



УДК 541.143+547.963.4.04

АКЦЕПТОРНЫЙ ОСТАТОК ЛИЗИНА
ПРИ ФОТОИНДУЦИРОВАННОЙ МИГРАЦИИ РЕТИНАЛЯ
В БАКТЕРИОРОДОПСИНЕ

Родионов А. В., Баирамашвили Д. И., Буделин А. В.,
Фейгина М. Ю., Шкроб А. М., Овчинников Ю. А.

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

Установлено, что фотоиндуцированная миграция ретиналя в бактериородопсине из *Halobacterium halobium* сопровождается образованием альдимида с ϵ -аминогруппой остатка Lys²¹⁶. Этот же остаток лизина является носителем протетической группы в аналоге бактериородопсина — хромопротеиде, полученном взаимодействием бактериоопсина с тетраенамом $n\text{-CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4(\text{CH}=\text{CH})_4\text{CHO}$. Таким образом, этот хромопротеид можно рассматривать как модель метастабильной формы, возникающей при фотопревращениях бактериородопсина.

Бактериородопсин — ретинальсодержащий белок из *Halobacterium halobium* — функционирует в клеточной мембране в качестве зависимого от света протонного насоса [1–4]. Ретиналь в бактериородопсине образует с лизиновой ϵ -аминогруппой альдимида, который в определенных условиях может быть восстановлен боргидридом или цианоборгидридом натрия в соответствующий ретиниламин [1, 5]. Недавно было показано, что восстановление альдимида в бактериородопсине на свету и в темноте приводит к белкам, содержащим остатки N^ε-ретиниллизина в разных участках пептидной цепи [5]. Эти данные явились прямым экспериментальным подтверждением ранее высказанной гипотезы о N→N-миграции ретиналя как возможной стадии фотохимического и/или транспортного цикла бактериородопсина [6]. С другой стороны, оказалось, что в фотохимически активных аналогах бактериородопсина, содержащих вместо ретиналя некоторые арилполиенали, последние, в зависимости от строения, образуют альдимиды с разными остатками лизина [7].

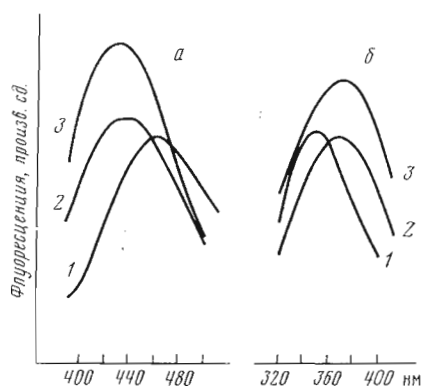
Настоящая работа была предпринята с целью установить, какой именно лизиновый остаток является акцептором ретиналя при его обратимой фотоиндуцированной миграции в бактериородопсине, и проверить, образует ли этот остаток в аналогах бактериородопсина альдимида с арилполиеналями*.

Для решения этих задач в качестве основного метода использовалось расщепление предварительно восстановленного хромопротеида бромцианом с последующим выделением и идентификацией ретинил- или арилалкенилсодержащих пептидов. Предварительные опыты с использованием

Принятые сокращения: ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография.

* Предварительное сообщение о результатах данной работы см. [7].

Рис. 1. Спектры испускания (а) и возбуждения (б) флуоресценции растворов ретиновых производных в 50% водном пиридине: 1 — N⁶-ретилиллизин, 2 — N⁶-ретилиллизин после 24 ч инкубации в 70% муравьиной кислоте (20° С), 3 — фракция Б, выделенная при ВЭЖХ продуктов бромцианового расщепления ретинил-бактериоопсина



ретиновых производных октадециламина и лизина показали, что обработка бромцианом вызывает отщепление сравнительно небольшой доли ретиновых остатков (менее 20%), однако сказывается на спектральных характеристиках ретинового хромофора. Инкубация модельных соединений в 70% муравьиной кислоте, практически независимо от присутствия бромциана, сопровождается некоторым уширением полосы поглощения и гипсохромным сдвигом полосы в спектре испускания флуоресценции (рис. 1). Эти спектральные изменения, по-видимому, обусловлены возникновением равновесного набора конфигурационных изомеров при H⁺-катализируемых Z — E-превращениях в полиеновой цепи.

На рис. 2 представлены результаты высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на обращенной фазе продуктов бромцианового расщепления ретинил-бактериоопсина, который был получен восстановлением бактериородопсина боргидридом натрия на свету при pH 10. В этих условиях большая часть ретиновых остатков локализована на лизиновых ε-аминогруппах, служащих акцепторами ретиналя при его миграции [5]. Независимо от состава элюента, формы градиента и длины углеводородных цепей носителя (C₄ или C₈) обнаруживаются только две фракции, имеющие характерное для ретиниламинов поглощение при 330 нм.

Одна из этих фракций (А), обладающая незначительным поглощением при 330 нм, судя по данным деградации по Эдману, содержит пептид, включающий в себя остатки 33—56. Этот пептид образуется из тех молекул бактериородопсина, в которых при восстановлении ретиновый остаток оказался локализованным на Lys⁴¹ (ср. [8]).

Результаты аминокислотного анализа и деградации по Эдману показывают, что другая фракция (Б) содержит С-концевой пептид, включающий в себя остатки 210—248, и в качестве примеси около 10% пептида с остатками 164—209. Фракция Б обладает спектрами поглощения и флуоресценции, характерными для ретиниламинов, инкубированных в муравьиной кислоте (см. рис. 1). Если при восстановлении бактериородопсина использовать бортрид натрия, то в этой фракции концентрируется значительная доля радиоактивности, присущей исходной смеси продуктов бромцианового расщепления. Ни хромофор, ни носители радиоактивности не могут быть отделены от пептида экстракцией органическими растворителями.

Чтобы убедиться, что ретиновый остаток действительно ковалентно связан с С-концевым пептидом, а не с пептидом 164—209 или с другой примесью, не поддающейся экстракции, вышеописанные операции были повторены с бактериородопсином, у которого перед восстановлением С-концевая область (остатки 232—248) была удалена с помощью папанна (ср. [9]). В этом случае на хроматограмме фракции Б отвечает большее время удерживания (ср. кривые 1 и 2 на рис. 3). Как и раньше, эта фракция содержит С-концевой пептид (остатки 210—231), обладает радиоактивностью и имеет спектры, характерные для ретиниламинов, инкубированных в муравьиной кислоте.

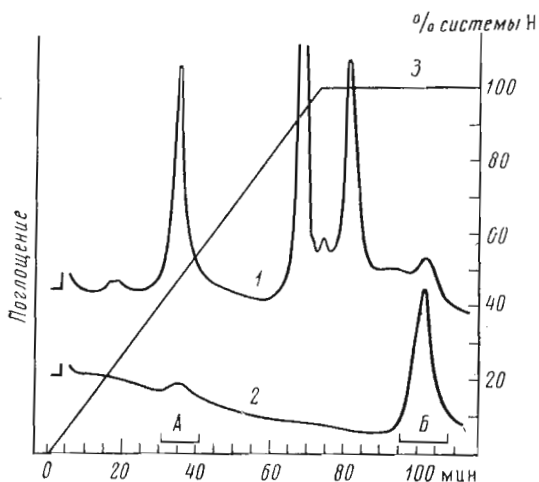


Рис. 2

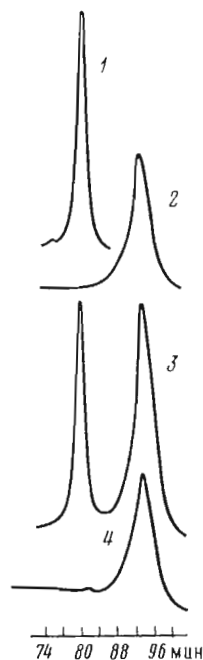


Рис. 3

Рис. 2. Разделение продуктов бромцанового расщепления ретинилбактериоопсина с помощью ВЭЖХ (см. «Экспер. часть»); запись поглощения при 280 (1) и 330 нм (2); 3 — профиль градиента

Рис. 3. Фрагменты хроматограмм продуктов бромцанового расщепления следующих белков (линейный градиент от 0 до 50% системы Н за 20 мин и от 50 до 100% системы Н за 40 мин): 1 — ретинил-бактериоопсин, 2 — ретинил-бактериоопсин с укороченной цепью, 3 — смесь ретинил-бактериоопсинов с нормальной и укороченной цепью; 4 — смесь бактериоопсина и ретинил-бактериоопсина с укороченной цепью; запись поглощения при 330 нм

Если специфическое поглощение, флуоресценция и радиоактивность фракции Б обусловлены избирательной сорбцией на обычном и укороченном С-концевом пептиде некоей примеси, а сами эти пептиды в действительности не содержат ретинильного остатка, естественно ожидать, что подобная, нековалентно связанная примесь в растворе смеси обоих пептидов будет распределяться между ними. Эта возможность была проверена следующим экспериментом.

Кривая 3 на рис. 3, являющаяся фрагментом хроматограммы смеси продуктов бромцанового расщепления двух белков — ретинил-бактериоопсинов с нормальной и укороченной цепью, свидетельствует о возможности уверенного хроматографического разделения обеих фракций Б. Кривая 4 на рис. 3 отвечает смеси продуктов расщепления нативного бактериоопсина и ретинил-бактериоопсина с укороченной цепью. В отдельных опытах было показано, что время удерживания С-концевого пептида, образующегося из бактериоопсина, практически не зависит от того, присутствует ли в последнем ретинильный остаток. Если бы произошло указанное выше перераспределение примесей между нормальным и укороченным С-концевыми пептидами, на кривой 4 был бы не один, а два пика. Этого, однако, не происходило независимо от того, как долго инкубировали в муравьиной кислоте смеси продуктов расщепления двух белков перед хроматографическим разделением.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что во фракциях Б ретинильный остаток ковалентно связан с С-концевыми пептидами.

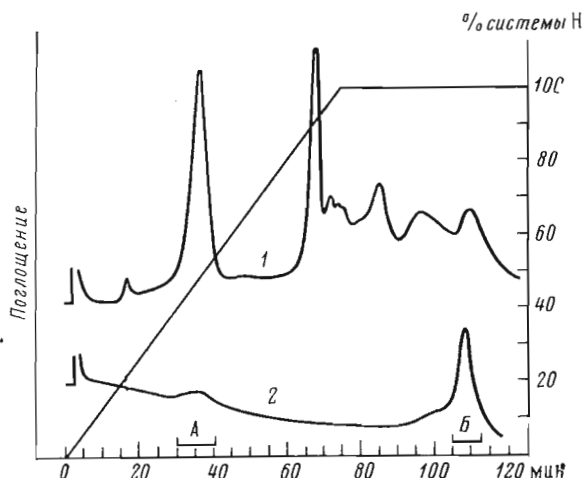


Рис. 4. Разделение продуктов бромцианового расщепления восстановленного хромопротеида, который был получен из бактериоопсина и тетраенала $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4(\text{CH}=\text{CH})_4\text{CHO}$, с помощью ВЭЖХ; запись поглощения при 280 (1) и при 340 нм (2)

Исходя из того, что эти фракции по своим спектральным характеристикам подобны модельным ретиниламинам, инкубированным в муравьиной кислоте, можно заключить, что С-концевые пептиды 210–248 и 210–231 содержат остаток N^{ϵ} -ретиниллизина. Отсюда следует, что Lys^{216} , который является единственным лизинным остатком в обоих пептидах, может быть акцептором ретиналя при его фотоиндуцированной миграции в бактериородопсине. Если исходить из предположения, что остатки Lys^{41} и Lys^{216} , между которыми мигрирует ретиналь (ср. [5]), пространственно сближены, полученные данные указывают на соседство второго и седьмого (считая от N-конца) спиральных сегментов в молекуле бактериородопсина (ср. [10]).

Аналогичные эксперименты были выполнены с фотохимически активным аналогом бактериородопсина, содержащим в качестве простетической группы альдимин тетраенала $n\text{-CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4(\text{CH}=\text{CH})_n\text{CHO}$. Ранее было показано, что при восстановлении этого хромопротеида боргидридом или цианоборгидридом натрия в темноте арилалкенильный остаток оказывается локализованным преимущественно на фрагменте цепи 72–248 [7]. Хроматографическое разделение продуктов бромцианового расщепления как самого арилалкенил-бактериоопсина, так и несущего арилалкенильный остаток фрагмента 72–248 показало, что и в этом случае арилалкениламинные хромофоры присутствуют в основном во фракции Б (рис. 4) и ковалентно связаны с находящимся в этой фракции С-концевым пептидом.

Таким образом, остатки Lys^{216} , с одной стороны, связаны с ретином в одной из метастабильных форм бактериородопсина, возникающих из последнего под действием света, а с другой — образуют альдимин в аналоге бактериородопсина. Этот результат демонстрирует возможность получения из бактериоопсина таких хромопротеидов, которые моделируют не столько сам бактериородопсин, сколько короткоживущие промежуточные формы его фотохимического цикла.

В хромопротеидах, образуемых бактериоопсином и альдегидами общей формулы $n\text{-CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4(\text{CH}=\text{CH})_n\text{CHO}$ ($2 \leq n \leq 5$), уменьшение длины полиеновой цепи приводит к постепенному возрастанию доли арилалкенилиденовых остатков, связанных с Lys^{41} [7]. Ясно, что у таких хромопротеидов в темноте разница в энергиях, отвечающих состояниям белка с различной локализацией простетической группы, существенно меньше, чем у

бактериородопсина. Ранее было показано, что большая термодинамическая устойчивость альдими́на рети́наля в нативном бактериородопсине обеспечивается исключительно высоким значением его pK_a [11]. С этой точки зрения указанное уменьшение разницы в энергиях может быть обусловлено относительно малой основностью альдими́нов в модельных хромопротеидах [7]. С другой стороны, фотоиндуцированное уменьшение pK_a альдими́на в бактериородопсине также должно дестабилизировать этот альдими́н и, по-видимому, может служить движущей силой миграции рети́наля. Эта миграция, очевидно, может протекать не только как следствие непосредственного присоединения аминогруппы по $C=N$ -связи, но и в результате взаимодействия этой аминогруппы с альдегидом, ранее образовавшимся при гидролизе исходного альдими́на (ср. [6]). Сейчас необходимо установить, является ли миграция рети́наля необходимым элементом работы бактериородопсина, или же она обнаруживается из-за того, что гидриды атакуют альдими́н в некоей минорной форме, возникающей побочно к основному фотохимическому циклу.

Экспериментальная часть

Пурпурные мембраны выделяли из клеток *H. halobium* R1 по методике, описанной в работе [1]. Мембраны, содержащие хромопротейд с остатком тетраеналя $CH_2OC_6H_4(CH=CH)_4CHO$, получали согласно работе [7]. В этой же работе описаны использованные методы расщепления хромопротеида на два фрагмента с помощью химотрипсина, а также восстановление в нем альдими́нной группы боргидридом и цианоборгидридом натрия. Разделение фрагментов расщепленного хромопротеида после его восстановления выполняли согласно методике, приведенной в работе [12]. Отщепление от бактериородопсина C-концевого участка обработкой пурпурных мембран папаином проводили в условиях, описанных в работе [9]. Контроль за полнотой этого процесса осуществляли с помощью электрофореза на градиентных полиакриламидных пластинках РАА 4/30 (Pharmacia, Швеция) в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия. Фотоиндуцированное восстановление альдими́на рети́наля в бактериородопсине проводили согласно работе [5] при pH 10 (20°C). Полностью обесцвечившуюся суспензию мембран освобождали от солей многократной промывкой водой и осаждением мембран центрифугированием, а затем подвергали лиофильной сушке.

В работе без дополнительной очистки использовали L-лизин (Reanal, ВНР), октадециламин (Chemapol, ЧССР), бромциан, боргидрид и цианоборгидрид натрия (Merck, ФРГ), химотрипсин и папаин (Worthington, Англия), бортрид натрия (Amersham, Англия; 9,6 Ки/ммоль), а также следующие растворители: изопропанол для УФ-спектроскопии (Chemapol, ЧССР), этанол марки ос.ч и муравьиную кислоту (Merck, ФРГ). Для приготовления растворов использовали соли марок х.ч. и ос.ч. и дважды дистиллированную воду. Ацетонитрил марки ч. очищали, встряхивая его несколько часов с перманганатом калия, а затем фильтровали через слой окиси алюминия и подвергали ректификации, собирая фракцию с поглощением менее 0,005 ед./см при 230 нм. Кристаллический полностью-Е-рети́наль был любезно предоставлен Б. И. Мицлером, а тетраеналь $CH_2OC_6H_4(CH=CH)_4CHO$ — Г. А. Ермаковой и С. М. Макиным (МИТХТ им. М. В. Ломоносова, Москва).

Бромциановое расщепление. При подготовке белков к бромциановому расщеплению лиофилизированные мембраны растворяли в растворе 2% додецилсульфата натрия, белок далее осаждали, разбавляя раствор спиртом или ацетоном (20 : 1), и осадок промывали несколько раз спиртом и водой. Промытый осадок растворяли в минимальном количестве муравьиной кислоты, раствор разбавляли водой (10 : 1) и добавляли к нему водный аммиак вплоть до выпадения осадка, который далее тщательно промывали во-

дой и суспендировали в спирте. Аликвоту спиртовой суспензии белка переносили в реакционный сосуд, упаривали досуха, а остаток суспендировали в воде и лиофилизировали. Далее белок растворяли в минимальном количестве муравьиной кислоты, раствор разбавляли водой (30% по объему) и вносили в него бромциан (1000 моль на 1 моль белка).

После инкубации реакционной смеси в атмосфере аргона в течение суток при 20°С ее разбавляли спиртом, упаривали досуха, а остаток суспендировали в воде и лиофилизировали. Полноту расщепления белка контролировали посредством определения дансильным методом N-концевых аминокислотных остатков в образующихся пептидах, а также оценивая содержание нерасщепленного белка с помощью электрофореза в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия на градиентных полиакриламидных пластинках. Пептиды, образовавшиеся при бромциановом расщеплении, разделяли ВЭЖХ на колонке «Zorbax C-8» (4,6×250 мм) (Du Pont, США) с помощью насосной системы «Dialograd 384» (ISCO, США) при расходе элюента 1 мл/мин.

Для контроля за разделением использовали два последовательно соединенных проточных спектрофотометра (Du Pont, США) с объемом ячейки 8 мкл, один из которых измерял поглощение при 280 нм, а другой — при 330 или 340 нм. Образец вводили в виде раствора в муравьиной кислоте (0,75–1 мг в 40–50 мкл), который предварительно выдерживали не менее 3 ч при 20°С. Для элюирования использовали градиент из систем L (ацетонитрил — муравьиная кислота, 97 : 3, по объему) и H (этанол — изопропанол — муравьиная кислота, 50 : 47 : 3, по объему), форма которого указана на рисунках. Непосредственно перед разделением колонку промывали системой L и смесью этанол — муравьиная кислота (97 : 3, по объему) несколькими циклами по 5–10 мин каждый, в ходе которых происходила плавная замена одной из этих систем на другую. Эта процедура улучшает разделение пептидов, способствует его воспроизводимости и увеличивает выход до 25–30%. Гомогенность и строение выделенных пептидов проверены определением N-концевых остатков дансильным методом, а также 4–6 шагами деградации по Эдману. Во фракциях B содержание аминокислот из примесных пептидов (тирозин), по данным аминокислотного анализа, не превышало 20% от содержания валина, два остатка которого присутствует в C-концевых пептидах.

N^ε-Ретиниллизин получали взаимодействием в 95% метаноле лизина и полностью-E-ретиная (1,5 моль на 1 моль лизина), контролируя достижение равновесия реакции спектрофотометрически. Реакционную смесь упаривали в вакууме, остаток экстрагировали ацетоном, а затем растворяли в метаноле и прибавляли избыток боргидрида натрия. Реакционную смесь далее нейтрализовали уксусной кислотой, упаривали в вакууме и подвергали ТСХ на силикагельных пластинках (Merck, ФРГ) в системе хлороформ — метанол — трифторуксусная кислота, 5 : 3 : 0,04, по объему. Зону N^ε-ретиниллизина (R_f 0,14) обнаруживали по характерной флуоресценции и реакцией с нингидрином. Инкубация ретиниллизина в муравьиной кислоте практически не сказывается на его хроматографической подвижности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Oesterhelt D., Stoeckenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*.— Nature New Biol., 1971, v. 233, № 39, p. 149–152.
2. Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Lobanov N. A. The structural basis of the functioning of bacteriorhodopsin: an overview.— FEBS Lett., 1979, v. 100, № 2, p. 219–224.
3. Henderson R., Unwin P. N. T. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy.— Nature, 1975, v. 257, № 5521, p. 28–32.
4. Stoeckenius W., Lozier R. H., Bogomolni R. A. Bacteriorhodopsin and the purple membrane of halobacteria.— Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 505, № 3–4, p. 215–278.

5. Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Цетлин В. И., Киселев А. З., Закис В. И. Миграция альдиминной связи в процессе фотохимического цикла бактериородопсина.— Биоорганич. химия, 1980, т. 6, № 9, с. 1427-1429.
6. Шкроб А. М., Родионов А. В., Овчинников Ю. А. Обратимый фотоиндуцированный гидролиз альдими́на ретиналя в солюбилизованном бактериородопсине.— Биоорганич. химия, 1978, т. 4, № 3, с. 354-359.
7. Шкроб А. М., Родионов А. В., Овчинников Ю. А. Ароматические аналоги бактериородопсина.— Биоорганич. химия, 1981, т. 7, № 8, с. 1169-1194.
8. Bridgen J., Walker I. D. Photoreceptor protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. Molecular weight and retinal binding site.— Biochemistry, 1976, v. 15, № 4, p. 792-798.
9. Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Ovchinnikov Yu. A., Drachev L. A., Kaulen A. D., Khitrina L. V., Skulachev V. P. Products of limited proteolysis of bacteriorhodopsin generate a membrane potential.— FEBS Lett., 1978, v. 90, № 2, p. 190-194.
10. Engelman D. M., Henderson R., McLachlan A. D., Wallace B. A. Path of the polypeptide in bacteriorhodopsin.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 4, p. 2023-2027.
11. Шкроб А. М., Родионов А. В. Щелочная денатурация бактериородопсина в пурпурных мембранах.— Биоорганич. химия, 1978, т. 4, № 3, с. 360-368.
12. Gerber G. E., Anderegg R. J., Herlihy W. C., Gray C. P., Biemann K., Khorana H. G. Partial primary structure of bacteriorhodopsin: sequencing methods for membrane proteins.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, № 1, p. 227-231.

Поступила в редакцию
23.IV.1981

ACCEPTOR LYSINE RESIDUE IN THE LIGHT-INDUCED RETINAL MIGRATION IN BACTERIORHODOPSIN

RODIONOV A. V., BAIRAMASHVILI D. I., KUDELIN A. B.,
FEIGINA M. Yu., SHKROB A. M., OVCHINNIKOV Yu. A.

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

Illumination of the purple membrane from *Halobacterium halobium* results in the migration of the retinal in bacteriorhodopsin molecules onto the Lys²¹⁶ residue. The same lysine residue is the carrier of the prosthetic grouping in the dark form of chromoprotein formed by bacterioopsin with the tetraenal $p\text{-CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4(\text{CH}=\text{CH})_2\text{CHO}$. It is supposed that this chromoprotein can serve as a model of some transient intermediate of the bacteriorhodopsin photocycle.