



УДК 547.963.4.022 : 577.112.088.6

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОПОГРАФИИ БАКТЕРИОРОДОПСИНА
МЕТОДОМ ТРИТИЕВОЙ ПЛАНИГРАФИИ

*Аленычева Т. Н., Курятов А. В., Антропова Л. П.,
Шемякин В. В., Нейман Л. А., Цетлин В. И.,
Иванов В. Т.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

На примере бактериородопсина показана возможность применения метода тритиевой планиграфии для изучения топографии мембранных белков. Пурпурные мембраны после ограниченного расщепления с помощью папаина или боргидрида натрия подвергали действию термически активированного трития и в выделенных крупных пептидах (соответствующих участкам 4–65, 73–231 и 156–248) определяли содержание трития на каждом шаге после автоматической деградации по Эдману. Аналогичным образом анализировали более короткие пептиды (фрагменты 21–32, 33–56, 57–60, 61–65 и 210–231), полученные после дополнительного расщепления фрагментов 4–65 и 73–231 бромцианом. Проведение указанных исследований на образцах бактериородопсина, селективно меченных ^3H , позволило проконтролировать ход деградации и количественно оценить включение трития в определенные аминокислотные остатки. Метод тритиевой планиграфии дает возможность различать аминокислотные остатки, лежащие внутри мембраны, и участки полипептидной цепи, находящиеся вблизи или на поверхности мембраны. Обнаружены ограничения в доступности для атомов трития фрагментов, не принадлежащих внутримембранным сегментам. На основании полученных результатов предложена схема укладки ряда участков полипептидной цепи бактериородопсина в мембране.

Идентификация участков полипептидных цепей, расположенных внутри мембраны либо на ее поверхности, является необходимым этапом исследования структурно-функциональной организации мембранных белков. Для локализации экспонированных участков используются такие экспериментальные подходы, как химическая модификация, ограниченный протеолиз, а также анализ взаимодействия с поли- или моноклональными антителами. В данной работе для этой цели впервые применен метод тритиевой планиграфии.

При термической диссоциации молекул трития на накаленной вольфрамовой нити образуется атомарный тритий, взаимодействие которого с органическими соединениями приводит к обмену атомов водорода на тритий. Малая величина пробега реакционноспособных атомов трития в конденсированной фазе (2–3 Å) обуславливает локализацию радиоактивной метки преимущественно в тонких поверхностных слоях мишени, что позволяет на основании данных о распределении трития получать сведения о пространственной структуре белка, а также о топографии белковых и нуклеопротеидных комплексов [1, 2].

Мы полагаем, что метод тритиевой планиграфии может дать информацию и об организации мембранных белков, поскольку наличие липидного бислоя должно приводить к заметным различиям в доступности для трития экспонированных и внутримембранных участков полипептидной цепи. В качестве объекта исследования нами был выбран бактериородопсин (предварительные результаты см. [3, 4]), один из наиболее охарактеризованных мембранных белков, для которого известна аминокислотная последовательность, в общих чертах выяснен тип пространственной организации, а также идентифицирован ряд экспонированных остатков (см. [5–7] и приведенные там ссылки). Такая ситуация, с одной стороны, позволяет оценить адекватность метода тритиевой планиграфии для мембранных белков, а с другой — получить экспериментальные данные, необходимые для проверки и дальнейшей детализации существующих моделей топографии бактериородопсина.

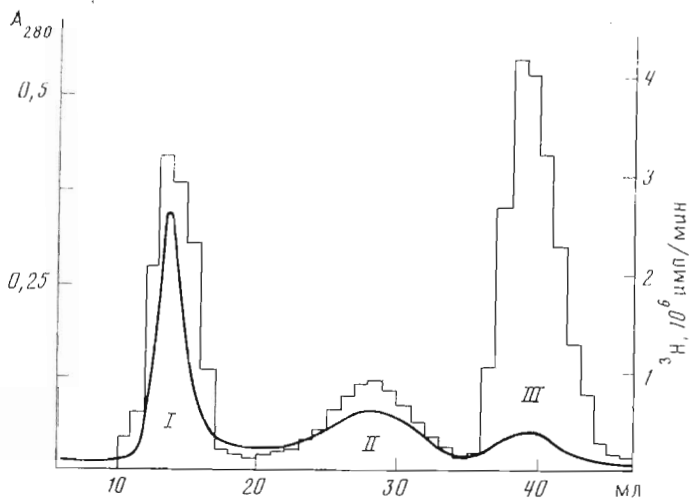


Рис. 1. Гель-хроматография фрагментов [$^3\text{H}/^{14}\text{C}$]бактериородопсина на сефадексе LH-60 (колонка 1×80 см) в системе этанол — муравьиная кислота (7:3) (в условиях [14]). Контроль по поглощению (I) и по содержанию трития во фракциях (2). Пики соответствуют фрагментам Gly 73 —Gly 231 (I), Phe 4 —Gly 65 (II), ретинолу, липидам и отмываемому тритию (III)

Мы планировали провести обработку бактериородопсина термически активированным тритием, расщепить полипептидную цепь на фрагменты, а затем при их деградации по Эдману определить включение трития в определенные остатки аминокислотной последовательности белка. Первоначально был использован метод [1, 2] бомбардировки тритием образцов, нанесенных на бумажную подложку. Пурпурные мембраны удается элюировать с подложки только смесью органических растворителей, и это не позволяет после действия трития провести расщепление полипептидной цепи на крупные фрагменты (с помощью ограниченного протеолиза [8] или боргидрида натрия [9]) и таким образом значительно упростить как последующее получение и разделение более коротких фрагментов, так и анализ включения трития. Поэтому действию термически активированного трития подвергали препараты пурпурных мембран, предварительно расщепленных папаином на фрагменты Phe 4 —Gly 65 и Gly 73 —Gly 231 [8] или боргидридом натрия на фрагменты Clp 1 —Gly 153 и Phe 156 —Ser 248 [9]. Использование таких расщепленных препаратов вполне оправдано, поскольку указанные разрывы не ведут к утрате функциональной активности и существенным перестройкам пространственной структуры [8, 9]; можно ожидать, что расщепление скажется в основном лишь на экспонированности остатков, примыкающих к участкам разрыва.

Следует также обратить внимание на то, что бомбардировке тритием подвергаются мембраны в высушенном состоянии. Дегидратация пурпурных мембран влияет на *цис-транс*-изомеризацию хромофора [10], фотохимические превращения [10, 11], однако, по данным оптических [11] и дифракционных [12] методов, почти не отражается на вторичной и третичной структуре бактериородопсина. Мы полагали, что расщепление не должно внести существенных изменений в укладку полипептидной цепи бактериородопсина в высушенных мембранах и соответствующие препараты являются адекватными объектами для проверки возможностей метода тритиевой планиграфии мембранных белков.

После действия термически активированного трития удаляли основную часть лабильного трития (см. «Экспериментальную часть»), выделяли перечисленные выше крупные фрагменты, а затем подвергали их автоматической деградации по Эдману. Чтобы определение количества трития на каждом шаге деградации отражало его реальное включение в данный

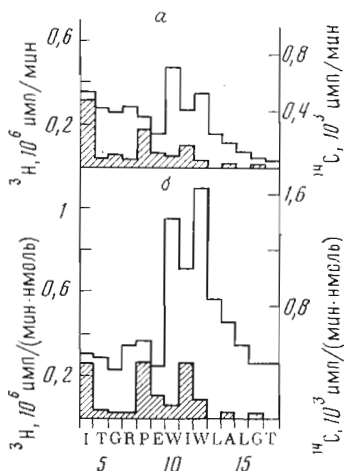


Рис. 2

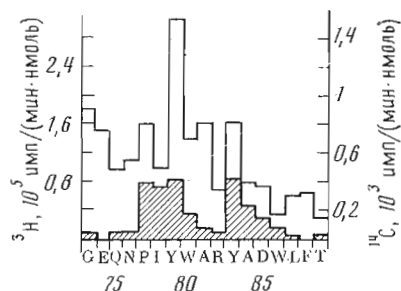


Рис. 3

Рис. 2. Распределение радиоактивности по аминокислотным остаткам во фрагменте $\text{Pe}^4\text{—Gly}^{65}$ [$^3\text{H}/^{14}\text{C}$]бактериородопсина. Здесь и на рис. 3, 5, 6, 7 метка вводилась в обработанную папаином смесь мембран, содержащих бактериородопсин с биосинтетически включенными ^{14}C -мечеными остатками изолейцина, тирозина и фенилаланина. *a* — абсолютное включение радиоактивности, *b* — включение радиоактивности в расчете на 1 нмоль аминокислоты с учетом неполноты деградации и вымывания пептида. Здесь и на рис. 3—7 светлый профиль — включение трития, заштрихованный — содержание ^{14}C .

Рис. 3. Распределение радиоактивности по аминокислотным остаткам во фрагменте $\text{Gly}^{73}\text{—Thr}^{89}$ [$^3\text{H}/^{14}\text{C}$]бактериородопсина. (Здесь и на рис. 4—7 данные приведены с учетом неполноты деградации и вымывания пептида)

остаток, необходимо контролировать полноту отщепления, а также возможное вымывание пептида из секвенатора в ходе деградации. С этой целью в качестве «внутреннего» репера мы использовали изотоп ^{14}C : большая часть исследований выполнена на пурпурных мембранах, полученных смешением биосинтетических препаратов бактериородопсина, содержащих ^{14}C -меченые остатки изолейцина, тирозина и пролина или фенилаланина [13].

При разделении фрагментов, полученных после бомбардировки тритием пурпурных мембран, предварительно подвергнутых ограниченному протеолизу под действием папаина (рис. 1), обращает на себя внимание тот факт, что радиоактивность фракции I примерно в 4 раза выше, чем фракции II. Это означает, что в расчете на один аминокислотный остаток во фрагмент $\text{Gly}^{73}\text{—Gly}^{231}$ в среднем включается примерно в 1,5 раза больше трития, чем во фрагмент $\text{Pe}^4\text{—Gly}^{65}$. По-видимому, во фрагменте $\text{Gly}^{73}\text{—Gly}^{231}$ выше относительная доля экспонированных остатков, доступных для трития.

Сопоставление уровней ^{14}C для остатков Pe^4 , Pro^8 и Pe^{11} на кривой распределения радиоактивности при автоматической деградации пептида $\text{Pe}^4\text{—Gly}^{65}$, содержащего остатки [^{14}C]изолейцина и [^{14}C]пролина (рис. 2*a*), показывает, что вследствие неполноты отщепления на каждом шаге абсолютное количество аминокислот при последующих стадиях деградации уменьшается. С другой стороны, наличие значительной ^{14}C -радиоактивности в таких положениях, как Gly^6 и Glu^9 , по-видимому, связано также и с более сильным вымыванием пептида на этих шагах. На основании определения ^{14}C , а также результатов «холостых шагов» (проводившихся без добавления фенилизотиоцианата после каждых 3—6 циклов деградации) данные рис. 2*a* о включении трития представлены в виде графика (2*b*), в котором учтены неполнота деградации и вымывание пептида. Характерной особенностью этого графика является высокое включение ^3H в остатки $\text{Trp}^{10}\text{—Pe}^{11}\text{—Trp}^{12}$ и спад радиоактивности для следующих за ними остатков. Одно из возможных объяснений такого монотонно-

то уменьшения радиоактивности состоит в том, что анализируемый участок полипептидной цепи все больше погружается в толщу мембраны, становясь менее доступным для трития.

Распределение радиоактивности на участке Gly⁷³—Thr⁸⁹, установленное при деградации по Эдману фрагмента Gly⁷³—Gly²³¹, имеет достаточно сложный вид (рис. 3): падение на участке Gly⁷³—Gln⁷⁵, возрастание для остатков Pro⁷⁷ и особенно Tyr⁷⁹, а затем четко выраженный спад вплоть до остатка Thr⁸⁹. Уменьшение включения трития хорошо прослеживается при сопоставлении «одноименных» остатков Tyr⁷⁹ и Tyr⁸³, Trp⁸⁰ и Trp⁸⁶, Ala⁸¹ и Ala⁸⁴. В данном случае есть все основания полагать, что уменьшение включения трития после Tyr⁷⁹ отражает все возрастающую удаленность остатков от поверхности мембраны. При этом, например, радиоактивность остатка Thr⁸⁹, который должен находиться в толще мембраны, существенно ниже, чем остатка Gly⁷³, расположенного на поверхности мембраны (о таком расположении свидетельствует доступность связи Gly⁷²—Gly⁷³ для папаина). С другой стороны, обращает на себя внимание тот факт, что включение трития в Gly⁷³ почти не отличается от включения в Ala⁸¹, который должен располагаться внутри мембраны. Аналогичную ситуацию можно было видеть на рис. 2б, где включение трития во фрагменты Thr⁵—Gly⁶ и Gly¹⁶—Thr¹⁷ было практически одинаковым. Очевидно, фрагменты, не лежащие внутри мембраны, оказываются частично экранированы вследствие наличия определенной вторичной структуры или взаимодействий с другими экспонированными из мембраны фрагментами полипептидной цепи. С другой стороны, радиоактивность внутримембранных фрагментов может быть несколько завышенной, если в процессе бомбардировки тритием часть молекул бактериородопсина подвергается денатурации. На данном этапе трудно однозначно интерпретировать абсолютные уровни включенного трития, но выраженное падение радиоактивности в пределах достаточно длинных фрагментов указывает на возрастающую удаленность последующих остатков от поверхности мембраны.

Наиболее протяженный участок полипептидной цепи (24 остатка) был проанализирован при деградации фрагмента Phe¹⁵⁶—Ser²⁴⁸, выделенного после бомбардировки тритием пурпурных мембран, предварительно расщепленных боргидридом натрия. На рис. 4 хорошо видно резкое снижение радиоактивности после Ser¹⁶⁹, т. е. следующий за этим остатком участок цепи, вплоть до Val¹⁷⁹, по-видимому, расположен внутри мембраны. Хотя остатки Phe¹⁵⁶ (доступный для боргидрида натрия [9] и моноклональных антител [7]) и Ser¹⁶²—Met¹⁶³ (связь, доступная для папаина при больших нагрузках фермента [5]) находятся вне мембраны, в целом фрагмент Phe¹⁵⁶—Ser¹⁶⁹ не является полностью экспонированным, о чем свидетельствуют данные о включении трития.

Поскольку в пептидах Phe⁴—Gly⁶⁵ и Gly⁷³—Gly²³¹ при деградации по Эдману удалось проанализировать включение трития лишь в первые 17 остатков, для получения информации об остальных участках цепи эти пептиды подвергали дальнейшему расщеплению до более коротких фрагментов. Так, фрагмент Phe⁴—Gly⁶⁵ обрабатывали бромцианом и после разделения гидролизата с помощью ВЭЖХ полученные пептиды Gly²¹—Hse³², Gly³³—Hse⁵⁶, Tyr³⁷—Hse⁶⁰ и Leu⁶¹—Gly⁶⁵ подвергали ступенчатой деградации.

В пептиде Gly²¹—Hse³² на первых семи шагах (Gly²¹—Phe²⁷) не наблюдается существенных отличий в распределении трития по аминокислотным остаткам (данные не приведены). Резкое (в 20—50 раз) возрастание радиоактивности на восьмом и девятом шагах (Leu²⁸—Val²⁹) и вновь резкий спад на последующих шагах (Lys³⁰, Gly³¹, Hse³²) дает основание полагать, что пентапептид Leu²⁸—Hse³² вымылся на восьмом и девятом шагах из реактора секвенатора. Поскольку средняя радиоактивность в расчете на один аминокислотный остаток пептида Leu²⁸—Hse³² на порядок выше, чем для последовательности Gly²¹—Phe²⁷, можно предположить, что в области остатков Leu²⁸—Hse³² находится «выход» полипептидной цепи из мембраны.

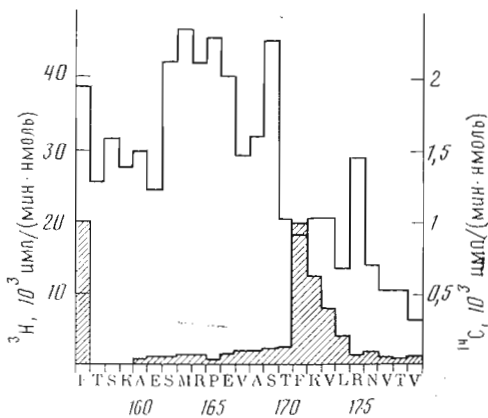


Рис. 4

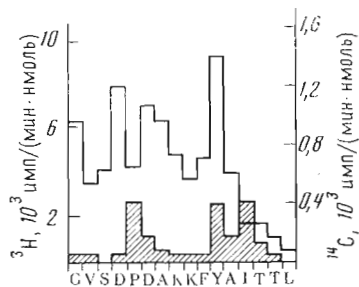


Рис. 5

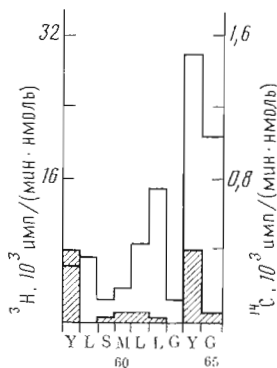


Рис. 6

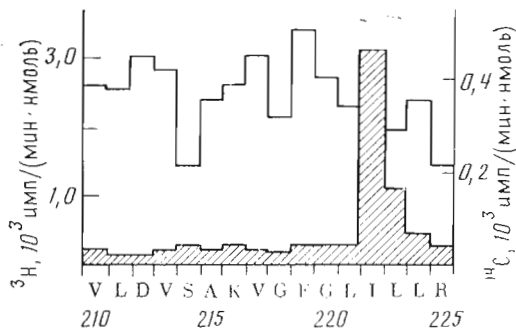


Рис. 7

Рис. 4. Распределение радиоактивности по аминокислотным остаткам во фрагменте Phe¹⁵⁶–Val¹⁷⁹ [³H/¹⁴C]бактериородопсина. Бомбардировке тритием подвергали расщепленный боргидридом натрия препарат бактериородопсина, содержащий ¹⁴C-меченый фенилаланин

Рис. 5. Распределение радиоактивности по аминокислотным остаткам во фрагменте Gly³³–Leu⁴⁸ [³H/¹⁴C]бактериородопсина

Рис. 6. Распределение радиоактивности по аминокислотным остаткам во фрагменте Thr⁵⁷–Gly⁶⁵ [³H/¹⁴C]бактериородопсина

Рис. 7. Распределение радиоактивности по аминокислотным остаткам во фрагменте Val²¹⁰–Arg²²⁵ [³H/¹⁴C]бактериородопсина

В пептиде Gly³³–Hse⁵⁶ включение трития проанализировано на участке Gly³³–Leu⁴⁸ (рис. 5). Радиоактивность падает после остатка Gly³³, возрастает на участке Ser³⁵–Asp³⁶, после чего идет достаточно равномерный спад с единственным «выбросом»: значительное количество трития включается в остаток Thr⁴³. Ранее было показано, что остатки Phe⁴² и Asp³⁶ и/или Asp²⁸ экспонированы, поскольку моноклональное антитело, в состав антигенной детерминанты которого они входят, связывается с пурпурными мембранами [7]. С этим результатом согласуется обнаруженная в настоящей работе экспонированность остатка Thr⁴³. По-видимому, фрагмент Ala¹⁴–Leu⁴⁸ находится внутри мембраны, так как спад радиоактивности здесь наиболее резкий и по абсолютной величине включение трития в такие остатки, как Thr¹⁷ и Leu⁴⁸, не превышает 10–15% от включения в Gly³³ или Asp³⁶. Наблюдаемые изменения радиоактивности на участке Gly³³–Phe⁴² свидетельствуют об определенных ограничениях доступности ряда остатков этого фрагмента, соединяющего внутримембранные α-спиральные сегменты и имеющего «примембранное» расположение.

Следует отметить, что анализ включения трития в пептиды Ile⁴–Gly⁶⁵, Gly³³–Hse⁵⁶ и Phe¹⁵⁶–Ser²⁴⁸ проводили дважды на образцах, полученных в двух независимых опытах. При этом имела место хорошая воспроизво-

димось результатов, профили распределения радиоактивности по аминокислотным остаткам в основном совпадали.

Анализ радиоактивности, включенной в пептиды Tyr⁵⁷—Hse⁶⁰ и Leu⁶¹—Gly⁶⁵, проводили с помощью ручного варианта метода Эдмана с идентификацией аминокислот в виде 1-диметиламинонафталин-5-сульфонильных производных (рис. 6). В целом в пределах последовательности Tyr⁵⁷—Gly⁶⁵ включение трития возрастает и достигает наибольших значений для остатков Tyr⁶⁴ и Gly⁶⁵. Анализ результатов здесь достаточно прост, поскольку во фрагменте Tyr⁵⁷—Gly⁶⁵ содержатся три группы одинаковых остатков (Tyr⁵⁷ и Tyr⁶⁴; Leu⁵⁸, Leu⁶¹ и Leu⁶²; Gly⁶³ и Gly⁶⁵), в каждой из которых четко прослеживается возрастание включения трития. Это возрастание, по-видимому, является следствием того, что полипептидная цепь из толщи мембраны приближается к ее поверхности и, наконец, такие остатки, как Tyr⁶⁴ и Gly⁶⁵, выходят на поверхность. Такая интерпретация согласуется с имеющимися экспериментальными данными: расщепление пептидом связи, образованной карбоксильной группой остатка Gly⁶⁵, означает, что этот остаток не должен быть погружен в мембрану, а экспонированность Tyr⁶⁴ подтверждается результатами химической модификации [15].

После расщепления фрагмента Gly⁷³—Gly²³¹ бромцианом в индивидуальном виде был выделен пептид Val²¹⁰—Gly²³¹ и с помощью автоматической деградации по Эдману определено включение трития в сегмент Val²¹⁰—Arg²²⁵. Распределение радиоактивности достаточно равномерно во всех остатках этого сегмента (рис. 7): так, например, уровень включения трития в остатки Val²¹⁰, Val²¹³ и Val²¹⁷ или Leu²¹¹, Leu²²¹, Leu²²³ и Leu²²⁴ почти одинаков. При этом абсолютные величины содержания трития имеют тот же порядок или несколько ниже, чем для внутримембранных остатков (например, Ala⁴⁴, Ile⁴⁵, Leu⁵⁸) в аналогичным образом полученных бромциановых пептидах, относящихся к N-концевой части молекулы (рис. 5, 6). Во всех существующих моделях укладки полипептидной цепи бактериородопсина фрагменту Val²¹⁰—Arg²²⁵ приписывается внутримембранное расположение (С-концевой «столб» в модели семи α -спиральных сегментов). В этом смысле отсутствие «всплесков» радиоактивности в пределах данной последовательности согласуется с такими моделями. При этом, однако, неясно, почему по мере приближения к остатку Arg²²⁵ в направлении выхода цепи из мембраны не происходит увеличения включения трития подобно тому, что наблюдалось во фрагменте Tyr⁵⁷—Gly⁶⁵.

Тот факт, что внутримембранные остатки, удаленные от поверхности мембраны не менее чем на 5 Å (т. е. на величину, существенно превышающую ожидаемую длину свободного пробега атомов трития), все-таки включают определенное количество трития, объясняется, по-видимому, тем, что содержания липидов в пурпурной мембране (~10 молекул на 1 молекулу белка) [12] недостаточно для того, чтобы сделать внутримембранные участки полипептидной цепи полностью недоступными для трития.

Профили включения трития легче было бы интерпретировать в терминах погруженности или экспонированности полипептидной цепи из мембраны, если бы было точно известно, как включение зависит от природы аминокислотных остатков. К сожалению, имеющиеся в литературе данные для водорастворимых белков противоречивы [4, 2], однако сопоставление включения радиоактивности в одинаковые аминокислотные остатки, входящие в состав анализируемого пептида, позволяет установить, какой из одноименных остатков более экспонирован. Если число одинаковых остатков достаточно велико, можно сделать выводы и о характере доступности протяженных участков полипептидной цепи, что в свою очередь дает информацию о топографии полипептидной цепи в мембране.

Для того чтобы подтвердить, что наблюдаемые зависимости включения трития отражают реальное расположение полипептидной цепи бактериородопсина в мембране, мы подвергли действию атомарного трития (в тех же условиях, что и пурпурные мембраны) делинидированные фрагменты Ile⁴—Gly⁶⁵ и Gly⁷³—Gly²³¹. Последующая хроматография показала, что в результате действия трития в полипептидных цепях этих фрагментов

появились дополнительные участки расщепления. Отсутствие обнаруживаемых N-концевых групп свидетельствовало о дезаминировании остатков Phe^4 , Gly^{73} , а также α -аминогрупп образовавшихся более коротких фрагментов. Свободные N-концевые α -аминогруппы не были обнаружены и после действия бромциана на выделенные пептиды, что указывает на деструкцию остатков метионина. Очевидно, для того чтобы получить данные о распределении трития в свободном пептиде, необходимо подобрать более мягкие условия для реакции с тритием. Проведенный опыт наглядно иллюстрирует значительный экранирующий («защитный») эффект, оказываемый липидами на полипептидную цепь. Поскольку для пурпурных мембран, в которых полипептидная цепь бактериородопсина была предварительно подвергнута протеолизу или действию NaNH_2 , мы не наблюдали появления новых участков расщепления или новых видов химической деградации при действии термически активированного трития, можно сделать вывод, что даже внемембранные участки полипептидной цепи бактериородопсина (доступные для протеолиза, боргидрида натрия или антител) в мембранных препаратах в какой-то степени оказываются экранируемыми. Такое заключение позволяет понять, почему в большинстве случаев не наблюдалось резкого различия в уровне включения трития в экспонированные остатки и остатки, лежащие внутри мембраны, но достаточно близко к ее поверхности.

На рис. 8 в схематическом виде показано расположение ряда фрагментов полипептидной цепи бактериородопсина в мембране по данным метода тритиевой планиграфии. В целом эта модель согласуется с данными других методов [7]. При этом полученные нами результаты свидетельствуют о большей длине фрагментов, соединяющих внутримембранные α -спиральные сегменты, чем предполагалось в более ранних моделях укладки полипептидной цепи [16, 17]. Следует обратить внимание также на расположение остатков Trp^{10} и Trp^{12} вблизи поверхности, а не в толще мембраны. Характерной особенностью предложенной нами модели является частично экранированное расположение фрагментов, которые не входят в состав внутримембранных α -спиральных сегментов.

Здесь уместно отметить, что локализация внутри или снаружи мембраны экспериментально доказана лишь для сравнительно небольшого числа аминокислотных остатков бактериородопсина, а заключения о расположении и протяженности трансмембранных фрагментов в значительной мере зависят от выбранного способа предсказания таких структур. Полученные нами данные находятся в хорошем соответствии с моделью, недавно предложенной на основе теоретических соображений [18], в которой, в частности, первый (N-концевой) α -спиральный сегмент начинается с остатка Trp^{12} , второй — с остатка Phe^{45} , а между пятым и шестым сегментами находится протяженный соединяющий фрагмент $\text{Ser}^{158} - \text{Val}^{177}$.

Хотя данные о распределении трития в полипептидной цепи получены при исследовании высушенных препаратов пурпурных мембран, предварительно подвергнутых ограниченному расщеплению, есть все основания полагать, что представленная на рис. 8 схема справедлива и для нативного бактериородопсина. Об этом свидетельствует, во-первых, разумное согласие полученных нами экспериментальных результатов с данными других методов. Во-вторых, проведенные нами недавно опыты (результаты будут опубликованы отдельно) по бомбардировке тритием замороженных водных суспензий нативных пурпурных мембран показали, в частности, что распределение трития в пределах последовательности аминокислотных остатков 4—65 в целом такое же, как установленное в данной работе. Как и следовало ожидать, различия касаются включения в остатки, вблизи которых проводится расщепление. Например, при действии активированного трития на интактные мембраны распределение трития в последовательности 57—65 имеет тот же вид, что и на рис. 6, однако включение в остатки Trp^{64} и Gly^{65} уже не столь резко отличается от включения в предыдущие остатки.

Таким образом, в настоящем исследовании получены новые экспериментальные данные об укладке полипептидной цепи бактериородопсина,

а также показана принципиальная возможность применения метода тритиевой планиграфии для исследования топографии мембранных белков. Для того чтобы с помощью этого подхода, не опираясь на другие методы, можно было надежно устанавливать расположение полипептидных цепей мембранных белков, необходимы дальнейшие исследования, которые позволили бы оценить влияние на включение трития различных факторов: природы аминокислотных остатков, амфифильности спиралей, плотности упаковки внутримембранных фрагментов, содержания и природы липидов, входящих в состав мембраны.

Авторы выражают благодарность Н. Б. Левиной за ценные советы и Е. В. Ножевниковой за помощь в получении меченных тритием препаратов бактериородопсина.

Экспериментальная часть

Нативные пурпурные мембраны и ^{14}C -меченные препараты бактериородопсина получали по методике [13]. Препараты пурпурных мембран содержали меченные ^{14}C остатки изолейцина, тирозина и пролина с радиоактивностью 0,18 Ки/моль аминокислоты или фенилаланина с радиоактивностью 0,45 Ки/моль аминокислоты.

Расщепление пурпурной мембраны папаином или боргидридом натрия проводили как описано в работах [5] или [9] соответственно.

Для термической активации газообразного трития использовали установку, аналогичную описанной в работе [1]. Водную суспензию расщепленных пурпурных мембран с концентрацией 6,7 мг/мл равномерно наносили на лист фильтровальной бумаги размером 22×10 см, который предварительно промывали смесью хлороформ — метанол (1:1), содержащей 0,2% трифторуксусной кислоты (система А). Бумагу тщательно высушивали и затем выстилали ею стенки реакционного сосуда, который вакуумировали до $5 \cdot 10^{-3}$ Торр. Затем напускали 3,7 ГБк (100 мКи) $^3\text{H}_2$ («Изотоп», СССР) и на вольфрамовую нить, расположенную внутри сосуда, подавали напряжение, нагревая ее до 2200 К в течение 10 с при одновременном охлаждении сосуда снаружи жидким азотом. После откачивания до $5 \cdot 10^{-3}$ Торр сосуд заполняли воздухом, отсоединяли от установки и полученные меченые препараты смывали с бумаги системой А. Растворитель упаривали на ротационном испарителе, остаток растворяли в системе А и вновь упаривали. Эту операцию повторяли до достижения постоянного уровня радиоактивности растворенного вещества.

Выделение пептидов после действия термически активированного трития. Пептиды $\text{Phe}^4\text{-Gly}^{65}$ и $\text{Gly}^{73}\text{-Gly}^{231}$, а также пептиды $\text{Glp}^1\text{-Gly}^{155}$ и $\text{Phe}^{156}\text{-Ser}^{248}$ выделяли гель-хроматографией на сефадексе LH-60 (колонка 1×80 см) в системе этанол — муравьиная кислота (7:3). Дополнительно лабильный тритий удаляли гель-хроматографией фрагментов на сефадексе LH-20 (колонка 1×80 см) в системе А.

Фрагменты $\text{Phe}^4\text{-Gly}^{65}$ и $\text{Gly}^{73}\text{-Gly}^{231}$, содержащие изотопы ^{14}C и ^3H , подвергали бромцаноповому расщеплению в 70% муравьиной кислоте по стандартной методике [14, 15]. Полученные пептиды выделяли с помощью ВЭЖХ на колонке Nucleosil₇C8 в системе, описанной в работе [9]. Все полученные пептиды охарактеризованы N-концевым анализом, который проводили по методике [19].

Радиоактивность измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике SL-9800 (Beckman, США), используя сцинтилляционные смеси Unisolv I или Supersolv X (Koch-Light Laboratories, Англия). Радиоактивность измеряли одновременно для ^3H и ^{14}C в двух специально подобранных каналах.

Дегградация пептидов после действия термически активированного трития. Пептиды $\text{Phe}^4\text{-Gly}^{65}$, $\text{Gly}^{73}\text{-Gly}^{231}$, $\text{Phe}^{156}\text{-Ser}^{248}$, $\text{Gly}^{21}\text{-Hse}^{32}$, $\text{Gly}^{33}\text{-Hse}^{56}$ и $\text{Val}^{210}\text{-Gly}^{231}$ подвергали дегградации на секвенсаторе Beckman 890 C (США) по стандартной белковой программе с использованием полибрена и 0,1 М квадрола, при этом определялась радиоактивность на каждом шаге. Перед началом дегградации пептид в реакторе секвенсатора 3 раза промывали всеми растворителями и реагентами, используемыми при дегградации, не добавляя фенилизотиоцианат. Аналогичную операцию проводили через каждые 3–6 циклов дегградации. Такие «холостые» шаги при построении кривой распределения радиоактивности позволили учесть влияние вымывания из реактора той части пептида, у которой была закрыта N-концевая α -аминогруппа.

Количество пептида при дегградации определяли, исходя из количественной оценки фенилтиогидантоиновых производных на отдельных шагах и по содержанию ^{14}C на шагах, соответствующих фенилтиогидантоиновым производным изолейцина, тирозина, пролина или фенилаланина.

Анализ радиоактивности, включенной в пептиды $\text{Tyr}^{57}\text{-Hse}^{60}$ и $\text{Leu}^{61}\text{-Gly}^{65}$, проводили с помощью ручного варианта метода Эдмана с идентификацией аминокислот в виде 1-диметиламинонафталин-5-сульфонильных (Dns) производных по методике [20]. В этом случае «холостые» шаги делались перед началом и через каждые два шага дегградации. После каждой ступени дегградации отбиралась аликвота оставшегося пептида и при помощи ВЭЖХ на колонке (4,6×250 мм) Ultrasphere ODS (5 мкм) определялось количество Dns-производного N-концевой аминокислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шишков А. В., Нейман Л. А., Смоляков В. С. // Успехи химии. 1984. Т. 53. Вып. 7. С. 1125-1151.
2. Нейман Л. А., Смоляков В. С., Шишков А. В. Радиопозитронные методы в физико-химической биологии. Использование реакций атомарного трития. М.: ВИНТИ, 1985. 208 с.
3. Курятов А. Б., Шемякин В. В., Антропова Л. П. // 16-я Конф. ФЕБО. Тез. докл. М., 1984. С. 335.
4. Курятов А. Б., Арсеньев А. С., Аленычева Т. Н., Нейман Л. А., Цетлин В. И. Международный симпозиум «Ретинопальсодержащие белки». Тез. докл. М., 1986. С. 76-77.
5. Ovchinnikov Yu. A. // FEBS Lett. 1982. V. 148. № 2. P. 179-191.
6. Stoerkenius W. // TIBS. 1985. V. 10. № 12. P. 483-486.
7. Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Vasilov R. G., Vturina I. Yu., Kuryatov A. B., Kiselev A. V. // FEBS Lett. 1985. V. 179. № 2. P. 343-350.
 8. Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Ovchinnikov Yu. A., Drachev L. A., Kaulen A. D., Khitrina L. V., Skulachev V. P. // FEBS Lett. 1978. V. 90. № 2. P. 190-194.
9. Цетлин В. И., Закус В. И., Алдашев А. А., Курятов А. Б., Овечкина Г. В., Шныров В. Л. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 12. С. 1589-1605.
10. Korenstein R., Hess B. // FEBS Lett. 1977. V. 82. № 1. P. 7-11.
11. Lazarev Yu. A., Terpigov E. L. // Biochim. et biophys. acta. 1980. V. 590. № 3. P. 324-338.
12. Henderson R. // J. Mol. Biol. 1975. V. 93. № 2. P. 123-138.
13. Курятов А. Б., Овечкина Г. В., Аленычева Т. Н., Минаева Л. П., Цетлин В. И. // Биоорг. химия. 1984. Т. 10. № 3. С. 333-340.
14. Gerber G. E., Anderegg R. J., Herlihy W. C., Gray C. P., Biemann K., Khorana H. G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979. V. 76. № 1. P. 227-231.
15. Lemke H. D., Bergmeyer J., Straub J., Oesterheld D. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 16. P. 9384-9388.
16. Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Lobanov N. A. // FEBS Lett. 1979. V. 100. № 2. P. 219-224.
17. Engelman D. M., Henderson R., McLachlan A. D., Wallace B. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. № 4. P. 2023-2027.
18. Mohana Rao J. K., Argos P. // Biochim. et biophys. acta, 1986. V. 869. № 2. P. 197-214.
19. Levina N. B., Nasimov I. V. // J. Chromatogr. 1984. V. 286. P. 207-216.
20. Гринкевич В. А., Арзамасова И. М., Потапенко Н. А., Гринкевич Х. А., Кравченко З. Б., Фейгина М. Ю., Алданова Н. А. // Биоорг. химия. 1979. Т. 5. № 12. С. 1757-1774.

Поступила в редакцию
16.IX.1986

TRITIUM PLANIGRAPHY STUDY ON THE BACTERIORHODOPSIN TOPOGRAPHY

ALYONYCHEVA T. N., KURYATOV A. B., ANTROPOVA L. P., SHEMYAKIN V. V.,
NEIMAN L. A., TSETLIN V. I., IVANOV V. T.

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

The applicability of the tritium planigraphy for studying the membrane protein topography has been demonstrated using bacteriorhodopsin as an example. Purple membranes were subjected to limited cleavage with papain or sodium borohydride and then treated with thermally activated tritium gas. The tritium content in the large peptide fragments 4-65, 73-231, and 156-248 was determined at each step of Edman degradation. Shorter peptides (21-32, 33-56, 57-60, 61-65, and 210-231) obtained by the cyanogen bromide cleavage of the fragments 4-65 and 73-231 were analysed in a similar manner. The above studies were carried out with ¹⁴C-selectively labelled bacteriorhodopsin derivatives which facilitated monitoring the Edman degradation and tritium quantitation in the specified amino acid residues. Tritium planigraphy allows one to distinguish the intramembrane amino acid residues and the polypeptide sequences lying out of the membrane or close to its surface. The differences in the tritium accessibility were observed within the fragments that are not intramembraneous. On the basis of the results obtained a model was proposed that described folding of certain regions of the bacteriorhodopsin polypeptide chain.