



УДК 541.143

МИГРАЦИЯ АЛЬДИМИННОЙ СВЯЗИ В ПРОЦЕССЕ
ФОТОХИМИЧЕСКОГО ЦИКЛА БАКТЕРИОРОДОПСИНА*Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Цетлин В. И.,
Киселев А. В., Закис В. И.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва*

Нами установлено, что в процессе фотохимического цикла бактериородопсина происходит миграция альдиминной связи. Показано, что в зависимости от того, проводится реакция восстановления бактериородопсина и его модифицированных производных боргидридом натрия в темноте или при освещении, ретинильный остаток оказывается связанным с ϵ -аминогруппами разных остатков лизина, и что это явление — не артефакт реакции восстановления, а следствие миграции альдиминной связи, обусловленной фотохимическими превращениями.

Использованный в данной работе экспериментальный подход основан на анализе продуктов ограниченного расщепления хмотрипсином или папаином нативного [1] и восстановленного бактериородопсина. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле из обоих образцов получены по два фрагмента: 1—71 и 72—247 (248) — хмотриптические, или 3—65 и 73—230 (231) — папаиновые (нумерация остатков по работе [2], в скобках — по [3]; эти фрагменты далее будут именоваться соответственно малым и большим). Интенсивная флуоресценция ретинильного остатка обеспечила его легкое обнаружение на электрофореграммах как в самом ретинил-бактериородопсине, так и в указанных фрагментах.

После восстановления бактериородопсина боргидридом натрия на свету (во всех опытах использовали галогенную лампу 250 вт, свет которой пропускали через 3-см слой 10% раствора CuSO_4 и стеклянный фильтр ЖС-18) при pH 9,5 и температуре 20°С [4] ретинильный остаток находится в малом и большом фрагментах.

Транспорт протонов через пурпурную мембрану, как правило, связывают с последовательно протекающим протонированием и депротонированием альдиминной связи, образованной альдегидной группой ретиналя с остатком Lys^{41} (см. обзор [5]). Полученные данные указывают на то, что ϵ -аминогруппа этого остатка не является единственным участком ковалентного связывания ретиналя с полипептидной цепью бактериородопсина, а альдиминная связь может быть образована как остатком лизина малого фрагмента (по-видимому, Lys^{41}), так и остатком или остатками (обозначенными как Lys^x) большого фрагмента, находящимися в положениях 130, 159, 170 (174) и 215 (216).

Расщепленные папаином или хмотрипсином препараты бактериородопсина сохраняют спектральные и функциональные свойства нативной молекулы, однако приобретают способность восстанавливаться боргидридом натрия. Этот факт был использован нами для получения сведений о

локализации альдиминной связи в темновых условиях. Найдено, что ретинильный остаток в темновом препарате связан только с малым фрагментом. При восстановлении расщепленных препаратов на свету, как и в случае восстановления на свету нативного бактериородопсина, флуоресценция обнаруживается в обоих фрагментах. Эти данные доказывают наличие $N \rightarrow N$ -миграции ретиналя при фотохимических превращениях бактериородопсина.

После восстановления в темноте расщепленных препаратов, предварительно адаптированных к свету или темноте, так же как и препаратов, регенерированных из подвергнутого протеолизу бактериопсина и 13-цис-или *полностью-транс*-ретиналя, флуоресценция сосредоточена только в малом фрагменте. Это означает, что в темноте, независимо от конфигурации двойной связи, ретипаль связан с остатком (Lys^{41}) и образование альдиминной связи с новым остатком (Lys^X) в световых условиях не может быть обусловлено изомеризацией ретиналя в процессе фотохимического цикла.

Восстановление бактериородопсина на свету проводили также в условиях домиширования промежуточной формы фотохимического цикла (так называемая форма M412 или родственные ей состояния), в которой альдимин депротонирован. Стабилизация этой формы достигается добавлением грамицидина S [6] или понижением температуры [5, 7]. В обоих случаях восстановление значительно ускоряется и приводит к исключительной локализации ретинильного остатка на Lys^X . Можно было предположить, что и в этих условиях существуют альдимины, образованные остатками Lys^{41} и Lys^X , но только второй способен восстанавливаться $NaBH_4$. Однако, поскольку в расщепленном бактериородопсине альдиминная связь остатка Lys^{41} доступна для $NaBH_4$ и в темноте, и на свету, нахождение ретинильного остатка только в большом фрагменте при восстановлении в условиях стабилизации формы M412 означает отсутствие альдимина по связи Lys^{41} и свидетельствует о полной миграции альдимина на остаток Lys^X . Таким образом, существует несомненная корреляция между депротонированием альдиминной связи и ее миграцией.

Миграция может протекать как через гидролиз альдимина и последующую реакцию отщепленного ретиналя с аминогруппой другого остатка лизина (ранее был обнаружен фотоиндуцируемый гидролиз альдиминной связи и высказана гипотеза о возможности миграции [8]), так и путем непосредственной атаки альдимина другой пространственно сближенной аминогруппой с образованием промежуточного тетраэдрического производного. Мы показали, что трифторацетилирование или сукцинилирование доступных аминогрупп в бактериородопсине не предотвращает миграцию альдимина, из чего можно сделать вывод, что недоступная для модификации аминогруппа Lys^X , являясь подходящим акцептором при миграции ретиналя, находится в гидрофобном окружении и имеет низкое значение pK .

Данные восстановления бактериородопсина и его модифицированных производных со всей очевидностью указывают на то, что миграция не есть обусловленное влиянием pH среды и присутствием $NaBH_4$, образование «случайных» альдимinov с любой из доступных аминогрупп. Независимо от того, связан ретинильный остаток с остатком Lys^{41} или Lys^X , он находится в хромоформном центре бактериородопсина, поскольку ни для одного из восстановленных препаратов нет регенерации при добавлении *полностью-транс*-ретиналя. Более того, в микроокружении ретинильных остатков, связанных с разными остатками лизина, существуют определенные различия, поскольку характерная тонкая структура и длинноволновый сдвиг полосы поглощения наблюдаются только в случае связи с Lys^X .

Предпочтительность локализации альдиминной связи в темноте на остатке Lys^{41} и способность к фотоиндуцируемой миграции на остаток Lys^X присущи нативному бактериородопсину, но могут утрачиваться в определенных условиях, влияющих на относительную стабильность этих альдими-

нов. Так, при восстановлении на свету и в темноте ретицильный остаток связан только с Lys⁴¹ при модификации ретиналя в C(4)-положении, и только с Lys^x, если восстановление расщепленного бактериородопсина проводится в кислых условиях с помощью NaBH₃CN.

Обнаруженное в данной работе явление миграции альдиминной связи означает, что в фотохимический цикл бактериородопсина оказываются вовлеченными, по крайней мере, две удаленные по аминокислотной последовательности аминокислоты, находящиеся в двух из семи α -спиральных сегментов бактериородопсина. (Работа по локализации соответствующих остатков лизина проводится в настоящее время). Этот факт следует учитывать при интерпретации данных физико-химических исследований бактериородопсина и обсуждении механизмов его функционирования, в которых альдиминной связи ретиналя отводится ключевая роль. Возможность протонирования и депротонирования альдиминных связей, образованных аминокислотными различными остатками и имеющих различное микроокружение, представляется весьма выгодной для осуществления переноса протона через пористую мембрану. Вероятно, фотоиндуцированная миграция альдиминной связи является составной частью механизма функционирования бактериородопсина как протонного насоса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Ovchinnikov Yu. A., Drachev L. A., Kaulen A. D., Khitrina L. V., Skulachev V. P. (1978) FEBS Letters, 90, 190-194.
2. Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Lobanov N. A. (1979) FEBS Letters, 100, 219-224.
3. Khorana H. G., Gerber G. E., Herlihy W. G., Gray C. P., Anderegg R. J., Nihei K., Biemann K. (1980) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76, 5046-5050.
4. Schreckenbach T., Walckhoff B., Oesterhelt D. (1977) Eur. J. Biochem., 76, 499-511.
5. Stoeckenius W., Lozier R. H., Bogomolni R. A. (1979) Biochim. et biophys. acta, 505, 245-278.
6. Мельник Е. И., Чижев И. В., Скопинская С. Н., Снежкова Л. Г., Мирошников А. И. (1979) Тезисы I-го Советско-Швейцарского симпозиума «Биологические мембраны: структура и функция», Тбилиси, стр. 75.
7. Peters L., Peters R., Stoeckenius W. (1976) FEBS Letters, 61, 128-134.
8. Шкроб А. М., Родионов А. В., Овчинников Ю. А. (1978) Биооргани. химия, 4, 354-359.

Поступило в редакцию
16.VI.1980

ALDIMINE BOND MIGRATION IN THE PHOTOCHEMICAL CYCLE OF BACTERIORHODOPSIN

OVCHINNIKOV Yu. A., ABDULAEV N. G., TSETLIN V. I.,
KISELEV A. V., ZAKIS V. I.

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

Reduction of bacteriorhodopsin and its chemically or enzymatically modified derivatives was carried out in the light and dark, and a migration of aldimine bond onto a lysine residue of fragment 73-231 was shown to take place in the process of photochemical cycle.