



УДК 577.322.4:547.963.4.:543.422.25+27

ОТНЕСЕНИЕ ^1H - ^{15}N -СИГНАЛОВ И ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА ДЕЗ-(232–248)-БАКТЕРИОРОДОПСИНА В РАСТВОРЕ

© 1997 г. И. А. Грабчук[#], В. Ю. Орехов, Л. Ю. Мусина, 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 30.09.96 г. Принята к печати 03.02.97 г.

^{15}N -Меченый дез-(232–248)-бактериородопсин (БР-(1–231)) солюбилизован в имитирующей мембрану среде хлороформ–метанол (1 : 1), содержащей 0.1 М $^2\text{HCO}_2\text{N}^2\text{H}_4$. Отнесение сигналов в спектре ^1H - ^{15}N -НМЭС БР-(1–231) проведено с использованием данных 2D- и 3D-ЯМР-экспериментов. 98 кросс-пиков из 117 присутствовавших в спектре ^1H - ^{15}N -НМЭС отнесены к остаткам из областей белка 1–75 и 193–231. Практически все кросс-пики, соответствующие участку 76–192, отсутствуют в спектре НМЭС (за исключением 6 кросс-пиков от боковых цепей и 14 от основной цепи). Данные по дейтерообмену амидных протонов и кросс-пики ЯЭО позволили локализовать спирали А (остатки 8–30), В (остатки 40–65) и G (остатки 198–226). Периодичность в скоростях дейтерообмена протонов NH спиралей А, В и G объясняется компактным расположением этих спиралей в белковой глобуле. Уширение сигналов от 6 остатков в спирали G, контактирующей, согласно данным ЭКМ-модели БР, с “ЯМР-невидимым” пучком спиралей CDEF, свидетельствует о специфических взаимодействиях спиралей в БР-(1–231). Полученные данные указывают на то, что солюбилизованный в органической среде БР-(1–231) имеет пространственную структуру, сходную с ЭКМ-моделью БР.

Ключевые слова: бактериородопсин, белки, ЯМР, отнесение, дейтерообмен.

Бактериородопсин (БР) – трансмембранный белок, содержащий 248 а.о. и выполняющий функцию светозависимого протонного насоса в пурпурной мембране *Halobacterium salinarium* (обзор [1]). Данные электронной криомикроскопии (ЭКМ) показали, что белок состоит из семи (А–G) трансмембранных α -спиралей [2], положения атомов которых достаточно точно охарактеризованы (разрешение 3.5 Å в плоскости мембраны и 4.3 Å в перпендикулярной плоскости) [3]. При этом разрешение, достигнутое для большинства петель между спиральями, все же не позволяет охарактеризовать их конформацию. Исследование методом ЯМР встроенного в бислойную липидную мембрану БР сопряжено с трудностями, вызванными уширением линий в спектрах. Однако подбор соответствующей среды солюбилизации все же позволяет исследовать мембранные белки.

Как показано в работе [4], наилучшее разрешение в спектрах ЯМР достигается в смеси хлороформ–метанол (1 : 1), содержащей 0.1 М $^2\text{HCO}_2\text{N}^2\text{H}_4$, которая и использовалась в данной работе. Для повышения растворимости БР в смеси органических растворителей при обработке пурпурных мембран Суs-активированным папаином удалено 17 гидрофильных С-концевых аминокислотных остатков. В пурпурной мембране БР-(1–231) полностью сохраняет функцию светозависимого протонного насоса и, следовательно, пространственную структуру нативного белка [4].

Результаты КД [5] и FTIR [6] показали, что БР сохраняет свою вторичную структуру в среде хлороформ–метанол (1 : 1) с 0.1 М LiClO_4 . Известно, что в этой среде присутствуют по крайней мере некоторые элементы нативной третичной структуры БР [5, 7]. Серия однородно и селективно ^{15}N -меченых образцов БР-(1–231), солюбилизованных в смеси хлороформ–метанол (1 : 1), содержащей 0.1 М $^2\text{HCO}_2\text{N}^2\text{H}_4$, изучалась с помощью спектроскопии ^1H - ^{15}N -ЯМР [4]. В этих условиях в спектрах ЯМР наблюдались только сигналы от трансмембранных сегментов А, В и G. Кросс-пики от сегментов С, D, E и F (остатки 75–192), образующих плотно упакованный α -спиральный пучок, отсутствовали в спектрах ЯМР из-за наличия конформационного обмена в миллисекундном временном диапазоне.

Сокращения: БР – бактериородопсин, БР-(1–231) – дез-(232–248)-БР, 2/3 D – двух/трехмерный, НМЭС – 2D-спектр корреляции химических сдвигов сигналов гетероядер, ЯЭО – ядерный эффект Оверхаузера, NOESY – 2D-спектроскопия ЯЭО, TOCSY – тотальная корреляционная спектроскопия, RMSD – среднеквадратичное отклонение, FTIR – инфракрасная фурье-спектроскопия, ЭКМ – электронная криомикроскопия.

[#] Автор для переписки (тел.: 330-59-29, факс: 335-50-33, e-mail: igle@siobc.ras.ru).

К настоящему времени изучены структуры отдельных трансмембранных α -спиралей, сольбулизированных в органической среде или мицеллах (см. [8] и указанные в ней ссылки). Однако структура этих спиралей в целом белке, а также структура петель между спиральями остаются невыясненными.

Здесь мы представляем отнесение кросс-пиков ^1H - ^{15}N в спектре НМҚС однородно ^{15}N -меченого БР-(1–231), сольбулизированного в смеси хлороформ–метанол (1 : 1), содержащей 0.1 М $^2\text{HCO}_2\text{N}^2\text{H}_4$, и анализ структуры БР-(1–231) на основе химических сдвигов сигналов, кросс-пиков ЯЭО и данных по дейтерообмену амидных протонов.

Отнесение сигналов. Количество наблюдаемых в ^1H - ^{15}N -НМҚС-спектре БР-(1–231) (рис. 1) кросс-пиков существенно меньше, чем предполагалось на основании аминокислотной последовательности белка (~117 из ожидаемых 240). Как было показано селективным ^{15}N -мечением БР [4], большинство сигналов, наблюдаемых в ^1H - ^{15}N -НМҚС-спектре БР-(1–231), происходит от трансмембранных спиралей А, В и G. Кросс-пики от боковых цепей всех 8 остатков Трп, присутствующих в белке, видны в спектре НМҚС (левый нижний угол на рис. 1), в то же время амидные группы основной цепи наблюдали только у остатков Трп10 и Трп12 [4]. Четыре пары кросс-пиков от амидных групп боковой цепи остатков Gln и Asp также присутствуют в спектре (правый верхний угол на рис. 1).

Прямые процедуры последовательного отнесения сигналов неэффективны для спектров БР-(1–231) из-за сильного перекрывания сигналов и малой эффективности ^1H - ^{15}N -переноса когерентности. Проведенные ранее эксперименты с селективно ^{15}N -мечеными фрагментами БР [4] показали, что химические сдвиги ^1H и ^{15}N как основной, так и боковых цепей α -спиральных остатков в целом бактериородопсине практически те же, что и в его фрагментах. Поэтому отнесение кросс-пиков ^1H - ^{15}N , сделанное для БР-(1–71)-фрагмента (спирали А и В) [8], вместе с отнесением сигналов для селективно ^{15}N -меченых препаратов бактериородопсина-(1–231) [4] давало нам набор начальных точек. Независимый контроль отнесения сигналов осуществляли по полученному ранее отнесению сигналов протонов для БР-(1–71) [8] и БР-(163–231) [9]. Отнесение сигналов алифатических протонов проводили с помощью стандартной процедуры [10], используя 3D-TOCSY-НМҚС- и 3D-NOESY-НМҚС-спектры БР-(1–231). При отнесении сигналов протонов H2(H6) и H3(H5) боковых цепей остатков Трп и Phe использовали их отнесение во фрагментах БР-(1–71) [8] и БР-(163–231) [9].

Так, если химический сдвиг сигнала в спектре БР-(1–231) некоторого остатка Трп или Phe совпадал с химическим сдвигом сигнала протона H2(H6) или H3(H5) того же остатка во фрагменте БР, то этот сигнал относили к данному протону.

Последовательное отнесение сигналов базировалось в основном на NH-NH-кросс-пиках ЯЭО, которые наблюдались в 3D-NOESY-НМҚС- (рис. 2) и 3D-НМҚС-NOESY-НМҚС-спектрах. Перенос намагниченности между протонами NH очень эффективен благодаря преимущественно α -спиральной структуре БР с короткими расстояниями между протонами NH соседних аминокислотных остатков.

Результаты отнесения сигналов ^1H и ^{15}N БР-(1–231) суммированы в табл. 1 и на рис. 1. 102 остатка, чьи кросс-пики ^1H - ^{15}N отнесены в настоящей работе, выделены темными прямоугольниками на рис. 3. Остатки, относящиеся к CDEF-пучку, не отмечены, так как сигналы от этих остатков не были найдены в спектре НМҚС БР-(1–231). Остатки, чьи кросс-пики ^1H - ^{15}N ожидалось согласно данным [4] в спектре НМҚС, но не наблюдались, помечены светлыми прямоугольниками (6 остатков из сегмента G). Отсутствие сигналов в спектре НМҚС указывает на их "чувствительность" к процессу конформационного обмена в CDEF-пучке БР-(1–231). Интересно, что эти 6 остатков (Asn202, Glu204, Thr205, Met209, Asp212 и Arg227) располагаются примерно на одной стороне спирали G. В соответствии с ЭКМ-моделью бактериородопсина [3] остатки 202, 204, 205, 209, 212 и 227 расположены внутри белковой глобулы и контактируют со спиралью C, которая вовлечена в процесс конформационного обмена в "ЯМР-невидимом" CDEF-пучке [4].

Кроме сигналов от протонов NH основной цепи получено отнесение сигналов для групп NH боковых цепей остатков триптофанов 10, 12, 182, 189 и групп NH₂ боковых цепей Gln3, Gln75 и Asn202. Отнесение для всех этих сигналов, за исключением протонов Gln75, перенесено из ранее полученных данных [4, 9]. Отнесение для группы NH₂ остатка Gln75 выполнено на основании кросс-пиков ЯЭО NH₂Gln75/ α , β , γ H Gln75.

В спектре ^1H - ^{15}N -НМҚС БР-(1–231) 19 кросс-пиков остались неотнесенными (рис. 1). Из них 3 происходят от групп NH боковых цепей 3 остатков Трп, еще 2 – от боковой цепи остатка Asn176, Gln105 или Asn176. Оставшиеся 14 неотнесенных кросс-пиков от протонов групп NH основной цепи (табл. 2) разделены на четыре группы в соответствии с химическими сдвигами сигналов ^{15}N в спектре НМҚС и сигналов алифатических протонов, найденных в спектре НМҚС-TOCSY: 1) остатки Gly; 2) остатки Ser; 3) остатки Ala или Thr; 4) остатки с длинными боковыми цепями (Met, Gln, Glu

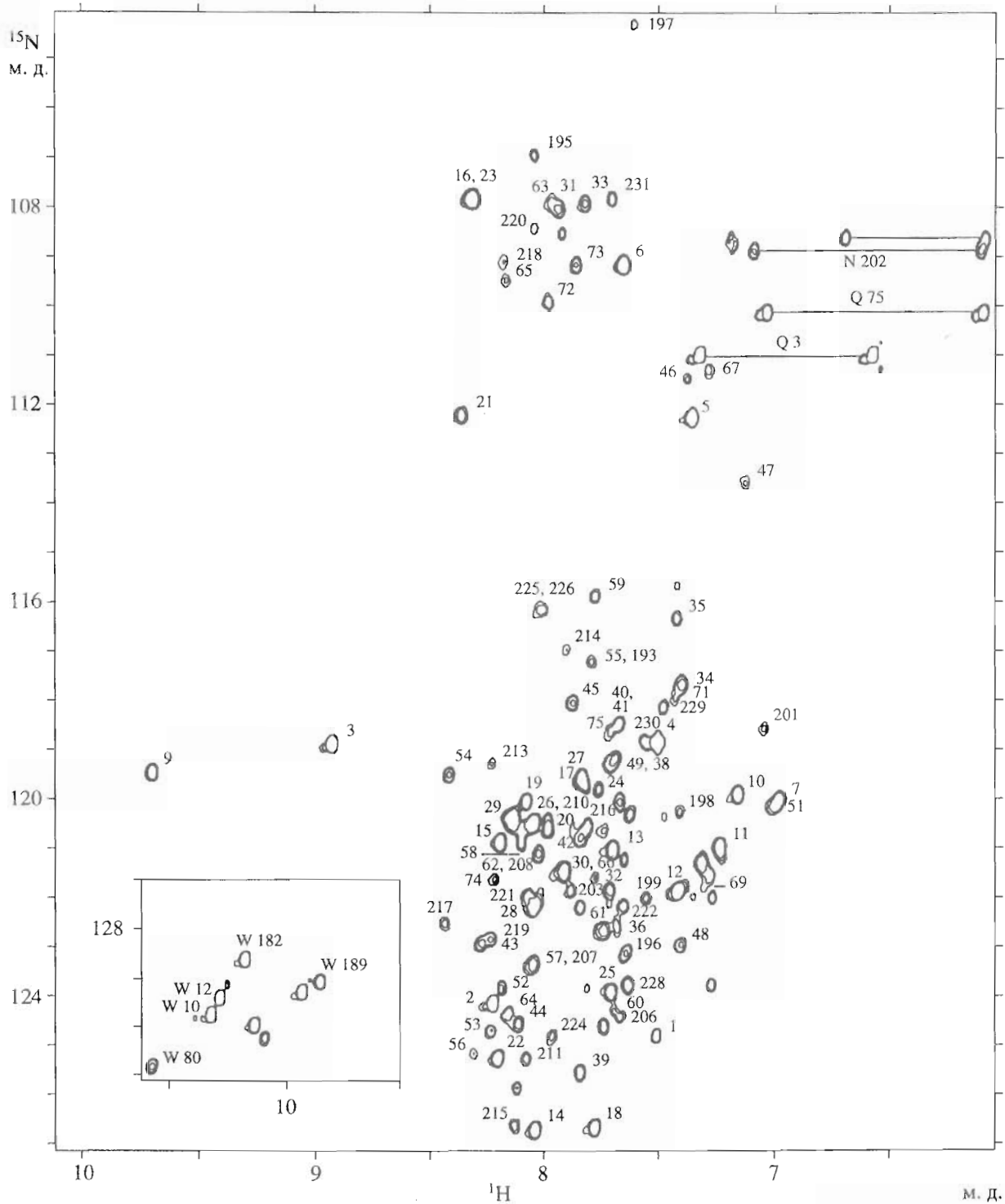


Рис. 1. Спектр HMQC ^{15}N -меченого образца БР-(1-231). Отнесенные кросс-пики помечены номерами соответствующих остатков. Числа с буквами относятся к кросс-пикам боковых цепей.

или Arg). Остатки Val, Leu, Ile и Lys были исключены из последней группы, так как никаких сигналов, кроме отнесенных (табл. 1), не наблюдалось в спектрах селективно ^{15}N -меченного по остаткам Val, Leu, Ile или Lys БР-(1-231) [4]. Исходя из

положения кросс-пигов ЯЭО между протонами NH и вышеуказанной классификации неотнесенных спиновых систем 5 кросс-пигов из табл. 2 можно отнести к остаткам Lys159-Ala160-Glu161 и Ala168-Ser169. Оставшиеся 9 слабоинтенсивных

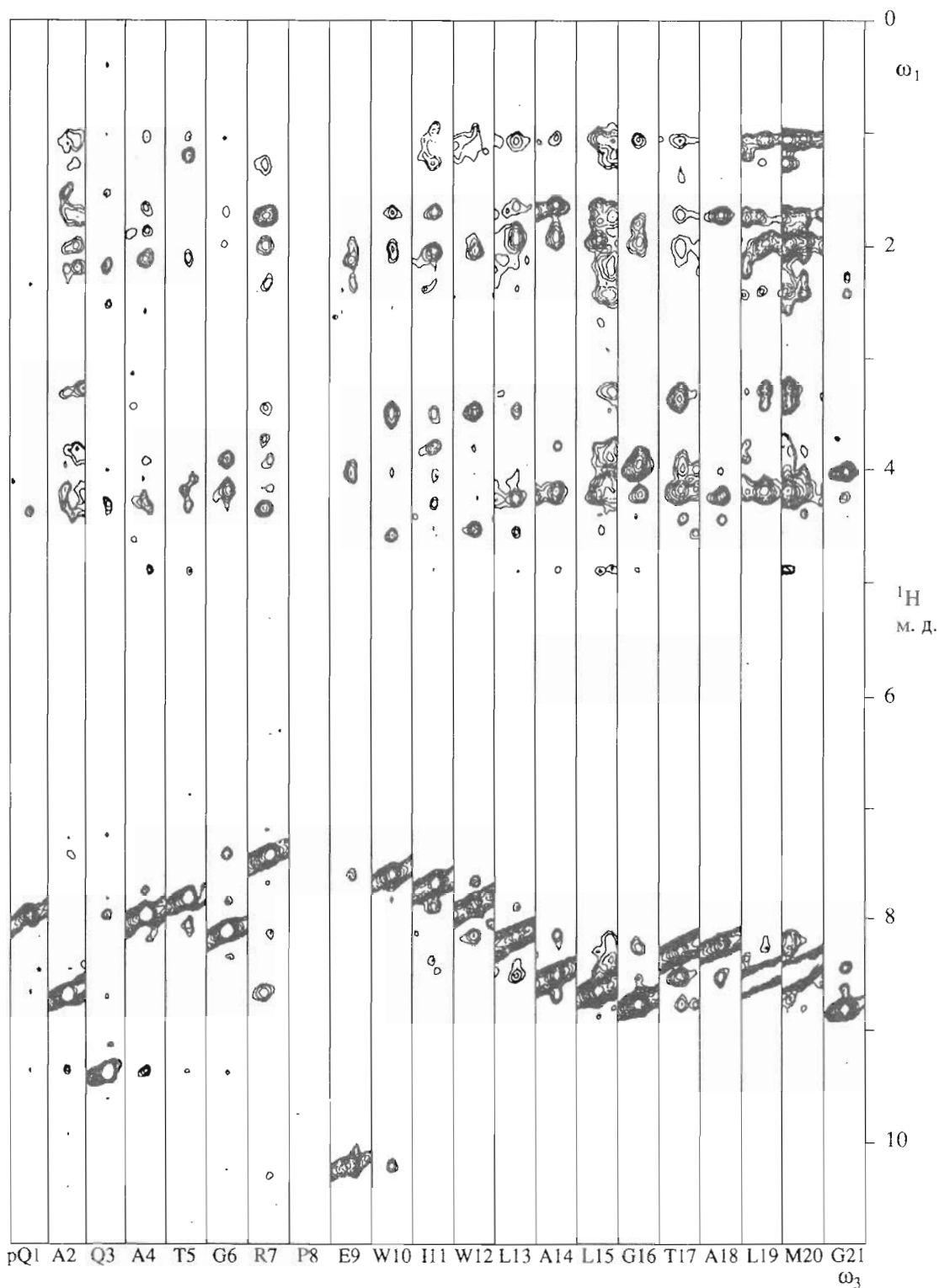


Рис. 2. Панели показывают участки $\omega_1\omega_3$ -плоскости 3D-спектра NOESY-HMQC ^{15}N -меченого БР-(1-231). Положения плоскостей $\omega_1\omega_3$ на ω_2 -оси соответствуют сигналам протонов NH основной цепи указанных остатков. Номера остатков указаны под каждой панелью. Для наглядности каждая панель содержит только 0.2 м. д. по оси ω_3 .

кросс-пиков в табл. 2 не отнесены из-за отсутствия NH-NH-кросс-пиков ЯЭО между остатками, которым эти кросс-пики соответствуют, и другими остатками или из-за сильного перекрытия сигнала

лов. Так как кросс-пики ЯЭО между неотнесенными NH-группами не обнаружены в 3D-NOESY-HMQC-спектре, можно заключить, что эти протоны NH расположены, вероятно, в различных

Таблица 1. Химические сдвиги (м. д.) сигналов ^1H и ^{15}N БР-(1-231)[#]

Остаток	^{15}N	HN	C α H	C β H	Другие
Glp1	124.7	8.01	4.42	2.40	—
Ala2	124.1	8.72	4.41	1.56	
Gln3	118.9	9.42	4.36	2.23	C γ H ₂ 2.58, N ϵ 110.9 N ϵ H ₂ 7.82; 7.06
Ile4	118.9	8.01	4.35	2.16	C γ H ₂ 1.44; 1.69 C γ H ₃ 1.11, C δ H ₃ 1.10 C γ H ₃ 1.25
Thr5	112.2	7.86	4.20	4.34	C γ H ₃ 1.25
Gly6	109.0	8.15	3.95; 4.23		
Arg7	119.9	7.45	4.74	2.39	C γ H ₂ 1.69, C δ H ₂ 3.38
Glu9	119.4	10.33	4.08	2.20; 2.04	C γ H ₂ 2.60; 2.41
Trp10	119.8	7.64	4.64	3.53; 3.62	N1H 10.33, N1 129.7
Ile11	120.9	7.73	3.85	2.10	C γ H ₂ 1.74; 1.32 C γ H ₃ 1.01, C δ H ₃ 0.99
Trp12	121.8	7.91	4.59	3.52	N1H 10.29, N1 129.4
Leu13	120.9	8.20	4.30	1.69; 1.97	C γ H —, C δ H ₃ 1.12
Ala14	126.6	8.54	4.24	1.67	
Leu15	120.8	8.69	4.28	1.84; 1.99	C γ H 1.69, C δ H ₃ 1.10
Gly16	107.8	8.81	4.00		
Thr17	119.5	8.34	4.07	4.50	C γ H ₃ 1.44
Ala18	126.6	8.27	4.30	1.78	
Leu19	120.0	8.57	4.24	1.80; 2.08	C γ H —, C δ H ₃ 1.11
Met20	120.5	8.48	4.45	2.35; 2.47	C γ H ₂ 2.78; 2.87
Gly21	112.2	8.87	4.09		
Leu22	125.2	8.70	4.30	1.89; 2.05	C γ H —, C δ H ₃ 1.12
Gly23	107.9	8.81	4.02		
Thr24	119.8	8.26	4.23	4.60	C γ H ₃ 1.49
Leu25	123.8	8.20	4.28	2.04	C γ H 1.71, C δ H ₃ 1.12
Tyr26	120.4	8.54	4.24	3.34	H2,6 6.95, H3,5 7.42
Phe27	119.6	8.33	4.24	3.44	H2,6 7.53, H3,5 —
Leu28	122.1	8.54	4.23	1.84; 2.15	C γ H —, C δ H ₃ 1.11
Val29	120.4	8.63	3.83	2.26	C γ H ₃ 1.11; 1.24
Lys30	121.4	8.41	4.08	1.79	C γ H ₂ 1.37 C δ H ₂ 1.66, C ϵ H ₂ 3.00; 3.90
Gly31	108.5	8.43	3.97		
Met32	121.5	8.28	4.33	2.36; 2.93	C γ H ₂ 2.74; 3.09
Gly33	107.9	8.32	4.04		
Val34	117.7	7.89	4.24	2.44	C γ H ₃ 1.19
Ser35	116.3	7.95	4.55	4.08	
Asp36	122.5	8.19	4.94	2.94; 3.15	
Asp38	119.2	8.22	4.61	3.02; 2.82	
Ala39	125.4	8.34	4.28	1.74	
Lys40	118.5	8.18	4.23	2.23; 2.09	C γ H ₂ 1.78 C δ H ₂ 1.89, C ϵ H ₂ 3.14
Lys41	118.4	8.20	4.20	2.23; 2.11	C γ H ₂ 1.80 C δ H ₂ 1.91, C ϵ H ₂ 3.13

Таблица 1. Продолжение

Остаток	^{15}N	HN	C α H	C β H	Другие
Phe42	120.7	8.35	4.34	3.40	H2,6 7.26, H3,5 7.41
Tyr43	122.8	8.75	4.26	3.35	H2,6 7.26, H3,5 –
Ala44	124.5	8.61	4.20	1.79	
Ile45	118.0	8.38	3.95	2.06	C γ H ₂ 1.46; 1.79 C γ H ₃ 1.11, C δ H ₃ –
Thr46	111.4	7.87	4.09	4.23	C γ H ₃ 1.12
Thr47	113.5	7.63	4.39	4.19	C γ H ₃ 1.29
Leu48	122.9	7.90	4.40	1.82; 2.03	C γ H–, C δ H ₃ 1.12
Val49	119.1	8.19	3.95	2.56	C γ H ₃ 1.30
Ala51	119.9	7.48	4.39	1.78	
Ile52	123.8	8.68	3.92	2.25	C γ H ₂ 1.32; 2.05 C γ H ₃ 1.05, C δ H ₃ 1.15
Ala53	124.6	8.73	4.22	1.69	
Phe54	119.5	8.92	4.56	3.40; 3.56	H2,6 7.46, H3,5 –
Thr55	117.2	8.29	3.98	4.57	C γ H ₃ 1.52
Met56	125.1	8.80	4.28	2.30; 2.51	C γ H ₂ 2.94; 2.74
Tyr57	123.2	8.54	4.36	3.35	H2,6 7.12, H3, 5 –
Leu58	120.8	8.62	3.97	1.79	C γ H–, C δ H ₃ 0.98
Ser59	115.8	8.28	4.11	4.30	
Met60	124.2	8.20	4.29	2.22; 2.44	C γ H ₂ 2.90; 2.68
Leu61	122.6	8.23	4.16	1.72; 1.85	C γ H–, C δ H ₃ 0.96
Leu62	121.1	8.53	4.29	1.79; 1.97	C γ H–, C δ H ₃ 1.11
Gly63	108.0	8.44	3.96		
Tyr64	124.2	8.66	4.40	3.32	H2,6 7.19, H3, 5 6.95
Gly65	109.4	8.67	4.02; 3.94		
Leu66	121.3	8.40	4.34	1.79; 2.09	C γ H–, C δ H ₃ 1.10
Thr67	111.2	7.78	4.29	4.42	C γ H ₃ 1.48
Met68	118.7	7.79	4.66	2.21	C γ H ₂ 2.58
Val69	121.7	7.80	4.43	2.15	C γ H ₃ 0.94
Phe71	117.9	7.94	4.53	3.25; 3.42	H2,6 7.44
Gly72	109.8	8.53	3.97; 4.18		
Gly73	109.1	8.36	3.92		
Glu74	121.5	8.72	4.49	2.65; 2.93	C γ H ₂ –
Gln75	118.7	8.21	4.60	2.25	C γ H ₂ 2.51 N ϵ H ₂ 6.59; 7.58, N ϵ 110.0
Trp80			4.60	3.49	N1H 10.58, N1 130.0 H 7.47, 7.29, 7.81, 7.05 N1H 10.19, N1 128.6 N1H 9.86, N1 129.1
Trp182*					
Trp189*					
Ser193	117.2	8.27	4.34	3.87; 3.98	
Glu194	122.0	8.30	4.39	2.32; 2.41	C γ H ₂ 2.59
Gly195	106.9	8.55	4.03		
Ala196	123.0	8.13	4.32	1.71	
Gly197	104.3	8.11	4.01		
Ile198	120.2	7.91	4.23	2.18	C γ H ₂ 1.53; 1.84 C γ H ₃ 1.15, C δ H ₃ 1.31

Таблица 1. Окончание

Остаток	^{15}N	NH	C α H	C β H	Другие
Val199	121.9	8.05	4.13	2.54	C γ H ₃ 1.31; 1.15
Leu201*	118.5	7.54	4.33	1.92	C γ H -, C δ H ₃ 1.12
Asn202				2.95; 3.26	N δ H ₂ 6.59; 7.59
Ile203*	121.8	8.40	3.89	2.08	C γ H ₂ 1.79
					C γ H ₃ 1.20, C δ H ₃ 1.12
Leu206	124.3	8.17	4.27	2.01	C γ H -, C δ H ₃ 1.13
Leu207	123.3	8.55	4.29	2.11; 2.25	C γ H -, C δ H ₃ 1.10
Phe208	121.1	8.53	4.28	3.51; 3.32	H _{2,6} 7.13, H _{3,5} 7.46
Val210	120.4	8.57	3.82	2.06	C γ H ₃ 1.31; 1.12
Leu211	125.1	8.58	4.16	2.03	C γ H -, C δ H ₃ 1.09
Val213	119.2	8.73	3.77	2.37	C γ H ₃ 1.33; 1.17
Ser214	116.9	8.41	4.30	4.13	
Ala215	126.6	8.62	4.29	1.74	
Lys216	120.5	8.33	4.19	2.20; 2.05	C γ H ₂ 1.54
					C δ H ₂ 1.75, C ϵ H ₂ 3.04
Val217	122.4	8.93	3.92	2.38	C γ H ₃ 1.30; 1.15
Gly218	109.0	8.67	3.94; 4.02		
Phe219	122.8	8.76	4.52	3.42	H _{2,6} 7.42, H _{3,5} 7.21
Gly220	108.3	8.53	4.08; 3.93		
Leu221	121.8	8.56	4.18	2.01	C γ H -, C δ H ₃ 1.11
Ile222	122.1	8.15	3.82	2.23	C γ H ₂ 1.31; 2.03
					C γ H ₃ 1.07, C δ H ₃ 0.75
Leu223	120.5	8.49	4.35	2.00; 1.78	C γ H -, C δ H ₃ 1.06
Leu224	124.7	8.44	4.13	1.74	C γ H -, C δ H ₃ 1.06
Arg225	116.1	8.50	4.33	2.04; 2.16	C γ H ₂ 1.69, C δ H ₂ 3.47
Ser226	116.1	8.56	4.33	4.17	
Arg227	121.2	7.81	4.42	2.12	C γ H ₂ 1.74; -, C δ H ₂ -
Ala228	123.7	8.14	4.49	1.59	
Ile229	118.1	7.99	3.98	1.94	C γ H ₂ 1.74
					C γ H ₃ 0.76, C δ H ₃ 0.96
Phe230	118.8	8.05	4.67	3.46; 3.20	H _{2,6} 7.46
Gly231	107.8	8.20	4.11		

* Если сигнал не был найден в спектре, это отмечено знаком тире. Отнесение сигналов для остатков, помеченных звездочкой, перенесено из работы [4].

частях "невидимого в спектрах ЯМР" CDEF-пучка (рис. 3).

Химические сдвиги. Известно [14], что химические сдвиги сигналов ^{15}N , NH и C α H – очень чувствительные индикаторы конформации полипептидной цепи. Именно поэтому полезно сравнить химические сдвиги сигналов БР-(1–71) [7] и БР-(163–231) [9], чья пространственная структура известна, и БР-(1–231) (табл. 1). Наименьшие отличия химических сдвигов ^{15}N - и ^1H -сигналов БР-(1–231) (табл. 1, рис. 4) по сравнению с соответствующими сигналами БР-(1–71) [8] наблюдаются

для участков 10–27 и 40–62. Таким образом, структуры этих участков похожи и являются α -спиральными в БР-(1–71) и БР-(1–231). Наибольшие отличия химических сдвигов БР-(1–231) по сравнению с БР-(1–71) [9] наблюдались для остатков из петель между α -спиральными сегментами (рис. 4). Для участка Ser193–Gly231 в составе БР-(163–231) и БР-(1–231) наименьшие различия в химических сдвигах сигналов протонов NH и C α H наблюдаются в сегменте Val210–Ile222 спирали G, а наибольшие – в областях петель.

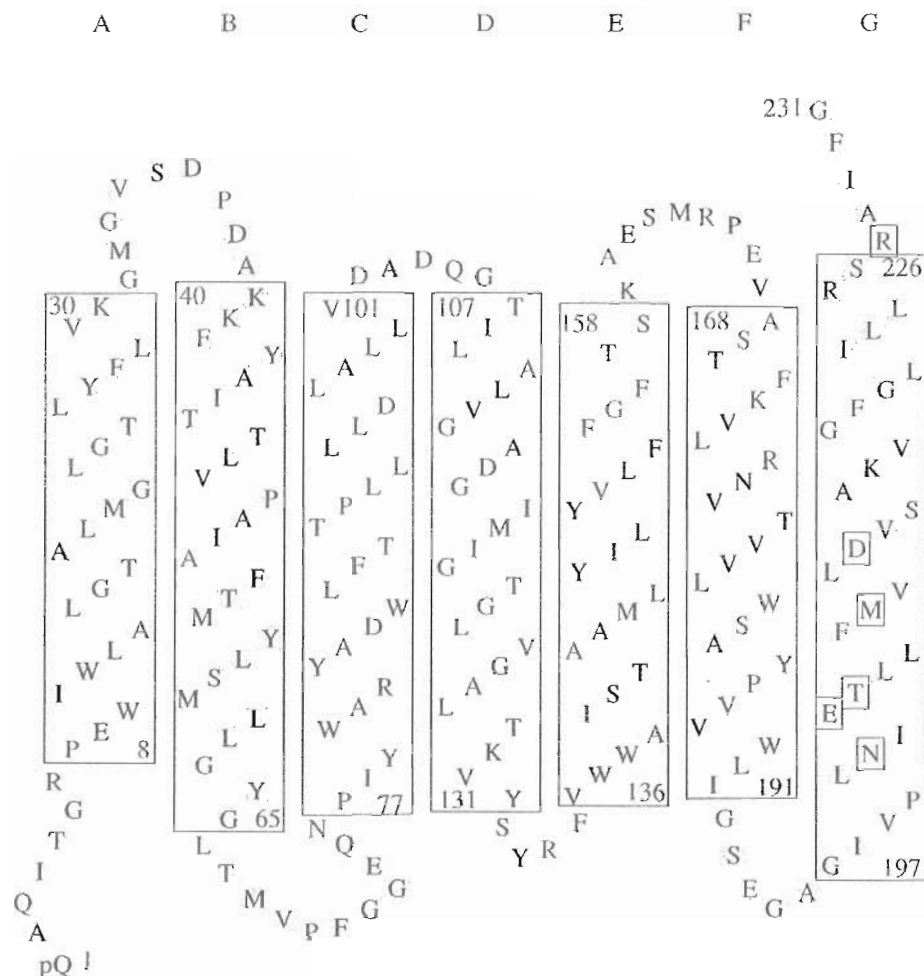


Рис. 3. Модель вторичной структуры бактериородопсина. Локализация α -спиральных сегментов А, В и G получена в настоящей работе, а сегментов С–F взята из работ [11–13]. Темными квадратами отмечены остатки, кросс-пики которых присутствуют и отнесены в спектре НМРС БР-(1–231).

Времена дейтерообмена (время, за которое половина амидных протонов данного остатка обменивается на дейтерий) для амидных протонов основной цепи показаны на рис. 5. Подобно тому, как было найдено ранее для БР-(1–71) [15] и для БР-(1–231) [9], амидные протоны основной цепи из α -спиральных областей в БР-(1–231) (остатки 10–30, 42–62 и 197–226) имеют медленные скорости дейтерообмена. В соответствии с данными по дейтерообмену все “видимые в спектрах ЯМР” спирали БР-(1–231) одинаково стабильны. Кроме α -спиральных областей БР-(1–231) медленный дейтерообмен наблюдался для протонов NH ряда остатков в петлях (рис. 5). Так, амидные протоны остатков Thr5, Asp36, Asp38, Gly63, Tyr64, Gly65, Glu74, Ser193, Gly195 и Ala196 медленно обменивались с растворителем. Интересно, что эти петлевые остатки демонстрировали быстрый обмен в БР-(1–71) [15] и БР-(163–231) [9]. Это указывает на существование стабильной структуры петель в БР-(1–231), фиксируемой соответствующими во-

дородными связями, в отличие от двухспиральных фрагментов БР, где петли не имели упорядоченной структуры.

Для всех α -спиралей наблюдается периодичность в скоростях дейтерообмена. Остатки Trp12, Leu13, Leu15, Leu19, Met20, Gly23, Tyr26, Leu28 (спираль А), Phe42, Tyr43, Thr46, Val49, Ala53, Phe54, Tyr57, Leu58, Leu61 (спираль В), Leu206, Val213, Val217, Leu221 и Leu223 (спираль G), которые располагаются примерно на одной стороне соответствующих спиралей, имеют замедленные скорости дейтерообмена амидных протонов по сравнению со скоростями соседних остатков (рис. 5). Так как замедленный обмен наблюдается для амидных протонов остатков с различными типами боковых цепей, его нельзя объяснить только экранирующим эффектом объемных боковых цепей. Наиболее вероятное объяснение для этой периодичности – плотная взаимная упаковка спиралей в белке. Действительно, в ЭКМ-модели БР (PDB-код 2BRD, {3}) остатки с замедленным дей-

Таблица 2. Химические сдвиги сигналов (м. д.) для однозначно не отнесенных кросс-пиков в НМРС-спектре БР-(1–231). Химические сдвиги от протонов боковых цепей, расположенные в порядке уменьшения объемов кросс-пиков в 3D-спектре НМРС-TOCSY, обозначены как CαH, CβH и “Другие протоны”. Группа остатков Ile, Met, Gln, Glu и Arg обозначена как “длинная цепь”

Номер пика	¹⁵ N	HN	CαH	CβH	Другие протоны	Возможное отнесение
1	108.4	8.42	3.98			Gly или Ser
2	108.7	7.67	4.53			Ser169
3	121.7	8.22	4.32	1.64		Ala160
4	123.7	7.77	4.65	1.59		Ala или Thr
5	120.3	8.13	4.46	1.67		Ala168
6	124.5	8.24	4.35	1.62		Ala или Thr
7	125.8	8.62	4.39	1.61		То же
8	121.5	7.77	4.23	2.42	1.27; 1.10	Длинная цепь
9	121.9	7.77	4.22	2.42	1.27	То же
10	115.6	7.92	4.43	2.16	2.25	Glu161
11	120.3	7.97	4.32	2.12		Ile159
12	121.1	8.15	4.72	2.94	1.65	Длинная цепь
13	120.0	8.17	4.50	2.24	1.42	То же
14	120.5	8.24	4.81	2.27	1.73	»

терообменом, за исключением Leu15, расположены на стыках поверхностей спиралей. Замедленную скорость дейтерообмена амидной группы Leu15 можно объяснить экранирующим эффектом объемных боковых цепей остатков Ile11, Trp12 и его собственной боковой цепи.

На основании данных по скоростям дейтерообмена протонов NH можно заключить, что α-спиральные области в БР-(1–231) и БР-(1–71) совпадают, за исключением нескольких остатков, прилегающих к петле между спиральями А и В. Медленный дейтерообмен амидных групп основной цепи наблюдался для остатков 11–31 и 45–62 в БР-(1–71) [15] и для остатков 10–30 и 42–62 в БР-(1–231) (рис. 5). Различия, по-видимому, объясняются участием протонов NH остатков Trp10, Phe42, Tyr43 и Ala44 БР-(1–231) в дополнительных водородных связях, которых не было в БР-(1–71). Таким образом, конформация петли между спиральями А и В различна в БР-(1–71) и в БР-(1–231).

Вторичная структура БР-(1–231) была определена на основе кросс-пиков ЯЭО, отвечающих связям основной цепи ($d(i, i + 1)$) и связям средней дальности ($d(i, i + 4)$, $d(i, i + 3)$), в 3D-спектре NOESY-НМРС (время смешивания 100 мс) и данных по дейтерообмену амидных протонов. Эти данные вместе с установленной по ним вторичной структурой суммированы на рис. 6.

Спирали. Присутствие средних и/или слабых ($d_{\alpha N}(i, i + 3)$ и $d_{\alpha N}(i, i + 4)$) и сильных ($d_{NN}(i, i + 1)$) связей, а также непрерывных последовательностей медленно обменивающихся протонов NH основной цепи – характерная черта α-спиральных

участков. В соответствии со всеми полученными данными вторичная структура “ЯМР-видимой” части БР-(1–231) включает в себя α-спирали Pro8–Lys30, Lys40–Leu65 и Gly197–Arg226. К сожалению, мы не можем точно определить окончания α-спиралей В и G из-за перекрытых или отсутствующих в спектре НМРС кросс-пиков от остатков Leu66 и Arg227. Эти остатки могут находиться в α-спиральной конформации. Как было установлено ранее для БР-(1–71), солубилизованного в органической среде [8], С-концевым остатком спирали В является Thr64, что хорошо согласуется с нашими данными. В то же время БР-(1–71), солубилизованный в мицеллах [8], имел дополнительную короткую спираль (остатки 65–68) возле С-конца спирали В (остатки 40–62). В БР-(1–231) кросс-пики от остатков 66–68 малоинтенсивны (по-видимому, из-за взаимодействия с “ЯМР-невидимым” CDEF-пучком). Поэтому мы не исключаем наличия короткой спирали или продолжения спирали В в области Leu66–Met68. Кроме того, кросс-пики от N-концевой части спирали G малоинтенсивны и начало спирали определялось по одному характерному для α-спирали контакту. Поэтому спираль G может начинаться с остатка Ile198 или Val199.

Петли. Мы предполагаем наличие γ-изгиба, фиксированного водородной связью (Thr5)NH...OC(Gln3), приводящей к медленному дейтерообмену протона NH остатка Thr5 в БР-(1–231) (рис. 5). В БР-(1–36), солубилизованном в органической среде с 0.1 М LiClO₄ [16], обнаружены два последовательных γ-изгиба, фиксированных двумя водородными связями:

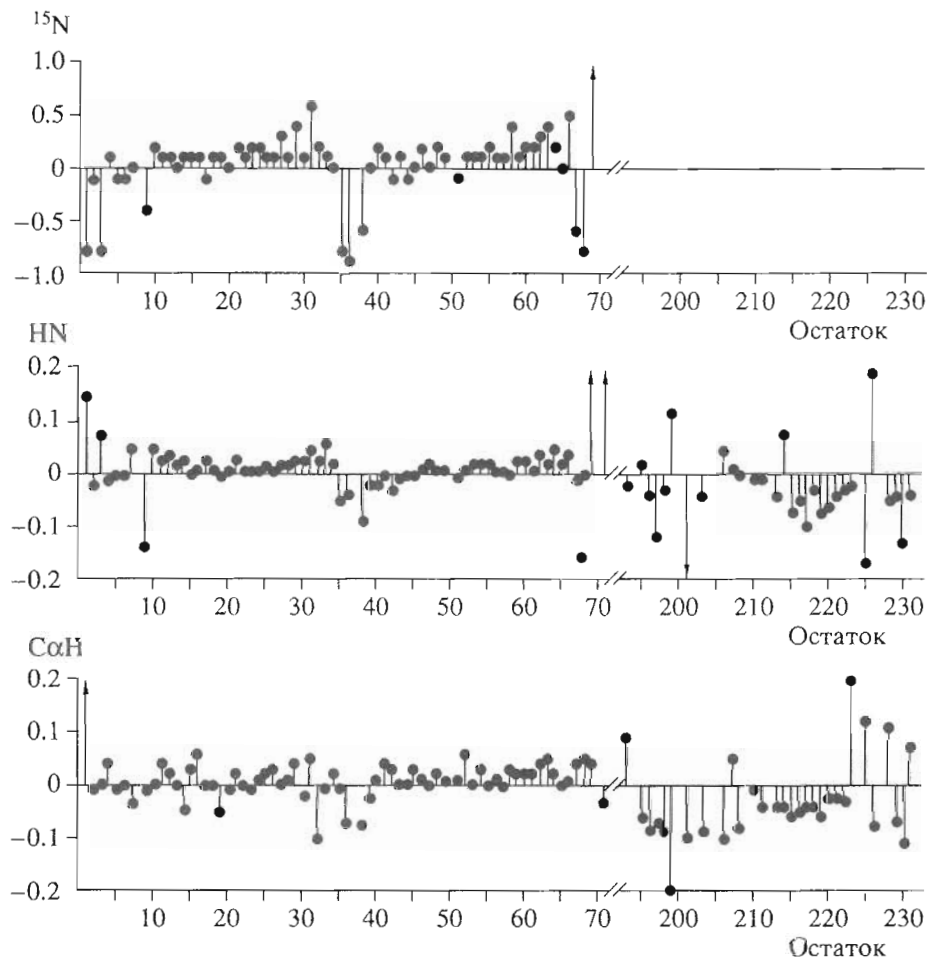


Рис. 4. Разницы в химических сдвигах сигналов ^{15}N , HN и C α H (м. д.), полученные вычитанием значений, измеренных для БР-(1-231), из соответствующих значений для БР-(1-71) [7] и для БР-(163-231) (показаны значения химических сдвигов только для сигналов протонов HN и H α [9]). Значения, выходящие за пределы шкалы, показаны стрелками.

(Ile4)NH...OC(Ala2) и (Thr5)NH...OC(Gln3). Вероятно, отсутствие водородной связи (Ile4)NH...OC(Ala2) в БР-(1-231) обусловлено заменой LiClO₄ в БР-(1-36) на $^2\text{HCO}_2\text{N}^2\text{H}_4$ в настоящей работе.

Петля между спиралью В и С, вероятно, фиксируется водородной связью (Glu74)NH...O δ (Gln75), на что указывают кросс-пики ЯЭО NH Glu74/C α , β H Gln75 и NH Gly73/C α , β H Gln75 и медленный дейтерообмен протона NH остатка Glu74.

Петля между спиралью F и G, по-видимому, имеет сходную структуру в ЭКМ-модели БР и в исследуемом укороченном БР-(1-231). Так, присутствующие в ЭКМ-модели [3] водородные связи (Gly195)NH...OC(Gly192) и (Ala196)NH...OC(Leu190) объясняют медленный дейтерообмен протонов NH остатков Gly195 и Ala196 в БР-(1-231) (рис. 5). Спираль F в БР-(1-231), по-видимому, заканчивается остатком Ser193, на что указывает медленный обмен про-

тона NH этого остатка. В ЭКМ-модели БР спираль F заканчивается остатком Gly192, но предполагается дополнительный виток, включающий остатки Ser193 и Glu194 [3].

Пространственная структура. Мы не можем точно охарактеризовать пространственную структуру БР-(1-231) из-за отсутствия однозначно определенных межспиральных кросс-пиков ЯЭО. В то же время мы можем сравнить полученные в настоящей работе данные о структуре БР-(1-231) с известными данными о структурах БР и его фрагментов. Локализация α -спиралей и конформации боковых цепей очень схожи в БР-(1-231) и в отдельных фрагментах БР-(1-71) [8] и БР-(163-231) [9], солюбилизованных в органической среде. На это указывают данные по дейтерообмену и практически одинаковые химические сдвиги сигналов ^{15}N , HN и H α в БР-(1-231) и в его фрагментах.

Что касается петель между спиралью А и В и спиралью F и G, то их пространственные струк-

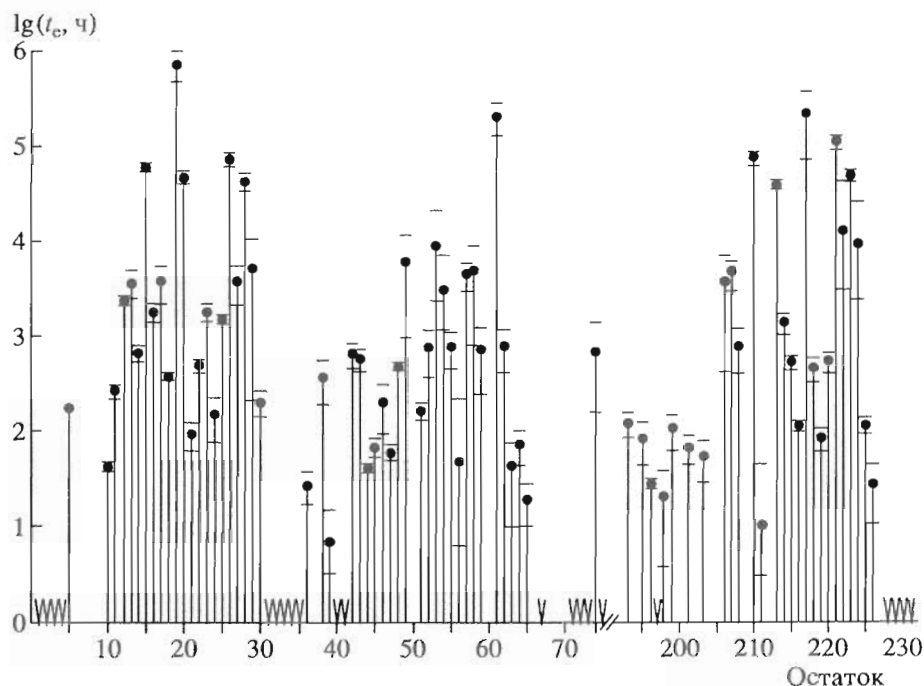


Рис. 5. Времена дейтерообмена (t_e) для протонов NH основной цепи БР-(1–231). Горизонтальные штрихи показывают погрешность измерения t_e . Быстро обменивающиеся протоны ($t_e < 0.5$ ч) отмечены знаком “V”. Протоны, сигналы которых были слабыми или перекрывались с другими сигналами в спектре НМРС, не показаны.

туры в БР-(1–231) отличаются от полученных для фрагментов БР. Об этом свидетельствует несколько медленно обменивающихся с растворителем протонов NH в петлях БР-(1–231) (рис. 5), тогда как во фрагментах БР эти же протоны демонстрировали быстрый обмен. Следовательно, петли в “ЯМР-видимой” части БР-(1–231) фиксированы набором водородных связей в отличие от фрагментов БР, где петли не имели упорядоченной структуры вообще. Во фрагментах БР петли были очень подвижными, в БР-(1–231) благодаря компактной упаковке спиралей петли приобретают фиксированную пространственную структуру.

Периодичность в скоростях дейтерообмена для протонов NH спиралей А, В и G и уширение кросс-пиков от 6 остатков спирали G указывают на то, что структура БР-(1–231) компактна. Взаимное расположение “ЯМР-видимых” спиралей, вероятно, сходно для БР-(1–231) и ЭКМ-модели, так как протоны NH БР-(1–231), медленно обменивающиеся по сравнению со своими соседями, находятся на стыках спиралей и внутри белковой глобулы в ЭКМ-модели БР. Шесть “ЯМР-невидимых” остатков из сегмента G (рис. 3) расположены примерно на одной стороне спирали G и, согласно ЭКМ-модели [3], контактируют с “ЯМР-невидимой” спиралью С, которая подвержена процессу конформационного обмена.

В то же время локализация α -спиральных областей в БР-(1–231) немного отличается от той,

что предлагается в ЭКМ-модели БР [3]. В частности, В-спираль ЭКМ-модели содержит остатки 38–62, тогда как в БР-(1–231) это остатки 40–65. Спираль G начинается в ЭКМ-модели с 202-го остатка, а в БР-(1–231) – со 197-го. Тем не менее конформация боковых цепей α -спиральных остатков в большинстве случаев совпадает в ЭКМ-модели БР и в БР-(1–231). Углы χ^1 в ЭКМ-модели БР [3] и во фрагментах БР-(1–71) и БР-(163–231) совпали в 60% случаев, причем для модели [3] степень совпадения выше, чем для ранее полученной методом ЭКМ [2] структуры БР. Степень совпадений углов χ^1 во фрагментах БР и ЭКМ-модели заметно выше для центральных участков спиралей. Так как конформации боковых цепей большинства остатков совпадают для БР-(1–231) и его фрагментов БР-(1–71) и БР-(163–231) (см. выше), то они совпадают для большинства остатков и в БР-(1–231), и в ЭКМ-модели БР. Кроме того, там, где метод ЭКМ позволил достаточно точно определить конформацию петель между спиралью и найти соответствующие водородные связи, структуры петель для ЭКМ-модели и БР-(1–231) оказались схожими (см. выше). Таким образом, несмотря на некоторые различия в локализации спиралей, пространственная структура БР, исследованного методом ЭКМ, и структура БР-(1–231) в органической среде похожи.

Атомная силовая микроскопия [17] и селективное мечение БР спиновыми метками [18] по-

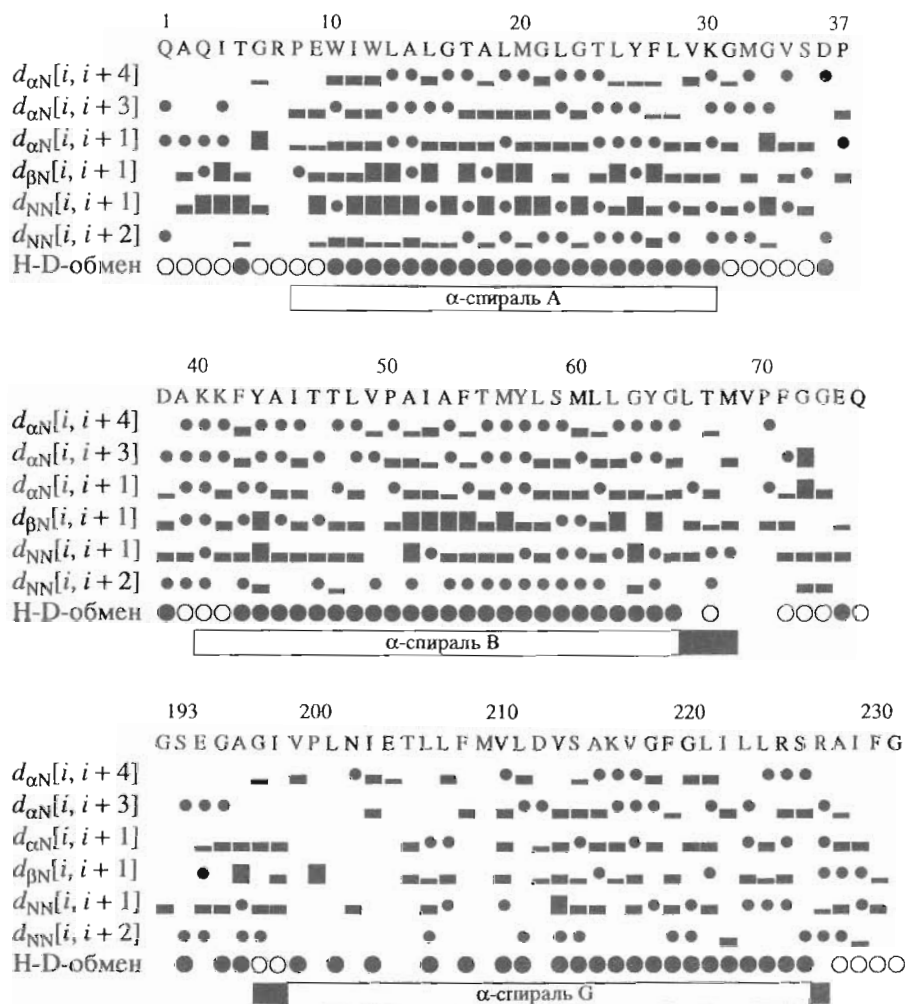


Рис. 6. Кросс-пики ЯЭО, отвечающие связям основной цепи и связям средней дальности, H-D-обмен и локализация α -спиралей в БР-(1–231), вытекающая из этих данных. Кросс-пики ЯЭО, соответствующие сильным, средним и слабым связям, показаны толстыми, средними и тонкими прямоугольниками соответственно. Кросс-пики, перекрытые с другими кросс-пиками, показаны темными кружками, остатки с временами дейтерообмена $t_e < 0.5$ ч – светлыми, а остатки с $t_e > 0.5$ ч – темными кружками. Там, где окончание спирали однозначно не определено, концевые остатки показаны темными прямоугольниками.

казали, что петли С–D и Е–F, экспонированные в цитоплазму, более подвижны и легче подвержены конформационным изменениям. Моделирование молекулярной динамики БР в мембранном окружении [19] указывает на повышенную подвижность петель цитоплазматической части белка. Повышенная подвижность этих петель, вероятно, облегчает движение спиралей С, D, Е и F в молекуле БР. Предыдущее изучение конформационных изменений во время фотоцикла БР методом рентгеновской дифракции [20, 21] показало, что наибольшие различия между M_{412} -состоянием и основным состоянием БР локализованы в спиральях G, B и между спиральями E и F. Однако дальнейшее исследование тех же изменений во время фотоцикла методом электронной дифракции [22] выявило различия в ориентациях спиралей С, D, Е, F и G и не обнаружило измене-

ний в спиральях А и В. Таким образом, мы можем предположить, что конформационный обмен, приводящий к исчезновению сигналов CDEF-пучка и 6 остатков спирали G в БР-(1–231), солибилизированном в органической среде, отражает нативные конформационные перестройки во время фотоцикла БР. Вполне возможно, что наблюдаемый конформационный обмен в CDEF-пучке представляет собой переход между двумя различными состояниями в соответствии с “флип-флопинговым” механизмом протонного насоса [23, 24], предполагающим альтернативный доступ к месту ионного связывания с обеих сторон мембраны.

В соответствии со всеми полученными данными в органической среде БР-(1–231) сохраняет плотно упакованную структуру, подобную ЭКМ-

модели БР [3]. Локализация α -спиральных участков в БР-(1–231) практически совпадает с найденной ранее для отдельных фрагментов БР-(1–71) [8], БР-(163–231) [9] и БР [3]. Белок состоит из двух различных структурных частей: “ЯМР-невидимой” части (спирали С, D, E, F и 6 остатков спирали G), которая подвержена конформационному обмену в миллисекундном временном диапазоне [4], и “ЯМР-видимой” части со стабильной структурой. Области петель между спиральями А–В и F–G, подвижные в БР-(1–71) и в БР-(163–231), имеют в БР-(1–231) стабильную структуру, фиксированную набором водородных связей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Приготовление образца. ^{15}N -Меченый бактериородопсин выделен как описано в работе [4] из однородно ^{15}N -меченого штамма ET1001 *H. salinarium*, который культивировали в соответствии с процедурой [25] в среде, содержащей гидролизат ^{15}N -меченых *Chlorella vulgaris*. Все использованные реагенты были такими же, как в работе [4]. Обработкой пурпурных мембран Суз-активированным папаином (соотношение фермент–белок составляло 1 : 100 по массе) удалены 17 аминокислотных остатков с С-конца БР. Это позволило увеличить растворимость белка в среде хлороформ–метанол (1 : 1), содержащей 0.1 М $^2\text{HCO}_2\text{N}^2\text{H}_4$.

ЯМР-эксперименты выполнялись на спектрометре UNITY-600 (Varian, США) при 30°C. Химические сдвиги сигналов протонов измерены относительно тетраметилсилана и сигналов ядер ^{15}N относительно внешнего стандарта $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (2.9 М $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ в 1 М HCl, 30°C, 24.93 м. д. относительно NH_3). Импульсные последовательности, использованные для экспериментов ^1H - ^{15}N -HMQC, 3D-NOESY-HMQC, 3D-TOCSY-HMQC и 3D-HMQC-NOESY-HMQC, базировались на описанных ранее [26, 27] с временами смешивания для трех последних экспериментов 100, 40 и 100 мс соответственно. Подавление сигнала протонов ОН растворителя во всех экспериментах достигалось их насыщением импульсами малой мощности во время периодов релаксации и смешивания. Для облучения ядер ^{15}N во время периода детектирования использовалась импульсная последовательность GARP [28]. Ширина спектра по ^1H - и ^{15}N -направлениям равнялась 8000 и 1400 Гц соответственно. Матрицы спектров ЯМР, состоящие из $150 \times 28 \times 512$, $150 \times 28 \times 512$ и $50 \times 42 \times 896$ комплексных точек по t_1 -, t_2 - и t_3 -направлениям, были преобразованы в спектры $512 \times 128 \times 512$, $512 \times 128 \times 512$ и $256 \times 128 \times 512$ действительных точек для экспериментов 3D-NOESY-HMQC, 3D-TOCSY-HMQC и 3D-HMQC-NOESY-HMQC соответственно. Все спектры обрабатывались модифицированной версией программы FELIX (Nare

Research Inc., Woodinville, WA). Отнесение сигналов в спектрах ЯМР проводилось с помощью программы XEASY (Т. Xia и С. Bartels (1993) EТН, Швейцария).

Времена дейтерообмена. Для измерения времен дейтерообмена амидных протонов получено 9 спектров HMQC через 0.5, 1.2, 1.8, 3.3, 8.3, 12.7, 19.7, 68.7 и 165.0 ч после солюбилизации БР-(1–231) в среде $\text{C}^2\text{H}_3\text{O}^2\text{H}-\text{C}^2\text{HCl}_3$ (1 : 1), содержащей 0.1 М $^2\text{HCO}_2\text{N}^2\text{H}_4$ при 30°C. Время накопления в этих спектрах увеличивали от спектра к спектру (от 30 мин до 5.5 ч) для улучшения соотношения сигнал/шум. Кросс-пики ^1H - ^{15}N интегрировали как описано в работе [29]. Времена дейтерообмена определяли с помощью стандартной процедуры “exrfit” из программы VNMR (VARIAN) по зависимости объемов кросс-пигов ^1H - ^{15}N от времени.

Настоящее исследование частично финансировалось (гранты 96-04-49788 и 96-04-50893) Российским фондом фундаментальных исследований. Работа выполнена на установке “Комплекс ЯМР-спектрометрии” при финансовой поддержке Миннауки России (грант 96-03-08).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ovchinnikov Yu.A. // FEBS Lett. 1982. V. 148. P. 179–191.
2. Henderson R., Baldwin J.M., Ceska T.A., Zemlin F., Beckmann E., Downing K.H. // J. Mol. Biol. 1990. V. 213. P. 899–929.
3. Grigorieff N., Ceska T.A., Downing K.H., Baldwin J.M., Henderson R. // J. Mol. Biol. 1996. V. 259. P. 393–421.
4. Orekhov V.Yu., Abdulaeva G.V., Musina L.Yu., Arseniev A.S. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 210. P. 223–229.
5. 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.
6. Torres J., Padros E. // FEBS Lett. 1993. V. 318. P. 77–79.
7. Абдулаева Г.В., Соболев А.Г., Арсеньев А.С., Цетлин В.И., Быстров В.Ф. // Биол. мембраны. 1991. Т. 8. С. 30–43.
8. Pervushin K.V., Orekhov V.Yu., Popov A., Musina L.Yu., Arseniev A.S. // Eur. J. Biochem. 1994. V. 219. P. 571–583.
9. Barsukov I.L., Abdulaeva G.V., Arseniev A.S., Bystrov V.F. // Eur. J. Biochem. 1990. V. 192. P. 321–327.
10. Wuthrich K. NMR of Proteins and Nucleic Acids. N.Y.: Wiley, 1986.
11. Масленников И.В., Бочаров Е.В., Арсеньев А.С. // Биоорганич. химия. 1995. Т. 21. С. 659–674.
12. Масленников И.В., Арсеньев А.С., Чикин Л.Д., Кожич А.Е., Быстров В.Ф., Иванов В.Т. // Биол. мембраны. 1991. Т. 8. С. 156–160.
13. Barsukov I.L., Nolde D.E., Lomize A.L., Arseniev A.S. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 206. P. 665–672.
14. Szilagyi L. // Prog. NMR Spectrosc. 1995. V. 27. P. 325–443.

15. Sobol A.G., Arseniev A.S., Abdulaeva G.V., Musina L.Yu., Bystrov V.F. // *J. Biomol. NMR*. 1992. V. 2. P. 161–171.
16. Pervushin K.V., Arseniev A.S. // *FEBS Lett*. 1992. V. 308. P. 190–196.
17. Muller D.J., Buldt G., Engel A. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 249. P. 239–243.
18. Hubbell W., Altenbach C. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1994. V. 4. P. 566–573.
19. Edholm O., Berger O., Jahnig F. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 250. P. 94–111.
20. Koch M.H.J., Dencher N.A., Oesterhelt D., Plohn H.-J., Rapp G., Buldt G. // *EMBO J*. 1991. V. 10. P. 521–526.
21. Nakasako M., Kataoka M., Amemiya Y., Tokunaga F. // *FEBS Lett*. 1991. V. 292. P. 73–75.
22. Subramaniam S., Gerstein M., Oesterhelt D., Henderson R. // *EMBO J*. 1993. V. 12. P. 1–8.
23. Fodor S.P.A., Ames J.B., Gebhard R., Berg E.M.M., Stoerkenius W., Lugtenburg J., Mathies R.A. // *Biochemistry*. 1988. V. 27. P. 7097–7101.
24. Lanyi J.K. // *Nature*. 1995. V. 375. P. 461–463.
25. Crespi H.L. // *Methods Enzymol*. 1982. V. 88. P. 3–5.
26. Summers M.F., Marzilli L.G., Bax A. // *J. Am. Chem. Soc.* 1986. V. 108. P. 4285–4294.
27. Ikura M., Bax A., Clore G.M., Gronenborn A.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 1990. V. 112. P. 9020–9022.
28. Shaka A.J., Barker P.B., Freeman R. // *J. Magn. Reson.* 1985. V. 64. P. 547–552.
29. Barsukov I.L., Pervushin K.V., Orekhov V.Yu., Barsukov T.L., Arseniev A.S. // *Appl. Magn. Reson*. 1992. V. 3. P. 965–973.

^1H - ^{15}N NMR Signal Assignment and the Secondary Structure of Bacteriorhodopsin(1–231) in Solution

I. A. Grabchuk, V. Yu. Orekhov, L. Yu. Musina, and A. S. Arseniev
*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
 ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

Abstract— ^{15}N -Labeled de-(232–248)-bacteriorhodopsin [BR(1–231)] was solubilized in 1 : 1 chloroform–methanol solvent mixture that contained 1.0 M $^2\text{HCO}_2\text{N}^2\text{H}_4$ and mimic membrane medium. Resonances in the ^1H - ^{15}N heteronuclear multiple-quantum coherence (HMQC) spectrum of BR(1–231) were assigned using the data of two- and three-dimensional NMR experiments. Of 117 cross-peaks present in the ^1H - ^{15}N HMQC spectrum, 98 were assigned to residues in 1–75 and 193–231 segments of the protein. Almost all cross-peaks that correspond to the 76–192 segment were absent in the HMQC spectrum (except for six cross-peaks from the side chains and 14 cross-peaks from the backbone). Deuterium exchange rates of amide protons and cross-peaks of nuclear Overhauser effect helped to localize helices A (residues 8–30), B (residues 40–65), and G (residues 198–226). The periodicity in the rates of deuterium exchange of NH protons of helices A, B, and G was explained by the compact arrangement of these helices in the protein globule. The broadening of signals from six residues in helix G, which, according to the electron cryomicroscopy model of bacteriorhodopsin, is in contact with the NMR-unobservable bundle of helices CDEF, indicates specific interactions of the helices in BR(1–231). These data suggest that BR(1–231) solubilized in an organic medium has a spatial structure similar to that in the electron cryomicroscopy model of BR.

Key words: bacteriorhodopsin, proteins, NMR, assignment, deuterium exchange