



УДК 577.322.4:547.962.4.04

ТОПОГРАФИЯ РЕТИНИЛСВЯЗЫВАЮЩЕГО УЧАСТКА
В ВОССТАНОВЛЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БАКТЕРИОРОДОПСИНАЦетлин В. И., Закис В. И., Алдашев А. А.,
Курятов А. Б., Овечкина Г. В.*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР,
Москва***Шныров В. Л.***Институт биофизики Академии наук СССР, г. Пущино Московской обл.*

Исследовано восстановление альдиминной связи в бактериородопсине и его аналогах. Показано, что длительное выдерживание бактериородопсина с боргидридом натрия в темноте приводит к расщеплению связи $\text{Gly}^{155}-\text{Phe}^{156}$. С помощью гель-хроматографии выделен ретинилиденсодержащий пептид 156–248. Восстановление бактериородопсина боргидридом натрия на свету при 4°C не сопровождается разрывом полипептидной цепи. Согласно спектральным данным, ретинильный остаток в нерасщепленном ретинил-бактериоопсине занимает приблизительно тот же участок, что и остаток ретиналя в бактериородопсине. На основании данных о влиянии различных тушителей на флуоресценцию ретинил-бактериоопсина, а также о миграции энергии с ретинильного остатка на 4-сульфобензилазогруппу модифицированного остатка Tyr^{64} и с $\text{Tyr}(\text{NH}_2)^{64}$ на альдимин ретиналя определены расстояния от ретинильного и ретинилиденового хромофоров до поверхностей мембраны.

Для выяснения пространственного строения и механизма функционирования бактериородопсина необходима детальная информация об участке связывания ретиналя. Основным источником такой информации являются спектры поглощения, КД и комбинационного рассеяния (см. обзоры [1, 2]). Восстановление альдимида ретиналя в бактериородопсине приводит к ретинил-бактериоопсину [3], спектральные свойства которого открывают возможность широко использовать метод флуоресценции для исследования хромофорного центра.

Настоящее сообщение посвящено ретинильным производным, полученным восстановлением как самого бактериородопсина, так и его модифицированных аналогов. Анализ параметров ретинильной флуоресценции и влияния на нее различных тушителей дал сведения о том, как изменяется микроокружение хромофора при ферментативном расщеплении полипептидной цепи, а также при химической или биосинтетической модификации отдельных аминокислотных остатков. Для контроля за тем, насколько велики сопутствующие модификациям изменения в пространственной структуре всей молекулы и насколько адекватно информация о ретинильном хромофоре характеризует окружение ретинилиденового остатка в бактериородопсине, наряду со спектральными параметрами ретинильного хромофора изучалась собственная белковая флуоресценция нативного и модифицированного бактериородопсина и их восстановленных производных (табл. 1). Анализ миграции энергии между ретинильным флуорофором и добавляемыми во внешнюю среду тушителями, а также остатком Tyr^{64} , модифицированным диазосульфаниловой кислотой, позволил оценить расстояния от ретинильного остатка до обеих поверхностей мембраны.

После восстановления бактериородопсина боргидридом натрия на свету при $0-4^\circ\text{C}$ ретинильный остаток обнаруживается связанным с остатком лизина последовательности 72–248 [4], недавно идентифицированным как Lys^{216} (см. [5] и приведенные там ссылки). Максимум полосы в спектре испускания и квантовый выход собственной флуоресценции полученного ретинильного производного (Ia) практически совпадают с соответствующими

Спектральные характеристики бактериородопсина и его производных ($\lambda_{\text{макс}}$, нм, и квантовый выход флуоресценции Q)

Номер	Соединение и условия получения	Спектр поглощения	Спектр КД	Резиновая флуоресценция		Собственная флуоресценция остатка	
				Спектр возбуждения	Спектр испускания	Спектр испускания	Q
(I)	Нативный бактериородопсин (БР)	570	535+, 605-*			315	0,01
(Ia)	БР, NaVN ₄ , свет, 0-4 °C		345, 362, 383		490 (500)**	315	0,008
(Iб)	БР, NaVN ₄ , свет, 20 °C		345, 362, 383		490	320	0,011
(Iв)	БР, NaVN ₄ , свет, 4 °C, затем α -химотрипсин		345, 362, 383		490	328, пл. 315	0,017
(Iг)	БР, NaVN ₄ , свет, хлоргидрат гуанидина, 4 °C		345, 362, 383		490, пл. 390	323	0,016
(II)	БР, расщепленный химотрипсин	570	535+, 605-*			315	0,016
(IIa)	NaVN ₄ , свет, 4 °C		345, 362, 383		490	317	
(IIб)	NaVN ₄ , темнота, 4 °C		-		470 (480)	331	0,02
(IIв)	NaVN ₄ , свет, 20 °C	330	345, 362, 383	335	490	320	0,011
(IIг)	NaVN ₃ CN, свет, 20 °C		345, 362, 383		480		
(IIд)	NaVN ₃ CN, темнота, 20 °C	330	-	350	470	328	0,039
(III)	БР, трифторацетилированный	566	530+, 600-*			323	0,022
(IIIa)	NaVN ₄ , свет, 4 °C		345, 362, 383		480 (490)**	323	
(IIIб)	NaVN ₄ , темнота, 4 °C	330	-	340	460 (470)**	328	0,012
(IV)	БР, остатки Trp замещены на Trp (F)	575	535+, 605-*			322	0,014
(Va)	NaVN ₄ , свет, 4 °C		345, 362, 383		495	320	
(IVб)	NaVN ₄ , темнота, 4 °C	330	-	347	450	328	

* Положительный и отрицательный экстремумы соответственно.

** В скобках указано положение максимума в коррелированном спектре.

щими параметрами нативного бактериородопсина (см. табл. 1), что, согласно работе [6], свидетельствует о сходной пространственной организации обоих хромопротеидов. Эти соединения имеют также близкие спектры КД в области 190–240 нм. Другой общей чертой бактериородопсина и производного (Ia) является наличие одного титрующегося остатка тирозина с pK_a соответственно 11,5 и 10,6 [6].

Рассмотрим спектральные характеристики, обусловленные собственно ретинильным хромофором в соединении (Ia) (табл. 1). В спектрах поглощения, КД и возбуждения флуоресценции в области 340–380 нм имеется полоса с тонкой структурой (ср. с [1, 3, 7, 8]). Наведенная оптическая активность свидетельствует об асимметричности белкового окружения ретинильного хромофора, а тонкая структура — о компланарности ионового кольца и полиеновой цепи [8]. Компланарность индуцирована белковым окружением, а не изомеризацией в ретроретинильное производное, поскольку тонкая структура в спектрах исчезает при солиubilизации препарата с помощью бромида цетилтриметиламмония или додецилсульфата натрия. Высокий квантовый выход испускания флуоресценции, значительно превышающий квантовые выходы ретинила в модельных соединениях [9], и близкое к предельному значение коэффициента поляризации (0,41) при большом времени жизни возбужденного состояния (15,3 нс) свидетельствуют об иммобилизации ретинильного остатка. Такое окружение хромофора реализуется в пределах одной молекулы белка, так как при солиubilизации в Тритоне X-100 (в котором бактериородопсин существует в мономерном состоянии [1]) тонкая структура в спектрах поглощения и возбуждения сохраняется. Иммобилизация ретинильного остатка в восстановленном бактериородопсине, полученном аналогично производному (Ia), была продемонстрирована также в работе [10].

Подобие производного (Ia) и бактериородопсина проявляется в том, что в последнем остаток ретиналя также находится в белковом окружении, о чем свидетельствует наличие оптической активности в спектре КД ($\lambda_{\text{макс}} \sim 535$ нм). Согласно сообщению Стокениуса и соотр. [7], в препарате восстановленного бактериородопсина, полученном аналогично соединению (Ia), сохраняется как гексагональная упаковка белка в мембране, характерная для нативного бактериородопсина, так и угол наклона ретиналевого хромофора к плоскости мембраны.

В целом литературные и полученные нами данные свидетельствуют о том, что восстановление альдиминной связи в приведенных выше условиях не вызывает существенных изменений пространственной структуры молекулы и ретинильный остаток остается в том же участке, где связывается ретиналь в бактериородопсине. По спектральным параметрам, отвечающим собственно белку, хромофору или обусловленным их взаимодействием, ретинильное производное (Ia) является близким структурным аналогом бактериородопсина и адекватной моделью для изучения структуры хромофорсвязывающего участка.

В табл. 1 приведены также характеристики производных бактериородопсина, полученных при варьировании условий восстановления. Восстановление при 20° С в условиях, описанных в работе [8], приводит к производному (Iб), у которого характеристики ретинильного хромофора сходны с таковыми рассмотренного выше соединения (Ia). Фотостационарная концентрация различных промежуточных продуктов фотохимического цикла бактериородопсина зависит от температуры и состава среды. Так, в присутствии хлоргидрата гуанидина при 0° С доминирует форма, родственная так называемой форме M_{412} [11], в которой альдимин ретиналя депротонирован и имеет 13-цис-конфигурацию [1]. В результате восстановления бактериородопсина в этих условиях получено производное (Iг), ретинильный хромофор которого имеет в основном те же спектральные параметры, что и рассмотренные выше соединения. Разница заключается лишь в наличии плеча при 390 нм в спектре испускания флуоресценции. Параметры собственной флуоресценции соединений (Iб) и (Iг) указывают на менее плотную упаковку полипептидной цепи в мембране (ср. [6]). Сходные изменения собственной флуоресценции наблюдаются при образовании

соединения (Iв) в результате действия на производное (Iа) химотрипсина, расщепляющего в бактериородопсине связь $\text{Phe}^{71}-\text{Gly}^{72}$ [12].

Рассмотрим свойства модифицированных производных бактериородопсина и их восстановление. Как видно из табл. 1, при ограниченном расщеплении белка химотрипсином, трифторацетилировании доступных аминогрупп или биосинтетической замене остатков триптофана на 5-фтортриптофан (соединения (II) — (IV) соответственно) спектральные свойства бактериородопсина в основном сохраняются. Вместе с тем производные (II) — (IV) характеризуются более высокими значениями квантового выхода и более длинноволновым положением максимума собственной флуоресценции. При этом параметры флуоресценции 5-фтортриптофана в растворе практически не отличаются от таковых триптофана. В целом производные (II) — (IV), очевидно, имеют несколько менее плотную («рыхлую») упаковку в мембране, чем нативный бактериородопсин. Модифицированные производные характеризуются и меньшей стабильностью альдиминной связи — так, например, расщепленный химотрипсином препарат (II) в отличие от бактериородопсина обесцвечивается гидроксиланом в темноте. Можно было надеяться, что в этих производных удастся восстановить альдиминную связь действием боргидрида натрия в темноте, не прибегая к добавкам детергентов, и получить сведения о микроокружении хромофора в основном состоянии бактериородопсина. Такое восстановление было осуществлено после ограниченного протеолиза [4], однако проведенные нами дополнительные исследования показали, что, хотя реакция протекает при охлаждении ($0-4^\circ\text{C}$), вследствие ее длительности (24 ч) она сопровождается заметным расщеплением полипептидной цепи по связи $\text{Gly}^{155}-\text{Phe}^{156}$ (см. «Приложение»). В условиях получения производного (Iа) (действие боргидрида натрия при $0-4^\circ\text{C}$ в течение 10 мин) полипептидная цепь не расщепляется, однако эта побочная реакция имеет место и в том случае, когда восстановление бактериородопсина проводится при освещении и 20°C (получение соединения (Iб)), что согласуется с недавно опубликованными данными [13].

Как видно из табл. 1, расщепление полипептидной цепи в ходе восстановления на свету при 20°C (соединения (Iб) и (IIв)) не отражается на спектральных характеристиках ретинильного хромофора, хотя, судя по собственной флуоресценции белка, и приводит к «разрыхлению» мембраны. С другой стороны, у ретинильного производного (IIб), полученного восстановлением в темноте бактериородопсина, предварительно обработанного химотрипсином, в спектрах поглощения и возбуждения отсутствует тонкая структура, а в спектрах КД ретинильный хромофор не обнаруживает оптической активности. Коротковолновое положение максимума испускания флуоресценции, малое время жизни возбужденного состояния (6 нс) и низкий квантовый выход ретинильной флуоресценции сопоставимы с соответствующими величинами для ретинола в дигальмитоиллецитине [14]. Поляризация ретинильной флуоресценции соединения (IIб) зависит от температуры, причем наиболее сильные изменения наблюдаются около 60°C и обусловлены, по-видимому, конформационными перестройками не только белка, но и липидов (ср. [15]). В пользу такого предположения свидетельствует температурная зависимость интенсивности флуоресценции добавляемого к бактериородопсину диметиламинохалкона, локализующегося преимущественно в липидной фазе [16]. Влияние липидного окружения на ретинильный остаток в соединении (IIб) проявляется и в том, что после замены основной массы липидов на дезоксихолат по методике [17] максимум ретинильной флуоресценции сдвигается от 470 к 400 нм и хромофор становится доступным для ионов Cs^+ , являющихся тушителями флуоресценции. В производных (Iа) — (Iв), в которых ретинильный остаток находится в белковом окружении, коэффициент поляризации флуоресценции от температуры не зависит, а замена липидов слабо влияет на спектральные характеристики хромофора.

При восстановлении альдиминной связи в бактериородопсине цианоборгидридом натрия (см. [4, 18]) устраняется опасность расщепления полипептидной цепи, однако фотоиндуцированный гидролиз альдимида ретина-

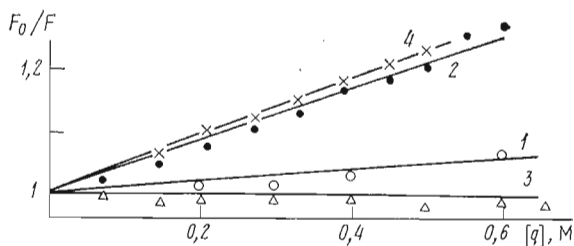


Рис. 1. Тушение ретилильной флуоресценции препаратов (Ia) и (Iв) ионами Cs^+ и I^- (F_0 и F — интенсивности флуоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя q). Указаны препарат и тушитель: 1 — (Ia), Cs^+ ; 2 — (Iв), Cs^+ ; 3 — (Ia), I^- ; 4 — (Iв), I^-

ля в кислой среде препятствует использованию этой реакции. При высоких концентрациях реагента удается осуществить и темновое восстановление бактериородопсина, однако при этом, как и при освещении, наряду с продуктом восстановления образуется бактериоопсин. Предварительная обработка мембран химотрипсином приводит к ускорению реакции с цианоборгидридом натрия как на свету, так и в темноте, но и в этом случае лишь часть бактериородопсина превращается в ретинил-бактериоопсин.

В спектрах поглощения, КД и возбуждения флуоресценции препарата (IIг), полученного в результате реакции расщепленного бактериородопсина с цианоборгидридом натрия на свету, имеется тонкая структура, однако флуоресценция ретилильного остатка характеризуется низким квантовым выходом, а значение молярной эллиптичности полосы при 362 нм в 3 раза ниже, чем для соединения (Ia), образующегося при восстановлении бактериородопсина с помощью боргидрида натрия. Препараты (IIд) и (IIб) — продукты темнового восстановления расщепленного химотрипсином бактериородопсина в присутствии соответственно цианоборгидрида и боргидрида натрия — имеют сходные спектральные параметры, однако в обоих препаратах, по-видимому, присутствует несколько форм ретилильных производных, поскольку положения максимумов в спектрах поглощения и возбуждения не совпадают. Длинноволновый сдвиг полосы в спектрах возбуждения флуоресценции этих препаратов относительно модельных ретиниламинов ($\lambda_{\text{возб}} 330$ нм) можно интерпретировать как проявление влияния, хотя и слабого, группировок белка на характеристики ретилильных хромофоров. Интересно, что аналогичное влияние прослеживается и в случае производных (IIIб) и (IVб) ($\lambda_{\text{возб}} 340$ и 347 нм соответственно), полученных при темновом восстановлении препаратов модифицированного бактериородопсина.

Таким образом, при восстановлении на свету нативного бактериородопсина или его производных (II) — (IV), полученных с помощью энзиматических, химических или биосинтетических методов, ретилильный остаток находится в белковом окружении (табл. 1). При темновом восстановлении, независимо от того, сопровождается оно дополнительным расщеплением полипептидной цепи или нет, ретилильный остаток оказывается в ином микроокружении, где прослеживается влияние липидов.

Полезную информацию об окружении ретилильных остатков дает исследование влияния pH и добавляемых во внешнюю среду зондов на параметры флуоресценции. Поскольку ретилильная флуоресценция производного (IIб) не тушится ионами Cs^+ или I^- , а ее интенсивность постоянна при pH 3–12, можно заключить, что ретилильный остаток в этом производном не экспонирован в водную среду и не испытывает влияния группировок белка, меняющих свое состояние протонирования в указанном диапазоне pH. Напротив, флуоресценция ретилильного остатка в соединении (Ia) тушится как при высоких значениях pH, так и ионами Cs^+ (константа Штерна-Фольмера $K_{\text{SV}}=0,069 \text{ M}^{-1}$, см. рис. 1, 1). При тушении ионами Cs^+ время жизни возбужденного состояния ретилильного остатка не ме-

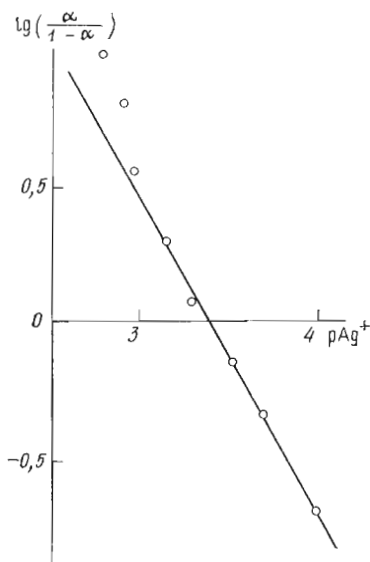


Рис. 2. Тушение ретикулярной флуоресценции соединения (Ia) ионами серебра (0,05 М морфолиноэтансульфокислота, рН 6,4; $\lambda_{\text{возб}}$ 360 нм, $\lambda_{\text{исп}}$ 490 нм). $\lg [\alpha/(1-\alpha)] = pK_d - n pAg^+$, где α — отношение уменьшения интенсивности флуоресценции при данной концентрации ионов Ag^+ к максимальному падению флуоресценции, K_d — константа нестойкости Ag^+ -комплекса, n — коэффициент Хилла, отражающий стехиометрию связывания

няется, что свидетельствует о статическом характере тушения, т. е. ионы Cs^+ связываются в хромофорном центре бактериородопсина.

В результате превращения препарата (Ia) в препарат (Iв) путем ограниченного протеолиза химотрипсином ретикулярный остаток становится одинаково доступным для ионов Cs^+ и I^- ($K_{sv} = 0,47 \text{ M}^{-1}$, см. рис. 1, 2 и 4).

Интересно, что в рамках существующих моделей топографии бактериородопсина [19–21] расщепляемая химотрипсином связь $Phe^{71}-Gly^{72}$ не находится в непосредственной близости от хромофора. Тем не менее в результате сопутствующих протеолизу нарушений пространственной структуры всей молекулы возрастает чувствительность альдиминной группы бактериородопсина к гидроксиламинолизу и восстановлению, а в восстановленных препаратах увеличивается доступность ретикулярных остатков для ионов.

Ранее было обнаружено, что связывание ионов Ag^+ в присутствии «сенсibilизирующих» количеств Тритона X-100 приводит к обесцвечиванию бактериородопсина [22]. Нами показано, что ионы Ag^+ в сравнительно невысоких концентрациях (0,1–1,5 мМ) способны тушить ретикулярную флуоресценцию соединений (Ia) и (Iб). Степень тушения достигает 40% и не возрастает при увеличении концентрации $AgNO_3$ свыше 2 мМ, что может указывать на гетерогенность окружения ретикулярных остатков в этих препаратах.

Тушение флуоресценции ионами Ag^+ не влияет на время жизни возбужденного состояния. При этом ионы Ag^+ индуцируют батохромный сдвиг полосы поглощения соединения (Ia) (в дифференциальном спектре появляется полоса с $\lambda_{\text{макс}}$ 420 нм), который, по всей вероятности, объясняется образованием комплекса Ag^+ с полиеновой системой в основном невозбужденном состоянии. Этот комплекс не флуоресцирует и не обладает оптической активностью. В целом представленные данные позволяют сделать вывод о том, что ионы Ag^+ связываются с какой-то группировкой вблизи ретикулярного остатка, т. е. в участке связывания хромофора.

Анализ тушения ретикулярной флуоресценции в координатах Хилла (рис. 2, см. также [22]) позволил оценить стехиометрию связывания и константу нестойкости комплекса Ag^+ с ретикулярным производным (Ia): $n = 1,11 \pm 0,03$, $K_d = (4,1 \pm 0,9) \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Найденная величина K_d практически совпадает со значением константы ингибирования ионами Ag^+ встраивания *полностью-транс*-ретинала в бактериородопсин [22]. Можно предположить, что отсутствие полного тушения ретикулярной флуоресценции ионами Ag^+ объясняется тем, что доступными для Ag^+ оказываются только те ретикулярные остатки, которые соответствуют остаткам *полностью-транс*-ретинала в бактериородопсине.

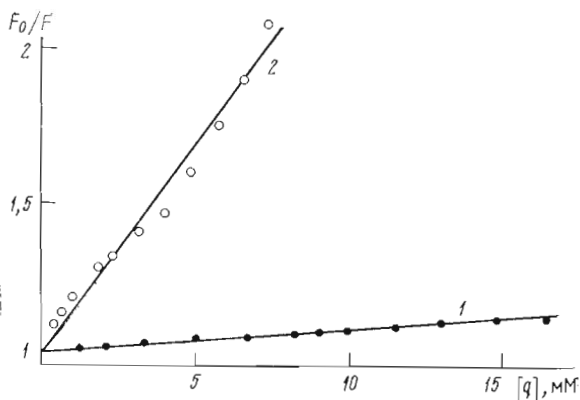


Рис. 3. Тушение ретилильной флуоресценции восстановленных производных бактериородопсина спиновым зондом — 1-оксил-2,2,5,5-тетраметилпирролин-3-карбоновой кислотой. 1 — (Ia) ($\lambda_{\text{возб}}$ 360 нм, $\lambda_{\text{исп}}$ 490 нм); 2 — (IIIб) ($\lambda_{\text{возб}}$ 330 нм, $\lambda_{\text{исп}}$ 460 нм). Обозначения по осям координат те же, что и на рис. 1

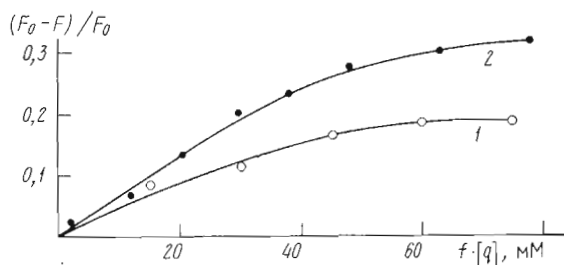


Рис. 4. Тушение ретилильной флуоресценции соединения (Ia) ионами Ho^{3+} ($j=1/2$, $\lambda_{\text{возб}}$ 360 нм, $\lambda_{\text{исп}}$ 500 нм) (1) и Co^{2+} ($j=1$, $\lambda_{\text{возб}}$ 360 нм, $\lambda_{\text{исп}}$ 570 нм) (2)

В целом исследования ретилильных производных позволяют заключить, что хромофор в бактериородопсине находится в белковом окружении, иммобилизован и имеет ограниченную возможность контактов с внешней средой. Обнаруженное влияние липидов на ретилильные остатки в производных (IIб), (IIIб) и (IVб) можно объяснить тем, что в бактериородопсине ретилилиденновый остаток, находясь в белковом окружении, тем не менее расположен достаточно близко к области контакта полипептидной цепи с липидами. Поэтому нарушения структуры мембраны при различных ферментативных или химических модификациях могут сопровождаться смещением ретилильного остатка в липидную фазу.

Исследование тушения ретилильной флуоресценции позволило не только получить информацию об окружении хромофора, но и определить расстояния от хромофора до поверхностей мембраны.

Нами обнаружено, что ретилильная флуоресценция в производных бактериородопсина тушится 1-оксил-2,2,5,5-тетраметилпирролин-3-карбоновой кислотой (рис. 3). Известно, что подобные соединения способны тушить флуоресценцию в том случае, если расстояние от неподеленного электрона иминоксильного радикала до флуорофора не превышает 4–6 Å [23]. Константа Штерна-Фольмера для соединения (Ia), в котором ретилильный остаток находится в белковом окружении, равна 8 M^{-1} . В случае соединения (IIIб), в котором ретилильный остаток испытывает влияние липидного окружения, тушение на порядок более эффективно ($K_{\text{SV}} = 126 \text{ M}^{-1}$). Сопоставление этих данных указывает на то, что использованный спиновый зонд, имеющий гидрофобный фрагмент и отрицательно заряженную карбоксильную группу, по-видимому, располагается в липидах вблизи поверхности мембраны. Поэтому хотя тушение ретилильной флуоресценции спиновым зондом и свидетельствует о сближенности хро-

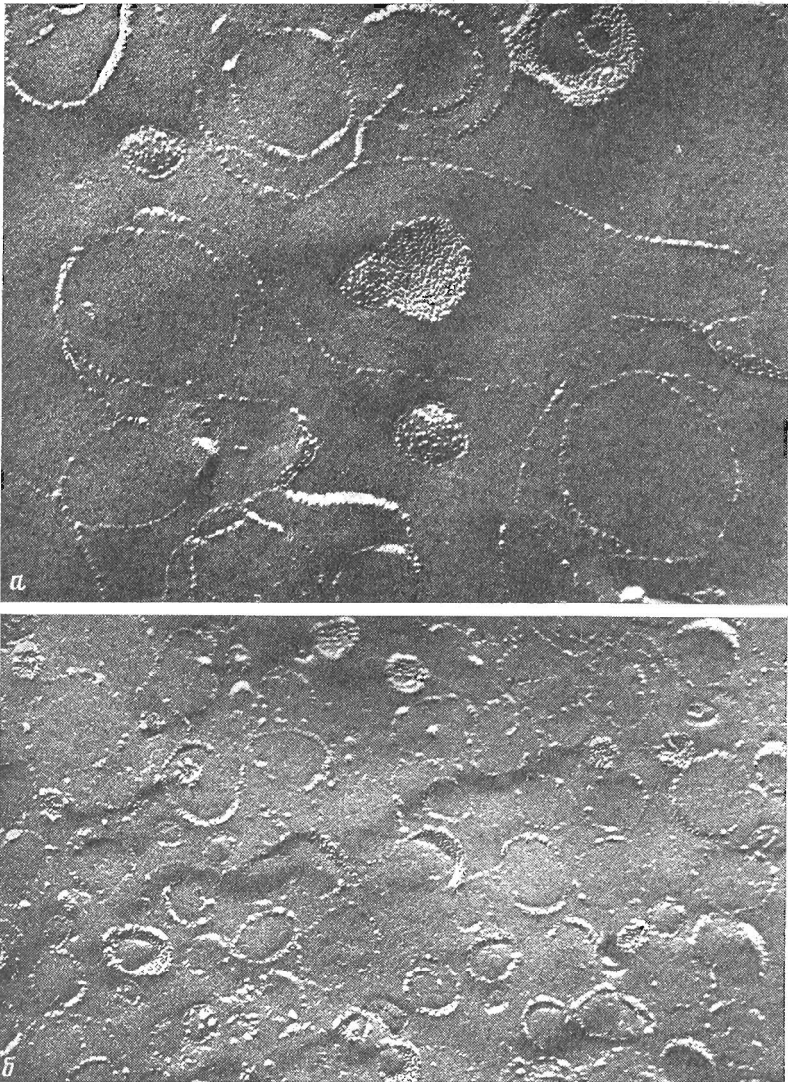


Рис. 5. Платино-углеродные реплики суспензий бактериородопсина после прогрева до 80 °С (а) и препарата (1а) после прогрева до 84 °С (б) (получены В. Л. Боровиным). Скальвание и напыление осуществляли при -150 °С в вакууме ($\sim 10^{-7}$ торр) в усовершенствованной установке ЖЕЕ-4В (Япония). Реплики просматривали в электронном микроскопе EM-100В при увеличении 25 000 и 48 000

мофора с поверхностью мембраны, однако не может быть использовано для надежных оценок соответствующего расстояния.

Другую возможность для установления пространственной локализации ретикулярного остатка предоставляют ионы лантаноидов. По имеющимся сведениям, они не проникают внутрь бактериородопсина [24], а их спектральные свойства (наличие в спектре поглощения полос с низким коэффициентом молярной экстинкции) позволяют использовать лантаноиды в качестве акцепторов при миграции энергии с ретикулярных хромофоров на близких расстояниях. Для таких донорно-акцепторных пар были рассчитаны значения интегралов перекрытия и критических радиусов Фёрстера (табл. 2).

Титрование лантаноидами соединения (1а) приводит к уменьшению интенсивности ретикулярной флуоресценции (рис. 4). Эффективность миграции энергии рассчитывалась при таких концентрациях ионов лантаноидов, когда кривая зависимости тушения от концентрации тушителя выходила на плато.

Анализ миграции энергии между ретинильным хромофором в препарате (Ia) и добавляемыми в раствор ионами, а также между ретинильными остатками

Акцептор	Интеграл перекрывания $I \cdot 10^{18}, \text{ см}^2 \cdot \text{М}^{-1}$	Радиус Фёрстера $R_0, \text{ \AA}$	Эффективность переноса энергии $E, \%$	Расстояние $R, \text{ \AA}$
Co ²⁺	14,0	7,5	30	8,8±1,2
Ho ³⁺	1,8	5,7	16	7,2–11,4
Pr ³⁺	1,5	5,2	10	6,5–10,4
Nd ³⁺	4,5	6,3	10	8,3–12,6
Ретинильный остаток	1100	18	—	≥27

Уравнения для расчета расстояния между донором и акцептором описывают взаимодействия одного донора с одним акцептором. В нашем же случае, когда один донор взаимодействует с n акцепторами (причем точное значение n неизвестно), можно использовать «эквивалентную систему осцилляторов», т. е. сложную систему рассматривать как одну донорно-акцепторную пару [25]. Для такой системы тушение флуоресценции описывается уравнением

$$Q_0/Q = + \sum_i^n (R_0/R_i)^6,$$

где Q_0 и Q — квантовые выходы в отсутствие и в присутствии тушителя, R_0 — критический радиус, R_i — расстояние от i -го акцептора до донора. С учетом поправки на эффект внутреннего фильтра вместо отношения Q_0/Q можно использовать отношение интенсивностей флуоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя, т. е. F_0/F .

Так как измеренные величины эффективности миграции энергии E меньше 0,5 (см. табл. 2), можно ограничиться первым членом ряда ($n=1$). Достоверная оценка расстояния между донором и акцептором возможна при $0,2 \leq E \leq 0,8$ [25]. При тушении ретинильной флуоресценции лантаноидами $E \leq 0,2$, что позволяет лишь оценить пределы расстояний от ретинильного остатка до ионов: $1,26R_0 \leq R \leq 2R_0$ [25]. Из табл. 2 видно, что ретинильный остаток должен находиться от водной фазы на расстоянии $\sim 10 \text{ \AA}$.

В качестве тушителей ретинильной флуоресценции нами также были использованы ионы Co²⁺. В воде они образуют аквакомплекс, в спектре поглощения которого имеется широкая полоса с $\lambda_{\text{макс}} 510 \text{ нм}$ и низким коэффициентом молярной экстинкции ($\epsilon_{510} 4,8 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$). Эта полоса перекрывается со спектром испускания флуоресценции ретинильного хромофора, и для пары соединения (Ia) — Co²⁺ R_0 равно $7,5 \pm 0,7 \text{ \AA}$. Эффективность тушения ионами Co²⁺ ретинильной флуоресценции достигает 30% (табл. 2, рис. 4), что позволяет достаточно точно оценить расстояние от ретинильного остатка ($8,8 \pm 1,2 \text{ \AA}$). Найденная величина согласуется с расстояниями, определенными по миграции энергии на ионы лантаноидов.

После того как были опубликованы наши данные о расстоянии от ретинильного остатка до поверхности мембраны [5, 26], аналогичный результат ($8 \pm 3 \text{ \AA}$) был получен Икегами и сотр. [27], анализировавшими зависимость времени жизни ретинильной флуоресценции от концентрации этилендиаминтетраацетата кобальта. Что касается расположения простетической группы в бактериородопсине, то в работе [28] на основании данных о миграции энергии с хелатов Tb³⁺ на остаток ретиналя было показано, что последний расположен не далее 10 \AA от одной из поверхностей мембраны. Однако, по данным нейтронной дифракции, иононовое кольцо ретиналя приблизительно одинаково удалено от обеих поверхностей [29]. По-видимому, полученные с помощью флуоресценции значения отвечают расстояниям между хромофором и ионами, располагающимися в области полярных головок липидов. Если учесть размеры последних, то расстояние

от хромофора до поверхности мембраны будет примерно на 5 \AA больше найденной величины, что находится в лучшем соответствии с данными нейтронной дифракции.

Исследование влияния тушителей на ретикулярную флуоресценцию позволяет оценить и взаимное расположение хромофоров в тримерах бактериородопсина. В присутствии спинового зонда или ионов Co^{2+} квантовый выход флуоресценции снижается, однако коэффициент поляризации при этом не меняется. Этот результат говорит об отсутствии миграции энергии между ретикулярными остатками. Такое условие выполняется при $R \geq 1,5R_0$ (см. табл. 2), т. е. расстояние между ретикулярными остатками должно быть не менее 27 \AA (эта оценка удовлетворительно согласуется со значениями, полученными в работах [30] и [31]).

Представляет несомненный интерес выяснить, расстояние до какой из двух поверхностей мембраны — наружной или внутренней — характеризуют полученные нами данные о миграции энергии с ретикулярного остатка на ионы-тушители. Ответ на этот вопрос может дать исследование тушения флуоресценции ретикулярных производных в везикулах, содержащих молекулы белка, ориентированные преимущественно одинаковым образом.

С использованием лецитина соевых бобов нами получены везикулы, в которых пурпурные мембраны ориентированы цитоплазматической поверхностью наружу. В условиях фотостационара эффективность транспорта протонов для них составляла $150 \text{ нэВ Н}^+/\text{мг}$ белка, что согласуется и с имеющимися литературными данными [32]. В идентичных условиях были приготовлены везикулы из препарата (Ia). Учитывая сходство в пространственной организации бактериородопсина и его ретикулярного производного (Ia), можно полагать, что в везикулах, полученных из этих препаратов, молекулы белка имеют одинаковую ориентацию. При добавлении ионов Cs^+ к везикулам, содержащим производное (Ia), тушения ретикулярной флуоресценции не наблюдалось. Этот опыт не позволяет идентифицировать поверхность мембраны, с которой сближен ретикулярный остаток, однако раскрывает интересную особенность строения хромофорного центра: ионы Cs^+ , очевидно, могут проникнуть в мембрану лишь со стороны поверхности, которая является наружной в пурпурных мембранах (внутренней в фосфолипидных везикулах).

Мы также попытались воспользоваться везикулами, полученными термообработкой пурпурных мембран [33]. По данным электронной микроскопии, более чем в 80% таких везикул внешней является цитоплазматическая поверхность пурпурных мембран. Подобные везикулы были получены из ретикулярного производного (Ia) (рис. 5).

Эффективность тушения ретикулярной флуоресценции производного (Ia) в полученных таким образом препаратах ионами лантаноидов и Co^{2+} была такой же, как и в суспензии мембран. Этот факт можно было бы объяснить тем, что с помощью миграции энергии определено расстояние от ретикулярного остатка до цитоплазматической поверхности.

Добавление ионов Ag^+ или Cs^+ к везикулам, сформированным из препарата (Ia), не влияло на ретикулярную флуоресценцию. Если же ионы Ag^+ содержались внутри везикул (прибавлялись до термообработки), то имело место тушение флуоресценции. Это давало основания полагать, что, как и в случае фосфолипидных везикул, эти ионы проникают в мембрану через ту поверхность, которая в клетках *Halobacterium halobium* обращена наружу. Однако такой вывод можно считать корректным только в том случае, если везикулы, приготовленные с помощью термообработки, непроницаемы для ионов серебра.

Оказалось, что после термообработки мембран возрастает чувствительность альдиминной группы к действию гидридных восстановителей и гидроксилamina и скорость протеолиза бактериородопсина и его производного (Ia) химотрипсином или папаином. Обнаружено также, что везикулы, сформированные из бактериородопсина в присутствии $^{22}\text{Na}^+$, полностью теряют радиоактивность при гель-хроматографии на сефадексе G-50. Эти результаты означают, что частицы, которые образуются в результате термообработки мембран, и на электронных микрофотографиях выглядят как

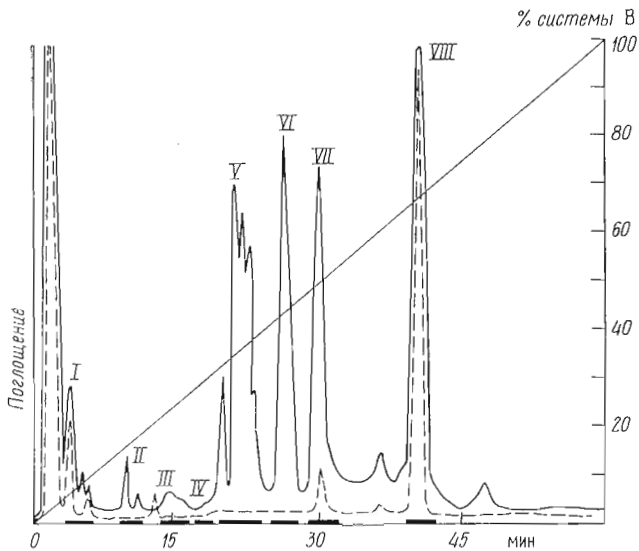


Рис. 6. Хроматография пептидов бромцианового гидролизата соединения (Ia), модифицированного диазосульфаниловой кислотой. Колонка: Nucleosil 5-C₈. Система А — 80% H₂O, 17% CH₃CN, 3% HCOOH; система В — 97% CH₃CN, 3% HCOOH. Скорость элюирования 1 мл/мин. Указанным фракциям отвечают следующие бромциановые пептиды: I — 61-68, II — 21-32, III — 33-56, IV — 210-248, V — 1-20, 146-163, VI — 119-145, VII — 164-209, VIII — 69-118, 61-118. Сплошная линия — поглощение при 280 нм, пунктир — при 320 нм

везикулы, проницаемы для ионов Na⁺ и, возможно, ионов Ag⁺, а обе поверхности мембраны доступны для протосолитических ферментов. Таким образом, несмотря на то что бактериородопсин и его ретинильное производное (Ia) при температурной обработке претерпевают сходные морфологические изменения, полученные препараты не могут быть использованы для установления топографии хромофора.

Другую возможность для выяснения пространственного расположения ретинильного или ретинилиденового остатка предоставляют производные, модифицированные диазосульфаниловой кислотой по остаткам тирозина. Мы проводили реакцию с бактериородопсином или с производным (Ia) в условиях, предложенных в работе [34] для модификации бактериородопсина. Для удобства оценки степени модификации и локализации модифицированных остатков в некоторых опытах нами использованы препараты бактериородопсина, в которые с помощью биосинтеза были введены остатки [¹⁴C]Tyr. Степень модификации бактериородопсина и препарата (Ia) составляла 1,1±0,2 моль меток/моль белка и была близка к найденной в работе [34]. При обработке дитионитом натрия восстанавливается ~1 моль меток. Анализ пептидов бромцианового расщепления (рис. 6) показал, что, как и в работе [34], модификация предпочтительно подвергается остаток Tyr⁶¹, однако в нашем случае относительная степень модификации этого остатка была выше (на его долю приходилось более 80% от обнаруженной в бромциановых пептидах метки против 60% в [34]). Причиной различия может быть отмеченная в работе [34] чувствительность реакции к состоянию мембраны, а также использование различных штаммов *Halobacterium halobium* — S9 в работе [34] и R₁ или R₁M₁ в данной работе.

Судя по моделям [19-21] и экспериментальным данным [34], остаток Tyr⁶¹ располагается вблизи внешней поверхности мембраны. Чтобы оценить эффективность миграции энергии с ретинильного хромофора на 4-сульфофенилазогруппу (Sra-группу), связанную с этим остатком, препарат (Sra-Ia) восстанавливали дитионитом натрия, что приводило к возращанию ретинильной флуоресценции (при добавлении дитионита к производному (Ia) флуоресценция не менялась). На основании найденной таким образом эффективности миграции энергии ($E=0,21\pm 0,04$) и значе-

Анализ миграции энергии в производных бактериородопсина, модифицированных по остатку Туг⁶⁴

Донор	Акцептор	Интеграл перекрытия $I \cdot 10^{15}$, см ³ ·М ⁻¹	Радиус Фёрстера R_0 , Å	Эффективность миграции E , %	Расстояние R , Å
Ретинильный остаток	Туг(Spa) ⁶⁴	8,2	22,4	21	22–34
Туг(NH ₂) ⁶⁴	Ретинилиденовый остаток	20,0	23,2	9	30–46

ния R_0 22,4 Å (см. табл. 3) было рассчитано расстояние между ретинильным остатком и Spa-меткой (R 28 Å). Так как при $0,1 \leq E \leq 0,5$ и $K^2 = 2/3$ (K^2 — фактор ориентации дипольных моментов перехода донора и акцептора) неопределенность в значениях R не превышает 20% [25], соответствующее расстояние составляет $28 \pm 5,6$ Å.

В результате восстановления дитионитом остаток Туг(Spa)⁶⁴ в бактериородопсине превращается в остаток аминотирозина, который по параметрам флуоресценции отличается от остатков тирозина и триптофана и поэтому может составить донорно-акцепторную пару с ретинилиденовым хромофором. Коэффициент поляризации флуоресценции Туг(NH₂)⁶⁴ равен 0,13, т. е. этот остаток находится на поверхности (об этом свидетельствует также высокая доступность Туг(Spa)⁶⁴ для дитионита) и обладает высокой подвижностью. Поэтому при расчете интеграла перекрытия можно принять значение фактора ориентации $K^2 = 2/3$ (значения I и критического радиуса R_0 приведены в табл. 3). После денатурации препарата нагреванием в присутствии бромида цетилтриметиламмония интенсивность флуоресценции остатка Туг(NH₂)⁶⁴ увеличивается на 9%, т. е. эффективность миграции энергии $E = 0,09$. Отсюда следует, что расстояние от остатка Туг(NH₂)⁶⁴ до ретинилиденового хромофора равно 30–46 Å. Сопоставление этой величины с расстоянием между Туг(Spa)⁶⁴ и ретинильным остатком показывает, что остаток Туг⁶⁴ удален от хромофора приблизительно на 30–35 Å.

В рамках существующих моделей укладки полипептидной цепи бактериородопсина в мембране второй α -спиральный сегмент (нумерация с N-конца), содержащий остаток Туг⁶⁴, сближен с седьмым сегментом, в котором расположен связанный с ретиналом остаток Lys²¹⁶ [20, 21]. По данным нейтронной дифракции, иононовое кольцо находится между вторым, шестым и седьмым сегментами (ср. [31] и [35]). В свете этих данных величина 30–35 Å, очевидно, характеризует удаленность хромофора от наружной поверхности мембраны, на которой находится Туг⁶⁴. Учитывая, что толщина мембраны бактериородопсина составляет ~ 45 Å [1], это заключение согласуется с рассмотренными выше данными о том, что ретинильный остаток находится на расстоянии ~ 9 Å от водной фазы (или полярных головок липидов), т. е. ближе к одной из поверхностей мембраны, которая, по-видимому, может быть идентифицирована как ее цитоплазматическая сторона (см. рис. 7).

Данные о локализации ретинильных остатков интересно сопоставить с имеющимися сведениями о доступности протетической группы бактериородопсина. Протопированный альдимин ретиналя в бактериородопсине характеризуется необычно высоким значением pK_a , высокой устойчивостью к гидролизу и атаке нуклеофильными агентами [36], а также сравнительно низкой скоростью дейтерообмена [37, 38]. Эти свойства, по крайней мере отчасти, можно объяснить экранированием альдиминной группы белком и липидами, которое проявилось в исследованиях ретинильных производных. Обнаруженная способность ионов Cs⁺ (а возможно, и Ag⁺) проникать в мембрану лишь с наружной ее стороны свидетельствует об асимметрии порпурных мембран, которая может оказаться существенной и для протонного транспорта. В этой связи заслуживает упоминания работа [39], в которой выдвинута гипотеза о том, что альдиминная группа в бактерио-

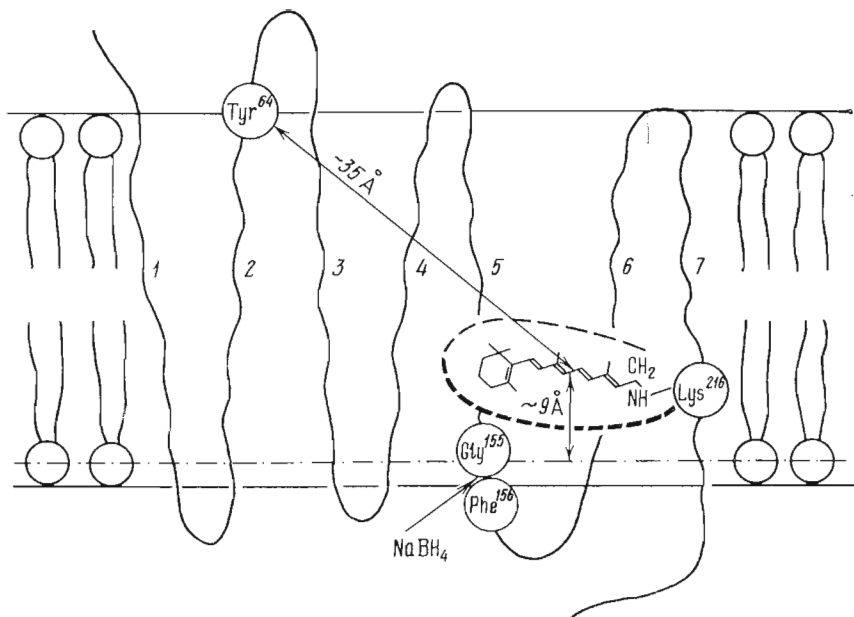


Рис. 7. Схема, иллюстрирующая расположение хромофора в ретинил-бактериородопсине. Пунктирная линия означает иммобилизацию ретинильного хромофора, более тонкая линия соответствует большей доступности хромофора для ионов с наружной стороны мембраны; 1-7 — нумерация α -спиральных сегментов, начиная с N-концевого; указана связь, расщепляемая NaBH_4 .

родопсине доступна только с внешней стороны мембраны, а ее репротонирование на завершающих стадиях фотохимического цикла осуществляется не путем прямого захвата протона на цитоплазматической стороне мембраны, а при посредстве какой-то депротонирующей группировки белка.

В заключение следует отметить, что если еще совсем недавно дискутировался вопрос о том, с каким именно остатком лизина связан ретиналь (см. [5]), то сейчас не меньшую остроту приобрела проблема точной характеристики пространственной локализации ретиналя. Так, Корана и сотр. [40] идентифицировали дипептид Ser^{193} — Glu^{194} как участок, с которым образуются фотоиндуцированные спивки при использовании фотоактивируемого ароматического аналога ретиналя, содержащего вместо циклогексенового кольца *m*-диазиринофенильный радикал. В рамках существующих моделей [19—21] это должно было бы означать, что хромофор сближен с наружной стороны мембраны. Авторы работы [40], однако, предположили, что хромофор располагается в глубине мембраны, где должны лежать остатки Ser^{193} и Glu^{194} . Это влечет за собой необходимость существенного изменения модели укладки полипептидной цепи бактериородопсина в мембране. На наш взгляд, следует учитывать, что в используемом пигменте ароматический аналог мог иметь иную ориентацию, чем ретиналь в бактериородопсине. По-видимому, для окончательного решения этого вопроса необходимы дальнейшие исследования бактериородопсина и его аналогов с помощью физических и химических методов.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Локализация участка расщепления полипептидной цепи бактериородопсина под действием боргидрида натрия

Гель-электрофоретический анализ препаратов, длительно выдерживавшихся с боргидридом натрия в темпоте, показал, что хромофорсодержащий фрагмент включает в себя около 100 аминокислотных остатков (молекулярная масса ~ 8 кД, см. также [13]) и образуется, вероятно, в результате атаки реагентом пептидной связи (или связей), расположенной в С-концевой области полипептидной цепи бактериородопсина. Для установления

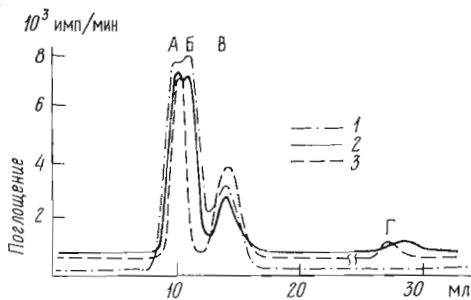


Рис. 8. Гель-хроматография на сефадексе LH-60 фрагментов [^{14}C -Phe]бактериородопсина, полученных при расщеплении полипептидной цепи NaBH_4 . Колонка $0,5 \times 180$ см, 98% муравьиная кислота — этанол. А, Б и В — нерасщепленный бактериородопсин, высокомолекулярный и низкомолекулярный фрагмент соответственно; Г — свободный ретиналь и липиды. 1 — радиоактивность, 2 и 3 — поглощение при 280 и 450 нм соответственно. Для фракции Г кривая 3 — поглощение при 380 нм

положения расщепляемой связи мы воспользовались двумя биосинтетическими производными бактериородопсина, содержащими остатки [^{14}C]тирозина или [^{14}C]фенилаланина (удельная радиоактивность соответственно 620 и 1100 расц/мин на 1 нмоль соответствующего остатка). После обработки этих препаратов боргидридом натрия (24 ч, 4°C , в темноте), последующего диализа, центрифугирования, промывок и лиофилизации была проведена гель-хроматография в системе 98% муравьиная кислота — абс. этанол (30:70), в которой ретиналь остается связанным с полипептидом в виде протонированного альдимида ($\lambda_{\text{макс}}$ 455 нм). Анализ полученных продуктов (рис. 8) показал, что расщепление полипептидной цепи протекает на 40–60%, степень восстановления бактериородопсина составляет 20–25%. Фрагмент В в отличие от нерасщепленного белка (А) и низкомолекулярного фрагмента В не содержит ретиналевого хромофора. По оценке радиоактивности, в состав пептида В входят один-два остатка тирозина и четыре-пять остатков фенилаланина, что, судя по распределению соответствующих остатков в аминокислотной последовательности бактериородопсина [19, 41], подтверждает принадлежность фрагмента В к С-концевой области белка.

N-Концевой анализ показал, что только фрагмент В имеет свободную α -аминогруппу (остаток фенилаланина). При определении первых шести аминокислотных остатков [^{14}C]Phe-содержащего фрагмента В деградацией по Эдману выход радиоактивной метки обнаружен только на первом шаге и установлена последовательность Phe-Thr-Ser-Lys-Ala-Glu, отвечающая остаткам 156 — 161 бактериородопсина. Таким образом, под действием боргидрида расщепляется связь между остатками Gly¹⁵⁵ и Phe¹⁵⁶. Упоминание о расщеплении этой связи в бактериородопсине без экспериментальных подробностей содержится в появившейся недавно работе Кураны и сотр. [42].

Реакции с боргидридом натрия зависят от стерических факторов [43], расщеплению подвергается ограниченное число пептидных связей, расположенных обычно в экспонированных участках цепи [44, 45], и, наконец, наличие заряда должно препятствовать проникновению аниона BH_4^- в гидрофобную область мембраны. Отсюда можно заключить, что расщепляемая связь Gly¹⁵⁵ — Phe¹⁵⁶ находится вблизи поверхности мембраны. Полученный результат подтверждает модель укладки полипептидной цепи бактериородопсина в пурпурной мембране (см. [21]).

Экспериментальная часть

Пурпурные мембраны выделяли из клеток *H. halobium* (штаммы R₁, R₁M₁ или 353-II) по методике, описанной в работе [46]. Трифторацетилированный бактериородопсин получен путем обработки мембран $\text{CF}_3\text{COSC}_2\text{H}_5$ при pH 10,0 и содержал, судя по данным ^{19}F -ЯМР-спектроскопии, ~3 моль модифицированных аминогрупп. Для получения аналогов бактериородопсина, в которых все остатки тирозина, фенилаланина или триптофана заменены соответственно на [^{14}C]тирозин, [^{14}C]фенилаланин или 5-фтортриптофан, клетки *H. halobium* R₁M₁ выращивали на синтетических средах, содержащих добавки соответствующих радиоактивных аминокис-

лот или DL-5-фтортриптофана (в условиях, аналогичных описанным в работе [47]).

Для освещения препаратов использовали галогенную лампу (250 Вт), снабженную фокусирующей системой, желто-оранжевым стеклянным фильтром ЖС-18 (5 мм) и тепловым фильтром (2 см 10% раствора CuSO_4). Реакцию с NaBH_4 проводили в 50 мМ бикарбонатном буфере при pH 9,0–10,0. По окончании восстановления суспензию подкисляли фосфатным буфером до pH 6,5–7,0, центрифугировали, осадок несколько раз промывали водой. Восстановление с помощью NaBH_3CN проводили в 50 мМ фосфат-цитратном буфере при pH 3,0–3,3. Степень восстановления оценивали по амплитуде полосы поглощения бактериородопсина и его производных при 560–570 нм.

Модификацию бактериородопсина и ретиныльного производного (Ia) диазосульфаниловой кислотой проводили в соответствии с работой [34], не прибегая, однако, к предварительному блокированию остатков лизина. Делипидирование модифицированных образцов и расщепление бромцианом проводили как в работе [18]. Бромциановые пептиды разделяли на колонке с Nucleosil 5-C₈ (рис. 6). Около 80% модифицированных остатков тирозина, поглощающих при 320 нм, обнаружено во фрагментах 61–68 и 61–118 (последний фрагмент является продуктом неполного расщепления бромцианом связи 68–69, причем пептид 69–118 метки не содержал) и 5% – во фрагменте 21–32, в котором могут быть модифицированы остатки Tyr^{26} и Lys^{30} [34].

Для тушения ретиныльной флуоресценции использовали PrCl_3 , NdCl_3 , $\text{Ho}(\text{HCOO})_3$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и AgNO_3 . Температурную обработку препарата (Ia) проводили в присутствии 1 мМ AgNO_3 , а затем избыток ионов Ag^+ удаляли центрифугированием с последующей многократной промывкой осадка водой. Разрушение полученных везикул с помощью Тритона X-100 или β -октилглюкозида и последующее связывание ионов Ag^+ тиосульфатом вызывало увеличение интенсивности ретиныльной флуоресценции. Отсюда следует, что ионы Ag^+ проникают в мембрану и тушат флуоресценцию ретиныльного остатка только с той стороны, которая обращена внутрь везикул.

N-Концевую последовательность хромофорсодержащего фрагмента (см. «Приложение») определяли с помощью 4-N,N-диметиламиноазобензол-4'-изотиоцианата по методике, описанной в работе [48], а также на секвенаторе Beckman 890 C (США) по стандартной белковой программе с использованием полибрена и 0,1 М квадрола. Аминокислотный анализ проводили на автоматическом анализаторе аминокислот D-500 (Durrum, США). Радиоактивность определяли в унисольве I (Koch-Light Laboratories, Англия) или сцинтиляторе Брея, используя жидкостный сцинтиляционный спектрометр SL-30 (Intertechnique, Франция).

Спектры поглощения снимали на приборах Specord UV VIS (ГДР) и Beckman Acta MVI (США), спектры КД – на дихрографе Mark III (Jobin Ivon, Франция), а корректированные и некорректированные спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре SPF-1000 CS (Aminco, США). Квантовые выходы ретиныльной и собственной флуоресценции белка определяли относительно соответственно хининсульфата в 0,1 н. H_2SO_4 ($Q=0,55$) и триптофана в воде ($Q=0,22$). Тушение ретиныльной флуоресценции анализировали по уравнению Штерна-Фольмера:

$$F_0/F = 1 + K_{SV} [q],$$

где $[q]$ – концентрация тушителя.

Для флуоресцентных исследований использовали препараты бактериородопсина и его производных ($2 \cdot 10^{-7}$ – 10^{-6} М) в фосфатном буфере (pH 7,0) или в растворе морфолиноэтансульфофосфаты (pH 6,4). Анализ миграции энергии и определение расстояний проводили как в работе [49]. Критический радиус рассчитывали по формуле

$$R_0 = (I \cdot K^2 \cdot Q_0 \cdot n_D^{-4})^{1/6} \cdot 9,7 \cdot 10^3 \text{ (Å)},$$

где n_D — показатель преломления среды, I — интеграл перекрывания спектров поглощения акцептора и флуоресценции донора. I вычисляли по формуле

$$I = \frac{\int_0^{\infty} \varepsilon_A(\lambda) F_D(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda}{\int_0^{\infty} F_D(\lambda) \cdot d\lambda},$$

где $\varepsilon_A(\lambda)$ и $F_D(\lambda)$ — коэффициент молярного поглощения акцептора и относительная интенсивность флуоресценции донора как функция λ . Для определения расстояния R между донором и акцептором использовали выражения

$$R = (E^{-1} - 1)^{1/6} \cdot R_0 \text{ и } E = 1 - Q/Q_0.$$

Авторы выражают благодарность акад. Ю. А. Овчинникову и члену-корр. В. Т. Иванову за постоянное внимание к данной работе.

Авторы признательны А. М. Шкробу и А. В. Родионову за ценные советы и критические замечания, Л. Н. Чегулаевой за образцы бактериородопсина из штамма 353-II, О. Ф. Борисовой за помощь в измерении времен жизни возбужденного состояния, М. Ю. Фейгиной, И. В. Назимову и В. В. Шемякину за определение аминокислотной последовательности пептидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stoerkenius W., Lozier R. H., Bogomolni R. A. *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 505, № 3-4, p. 245-278.
2. Stoerkenius W. *Account Chem. Res.*, 1980, v. 13, № 10, p. 337-344.
3. Peters J., Peters R., Stoerkenius W. *FEBS Lett.*, 1976, v. 61, № 2, p. 128-134.
4. Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Цеглин В. И., Киселев А. В., Закус В. И. *Биоорганическая химия*, 1980, т. 6, № 9, с. 1427-1429.
5. Ovchinnikov Yu. A. *FEBS Lett.*, 1982, v. 148, № 2, p. 178-191.
6. Алдашев А. А., Ефремов Е. С. *Биоорганическая химия*, 1983, т. 9, № 1, с. 11-25.
7. Katre N. V., Wolber P. K., Stoerkenius W., Stroud R. M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1981, v. 78, № 7, p. 4068-4072.
8. Schreckenbach T., Walckhoff B., Oesterhelt D. *Eur. J. Biochem.*, 1977, v. 76, № 2, p. 499-511.
9. Thomson A. J. *J. Chem. Phys.*, 1969, v. 51, № 9, p. 4106-4116.
10. Kouyama T., Kimura Y., Kinoshita K., Ikegami A. *FEBS Lett.*, 1981, v. 124, № 1, p. 100-105.
11. Yoshida M., Ohna K., Takeuchi Y., Kagawa Y. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1977, v. 75, № 4, p. 1111-1116.
12. Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Ovchinnikov Yu. A., Drachev L. A., Kaulen A. D., Khitrina L. V., Skulatchev V. P. *FEBS Lett.*, 1978, v. 90, № 2, p. 190-194.
13. Lemke H.-D., Oesterhelt D. *FEBS Lett.*, 1981, v. 128, № 2, p. 255-260.
14. Radda G. *Methods Membr. Biol.*, 1975, v. 4, p. 97-188.
15. Hwang S.-B., Stoerkenius W. *Biophys. J.*, 1979, v. 25, № 2 (part 2), p. 207a.
16. Aldashev A. A., Rodionov A. V., Efremov E. S., Shkrob A. M. In: *Chemistry of peptides and proteins/Eds Voelter M., Wunsch E., Ovchinnikov Yu., Ivanov V.* Berlin: Walter de Gruyter, 1982, v. 1, p. 451-456.
17. Hwang S.-B., Stoerkenius W. *J. Membr. Biol.*, 1977, v. 33, № 3-4, p. 325-350.
18. Родионов А. В., Байрамашвили Д. П., Куделин А. Б., Фейгина М. Ю., Шкроб А. М., Овчинников Ю. А. *Биоорганическая химия*, 1981, т. 7, № 9, с. 1328-1334.
19. Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Lobanov N. A. *FEBS Lett.*, 1979, v. 100, № 2, p. 219-224.
20. Engelman D. M., Henderson R., McLachlan A. D., Wallace B. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, v. 77, № 4, p. 2023-2027.
21. Kimura K., Mason T. L., Khorana G. N. *J. Biol. Chem.*, 1982, v. 257, № 6, p. 2859-2867.
22. Родионов А. В., Шкроб А. М. *Биоорганическая химия*, 1979, т. 5, № 3, с. 376-394.
23. Green J. A., Singler L. A., Parks J. N. *J. Chem. Phys.*, 1973, v. 58, № 7, p. 2690-2695.
24. Drachev L. A., Kaulen A. D., Skulachev V. P. *FEBS Lett.*, 1978, v. 87, № 1, p. 161-167.
25. Алфимова Е. А., Лихтенштейн Т. И. В сб.: *Молекулярная биология*. М.: ВИНТИ, 1976, т. 8, ч. II, с. 127-179.
26. Алдашев А. А., Закус В. И., Курятов А. Б., Овечкина Г. В., Шныров В. Л., Цеглин В. И. VI Двусторонний симпозиум СССР — Франция «Структура и функция белков и нуклеиновых кислот», Цхангубо, 19-22 окт. 1982 г. Тез. докл., с. 124-125.
27. Kouyama T., Kinoshita K., Jr, Ikegami A. *J. Mol. Biol.*, 1983, v. 165, № 1, p. 91-107.

28. Thomas D. D., Stryer L. *Fed. Proc.*, 1980, v. 39, № 6, p. 1847.
29. King G. I., Stoeckenius W., Crespi H. L., Shoenborn B. P. *J. Mol. Biol.*, 1979, v. 130, № 4, p. 395-404.
30. Kouyama T., Kimura Y., Kinoshita K., Jr, Ikegami A. *J. Mol. Biol.*, 1981, v. 153, № 2, p. 337-359.
31. King G. I., Mowery P. C., Stoeckenius W., Crespi H. L., Shoenborn B. R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, v. 77, № 8, p. 4726-4730.
32. Hellingwerf K. J., Scholte B. J., Van Dam K. *Biochim. et biophys. acta*, 1978, v. 513, № 1, p. 66-77.
33. Шныров В. Л., Тараховский Ю. С., Боровягин В. Л. *Биоорган. химия*, 1981, т. 7, № 7, с. 1054-1059.
34. Lemke H.-D., Bergmeyer J., Straub J., Oesterhelt D. *J. Biol. Chem.*, 1982, v. 257, № 16, p. 9384-9388.
35. Hayward S. B., Stroud R. M. *J. Mol. Biol.*, 1981, v. 151, № 3, p. 491-517.
36. Шкроб А. М., Подуинов А. В. *Биоорган. химия*, 1978, т. 4, № 3, с. 360-368.
37. Doukas A. G., Pande A., Suzuki T., Callender R. H., Honig B., Ottolenghi M. *Biophys. J.*, 1981, v. 33, № 2, p. 275-279.
38. Ehrenberg B., Lewis A., Porta T. K., Nagle J. F., Stoeckenius W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, v. 77, № 11, p. 6571-6573.
39. Kalisky O., Ottolenghi M., Honig B., Korenstein R. *Biochemistry*, 1981, v. 20, № 3, p. 649-655.
40. Huang K.-S., Radhakrishnan R., Bayley H., Khorana H. G. *J. Biol. Chem.*, 1982, v. 257, № 22, p. 13616-13623.
41. Khorana H. G., Gerber G. E., Herlihy W. C., Gray C. P., Anderegg R. J., Nihei K., Biemann K. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979, v. 76, № 10, p. 5046-5050.
42. Huang K.-S., Liao M.-J., Gupta C. M., Royal N., Biemann K., Khorana H. G. *J. Biol. Chem.*, 1982, v. 257, № 15, p. 8596-8599.
43. Brown H. C., Muzzio J. J. *Amer. Chem. Soc.*, 1966, v. 88, № 12, p. 2811-2822.
44. Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H. *J. Biol. Chem.*, 1963, v. 238, № 2, p. 622-627.
45. Par M. A., Henson E., Rombauer R., Abrash L., Blumfeld O., Gallop P. *Biochemistry* 1970, v. 9, № 10, p. 2123-2127.
46. Oesterhelt D., Stockenius W. *Methods Enzymol.*, 1974, v. 31, p. 667-678.
47. Gochbauer M. B., Kushner O. *J. Can. J. Microbiol.*, 1969, v. 15, p. 1157-1165.
48. Chang J. Y., Brauer D., Wiltman-Liebold B. *FEBS Lett.*, 1978, v. 93, № 2, p. 205-214.
49. Stryer L. *Ann. Rev. Biochem.*, 1978, v. 47, p. 819-846.

Поступила в редакцию
15.VI.1983

TOPOGRAPHY OF RETINYL-BINDING SITE IN THE BACTERIORHODOPSIN REDUCED DERIVATIVES

TSETLIN V. I., ZAKIS V. I., ALDASHEV A. A., KURYATOV A. B.,
OVECHKINA G. V., SHNYROV V. L.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow,
and Institute of Biological Physics, Academy of Sciences
of the USSR, Pushchino*

The reduction of aldimine bond in bacteriorhodopsin and its analogs has been studied. The prolonged treatment with NaBH₄ in the dark was found to cleave the Gly¹⁵⁵ - Phe¹⁵⁶ linkage in bacteriorhodopsin; gel filtration afforded the retinylidene-containing peptide 156--248. The light-induced reduction with NaBH₄ at 4° was not accompanied by polypeptide chain cleavage. As judged from the fluorescence, UV and CD data, the retinyl residue is located in a protein environment occupying approximately the same site as the retinylidene residue in bacteriorhodopsin. The distances from the retinyl and retinylidene chromophores to the membrane surfaces were determined basing on the retinyl fluorescence quenching by the lanthanide and Co²⁺ ions as well as on the analysis of the energy transfer between the retinyl or retinylidene moieties and 4-sulfophenylazo group at modified Tyr⁶⁴ or Tyr(NH₂)⁶⁴ side chain, respectively.