



УДК 577.322.5 : 543.422.25

© 1993 И. В. Масленников, А. С. Арсеньев,  
Л. Д. Чикин, А. Т. Кожич, В. Т. Иванов

## 2D-<sup>1</sup>H-ЯМР-ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИИ ТРАНСМЕМБРАННЫХ СЕГМЕНТОВ С, E и G БАКТЕРИОРОДОПСИНА

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва

При помощи двумерной спектроскопии <sup>1</sup>H-ЯМР исследована конформация синтетических фрагментов С (остатки 67—106), E (128—162) и G (190—233) бактериородопсина *Halobacterium halobium*, солюбилизованных в смеси хлороформ — метанол (1 : 1) с 0,1 М LiClO<sub>4</sub>. Полное отнесение сигналов в спектрах ЯМР проведено с использованием спектров DQF-COSY, TOCSY и NOESY. В спектрах NOESY идентифицированы ядерные эффекты Оверхаузера между протонами. Определены амидные группы с замедленной скоростью обмена протонов на дейтерий растворителя. Анализ полученных данных показал, что пептиды имеют конформации правых α-спиралей на участках 77—101 (сегмент С), 131—159 (E) и 198—227 (G).

В состав бактериородопсина (BR) — белка пурпурной мембраны *Halobacterium halobium* [1, 2] — входит одна полипептидная цепь из 248 остатков и ретинальный хромофор, связанный с остатком лизина-216 [3]. Реконструкция пространственной структуры по данным электронной криомикроскопии (ЭКМ) показала, что почти перпендикулярно плоскости мембраны расположены семь α-спиральных областей, которые соотнесены с аминокислотной последовательностью BR [4]. Однако достигнутого электронной микроскопией разрешения (3,5 Å в плоскости параллельной поверхности мембраны и 10 Å в направлении, перпендикулярном поверхности мембраны) недостаточно для выяснения тонких деталей пространственной структуры BR.

Методы двумерной <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии эффективны для изучения пространственной структуры пептидов и небольших белков как в водном растворе, так и в условиях, имитирующих гидрофобную среду биологических мембран (мицеллы или органические растворители). Показано [5], что BR, солюбилизованный в смеси хлороформ — метанол, сохраняет вторичную структуру нативного белка в пурпурной мембране и обладает специфической третичной структурой. Более того, индивидуальные фрагменты BR, выделенные после расщепления полипептидной цепи, сохраняют в этой смеси органических растворителей конформацию, характерную для интактной молекулы [5, 6].

Эти наблюдения позволяют предложить следующую схему «модульной сборки» пространственной структуры мембранных белков. Конформации α-спиральных фрагментов определяют независимо с помощью конформационного анализа на

Список сокращений: BR — бактериородопсин; sC, сегмент С — [Nle<sup>68</sup>]бактериоопсин-(67—106)-полипептид; sE, сегмент E — [Nle<sup>145</sup>]бактериоопсин-(128—162)-полипептид; sG, сегмент G — [Nle<sup>209</sup>]бактериоопсин-(190—233)-полипептид; SDS — додецилсульфат натрия; ЭКМ — электронная криомикроскопия; 2D-ЯМР — двумерный ЯМР; ЯЭО — ядерный эффект Оверхаузера; DQF-COSY — корреляционная спектроскопия с двухквантовым фильтром; TOCSY — тотальная корреляционная спектроскопия; NOESY — спектроскопия ЯЭО.

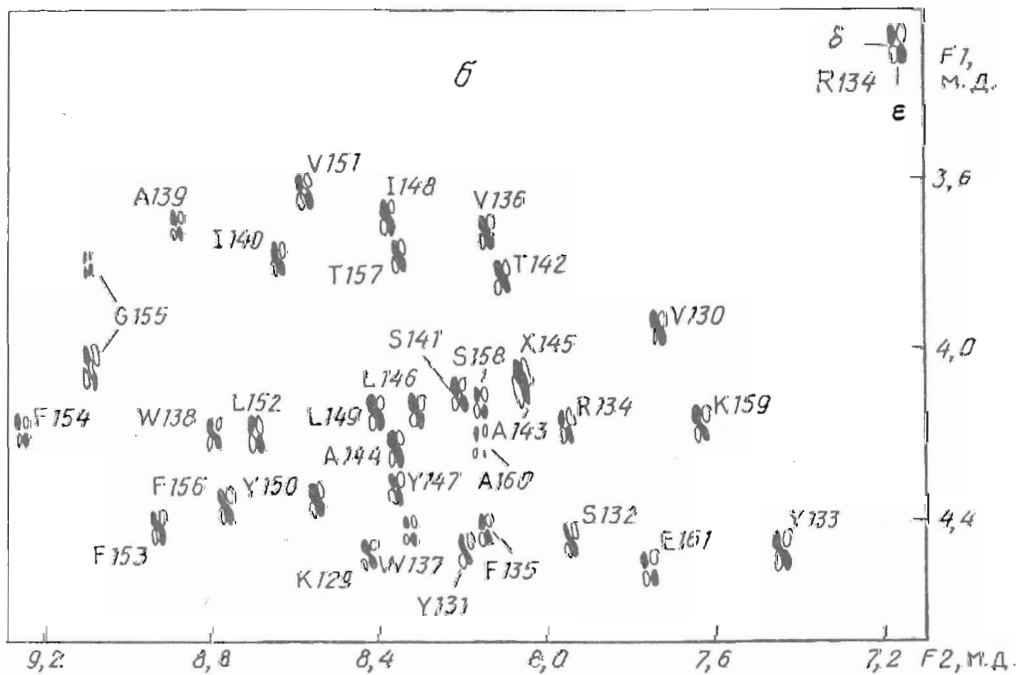
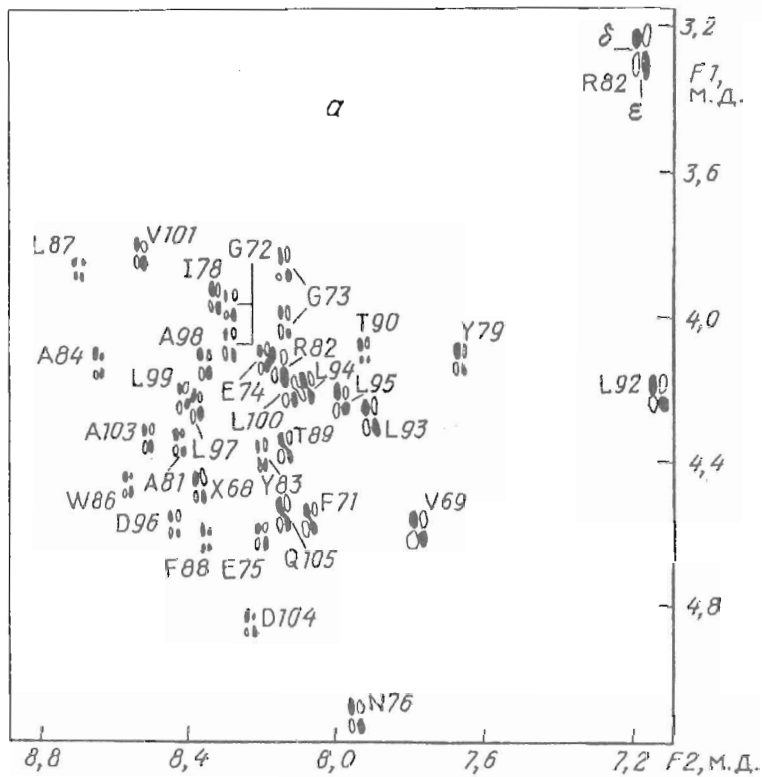


Рис. 1а,б

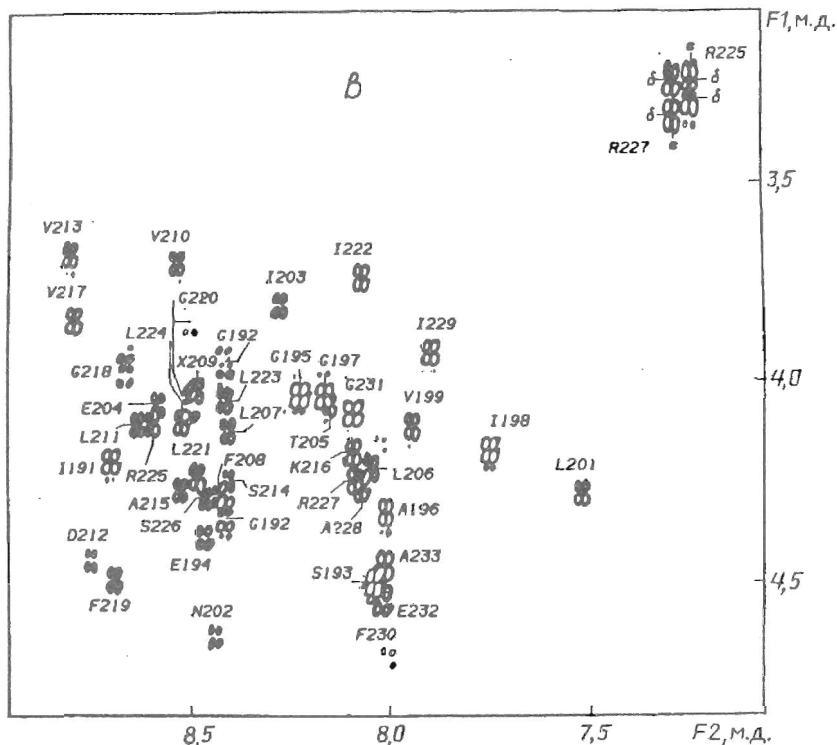


Рис. 1. NH/C $\alpha$ H-область DQF — COSY-спектров [Nle<sup>68</sup>]бактериоопсин-(67—106)-полипептида ( $\omega_1 = 7,10$ — $8,90$  м. д.,  $\omega_2 = 3,15$ — $5,20$  м. д.) (а), [Nle<sup>145</sup>]бактериоопсин-(128—162)-полипептида ( $\omega_1 = 7,10$ — $9,30$  м. д.,  $\omega_2 = 3,20$ — $4,70$  м. д.) (б) и [Nle<sup>209</sup>]бактериоопсин-(190—233)-полипептида ( $\omega_1 = 7,05$ — $8,90$  м. д.,  $\omega_2 = 3,10$ — $4,85$  м. д.) (в), солюбилизованных в смеси хлороформ — метанол (1 : 1) с 0,1 М LiClO<sub>4</sub>, при 30° С. Показано отнесение кросс-пиков NH/C $\alpha$ H

основе данных 2D-ЯМР, а пространственную упаковку фрагментов осуществляют с использованием данных ЯМР и ЭПР (см., например, [6]) и ЭКМ о контактах между спиралями. Дополнительно к экспериментальным данным можно учесть стерические ограничения, критерии компактной упаковки, результаты минимизации конформационной энергии и некоторые априорные соображения.

К настоящему времени проведен первичный анализ данных ЯМР и охарактеризованы конформации протеолитических фрагментов BP2 (остатки 163—231, соответствующие трансмембранным спиральям F и G) [7] и C2 (остатки 1—71, спиральи A и B) [8], фрагмента A (остатки 1—36) [9], синтетических аналогов трансмембранных сегментов B (остатки 34—65) [10], D (102—136) [11] и G (205—231) [12], солюбилизованных в смеси хлороформ — метанол, а также фрагмента A (1—36) [9] и синтетического аналога сегмента B [13], встроенных в мицеллы додецилсульфата натрия. По данным <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии рассчитаны конформации трансмембранного сегмента B, солюбилизованного в смеси хлороформ — метанол [14] и встроенного в мицеллы SDS [15], фрагмента A в растворе и в мицеллах SDS [16] и протеолитического фрагмента BP2, солюбилизованного в смеси хлороформ — метанол [17].

В настоящей работе проведено полное отнесение сигналов в спектрах <sup>1</sup>H-ЯМР синтетических трансмембранных сегментов C (в дальнейшем sC, остатки 67—106), E (sE, 128—162) и G (sG, 190—233) бактериоопсина, солюбилизованных в смеси хлороформ — метанол (1 : 1) с 0,1 М LiClO<sub>4</sub>. Наблюдаемые контакты ЯЭО и времена обмена амидных протонов NH на дейтерий растворителя определяют пространственную структуру пептидов как правые  $\alpha$ -спирали на центральных

C

70    75    80    85    90    95    100    105  
 ↓    ↓    ↓    ↓    ↓    ↓    ↓    ↓  
 TKVPFGGEQNPFIYWARYADWLF<sup>□</sup>TP<sup>□</sup>LLLLLDLALLVDADQG



E

130   135   140   145   150   155   160  
 ↓    ↓    ↓    ↓    ↓    ↓    ↓  
 TKVYSYR<sup>□□□□□□□□□□</sup>FWWAISTAAXLYILV<sup>□□□□□□□□□□</sup>LVFFGFTSKAES



G

190   195   200   205   210   215   220   225   230  
 ↓    ↓    ↓    ↓    ↓    ↓    ↓    ↓  
 LICSEGAGIVPLNIETLL<sup>□□□□□□□□□□</sup>FXVLDV<sup>□□□□□□□□□□</sup>SALVGFGLYLLRSRAIFGEA



участках и более подвижные на N- и C-концах. Проведено сравнение определенных по данным  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии структур трансмембранных сегментов BR, в различных средах, моделирующих мембранное окружение (смесь хлороформ — метанол, мицеллы SDS) [7—17], с ЭКМ-структурой BR [4].

После растворения пептидов в смеси хлороформ — метанол и инкубации в течение 24 ч при комнатной температуре были получены 2D-спектры, фрагменты которых приведены на рис. 1. Инкубация способствует достижению конформационной однородности пептидов в растворе.

Для выделения спиновых систем протонов отдельных аминокислотных остатков использовали спектры DQF-COSY и TOCSY. Отнесение сигналов к определенному положению остатков в первичной структуре было выполнено посредством анализа  $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ -,  $d_{\beta\text{N}}(i, i+1)$ - и  $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ -связей ЯЭО между амидным протоном  $(i+1)$ -го остатка и соответственно протонами  $\text{C}^\alpha\text{H}$ ,  $\text{C}^\beta\text{H}$  и NH предыдущего по аминокислотной последовательности  $i$ -го остатка [18]. Полное отнесение сигналов получено в основном при анализе  $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ - и  $d_{\beta\text{N}}(i, i+1)$ -связей. Найденные ЯЭО-контакты суммированы на рис. 2, а химические сдвиги сигналов протонов сегментов C, E и G представлены в табл. 1—3.

#### *Трансмембранный сегмент C — [Nle<sup>68</sup>]бактериоопсин-(67—106)-полипептид*

Наличие большого количества остатков лейцина, а также их локализация на коротком участке полипептидной цепи (на участке Pro-91 — Leu-100 семь остатков лейцина) сильно усложнили процедуру отнесения сигналов.  $d(i, i+1)$ -Связи между парами остатков Leu-94/Leu-95 и Ala-99/Leu-100 не идентифицированы из-за перекрывания сигналов в спектрах. Отсутствуют  $d(i, i+1)$ -связи между парами остатков Pro-77/Ile-78 и Gln-105/Gly-106. Из-за сильного перекрывания сигналов в  $\text{C}^\alpha\text{H}$ -области спектров NOESY выявлено лишь пять  $d_{\alpha\text{N}}(i, i+3)$ - и две  $d_{\alpha\text{N}}(i, i+4)$ -связи (контакты ЯЭО между протонами  $\text{C}^\alpha\text{H}$   $i$ -го и NH  $(i+3)$ - или  $(i+4)$ -го остатков соответственно; рис. 2 C, табл. 1).

Анализ однозначно идентифицированных контактов ЯЭО позволяет сделать вывод о том, что структура sC близка к  $\alpha$ -спиральной. По-видимому,  $\alpha$ -спиральный участок начинается с остатка Pro-77 и заканчивается остатком Val-101. На этом участке не наблюдается каких-либо кросс-пиков, противоречащих конформации  $\alpha$ -спирали. Замедленные скорости обмена амидных протонов NH остатков Trp-80 — Ala-84 и Trp-86 — Val-101 на дейтерий растворителя (время полуобмена не менее 10 ч для остатков Arg-82 и Leu-92 и не менее 25 ч для остальных остатков этого участка) подтверждают наличие  $\alpha$ -спирали начиная с CO-группы остатка Asn-76 и заканчивая NH-группой остатка Val-101. Исключение составляет протон NH остатка Asp-85, быстро обменивающийся с растворителем.

#### *Трансмембранный сегмент E — [Nle<sup>145</sup>]бактериоопсин-(128—162)-полипептид*

При использованных температурах не удалось идентифицировать  $d(i, i+1)$ -связи между остатками 128/129 и 161/162, что, по-видимому, вызвано большой подвижностью концевых остатков молекулы, а также между остатками 130/131 из-за перекрывания кросс-пиков.

Рис. 2. Аминокислотные последовательности синтетических аналогов сегментов C, E и G бактериоопсина и  $d$ -связи с участием протонов NH,  $\text{C}^\alpha\text{H}$  и  $\text{C}^\beta\text{H}$  ( $\text{C}^\beta\text{H}_2$ -протоны остатков пролина рассматривались как NH-протоны). Использовано однобуквенное обозначение аминокислотных остатков, X — остаток норлейцина. Цифры соответствуют номеру остатка в аминокислотной последовательности BR. Толщина линий, отвечающих  $d$ -связям, характеризует интенсивности (сильные, средние и слабые) соответствующих кросс-пиков в спектрах NOESY. Кругжками отмечены ЯЭО-связи, присутствие которых в спектре вызывало сомнение. Остатки с замедленной и промежуточной скоростью обмена амидных протонов NH на дейтерий отмечены соответственно черными и пустыми квадратами над аминокислотной последовательностью

Таблица 1

Химические сдвиги сигналов протонов ( $\delta$  ( $\pm 0,01$ ), м.д.) [ $^{68}\text{Me}$ ] бактериоопсин-(67-106)-полипептида (сегмент С) в смеси хлороформ-метанол (1:1) с 0,1 М  $\text{LiClO}_4$  при 30°C

Остаток	NH	$\text{C}^\alpha\text{H}$	$\text{C}^\beta\text{H}$	Другие протоны
Thr-67	-	3,96	4,31	$\text{C}^\gamma\text{H}_3$ 1,46
Nle-68	8,37	4,44	1,85; 2,00	$\text{C}^\gamma\text{H}_2$ 1,46; 1,46 $\text{C}^\delta\text{H}_2$ 1,53; 1,53 $\text{C}^\epsilon\text{H}_3$ 1,11
Val-69	7,78	4,54	2,17	$\text{C}^\gamma\text{H}_3$ 1,08; 1,08
Pro-70		4,38	2,03; 2,23	$\text{C}^\gamma\text{H}_2$ 2,03; 2,14 $\text{C}^\delta\text{H}_2$ 3,72; 3,91
Phe-71	8,06	4,51	3,27; 3,33	$\text{C}^\delta\text{H}_2$ 7,36; $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ 7,36 $\text{C}^\zeta\text{H}$ 7,36
Gly-72	8,28	3,92; 4,03		
Gly-73	8,13	3,82; 3,97		
Glu-74	8,18	4,08	2,17; 2,45	$\text{C}^\gamma\text{H}_2$ 2,30; 2,49
Gln-75	8,21	4,55	2,23; 2,23	$\text{C}^\gamma\text{H}_2$ 2,39; 2,50 $\text{N}^\epsilon\text{H}_2$ 6,59; 7,41
Asn-76	7,94	5,08	2,94; 3,22	$\text{N}^\delta\text{H}_2$ 6,62; 7,89
Pro-77		4,44	2,14; 2,21	$\text{C}^\gamma\text{H}_2$ 2,25; 2,56 $\text{C}^\delta\text{H}_2$ 4,09; 4,25
Ile-78	8,32	3,91	2,13	$\text{C}^\gamma\text{H}_2$ 1,80; 2,45 $\text{C}^\gamma\text{H}_3$ 1,05; $\text{C}^\delta\text{H}_3$ 1,05
Tyr-79	7,66	4,08	3,13; 3,13	$\text{C}^\delta\text{H}$ 6,59; $\text{C}^\epsilon\text{H}$ 6,43
Trp-80	7,54	4,59	3,43; 3,65	$\text{N}^{\epsilon 1}\text{H}$ 10,52; $\text{C}^{\delta 1}\text{H}$ 7,49 $\text{C}^{\epsilon 3}\text{H}$ 7,58; $\text{C}^{\zeta 3}\text{H}$ 7,28 $\text{C}^{\eta}\text{H}$ 7,05; $\text{C}^{\zeta 2}\text{H}$ 7,80
Ala-81	8,42	4,29	1,72	
Arg-82	8,15	4,10	1,92; 2,04	$\text{C}^\gamma\text{H}_2$ 1,70; 1,95 $\text{C}^\delta\text{H}_2$ 3,26; 3,26 $\text{N}^\epsilon\text{H}$ 7,18
Tyr-83	8,19	4,33	2,98; 3,10	$\text{C}^\delta\text{H}_2$ 7,20; $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ 6,89
Ala-84	8,64	4,09	1,74	
Asp-85	8,47	4,69	3,05; 3,25	
Trp-86	8,54	4,43	3,45; 3,67	$\text{N}^{\epsilon 1}\text{H}$ 9,96; $\text{C}^{\delta 1}\text{H}$ 7,27 $\text{C}^{\epsilon 3}\text{H}$ 7,58; $\text{C}^{\zeta 3}\text{H}$ 7,15 $\text{C}^{\eta}\text{H}$ 7,26; $\text{C}^{\zeta 2}\text{H}$ 7,49
Leu-87	8,69	3,84	1,52; 1,81	$\text{C}^\gamma\text{H}$ 1,63 $\text{C}^\delta\text{H}_3$ 0,92; 0,92
Phe-88	8,35	4,64	3,32; 3,44	$\text{C}^\delta\text{H}_2$ 7,36; $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ 7,36 $\text{C}^\zeta\text{H}$ 7,36
Thr-89	8,14	3,97	4,31	$\text{C}^\gamma\text{H}_3$ 1,46
Thr-90	7,91	4,05	4,21	$\text{C}^\gamma\text{H}_3$ 1,17
Pro-91		4,24	1,91; 2,46	$\text{C}^\gamma\text{H}_2$ 2,03; 2,29 $\text{C}^\delta\text{H}_2$ 3,66; 3,73

Таблица 1 (окончание)

Leu-92	7,13	4,17	1,80; 2,01	$C^{\gamma}H$ 1,89
				$C^{\delta}H_3$ 1,07; 1,07
Leu-93	7,91	4,21	1,88; 1,96	$C^{\gamma}H$ 1,85
				$C^{\delta}H_3$ 1,08; 1,08
Leu-94	8,08	4,15	1,94; 1,97	$C^{\gamma}H$ 1,70
				$C^{\delta}H_3$ 1,04; 1,04
Leu-95	7,98	4,18	1,89; 2,04	$C^{\gamma}H$ 1,70
				$C^{\delta}H_3$ 1,05; 1,05
Asp-96	8,44	4,58	2,92; 3,30	
Leu-97	8,37	4,18	1,94; 1,98	$C^{\gamma}H$ 1,95
				$C^{\delta}H_3$ 1,07; 1,07
Ala-98	8,35	4,08	1,71	
Leu-99	8,41	4,17	2,05; 2,17	$C^{\gamma}H$ 1,70
				$C^{\delta}H_3$ 1,05; 1,09
Leu-100	8,12	4,16	1,94; 2,03	$C^{\gamma}H$ 1,70
				$C^{\delta}H_3$ 1,06; 1,06
Val-101	8,53	3,79	2,25	$C^{\gamma}H_3$ 1,09; 1,21
Asp-102	8,55	4,61	2,99; 3,24	
Ala-103	8,51	4,28	1,69	
Asp-104	8,23	4,85	3,12; 3,12	
Gln-105	8,15	4,49	2,24; 2,60	$C^{\gamma}H_2$ 2,43; 2,60
				$N^{\epsilon}H_2$ 6,49; 7,55
Gly-106	8,19	3,96; 4,15		

Вторичная структура *sE*, полученная из сравнения экспериментальных и ожидаемых для разных типов вторичных структур *d*-связей [19, 20], близка к канонической  $\alpha$ -спирали ( $\varphi = -57^\circ$ ,  $\psi = -47^\circ$ ).  $\alpha$ -Спиральный участок начинается с остатка Tyr-131 (характерные кросс-пики NH(Tyr-131)/NH(Ser-132) и  $C^{\alpha}H$ (Tyr-131)/ $C^{\beta}H_2$ (Arg-134)) и заканчивается остатком Lys-159 (кросс-пики NH(Lys-159)/NH(Ala-160) и  $C^{\beta}H_2$ (Lys-159)/NH(Ala-160)). На этом участке не наблюдается каких-либо кросс-пигов, противоречащих конформации  $\alpha$ -спирали (рис. 2E). Замедленные скорости обмена амидных протонов NH остатков Arg-134 — Lys-159 на дейтерий растворителя (время полуобмена не менее 70 ч для участка Arg-134 — Tyr-138 и не менее 150 ч для участка Ala-139 — Lys-159) подтверждают наличие  $\alpha$ -спирали начиная с CO-группы остатка Val-130 и заканчивая NH-группой остатка Lys-159. При этом стабильный участок  $\alpha$ -спирали составляют остатки Phe-135 — Lys-159.

#### Трансмембранный сегмент G — [Nle<sup>209</sup>]бактериоопсин-(190—233)-полипептид

Во всех полученных спектрах *sG* не выявлены сигналы от протонов N-концевого остатка Leu-190. Для двух остатков — Ile-191 и C-концевого Ala-233 — не обнаружены ЯЭО-контакты с протонами других остатков. Из-за перекрывания кросс-пигов в спектрах NOESY не идентифицированы однозначно *d*(*i*, *i* + 1)-связи между следующими парами остатков: Phe-208/Nle-209, Gly-220/Leu-221, Leu-224/Arg-225 и Arg-227/Ala-228 (рис. 2G).

Исследованный нами ранее [12] укороченный аналог трансмембранного сегмента G — [Nle<sup>209</sup>]бактериоопсин-(205—231)-полипептид, имеет конформацию стабильной  $\alpha$ -спирали на участке Leu-207 — Arg-227, причем N-концевые остатки имели тенденцию продолжать  $\alpha$ -спираль. На C-конец молекулы наблюдались по крайней мере два состояния, одно из которых близко к  $\alpha$ -спиральной конформации и стабилизируется солевой связью между гуанидиновой группой боковой цепи

Таблица 2

Химические сдвиги сигналов протонов ( $\delta$  ( $\pm 0,01$ ), м.д.) [ $\text{Nle}^{145}$ ] бактериоопсин-(I28-I62)-полипептида (сегмент E) в смеси хлороформ-метанол (1:1) с  $\text{O}_2$  в  $\text{LiClO}_4$  при  $30^\circ\text{C}$

Остаток	NH	$\text{C}^\alpha\text{H}$	$\text{C}^\beta\text{H}$	Другие протоны
Thr-128		4,15	4,59	$\text{C}^\gamma\text{H}_3$ 1,51
Lys-129	8,42	4,50	1,99; 1,99	$\text{C}^\gamma\text{H}_2$ 1,63; 1,73 $\text{C}^\delta\text{H}_2$ 1,90; 1,90 $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ 3,16; $\text{N}^\zeta\text{H}_3$ 7,73
Val-130	7,73	3,98	2,17	$\text{C}^\gamma\text{H}_3$ 1,02; 1,12
Tyr-131	8,14	4,45	3,26; 3,26	$\text{C}^\delta\text{H}_2$ 7,26; $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ 6,91
Ser-132	7,94	4,47	4,13; 4,17	
Tyr-133	7,44	4,51	3,23; 3,23	$\text{C}^\delta\text{H}_2$ 7,23; $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ 6,87
Arg-134	7,94	4,20	2,03; 2,03	$\text{C}^\gamma\text{H}_2$ 1,77; 1,90 $\text{C}^\delta\text{H}_2$ 3,30; 3,30 $\text{N}^\epsilon\text{H}$ 7,15
Phe-135	8,18	4,50	3,32; 3,46	$\text{C}^\delta\text{H}_2$ 7,39; $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ 7,39 $\text{C}^\zeta\text{H}$ 7,39
Val-136	8,13	3,75	2,39	$\text{C}^\gamma\text{H}$ 1,13; 1,35
Trp-137	8,32	4,45	3,43; 3,55	$\text{N}^{\epsilon 1}\text{H}$ 9,76; $\text{C}^{\delta 1}\text{H}$ 7,11 $\text{C}^{\eta 3}\text{H}$ 7,66; $\text{C}^{\zeta 3}\text{H}$ 7,11 $\text{C}^{\eta}\text{H}$ 7,26; $\text{C}^{\zeta 2}\text{H}$ 7,50
Trp-138	8,79	4,23	3,51; 3,69	$\text{N}^{\epsilon 1}\text{H}$ 9,89; $\text{C}^{\delta 1}\text{H}$ 7,28 $\text{C}^{\epsilon 3}\text{H}$ 7,52; $\text{C}^{\zeta 1}\text{H}$ 7,11 $\text{C}^{\eta}\text{H}$ 7,26; $\text{C}^{\zeta 2}\text{H}$ 7,50
Ala-139	8,88	3,73	1,53	
Ile-140	8,64	3,81	1,94	$\text{C}^\gamma\text{H}_2$ 1,32; 1,87 $\text{C}^\gamma\text{H}_3$ 1,01; $\text{C}^\delta\text{H}_3$ 0,88
Ser-141	8,21	4,12	3,67; 3,87	
Thr-142	8,10	3,85	3,96	$\text{C}^\gamma\text{H}_3$ 1,14
Ala-143	8,05	4,12	1,66	
Ala-144	8,36	4,25	1,67	
Nle-145	8,06	4,10	2,05; 2,12	$\text{C}^\gamma\text{H}_2$ 1,46; 1,49 $\text{C}^\delta\text{H}_2$ 1,05; 1,05 $\text{C}^\epsilon\text{H}_3$ 1,65
Leu-146	8,31	4,17	1,69; 2,06	$\text{C}^\gamma\text{H}$ 2,04 $\text{C}^\delta\text{H}_3$ 1,02; 1,02
Tyr-147	8,36	4,35	3,30; 3,44	$\text{C}^\delta\text{H}_2$ 7,17; $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ 6,83
Ile-148	8,38	3,71	2,27	$\text{C}^\gamma\text{H}_2$ 1,44; 2,13 $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ 1,13; $\text{C}^\delta\text{H}_3$ 1,08
Leu-149	8,41	4,17	2,12; 1,73	$\text{C}^\gamma\text{H}$ 1,50 $\text{C}^\delta\text{H}_3$ 1,07; 1,07
Tyr-150	8,55	4,38	3,37; 3,37	$\text{C}^\delta\text{H}_2$ 7,18; $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ 6,81
Val-151	8,58	3,64	2,32	$\text{C}^\gamma\text{H}_2$ 0,96; 1,08
Leu-152	8,69	4,22	1,66; 2,15	$\text{C}^\gamma\text{H}$ 1,47 $\text{C}^\delta\text{H}_3$ 1,03; 1,03
Phe-153	8,92	4,44	3,29; 3,40	$\text{C}^{\delta\text{Phe} 2}$ 7,18; $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ 7,18 $\text{C}^\zeta\text{H}$ 7,18



Таблица 2 (окончание)

Phe-154	9,25	4,21	3,13; 3,25	$\delta_{\text{C}^{\text{H}}_2}$ 7,35; $\epsilon_{\text{C}^{\text{H}}_2}$ 7,35 $\zeta_{\text{C}^{\text{H}}}$ 7,35
Gly-155	9,09	3,83; 4,05		
Phe-156	8,76	4,39	3,24; 3,35	$\delta_{\text{C}^{\text{H}}_2}$ 7,33; $\epsilon_{\text{C}^{\text{H}}_2}$ 7,33 $\zeta_{\text{C}^{\text{H}}}$ 7,33
Thr-157	8,35	3,80	4,08	$\gamma_{\text{H}_3}$ 1,19
Ser-158	8,16	4,15	3,78; 3,95	
Lys-159	7,63	4,21	2,01; 2,01	$\gamma_{\text{H}_2}$ 1,49; 1,58 $\delta_{\text{C}^{\text{H}}_2}$ 1,56; $\epsilon_{\text{C}^{\text{H}}_2}$ 3,05 $\zeta_{\text{C}^{\text{H}}}$ 7,69
Ala-160	8,15	4,21	1,47	
Glu-161	7,76	4,54	2,17; 2,41	$\gamma_{\text{H}_2}$ 2,55; 2,64
Ser-162	8,25	3,74	3,87; 3,87	

остатка Arg-227 и С-концевой карбоксильной группой, а другое не имеет упорядоченной структуры [12]. Было сделано предположение, что [Nle<sup>209</sup>]бактериоопсин-(205—231)-полипептид несколько короче с N-конца по сравнению с  $\alpha$ -спиральным участком соответствующего ему трансмембранного сегмента G.

Полученные в настоящей работе данные однозначно определяют конформацию sG как  $\alpha$ -спираль, начинающуюся с CO-группы остатка Ile-198 и заканчивающуюся N<sup>o</sup>H-группой остатка Arg-227. Практически для всех остатков данного участка имеются  $d(i, i+3, 4)$ -связи (из-за перекрывания сигналов в алифатической области спектров не обнаружены подобные ЯЭО-контакты для остатков Leu-211, Val-217 и Leu-224). Замедленная скорость обмена амидных протонов NH на участке Ile-203 — Arg-227 на дейтерий растворителя (больше 150 мин для остатков Ile-203, Glu-204, Asp-212, Arg-227 и больше 250 мин на участках Thr-205 — Leu-211 и Val-213 — Ser-226) свидетельствует об образовании внутримолекулярных водородных связей между этими протонами и CO-группами остатков Val-199 — Leu-223 соответственно (рис. 2G).

Согласно данным дейтериеобмена,  $\alpha$ -спиральный участок на N-конце sG должен оканчиваться CO-группой остатка Val-199, однако наличие контактов C<sup>o</sup>H(Ile-198)/C<sup>o</sup>H<sub>2</sub>(Leu-201), C<sup>o</sup>H(Ile-198)/NH(Leu-201) и C<sup>o</sup>H(Val-199)/C<sup>o</sup>H<sub>2</sub>(Asn-202) указывает на конформацию, близкую к  $\alpha$ -спиральной, по крайней мере начиная с остатка Ile-198.

В отличие от хорошо определяемой конформации центральной части sG сложнее охарактеризовать конформацию N-концевых остатков Leu-190 — Gly-197. Отсутствие ЯЭО-контактов для остатков 190 и 191 свидетельствует об их высокой подвижности. Примерно равная интенсивность  $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ - и  $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ -контактов и полное отсутствие ЯЭО-контактов средней дальности на участке 192—195 указывают на неупорядоченную конформацию. Для остатков Ala-196 — Gly-197 не исключена конформация изгиба типа I' (торсионные углы  $\varphi_1 = +60^\circ$ ,  $\psi_1 = +30^\circ$ ,  $\varphi_2 = +90^\circ$  и  $\psi_2 = 0^\circ$ ) [21], поскольку кроме  $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ - и  $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ -связей наблюдаются также  $d_{\alpha\text{N}}(i, i+2)$ - и  $d_{\alpha\text{N}}(i, i+3)$ -связи.

Большое число перекрытых кросс-пиков для протонов С-концевой части sG не позволяет охарактеризовать конформацию участка Ala-228 — Ala-233. Не наблюдается также характерного для пептида бактериоопсин-(205—231) смещения сигнала от протонов N<sup>o</sup>H(Arg-227) в слабое поле, вызванного образованием солевой связи между гуанидиновой группой боковой цепи остатка Arg-227 и С-концевой карбоксильной группой [12].

Таблица 3

Химические сдвиги сигналов протонов ( $\delta$  ( $\pm 0,01$ ), м.д.) [Nle<sup>209</sup>]бактериоопсин-(190-233)-полипептида, в смеси хлороформ-метанол (1:1) с 0,1 M LiClO<sub>4</sub> при 30°C

Остаток	NH	C <sup><math>\alpha</math></sup> H	C <sup><math>\beta</math></sup> H	Другие протоны
Leu-190	-	-		
Ile-191	8,69	4,19	2,05	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>2</sub> 1,40; 1,79 C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>3</sub> 1,14; C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 1,10
Gly-192	8,41	3,97; 3,97		
Ser-193	8,04	4,50	3,97; 3,97	
Glu-194	8,48	4,04	2,27; 2,27	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>2</sub> 2,61; 2,61
Gly-195	8,25	4,04; 4,04		
Ala-196	8,03	4,35	1,62	
Gly-197	8,18	4,05; 4,05		
Ile-198	7,78	4,20	2,09	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>2</sub> 1,45; 1,71 C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>3</sub> 1,11; C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 1,11
Val-199	7,95	4,14	2,48	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>3</sub> 1,12; 1,25
Pro-200		4,40	2,08; 2,44	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>2</sub> 2,10; 2,37 C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>2</sub> 3,98; 3,78
Leu-201	7,56	4,29	1,85	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 1,86 C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 1,06; 1,06
Asn-202	8,44	4,65	2,91; 3,23	N <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>2</sub> 6,54; 7,52
Ile-203	8,28	3,85	2,11	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>2</sub> 1,35; 1,79 C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>3</sub> 1,08; C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 0,98
Glu-204	8,56	4,08	2,30; 2,40	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>2</sub> 2,52; 2,65
Thr-205	8,18	4,08	4,52	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>3</sub> 1,43
Leu-206	8,06	4,23	1,96; 1,96	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 1,96 C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 1,09; 1,09
Leu-207	8,41	4,14	1,80; 1,80	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 1,83 C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 1,09; 1,09
Phe-208	8,44	4,30	3,43; 3,43	C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>2</sub> 7,40; C <sup><math>\epsilon</math></sup> H <sub>2</sub> 7,40 C <sup><math>\zeta</math></sup> H 7,40
Nle-209	8,49	4,05	2,11; 2,22	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>2</sub> 1,51; 1,80 C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>2</sub> 1,05; C <sup><math>\epsilon</math></sup> H <sub>2</sub> -
Val-210	8,53	3,73	2,41	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>3</sub> 1,10; 1,27
Leu-211	8,63	4,12	1,72; 2,02	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 1,10 C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 1,01; 1,01
Asp-212	8,74	4,46	2,84; 2,95	
Val-213	8,79	3,72	2,31	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>3</sub> 1,13; 1,26
Ser-214	8,42	4,25	4,27; 4,32	
Ala-215	8,53	4,27	1,68	
Lys-216	8,12	4,18	2,09; 2,25	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>2</sub> 1,60; 1,94 C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>2</sub> 1,83; 1,83 C <sup><math>\epsilon</math></sup> H <sub>2</sub> 3,12; 3,12 N <sup><math>\zeta</math></sup> H <sub>3</sub> 7,43
Val-217	8,77	3,87	2,34	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>3</sub> 1,11; 1,24
Gly-218	8,67	3,90; 3,98		
Phe-219	8,69	4,49	3,36; 3,44	C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>2</sub> 7,38; C <sup><math>\epsilon</math></sup> H <sub>2</sub> 7,38 C <sup><math>\zeta</math></sup> H 7,38

Таблица 3 (окончание)

Gly-220	8,50	3,87; 4,05		
Leu-221	8,49	4,25	2,20; 1,65	$C^{\gamma}H$ 2,11 $C^{\delta}H_3$ 1,04; 1,04
Ile-222	8,10	3,77	2,18	$C^{\gamma}H_2$ 1,27; 1,98 $C^{\gamma}H_3$ 1,03; $C^{\delta}H_3$ 1,02
Leu-223	8,40	4,06	1,94; 1,94	$C^{\gamma}H$ 1,67 $C^{\delta}H_3$ 0,93; 0,93
Leu-224	8,53	4,12	1,83; 2,00	$C^{\gamma}H$ 1,84 $C^{\delta}H_3$ 1,04; 1,04
Arg-225	8,59	4,12	1,97; 2,09	$C^{\gamma}H_2$ 1,86; 1,97 $C^{\delta}H_2$ 3,29; 3,34 $N^{\epsilon}H$ 7,29
Ser-226	8,46	4,29	4,13; 4,13	
Arg-227	8,10	4,26	1,98; 2,14	$C^{\gamma}H_2$ 1,92; 1,99 $C^{\delta}H_2$ 3,29; 3,37 $N^{\epsilon}H$ 7,34
Ala-228	8,09	4,28	1,66	
Ile-229	7,90	3,96	1,86	$C^{\gamma}H_2$ 1,26; 1,65 $C^{\gamma}H_3$ 0,68; $C^{\delta}H_3$ 0,91
Phe-230	8,01	4,72	3,13; 3,46	$C^{\delta}H_2$ 7,47; $C^{\epsilon}H_2$ 7,47 $C^{\zeta}H$ 7,47
Gly-231	8,11	4,09; 4,09		
Glu-232	8,02	4,55	2,15; 2,34	$C^{\gamma}H_2$ 2,56; 2,64
Ala-233	8,01	4,46	1,57	

#### Остатки пролина в бактериородопсине

В состав BR входят 11 остатков пролина. Остаток Pro-8 находится в N-концевой части молекулы, Pro-236 и Pro-238 — на подвижном C-концевом участке молекулы. По данным ЭКМ, остатки 37, 70, 77, 165 и 200 расположены на петлях, соединяющих  $\alpha$ -спиральные участки. Три остатка пролина (50, 91 и 186) находятся в  $\alpha$ -спиральных сегментах (B, C и F соответственно) [4]. Известно, что присутствие остатка пролина вносит искажения в  $\alpha$ -спиральную структуру пептидов, поскольку атомы пролинового кольца наталкиваются на атомы боковой цепи предыдущего остатка [22] и на атомы предыдущего витка спирали. Эти искажения сводятся к изменению торсионных углов  $\varphi$  и  $\psi$  основной цепи на витке спирали, содержащем остаток пролина, и к нехарактерной для  $\alpha$ -спирали ориентации группы NH остатка, следующего за пролином по аминокислотной последовательности [14, 15].

Особенностью трансмембранного сегмента C является наличие трех остатков пролина (70, 77 и 91). Все они имеют *транс*-конфигурацию пептидной связи Хаа-Pro, о чем свидетельствуют интенсивные кросс-пики  $C^{\alpha}H(Val-69)/C^{\delta}H_2(Pro-70)$  и  $C^{\alpha}H(Asn-76)/C^{\delta}H_2(Pro-77)$ , а также наблюдаемая картина ЯЭО-контактов с участием протонов Pro-90. Остаток Pro-70 расположен на N-концевом участке sC с неупорядоченной структурой, Pro-77 терминирует  $\alpha$ -спираль, поскольку наблюдается интенсивный кросс-пик  $C^{\alpha}H(Asn-76)/C^{\delta}H_2(Pro-77)$  (угол  $\psi$  остатка Asn-76 при этом составляет  $\approx 120^\circ$ ). Таким образом,  $\alpha$ -спираль начинается с CO-группы основной цепи остатка Asn-76, участвующей в образовании водородной связи с протоном NH остатка Trp-80. Уменьшенная скорость обмена амидных протонов NH остатков Ile-78 и Trp-79 на дейтерий свидетельствует об участии этих протонов в образовании водородной связи с CO-группой боковой цепи

остатка Asn-76. Таким образом, на участке Asn-76 — Ile-78 реализуется Asx-изгиб, топологически эквивалентный  $\beta$ -изгибу [23].

Остаток Pro-91 расположен на участке стабильной  $\alpha$ -спирали. Присутствие Pro-91 приводит к несколько ускоренному обмену протона NH остатка Leu-92 на дейтерий (рис. 2С), а также к смещению сигнала от этого же протона в сильное поле — его химический сдвиг составляет 7,13 м. д. (до ближайшего сигнала от протона NH — 0,4 м. д., табл. 1).

Эффект смещения химического сдвига протона NH послепролинового остатка выявлен и при исследовании пространственной структуры других трансмембранных сегментов BR. Химический сдвиг протона NH остатка Ala-51, следующего за Pro-50, равен 7,47 м. д. для протеолитического фрагмента C2 [8], 7,44 м. д. для сегмента B в среде хлороформ — метанол [10] и 7,23 м. д. в мицеллах SDS [13]. Химический сдвиг протона NH остатка Val-187 протеолитического фрагмента BP2 составляет 7,37 м. д. [7]. Все перечисленные остатки находятся внутри  $\alpha$ -спиральных областей непосредственно за остатками пролина. Отметим отсутствие данного эффекта у послепролиновых остатков, не находящихся в  $\alpha$ -спиральной конформации — Asp-38 (8,13 м. д. [8], 8,18 м. д. [10], 8,66 м. д. [13]), Phe-71 (8,06 м. д., табл. 1), Ile-78 (8,32 м. д., табл. 1).

Роль остатков пролина в формировании пространственной структуры трансмембранных сегментов BR сводится к следующему. Остатки Pro-77 и Pro-200 терминируют  $\alpha$ -спиральные участки на N-концах sC и sG. Остаток Pro-91 находится в средней части  $\alpha$ -спирали sC и вызывает ее изгиб, так же как остаток Pro-50 в sB [14, 15] и остаток Pro-186 в BP2 [17].

#### Сравнение с результатами других работ

Молекула BR образует семь протяженных  $\alpha$ -спиральных участков, пронизывающих мембрану [4]. Ранее по данным спектроскопии ЯМР были определены структуры пяти из них (спиралей A [8, 9], B [8, 10, 13], D [11], F и G [7]). Определив в настоящей работе вторичную структуру синтетических аналогов оставшихся двух спиралей C и E, мы тем самым завершаем серию работ, посвященных первичному анализу пространственной структуры трансмембранных сегментов BR, солюбилизованных в смеси хлороформ—метанол, методом спектроскопии ЯМР.

На рис. 3 показана локализация участков регулярной вторичной структуры трансмембранных сегментов BR, определенная по данным спектроскопии  $^1\text{H}$ -ЯМР в средах, имитирующих мембранное окружение белка. Для сравнения приведены участки  $\alpha$ -спиральной структуры, соответствующие наиболее точной на сегодняшний день ЭКМ-модели структуры BR [4]. Участки стабильной  $\alpha$ -спирали сегментов A, B, C, E, F и G, полученные с помощью ЯМР-спектроскопии, практически совпадают с  $\alpha$ -спиральными участками BR, определенными по данным ЭКМ (рис. 3). Различия в определении  $\alpha$ -спирального участка трансмембранного сегмента D и небольшое расхождение на N-концевом участке  $\alpha$ -спирали сегмента C, по-видимому, объясняются недостаточно высоким разрешением метода ЭКМ.

$\alpha$ -Спиральный участок sC на N-конце терминируется Asx-изгибом (остатки Asn-76 — Pro-77 — Ile-78, см. выше). Известно, что Asx-изгиб довольно часто встречается в водорастворимых белках [23]. Участки такой конформации найдены и в молекуле белка из фотосинтетического реакционного центра галофильных бактерий [24]. По-видимому, и в нативном BR реализуется Asx-изгиб, терминирующий с N-конца  $\alpha$ -спиральный участок трансмембранного сегмента C. Реализация другой конформации, при которой  $\alpha$ -спираль продолжается до остатка Gln-75, маловероятна. Скорее всего авторы работы [4] ошибочно отнесли наблюдаемую от боковой цепи остатка Asn-76 электронную плотность к основной цепи остатка Gln-75.

N-Концевые участки  $\alpha$ -спиралей sE и sG, определенные по данным ЯМР,

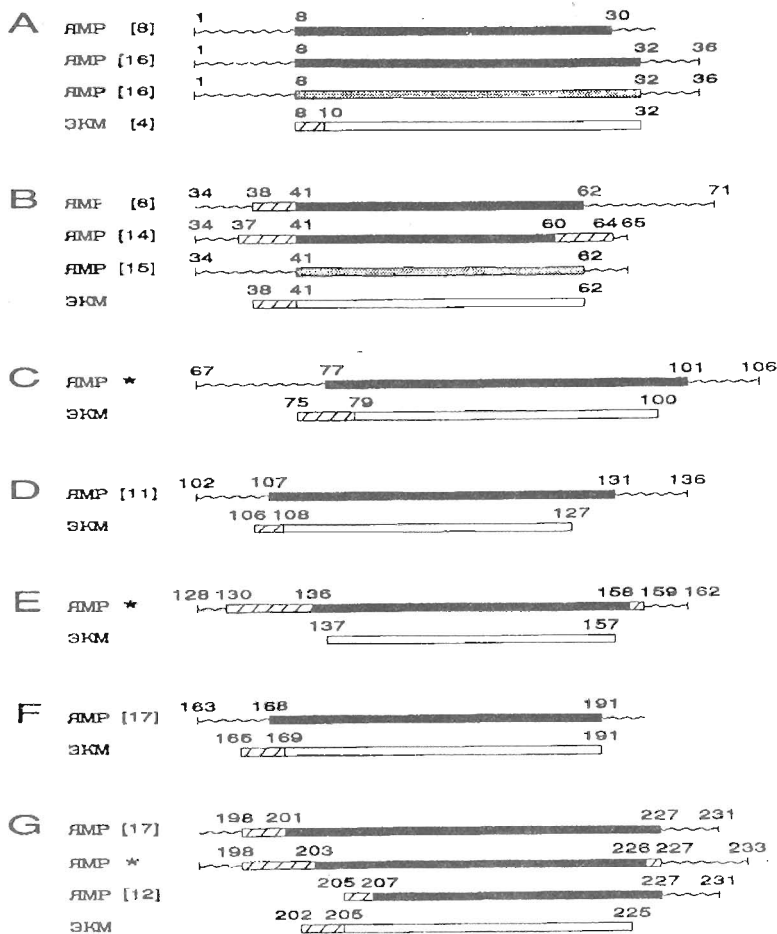


Рис. 3. Сравнение вторичной структуры трансмембранных сегментов BR, определенной по данным  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии (ЯМР) в смеси хлороформ—метанол (черные прямоугольники) и в мицеллах SDS (серые прямоугольники), с ЭКМ-моделью BR. В квадратных скобках даны номера ссылок на работы, в которых определено положение  $\alpha$ -спиралей. Пептиды, вторичная структура которых определена в настоящей работе, помечены звездочками. Прямоугольниками обозначены участки стабильной  $\alpha$ -спирали. Заштрихованы  $\alpha$ -спиральные участки, характеризующиеся ускоренным обменом амидных протонов NH (ЯМР-структура) или низкой электронной плотностью (ЭКМ-структура). Волнистой линией обозначены участки неупорядоченной структуры

соответственно на 6 и 5 остатков длиннее, чем в ЭКМ-структуре: таким образом, аминокислотная последовательность на участках Val-130 — Phe-135 (петля DE) и Ile-198 — Asn-202 (FG) BR предполагает возможность реализации  $\alpha$ -спиральной конформации. По данным ЯМР (рис. 3),  $\alpha$ -спираль на С-конце sD перекрывается с первым витком  $\alpha$ -спирали sE (остатки Val-130 и Tyr-131). Результаты исследования методом ЭПР спин-меченых мутантных аналогов BR показали, что остатки 129—131 составляют короткую перемычку между спиралями D и E [25]. Известно также, что полипептидная цепь петли DE подвергается протеолитическому расщеплению только при очень жестких условиях [26], а доступны для химической модификации лишь остатки Tyr-131 и Tyr-133 [27]. Полипептидная цепь петли FG недоступна для протеолиза, и неизвестны способы химической модификации аминокислотных остатков этого участка.

Исходя из вышеизложенного можно сделать вывод, что перемычку между сегментами D и E составляют всего несколько остатков (3—4), причем в этом

случае у нее должна быть довольно жесткая структура [28]. Перемычка FG несколько длиннее (8 остатков), причем остатки 195—196, возможно, образуют изгиб типа I' (см. выше). По-видимому, оба участка не экспонированы в межклеточное пространство, а, скорее, расположены на поверхности мембраны.

### Заключение

<sup>1</sup>H-ЯМР-анализ трансмембранных сегментов C, E и G бактериородопсина, солюбилизированных в смеси хлороформ — метанол (1 : 1) с 0,1 М LiClO<sub>4</sub>, показал, что их преимущественной конформацией является  $\alpha$ -спираль.  $\alpha$ -Спиральный участок сегмента C — остатки Pro-77 — Val-101. Присутствие остатка Pro-91 в центре  $\alpha$ -спирали вызывает ее искажение. Сегмент E имеет  $\alpha$ -спиральную конформацию практически на всем своем протяжении — от СО-группы остатка Val-130 до NH-группы остатка Tyr-159. Наиболее стабильный участок  $\alpha$ -спирали — остатки 136—158. Сегмент G имеет  $\alpha$ -спиральную конформацию на участке Ile-198 — Arg-227, причем стабильную часть спирали составляют остатки Ile-203 — Ala-226.

Расположение участков стабильной  $\alpha$ -спирали для sE и sG хорошо согласуется с соответствующими трансмембранными  $\alpha$ -спиральными сегментами в электронно-микроскопической структуре BR [4]. Сильное перекрывание сигналов в спектрах ЯМР и, как следствие, неполная картина контактов ЯЭО средней дальности не позволяют с большой точностью локализовать участок стабильной  $\alpha$ -спирали sC. Однако выяснилось, что N-концевой участок спирали C в действительности короче, чем в ЭКМ-структуре, так как терминируется остатком Asp-76, образующим канонический Asp-изгиб.

Настоящей работой завершается цикл, посвященный первичному анализу пространственной структуры трансмембранных сегментов BR, солюбилизированных в смеси хлороформ — метанол, имитирующей природное окружение белка в мембране. Полученные результаты подтверждают правильность и перспективность выбранной стратегии исследования пространственной структуры мембранных белков методами ЯМР. В настоящее время проводится дальнейшее уточнение пространственной структуры трансмембранных сегментов BR с использованием количественных данных 2D-спектроскопии <sup>1</sup>H-ЯМР.

### Экспериментальная часть

Пептиды были синтезированы твердофазным методом на модернизированном нами синтезаторе Beckman 990 (США) [29]. Остатки метионина-68 (sC), 145 (sE) и 209 (sG) при синтезе заменены на норлейцин. Подобная замена не влияет, как правило, на конформацию и функцию пептидов, но значительно упрощает синтез [30, 31].

Пептиды очищали препаративной ВЭЖХ на колонках Ultrasphere-octyl и Vydak C4 в градиенте концентрации ацетонитрила или смеси метанол — изопропанол (1 : 1) в 0,3—0,5% водной трифторуксусной кислоте. Предварительно пептиды характеризовали аминокислотным анализом и аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Пептиды растворяли в смеси хлороформ — метанол (1 : 1) с 0,1 М LiClO<sub>4</sub>. Использовали растворители C<sup>2</sup>H<sub>3</sub>OH (99% дейтерия, SIL, Великобритания), C<sup>2</sup>H<sub>3</sub>O<sup>2</sup>H (99,96% дейтерия, SIC, США), C<sup>2</sup>HCl<sub>3</sub> (100% дейтерия, SIC).

Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР снимали при 20, 30 и 40° С на спектрометре UNITY-600 Varian (США) с рабочей частотой для протонов 600 МГц. Получены следующие спектры <sup>1</sup>H-ЯМР: TOCSY [32] с периодом смешивания 50 мс, NOESY [33] с временем обмена компонент намагниченности ( $\tau_m$ ) 80, 150 и 200 мс, DQF-COSY [34]. Все 2D-спектры накоплены в фазоизбирательном режиме по методу [35]. Использовали задержку на релаксацию 1,2—1,6 с. Химические сдвиги протонов измеряли относительно остаточного сигнала метильной группы метанола, хими-

ческий сдвиг которой относительно сигнала тетраметилсилана равен 3,5 м. д. Оценка характерных времен обмена амидных протонов NH на дейтерий растворителя проводилась на основе анализа спектров NOESY ( $\tau_m=200$  мс) сегментов С и Е или спектров TOCSY ( $\tau_m=50$  мс) сегмента G, солюбилизованных в смеси  $C^2HCl_3 - C^2H_3O^2H$ . Поскольку различались условия съемки спектров (партии растворителей, степень обезжелезивания  $LiClO_4$ , pH образца и т. д.), сравнение характерных времен обмена амидных протонов NH на дейтерий растворителя разных сегментов некорректно и в работе использовались относительные времена обмена протонов для каждого сегмента.

Математическая обработка спектров проводилась при помощи стандартного пакета VNMR (Varian, США) и модифицированной версии программы FELIX (Hare Research Inc., США).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ovchinnikov Yu. A.//FEBS Lett. 1982. V. 148. P. 179—191.
2. Khorana H. G., Gerber G. E., Herliny W. C., Gray C. P., Anderegg R. J., Nihei K., Biemann K.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 5046—5050.
3. Bayley H., Huang K.-S., Radhakrishnan R., Ross A. H., Takagaki Y., Khorana H. G.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 2225—2229.
4. Henderson R., Baldwin J. M., Cheska T. A., Zemlin F., Beckmann E., Downing K. H.//J. Mol. Biol. 1990. V. 213. P. 899—929.
5. Arseniev A. S., Kuryatov A. B., Tsetlin V. I., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A.//FEBS Lett. 1987. V. 213. P. 283—288.
6. Абдулаева Г. В., Соболев А. Г., Арсеньев А. С., Цетлин В. И., Быстров В. Ф.//Биол. мембраны. 1991. Т. 8. № 1. С. 30—43.
7. Barsukov I. L., Abdulaeva G. V., Arseniev A. S., Bystrov V. F.//Eur. J. Biochem. 1990. V. 192. P. 321—327.
8. Sobol A. G., Arseniev A. S., Abdulaeva G. V., Musina L. Yu., Bystrov V. F.//J. Biomol. NMR. 1992. V. 2. P. 161—171.
9. Первушин К. В., Соболев А. Г., Абдулаева Г. В., Мусина Л. Ю., Арсеньев А. С.//Молекуляр. биология. 1992. № 6.
10. Arseniev A. S., Maslennikov I. V., Bystrov V. F., Kozhich A. T., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A.//FEBS Lett. 1988. V. 231. P. 81—88.
11. Масленников И. В., Арсеньев А. С., Чикин Л. Д., Кожич А. Т., Быстров В. Ф., Иванов В. Т.//Биол. мембраны. 1991. Т. 8. № 2. С. 156—160.
12. Масленников И. В., Арсеньев А. С., Кожич А. Т., Быстров В. Ф., Иванов В. Т.//Биол. мембраны. 1990. Т. 7. № 3. С. 222—229.
13. Pervushin K. V., Arseniev A. S., Kozhich A. T., Ivanov V. T.//J. Biomol. NMR. 1991. V. 1. P. 313—322.
14. Масленников И. В., Ломизе А. Л., Арсеньев А. С.//Биоорганич. химия. 1991. Т. 17. № 11. С. 1456—1469.
15. Lomize A. L., Pervushin K. V., Arseniev A. S.//J. Biomol. NMR. 1992. V. 2. P. 361—372.
16. Pervushin K. V., Arseniev A. S.//FEBS Lett. 1992. V. 308. № 2. P. 190—196.
17. Barsukov I. L., Nolde D. E., Lomize A. L., Arseniev A. S.//Eur. J. Biochem. 1992. V. 206. P. 665—672.
18. Wuthrich K. NMR of Proteins and Nucleic Acids. N. Y.: Wiley, 1986.
19. Wuthrich K., Wieder G., Wagner G., Braun W.//J. Mol. Biol. 1982. V. 155. P. 311—319.
20. Wagner G., Neuhaus D., Worgotter E., Vasak M., Kagi J. H. R., Wuthrich K.//J. Mol. Biol. 1986. V. 187. P. 131—135.
21. Richardson J. S.//Adv. Protein Chem. 1981. V. 34. P. 167—339.
22. Richardson J. S., Richardson D. C.//Principles and Patterns of Protein Conformation, in Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation/Ed. G. D. Fasman. N. Y.: Plenum Press, 1989. P. 1—98.
23. Abbadi A., Mcharfi M., Aubri A., Premilat S., Boussard G., Marraud M.//J. Amer. Chem. Soc. 1991. V. 113. P. 2729—2735.

24. *Deisenhofer J., Michel H.*//*Angew. Chem.* 1989. B. 28. № 7. S. 829—968.
25. *Altenbach C., Marti T., Khorana H. G., Hubbell W. L.*//*Science.* 1990. V. 248. P. 1088—1092.
26. *Fimmel S., Choli T., Dencher N. A., Buldt G., Wittman-Liebold B.*//*Biochim. et biophys. acta.* 1989. V. 978. P. 231—240.
27. *Lemke H.-D., Oesterhelt D.*//*Eur. J. Biochem.* 1981. V. 115. P. 595—604.
28. *Efimov A. V.*//*Protein Engineering.* 1991. V. 4. P. 245—250.
29. *Чикин Л. Д., Мошникова А. Б., Гребенникова Ж. О., Кожич А. Т., Иванов В. Т.*//*Биоорганическая химия.* 1993. Т. 19. № 1. С. 56—65.
30. *Wunsch E., Moroder L., Gillessen D., Soerensen U. B., Bali J.-P.*//*Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 1982. V. 363. P. 665—669.
31. *Erand R. M., Raymer K. E.*//*Int. J. Peptide and Protein Res.* 1987. V. 30. P. 515—521.
32. *Bax A., Davis D. G.*//*J. Magn. Reson.* 1985. V. 65. P. 355—366.
33. *Jeener J., Meier G. H., Bachman P., Ernst R. R.*//*J. Chem. Phys.* 1979. V. 71. P. 4546—4553.
34. *Rance M., Sorensen O. W., Bodenhausen G., Wagner C., Ernst R. R., Wuthrich K.*//*Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1983. V. 117. P. 479—485.
35. *States D. J., Habercorn R. A., Ruben D. J.*//*J. Magn. Reson.* 1982. V. 48. P. 286—292.

Поступила в редакцию  
30.VI.1992

I. V. MASLENNIKOV, A. S. ARSENIYEV, L. D. TCHIKIN,  
A. T. KOZHICH, V. T. IVANOV

## TWO-DIMENSIONAL NMR STUDY OF THE BACTERIORHODOPSIN TRANSMEMBRANE SEGMENTS C, E AND G

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

Conformations of synthetic peptides, analogues of the membrane spanning segments C (residues 67—106), E (128—162) and G (190—233) of bacteriorhodopsin *Halobacterium halobium* were studied by two-dimensional <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. Peptides were solubilized in the mixture chloroform-methanol (1 : 1), 0.1 M LiClO<sub>4</sub>. The spectrum resonances were assigned by means of phase-sensitive DQF-COSY, TOCSY and NOESY techniques. Interproton nuclear Overhauser effects were derived from NOESY spectra. Amide protons with slow deuterium exchange rates were determined. Analysis of the obtained data showed that segments C, E and G form right-handed α-helices including residues 77—101, 131—159 and 198—227, respectively.