



УДК 577.112.4:577.352.332:577.354.23

**ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП
В РОДОПСИНЕ. ЛОКАЛИЗАЦИЯ ДИСУЛЬФИДНОЙ СВЯЗИ****Куделин А. Б., Шемякин В. В., Хорошилова Н. Ш.,
Овчинников Ю. А.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

На интактных фоторецепторных дисках из глаз крупного рогатого скота проведена химическая модификация сульфгидрильных групп родопсина алкилирующими реагентами. Показано, что в нативном белке действию *N*-этилмаленимида и иодацетамида доступны остатки Cys¹⁴⁰ и Cys³¹⁶, а после его обесцвечивания иодацетамид дополнительно модифицирует остатки Cys³²² и Cys³²³. В инвертированных фоторецепторных мембранах, предварительно обработанных термолизином, в темноте алкилируются остатки Cys¹⁸⁵ и Cys¹⁸⁷. Установлено, что в молекуле родопсина присутствует дисульфидная связь, образованная остатками Cys¹¹⁰ и Cys¹⁶⁷. Найдено, что наблюдаемая в некоторых условиях димеризация фрагмента 241–327, являющегося продуктом ограниченного протеолиза родопсина термолизином, обусловлена образованием дисульфидной связи между остатками Cys²⁶⁴.

Присутствие сульфгидрильных групп в молекуле родопсина стимулировало большое число исследований, направленных на выяснение их возможной роли в функционировании этого зрительного пигмента. основополагающей работой в этой области можно считать работу Уолда и Брауна [1], которые впервые показали, что в родопсине, солюбилизованном в дигитонине, в темноте действию ионов серебра доступны две сульфгидрильные группы, а при освещении их число возрастает вдвое. Ими также было показано, что *n*-хлормеркурибензоат блокирует способность обесцвеченного родопсина рекомбинировать с 11-*цис*-ретиналом и что глутатион частично снимает это ингибирование. Эти и другие наблюдения [2] позволили предположить, что сульфгидрильная группа непосредственно вовлечена в связывание хромофора, а экспонирование новых сульфгидрильных групп в ходе фотоиндуцированных превращений родопсина связано с механизмом его действия. Хотя в последующих экспериментах эти предположения не подтвердились, они послужили отправной точкой для дальнейших работ в этом направлении.

В имеющихся в настоящее время публикациях приводятся противоречивые результаты о числе реакционноспособных сульфгидрильных групп в родопсине. Это, несомненно, обусловлено большим разнообразием применяемых экспериментальных условий и модифицирующих реагентов (см. обзор [3]). Общая тенденция, прослеживаемая в цитируемых в обзоре работах, сводится к тому, что индуцированное освещением фоторецепторных дисков изменение конформации молекулы родопсина приводит к экспонированию дополнительных реакционноспособных сульфгидрильных групп, которые, возможно, имеют отношение к функционированию родопсина. Поднимаемые при этом вопросы затрагивают, в частности, такие аспекты этой проблемы, как отнесение момента появления этих групп к определенной стадии превращений родопсина [4] и возможное включение реакции тиол-дисульфидного обмена в механизм его действия [5].

Найденное среднее число модифицированных остатков цистеина в молекуле родопсина, как правило, отождествляют с числом реакционноспособных сульфгидрильных групп. Однако это справедливо лишь в том

Принятые сокращения: SDS – додецилсульфат натрия, ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.

случае, если указанные сульфгидрильные группы подвергаются исчерпывающей модификации, а такие данные по естественным причинам в литературе отсутствуют. Поэтому только локализация модифицированных остатков в полипептидной цепи позволит уверенно оперировать полученными результатами при обсуждении возможных механизмов функционирования родопсина.

Недавно завершена работа по определению полной аминокислотной последовательности родопсина, молекула которого состоит из 348 аминокислотных остатков и содержит 10 остатков цистеина [6, 7]. На основании данных ограниченного протеолиза дисков предложена модель укладки молекулы родопсина, согласно которой его полипептидная цепь семь раз пересекает фосфолипидную мембрану [8].

Настоящее исследование, являющееся частью работ по структурно-функциональному изучению родопсина из сетчатки глаз крупного рогатого скота, посвящено химической модификации остатков цистеина и локализации дисульфидной связи в его молекуле. Модификацию сульфгидрильных групп проводили в основном на интактных фоторецепторных дисках нативной ориентации с учетом критерия спектральной чистоты препаратов мембран, способности опсина к денатурации [9] и специфичности используемых реагентов. В качестве алкилирующих агентов использовали N-этилmaleимид, иодацетамид и иодуксусную кислоту.

*Локализация «темновых» сульфгидрильных групп**

Известно, что молекула родопсина содержит два реакционноспособных остатка цистеина, различающихся по доступности к модифицирующим реагентам [10]. После обработки дисков термолизином один остаток цистеина, быстрореагирующий, обнаруживается во фрагменте 241–327 (FTh2), а другой, менее доступный, — во фрагменте 1–240 (FTh1) [8, 11], причем число модифицированных остатков цистеина не зависит от того, когда проводилась модификация: до или после протеолиза [12].

Для локализации «темновых» сульфгидрильных групп в них вводили радиоактивную метку, обрабатывая диски N-этил[2,3-¹⁴C]maleимидом с последующим добавлением меченого реагента. Далее проводили ограниченный протеолиз термолизином. По данным электрофореза в полиакриламидном геле, радиоактивность включилась в равной степени в оба фрагмента, а количество нерасщепленного родопсина составляло менее 5%. Фрагменты FTh1 и FTh2 после восстановления дитиотреитом и карбоксиметилирования разделяли на колонке с сефадексом LH-60, как описано ранее [8].

Для локализации быстрореагирующего остатка цистеина, расположенного во фрагменте FTh2, последний расщепляли бромцианом. Согласно первичной структуре родопсина [6], при этом следует ожидать образования четырех полных пептидов, B-11 (254–257), B-12 (258–288), B-13 (289–309) и B-14 (310–317), а также двух укороченных, B'-10 (241–253) и B'-15 (318–327), соответствующих N- и C-концевой последовательности FTh2. Поскольку известно, что амидная связь Met²⁸⁸–Thr²⁸⁹ расщепляется бромцианом с низким выходом, вместо пептидов B-12 и B-13 в смеси должен присутствовать в основном пептид B-(12+13).

Во фрагменте FTh2 содержатся четыре остатка цистеина: Cys²⁶⁴ в пептиде B-(12+13), Cys³¹⁶ в пептиде B-14, Cys³²² и Cys³²³ в пептиде B'-15. При гель-хроматографии полученной смеси пептидов на колонке с сефадексом LH-60 более 80% радиоактивности обнаружено во фракции I, содержащей пептиды B-14 и B'-15 (рис. 1). По данным автоматической деградации этих пептидов, основная радиоактивность сосредоточена в остатке, отщепившемся на седьмом шаге, что соответствует остатку Cys³¹⁶ в пептиде B-14 (см. строку 1 таблицы).

Такой же результат получен в другом опыте с использованием твер-

* Термины «темновые» и «световые» использованы для обозначения таких сульфгидрильных групп или остатков цистеина, которые модифицируются соответственно в нативном родопсине и при его обесцвечивании.

Локализация радиоактивных остатков цистеина в молекуле родопсина

Пептид	Радиоактивность, отщепляемая на i-м шаге ступенчатой деградации по Эдману, в % от суммарной за n шагов															Модифицированный остаток цистеина
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
В-14 + В'-15	7,5	5,7	5,9	5,4	4,9	5,9	49,7	14,5								Cys ³¹⁶
В'-10 + В-11 + В-14	5,5	4,3	3,9	3,7	5,7	4,6	57,2	14,7								Cys ³¹⁶
Тур ¹³⁶ - Arg ¹⁴⁷	10,9	6,5	7,0	8,0	50,1	15,7										Cys ¹⁴⁰
В'-15	3,6	6,6	3,9	5,3	26,3	43,1	10,9									Cys ³²² , Cys ³²³
Cys ¹⁸⁷ - Glu ²³⁶	75,9	17,8	6,2													Cys ¹⁸⁷
В-8	8,7	11,7	10,4	51,7	17,2											Cys ¹⁸⁷
NBS-II + NBS-III + + NBS-VI + NBS-VIII	16,6	5,7	6,1	3,1	7,3	5,2	5,2	36,5	10,1							Cys ¹⁸⁷
В-10 + В-11 + В-(12+13) + + В-14 + В'-15	8,7	4,5	4,3	29,9	4,5	4,3	3,6	5,5	4,5	4,6	5,1	6,1	6,1	3,9	3,7	Cys ¹⁸⁷
В-(12+13)	3,8	4,6	5,5	7,6	11,8	9,1	43,7	13,5								Cys ²⁶⁴

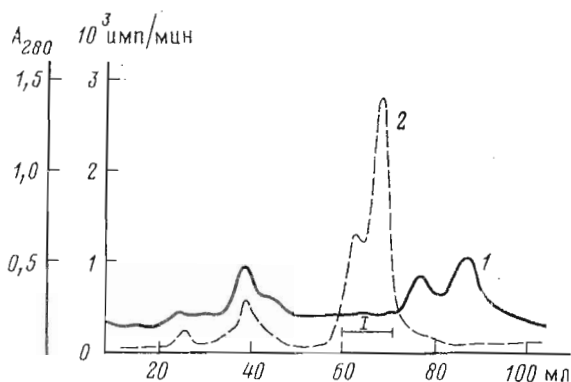


Рис. 1. Разделение бромциановых пептидов фрагмента FTh2 на колонке (1×200 см) с сефадексом LH-60 в системе муравьиная кислота – этанол (3 : 7). Скорость элюирования 7 мл/ч, объем фракции 2 мл. 1 – поглощение при 280 нм, 2 – профиль радиоактивности (аликвоту 50 мкл отбирали из каждой фракции и измеряли радиоактивность). Отмечена фракция, содержащая более 80% радиоактивности

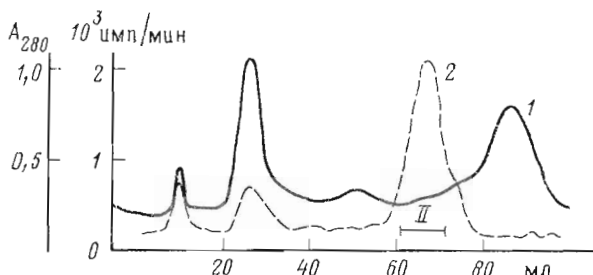


Рис. 2. Разделение продуктов триптического расщепления фрагмента FTh1. Условия хроматографии и обозначения см. в подписи к рис. 1. Обозначенная фракция II содержала более 60% радиоактивности

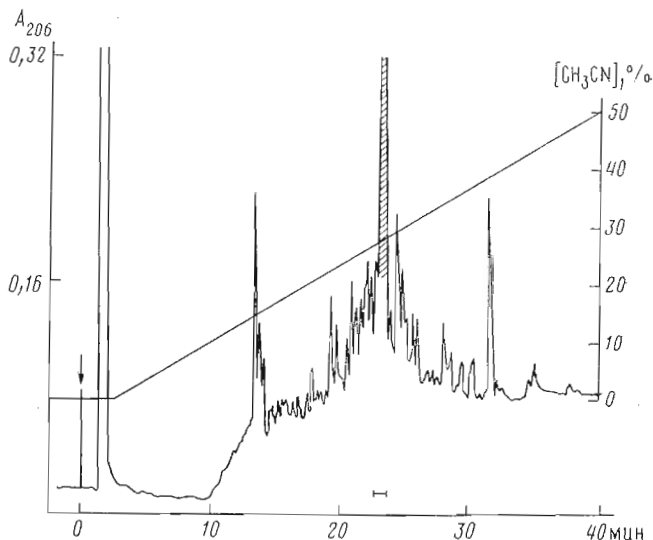


Рис. 3. Разделение фракции II (см. рис. 2) ВЭЖХ на колонке Vydac™ C-18; градиент концентрации ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте, скорость элюирования 1 мл/мин. Отмечена фракция, содержащая более 70% радиоактивности от нанесенной на колонку

дофазного секвенатора. Из раствора бромциановых пептидов в муравьиной кислоте пептид Б-(12+13) осаждали аммиаком. Пептиды растворимой фракции Б'-10, Б-11 и Б-14 далее присоединяли к γ -аминопропил-стеклу, а присутствующий в этой фракции пептид Б'-15, не содержащий остатка гомосерина, вымывали с носителя. Измерение радиоактивности

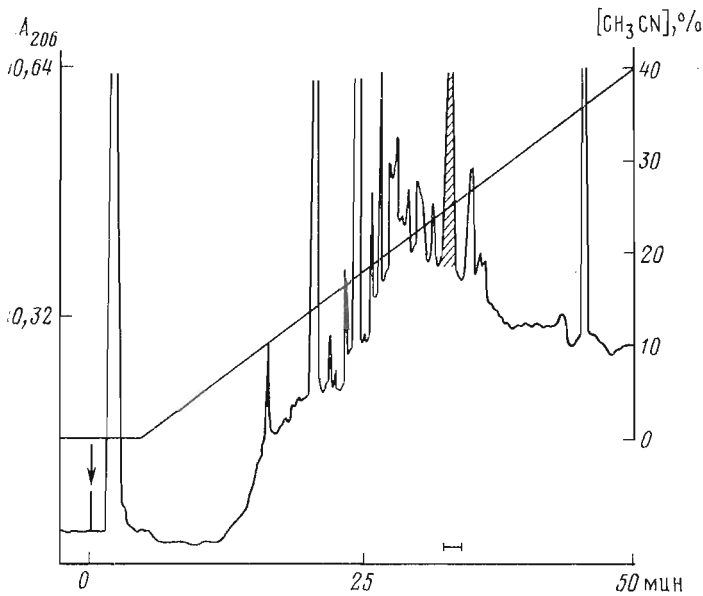


Рис. 4. Разделение водорастворимой фракции бромциановых пептидов фрагмента FTh2 ВЭЖХ на колонке Zorbax C-8 (условия см. в подписи к рис. 3). Отмечена фракция, содержащая пептид B'-15 (318-327) и более 60% радиоактивности от нанесенной на колонку

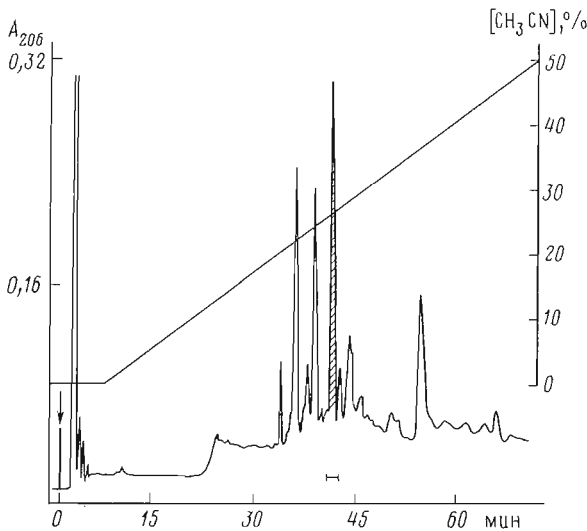


Рис. 5. Разделение пептидов супернатанта, полученного после ограниченного протеолиза инвертированных дисков протеиназой из *St. aureus*, ВЭЖХ на колонке VydacTM C-18; градиент концентрации ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте, скорость элюирования 2 мл/мин. Отмечена фракция, содержащая пептид Gly¹⁸²-Ser¹⁸⁶

производных аминокислот, отщепляемых в процессе деградации по Эдману на каждом шаге, свидетельствовало о том, что модифицирован остаток цистеина в положении 7 от N-конца (см. строку 2 таблицы). Таким образом, быстро реагирующим остатком цистеина во фрагменте FTh2 является Cys³¹⁶ (см. также [3]).

При локализации «темной» сульфгидрильной группы остатка цистеина во фрагменте FTh1 учитывали то обстоятельство, что этот остаток должен находиться вблизи цитоплазматической поверхности мембраны диска [12]. Судя по имеющимся данным о топографии молекулы родопсина в мембране [8], таким остатком, скорее всего, является Cys¹⁴⁰. Для подтверждения этого предположения удобно было использовать рас-

щепление полипептидной цепи FTh1 трипсином в положениях Arg¹³⁵—Tyr¹³⁶ и Arg¹⁴⁷—Phe¹⁴⁸. При этом следовало ожидать образования додекапептида Tyr¹³⁶-Val-Val-Val-Cys (MalNEt)-Lys-Pro-Met-Ser-Asn-Phe-Arg¹⁴⁷, содержащего модифицированный остаток цистеина в положении 5. Основная трудность проведения такого эксперимента заключалась в нерастворимости крупного мембранного фрагмента FTh1 в водных буферах. Протеолиз этого фермента в гетерогенной среде протекал с низкими выходами, а в ряде случаев вообще не удавалось получить желаемой фрагментации полипептидной цепи. Для преодоления этой трудности мелкодисперсный осадок, полученный при осаждении FTh1 из раствора в муравьиной кислоте аммиаком, растворяли в 0,5 М трис-НСl-буфере, рН 9,0, содержащем 5% SDS, и диализовали против 0,1 М трис-НСl-буфера, рН 8,4, содержащего 0,1% дwitterгента 3-14. Известно, что в растворах дwitterгента протеолитические ферменты сохраняют свою активность [13], поэтому такая замена детергента позволяла провести гидролиз FTh1 трипсином в гомогенной среде с высоким выходом. После триптического гидролиза реакционную смесь лиофилизировали, обессоливали на сефадексе LH-20, а затем фракционировали на сефадексе LH-60 (рис. 2). Полученная фракция II содержала более 60% радиоактивности и представляла собой смесь низкомолекулярных пептидов. В этой смеси доминировали пептиды, N-концевыми остатками которых являлись Tyr и Val. Методом ВЭЖХ из фракции II выделен пептид (рис. 3, заштрихованная фракция), в котором было сосредоточено более 70% радиоактивности и который содержал остаток Tyr в качестве N-концевой аминокислоты. Автоматическая деградация по Эдману выявила в этом пептиде радиоактивность на пятом шаге (строка 3 в таблице). Приведенные результаты однозначно показывают, что включение радиоактивности в FTh1 происходит за счет модификации остатка Cys¹⁴⁰. Аналогичный результат получен при использовании в качестве алкилирующего реагента меченого иодацетамида. Таким образом, в нативном родопсине действию N-этилмалеимида и иодацетамида доступны два остатка цистеина — Cys¹⁴⁰ и Cys³¹⁶.

Локализация «световых» остатков цистеина

Для определения числа остатков цистеина, экспонирующихся при засвечивании фоторецепторных дисков, «темновые» сульфгидрильные группы предварительно блокировали N-этилмалеимидом в темноте. Диски инкубировали в темноте с термолизинном, засвечивали и обрабатывали иод[1-¹⁴C]ацетамидом. Электрофорез в полиакриламидном геле показал, что радиоактивная метка включилась во фрагмент FTh2. Фрагмент FTh2 выделяли, как описано выше, расщепляли бромцианом. Полученные пептиды разделяли на водорастворимую и нерастворимую фракции, осаждали из муравьиной кислоты аммиаком, при этом в водорастворимой фракции оставалось более 80% радиоактивности. Эту фракцию далее разделяли с помощью ВЭЖХ (рис. 4). Во фракции, содержащей более 60% радиоактивности от нанесенной на колонку (отмечено на рисунке), был обнаружен пептид B'-15, который присоединяли к γ -аминопропил-стеклу через ϵ -аминогруппу остатка лизина. Автоматическая деградация по Эдману с последующим измерением радиоактивности на каждом шаге показала, что в пептиде B'-15 модифицированы остатки Cys³²² и Cys³²³ (строка 4 таблицы).

Итак, при засвечивании фоторецепторных дисков иодацетамиду становятся доступными остатки Cys³²² и Cys³²³.

Доступность остатков цистеина с внутридискковой стороны мембраны

Ранее было показано, что при инкубировании дисков, предварительно обработанных папаином или термолизинном, в буфере, содержащем 10 мМ NaCl и 100 мМ морфолиноэтансульфокислоту (рН 6,0), происходит их инвертирование и внутридискковая сторона становится доступной дейст-

вию протеиназ [14]. Этот прием использовали для модификации остатков цистеина, расположенных с внутридисквой стороны мембраны. Диски нативной ориентации последовательно обрабатывали N-этилмалеимидом и термолизином и проводили процедуру инвертирования. Инвертированные диски обрабатывали меченым подацетамидом и подвергали ограниченному протеолизу папаином, а затем протеиназой из *Staphylococcus aureus*, которые расщепляют соответственно связи Ser¹⁸⁶-Cys¹⁸⁷ и Glu¹⁸¹-Gly¹⁸² [8]. Диски осаждали центрифугированием, при этом радиоактивность распределялась между осадком и супернатантом примерно поровну. Присутствующий в дисках радиоактивный пептид (187-236), N-концевым остатком которого является Cys(CH₂CO₂H), выделяли гель-фильтрацией на сефадексе LH-60, как описано ранее [8], и анализировали с помощью автоматической деградации по Эдману. При этом радиоактивность была обнаружена на первом шаге (строка 5 таблицы). Следовательно, в темноте на внутридисквой стороне мембраны модифицируется остаток Cys¹⁸⁷. Смесь пептидов супернатанта разделяли с помощью ВЭЖХ (рис. 5). В отмеченной фракции, содержащей ~60% радиоактивности от нанесенной на колонку, с помощью аминокислотного анализа был идентифицирован пептид Gly¹⁸²-Met-Gln-Cys(CH₂CONH₂)-Ser¹⁸⁶. Следовательно, в инвертированных дисках действием подацетамида доступен также остаток Cys¹⁸⁵.

Таким образом, проведенный анализ доступности остатков цистеина в молекуле родопсина алкилирующим агентам показал, что с цитоплазматической стороны фоторецепторных дисков остатки Cys¹⁴⁰ и Cys³¹⁶ модифицируются в темноте, а Cys³²² и Cys³²³ экспонируются при засвечивании родопсина. С внутридисквой стороны в темноте модифицируются остатки цистеина Cys¹⁸⁵ и Cys¹⁸⁷.

Локализация дисульфидной связи в родопсине

Химические методы локализации дисульфидных связей в белке в качестве необходимой стадии включают его денатурацию. В случае белков, которые наряду с остатками цистеина, связанными S-S-мостиками, содержат тиольные группы, денатурация может сопровождаться реакцией тиол-дисульфидного обмена [15]. Чтобы свести к минимуму возможность протекания этой побочной реакции, необходимо добиться полноты модификации сульфгидрильных групп, а это, в свою очередь, зависит как от природы денатурирующего агента и избытка алкилирующего реагента [16, 17], так и от последовательности их добавления и pH реакционной смеси [17]. Все эти особенности учитывались при определении положения дисульфидной связи в родопсине. Однако основная трудность в данном случае обусловлена гидрофобным характером этого белка. Продуктами ферментативного и химического расщепления полипептидной цепи родопсина являются еще более гидрофобные пептиды, склонные к образованию агрегатов, что затрудняет их разделение. Кроме того, гидрофобное окружение сульфгидрильных групп остатков цистеина, расположенных в толще мембраны, препятствует их модификации алкилирующими реагентами, поэтому при последующей солиubilизации в детергентах не исключена возможность образования дополнительных дисульфидных связей.

Для преодоления указанных трудностей нами были подобраны условия исчерпывающего карбоксиметилирования всех свободных сульфгидрильных групп родопсина и солиubilизации его фрагментов (см. «Экспер. часть»). Карбоксиметилированный белок расщепляли по остаткам метионина бромцианом, а затем восстанавливали дисульфидные связи дитиотреитом. Пептиды, содержащие сульфгидрильные группы, выделяли аффинной хроматографией на Affi Gel 501, взаимодействующим с сульфгидрильными группами (рис. 6), обрабатывали меченой подуксусной кислотой и фракционировали путем добавления к реакционной смеси этанола на супернатант и осадок.

Результаты N-концевого анализа полученного осадка показали, что в нем присутствуют в основном пептиды, содержащие в качестве N-конце-

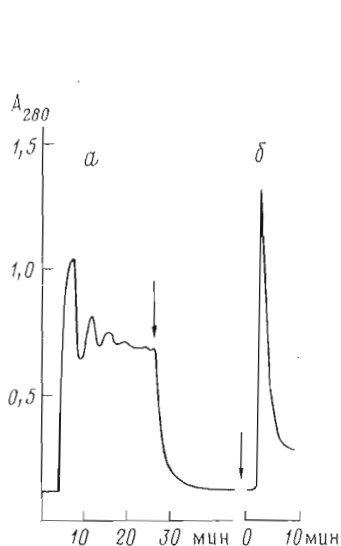


Рис. 6

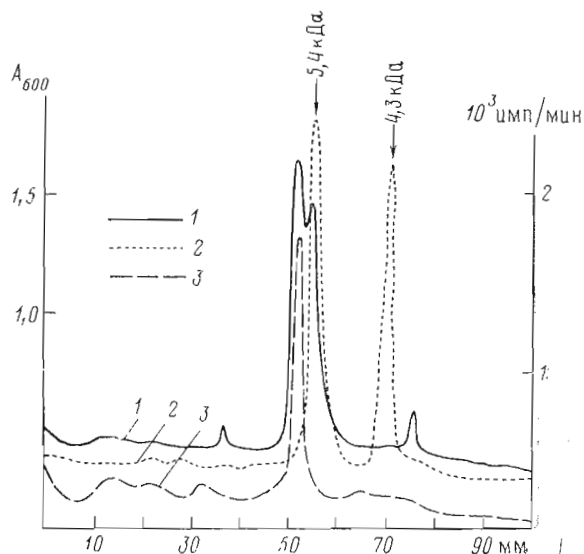


Рис. 7

Рис. 6. Выделение из общей смеси бромциановых пептидов карбоксиметилированного родопсина SH-содержащих пептидов с помощью аффинной хроматографии на колонке (1,5×4 см) с Affi Gel 501 (см. «Экспер. часть»); *a* – нанесение смеси пептидов на колонку (пять циклов) с последующим промыванием исходным буфером (показано стрелкой), *δ* – элюирование иммобилизованных пептидов буфером, содержащим 20 мМ дитиотреит. Скорость элюирования 15 мл/ч

Рис. 7. Электрофорез в 15% полиакриламидном геле нерастворимой фракции бромциановых пептидов, элюированных с аффинного сорбента Affi Gel 501 дитиотреитом и карбоксиметилированных меченой изодуксусной кислотой (1), и смеси реперных пептидов Б-10 (5,4 кДа) и Б-4 (4,3 кДа) (2); 3 – распределение радиоактивности в геле 1

вых аминокислот остатки Leu и Phe, а N-концевым остатком присутствующего в супернатанте пептида является Ala. Молекула родопсина включает в себя два бромциановых пептида – Б-2 (40–44) и Б-4 (50–86), которые в качестве N-концевой аминокислоты содержат остаток Leu, два пептида – Б-3 (45–49) и Б-10 (208–253), N-концевым остатком которых является Phe, и один пептид Б-8 (164–183), начинающийся с остатка Ala. Присутствие пептидов Б-2, Б-3, Б-4 в указанной смеси маловероятно, поскольку они не содержат остатков цистеина и, следовательно, не должны задерживаться на аффинном сорбенте. Судя по данным электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 7), нерастворимая фракция представляет собой смесь двух пептидов с M_r 6000 и 9000. Один из них по подвижности совпадает с реперным пептидом Б-10 (M 5,4 кДа), а M_r второго близка к молекулярной массе пептида Б-(4+5) (M 10,6 кДа). По-видимому, образование такого пептида обусловлено тем, что в условиях карбоксиметилирования белка модификации подвергается остаток Met⁸⁶ и поэтому связь Met⁸⁶ – Val⁸⁷ не расщепляется бромцианом. В пептиде Б-(4+5) присутствуют два остатка цистеина в положениях 110 и 140, причем последний, как показано выше, алкилируется в нативном родопсине.

На рис. 7 видно, что практически вся радиоактивность локализована в полосе, соответствующей пептиду Б-(4+5), а полоса, соответствующая пептиду Б-10, радиоактивности не содержит. Автоматическая деградация по Эдману нерастворимой фракции пептидов (N-концевые аминокислотные остатки Leu и Phe, 20 шагов) с идентификацией фенолтиогидаントиновых производных аминокислот (данные не приводятся) и измерением их радиоактивности подтвердила, что фракция состоит из пептидов Б-(4+5) и Б-10. При этом радиоактивности на 15-м шаге, соответствующем остатку Cys²²² в пептиде Б-10, выявлено не было, что совпадает с данными электрофореза в полиакриламидном геле. Итак, остаток Cys²²² в пептиде Б-10 после восстановления карбоксиметилированного белка не модифицируется и, следовательно, не участвует в образовании дисульфидной связи.

Рис. 8. Выделение бромцианового пептида Б-8 из супернатанта, полученного после аффинной хроматографии бромциановых пептидов на Affi Gel 501, с помощью ВЭЖХ на колонке Zorbax С-8. Система: 2% муравьиной кислоты, 3% ацетонитрила, градиент ацетонитрила до 100%. Скорость элюирования 1 мл/мин. Отмечена фракция, содержащая более 80% радиоактивности

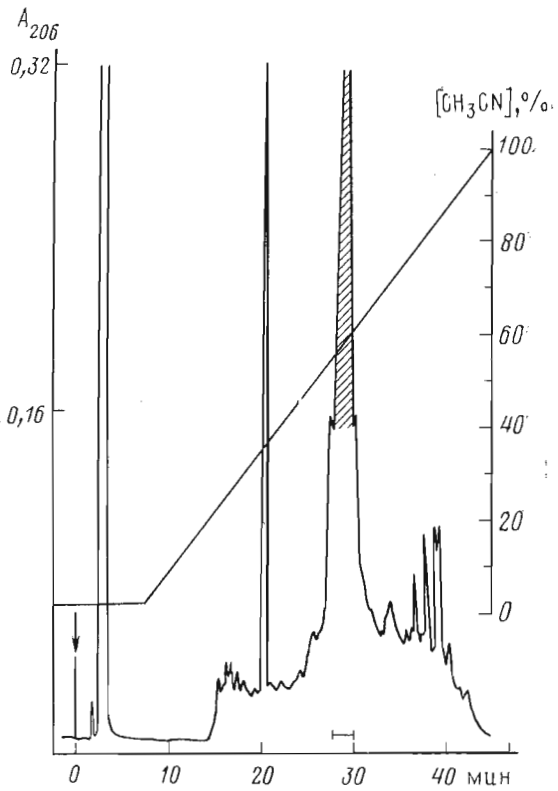


Рис. 8

Рис. 9. Расположение бромциановых пептидов в молекуле родопсина. Стрелками показаны основные точки расщепления полипептидной цепи химотрипсином (Ch), термолизисом (Th), папайном (P) и протеназой из *St. aureus* (St). На вставке схематически изображен трехфрагментный комплекс родопсина, полученный в результате последовательной обработки дисков химотрипсином и термолизисом

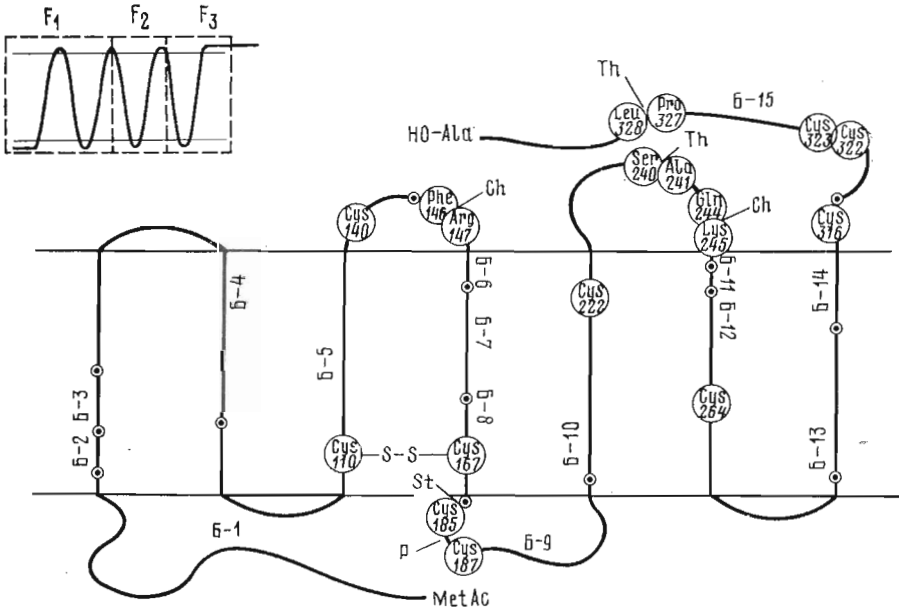


Рис. 9

Из супернатанта, полученного при фракционировании SH-содержащих пептидов (см. выше), с помощью ВЭЖХ (рис. 8, отмеченная фракция) был выделен радиоактивный пептид (фракция отмечена, 80% радиоактивности от нанесенной на колонку), содержащий в качестве N-концевой аминокислоты остаток Ala. Автоматическая деградация по Эдману этого пептида выявила радиоактивность на четвертом шаге (см. строку 6 таблицы), что соответствует модификации остатка Cys¹⁶⁷ в пептиде Б-8.

Аналогичная процедура по выделению бромциановых пептидов, участвующих в образовании дисульфидной связи, была проведена на обесцвеченных фоторецепторных дисках, дисках, инкубированных с дитиотреитом (существуют указания на то, что дисульфидные связи в родопсине способны восстанавливаться дитиотреитом в мембране [48]), и дисках, предварительно обработанных термолизином. В первых двух случаях были выделены те же бромциановые пептиды. Это свидетельствует о том, что дисульфидная связь сохраняется при обесцвечивании родопсина и недоступна действию восстанавливающего агента. В третьем случае наряду с пептидами Б-(4+5) и Б-8 был получен укороченный фрагмент пептида Б-10 (208—240), образовавшийся в результате расщепления амидной связи Ser²⁴⁰—Ala²⁴¹. Эти пептиды находятся во фрагменте FTh1. Отсюда следует, что фрагмент FTh2 не содержит остатков цистеина, участвующих в образовании дисульфидной связи. Автоматический анализ на секвенаторе во всех случаях не выявил радиоактивности на 15-м шаге, соответствующем остатку Cys²²² в пептиде Б-10. Этот пептид, по-видимому, задерживается на колонке с аффинным сорбентом за счет образования агрегата с пептидом Б-(4+5).

Итак, на основании представленных результатов можно высказать предположение, что в образовании дисульфидной связи в родопсине участвуют остатки Cys¹¹⁰ и Cys¹⁶⁷. Это предположение было подтверждено в следующей серии экспериментов.

Молекулу родопсина в фоторецепторных дисках расщепляли с помощью химотрипсина, как описано в работе [8], на мембраносвязанные фрагменты FCh1' (1—146), FCh2' (147—244) и FCh2 (245—336) (рис. 9). При этом образовывался также фрагмент FCh2'+FCh2 (147—336), представляющий собой продукт неполного гидролиза полипептидной цепи по связи Gln²⁴⁴—Lys²⁴⁵ [8]. Последующая обработка дисков термолизином, который расщепляет связи Ser²⁴⁰—Ala²⁴¹ и Pro³²⁷—Leu³²⁸, привела к образованию фрагментов (FCh2')Th (147—240) и (FCh2)Th (241—327). Таким образом, молекулу родопсина удалось расщепить на три типа мембраносвязанных фрагментов: F₁, соответствующий фрагменту 1—146, F₂, содержащий пептиды 147—244 и 147—240, и F₃, включающий последовательности 245—336 и 241—327. Необходимо отметить, что такой протеолиз хромопротеида не влияет на его спектральные свойства. После алкилирования остатков Cys¹⁴⁰ и Cys³¹⁶ в темноте N-этилмалеимидом диски инвертировали и дополнительно модифицировали остатки Cys¹⁸⁵ и Cys¹⁶⁷. Суспензию мембран лиофилизировали в темноте, растворяли в муравьиной кислоте и хроматографировали на колонке с сефадексом LH-60. В результате были получены фракции А и В (рис. 10а), объемом выхода которых был идентичен объему выхода фрагментов родопсина FTh1 (*M* 25 кДа) и FTh2 (*M* 12 кДа). Фракция В содержала два пептида, имеющих в качестве N-концевых аминокислот остатки Ala и Lys, что соответствовало С-концевому фрагменту родопсина F₃. Во фракции А в качестве N-концевой аминокислоты был обнаружен остаток Arg, что соответствовало фрагменту F₂. Фракция А также могла содержать фрагмент F₁, N-концевая аминокислота которого ацилирована. Аномальный объем выхода фракции А, соответствующий пептидам с *M* 20—25 кДа, по-видимому, связан с наличием дисульфидной связи между фрагментами F₁ и F₂. Для подтверждения этого предположения выполнен следующий эксперимент. Фракцию А рехроматографировали (рис. 10б), пептиды из полученной фракции А' осаждали добавлением аммиака до pH 5,0, подвергали исчерпывающему карбоксиметилированию в условиях, препятствующих реакции тиол-дисульфидного обмена (70-кратный избыток подуксусной кислоты вводили одновременно с растворением пептидов в 0,3 М трис-HCl-буфере (pH 7,5), содержащем 5% SDS и 8 М мочевины), а затем обрабатывали дитиотреитом. Пептиды, содержащие сульфгидрильные группы, выделяли хроматографией на аффинном сорбенте Affi Gel 501 (фракция С), карбоксиметилировали меченой подуксусной кислотой и хроматографировали на колонке с сефадексом LH-60. В результате были получены фракции C_I, C_{II} и C_{III}, из которых только фракции C_I и C_{III} содержали радиоактивность (рис. 10в).

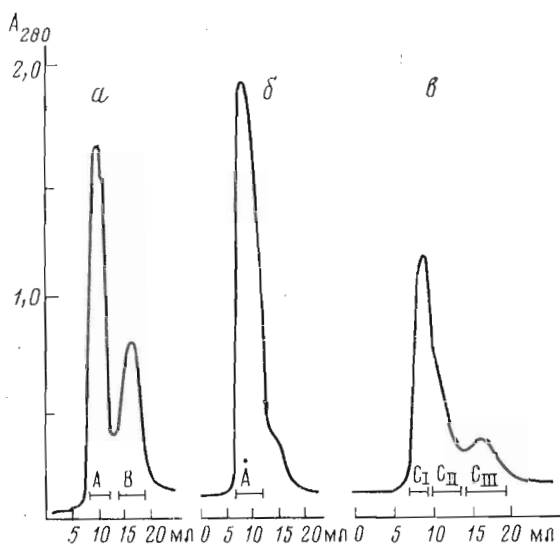


Рис. 10. Фракционирование трехфрагментного комплекса родоципа (F_1 , F_2 , F_3) на колонке (1×100 см) с сефадексом LH-60 в системе муравьиная кислота – этанол (3:7): *a* – отделение фрагмента F_3 ; *b* – рехроматография фракции A; *c* – разделение пептидов, полученных после инкубации фракции A' с дитиотреитом и аффинной хроматографией на Affi Gel 501 (пептиды фракции C). Скорость элюирования 10 мл/ч

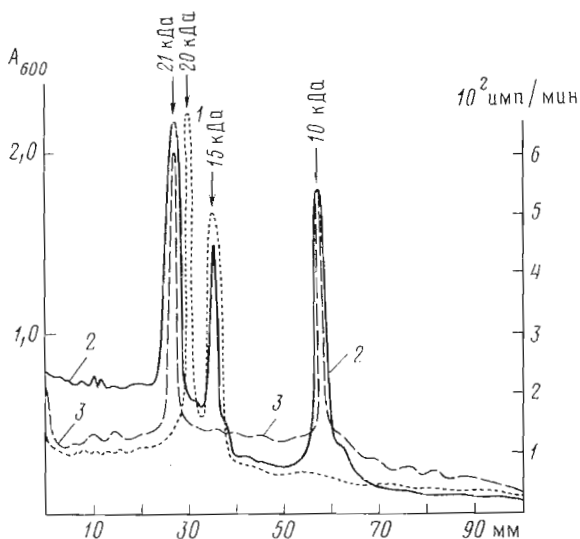


Рис. 11. Электрофорез в 12,5% полиакриламидном геле пептидов фракций A' (1) и C (2); 3 – распределение радиоактивности в геле 2

Электрофорез в полиакриламидном геле показал, что фракция A' наряду с основным пептидом (M_r 20 000) содержит минорный пептид с M_r 15 000 (рис. 11). На электрофореграмме фракции C обнаружены три полосы, одна из которых соответствует минорному пептиду, а две другие – пептидам с M_r 21 000 и 10 000. На рис. 11 видно, что полосы, отвечающие двум последним пептидам, содержат одинаковое количество радиоактивности, а пептид с M_r 15 000 нерадиоактивен. Несоответствие относительной молекулярной массы основного пептида во фракции A' (20 000) молекулярной массе продуктов его восстановления (21 000 и 10 000) объясняется присутствием дисульфидной связи в исходном пептиде, что часто приводит к снижению значения относительной молекулярной массы из-за неспособности SDS полностью развернуть такую молекулу (см., например, [19]). Кроме того,

наличие олигосахаридных цепей также может влиять на подвижность пептидов [20].

Для отнесения пептидов, элюирующихся во фракциях C_1 и C_{III} , к определенным участкам аминокислотной последовательности родопсина использованы данные о распределении бромциановых пептидов в белке [6]. Во фракции C_1 после ее обработки бромцианом в качестве N-концевых остатков были обнаружены Leu, Phe и Val, а во фракции C_{III} — Arg, Ala, Glu, Gly и Phe. Полученные результаты позволяют однозначно определить фрагменты родопсина, элюирующиеся во фракциях C_1 и C_{III} , как F_1 и F_2 .

Для локализации радиоактивной метки во фрагменте F_1 его расщепляли по остаткам Tug N-бромсукцинимидом. При этом, исходя из первичной структуры F_1 , можно было ожидать появления следующих пептидов: NBS-I (1–10), NBS-II (11–29), NBS-III (31–43), NBS-IV (44–60), NBS-V (61–74), NBS-VI (75–96), NBS-VII (97–102), NBS-VIII (103–136) и NBS-IX (137–146). Видно, что остаток Cys¹¹⁰ занимает положение 8 в пептиде NBS-VIII, а Cys¹¹⁰ — положение 4 в пептиде NBS-IX. Автоматическая деградация по Эдману с последующей идентификацией отщепляемых аминокислот, а также измерение радиоактивности на каждом шаге показали, что в реакционной смеси присутствовали пептиды, имеющие такие же N-концевые последовательности, как пептиды NBS-II, NBS-III, NBS-VI и NBS-VIII. Эти пептиды образовались в результате расщепления N-бромсукцинимидом полипептидной цепи по остаткам Tug в гидрофильных участках фрагмента F_1 . Около 40% радиоактивности появлялось на восьмом шаге (см. строку 7 таблицы), что подтверждает участие остатка Cys¹¹⁰ в образовании дисульфидной связи. Следует отметить, что на четвертом шаге радиоактивности не обнаружено.

Для локализации радиоактивности во фрагменте F_2 , который содержит остатки Cys¹⁶⁷ (бромциановый пептид Б-8, положение 4), Cys¹⁸⁵ и Cys¹⁸⁷ (Б-9, положения 2 и 4) и Cys²²² (Б-10, положение 15), проводили его расщепление бромцианом. При автоматической деградации по Эдману полученной смеси бромциановых пептидов основная радиоактивность обнаружена на четвертом шаге (строка 8 таблицы), тогда как уровень радиоактивности на 15-м шаге не отличается от фона. Это соответствует модификации остатка Cys¹⁶⁷.

Таким образом, совокупность приведенных данных указывает на то, что дисульфидная связь в родопсине находится между остатками Cys¹¹⁰ и Cys¹⁶⁷.

Локализация дисульфидной связи, участвующей в образовании димера FTh2

Известно, что фрагменты родопсина FTh1 и FTh2, образующиеся при его ограниченном протеолизе термוליзином, связаны в виде нековалентного комплекса, способного диссоциировать в детергентах под действием света [11]. Это свойство использовалось для разделения фрагментов с помощью аффинной хроматографии на конканавалин-А-сефарозе в цетавлоне [8]. Нами обнаружено, что фрагмент FTh2 предварительно карбоксиметилированного в дисках родопсина элюируется с колонки преимущественно в виде димера, который после восстановления превращается в мономер. Отсюда следует, что причиной димеризации является образование дисульфидной связи.

Для определения остатков цистеина, участвующих в образовании димера FTh2, были использованы те же подходы, что и при локализации дисульфидной связи в молекуле родопсина. После повторного карбоксиметилирования димер FTh2 расщепляли бромцианом, полученную смесь пептидов обрабатывали дитиотреитом, пептиды, содержащие сульфгидрильные группы, выделяли хроматографией на аффинном сорбенте Affi Gel 501 и карбоксиметилировали меченой иодуксусной кислотой. При последующей гель-фильтрации на сефадексе LH-60 был получен пептид Б-(12+13), гомогенность которого подтверждена данными электрофореза в полиакриламидном геле и N-концевого анализа. Согласно результатам автоматической деградации по Эдману, этот пептид содержал радиоактивный остаток в

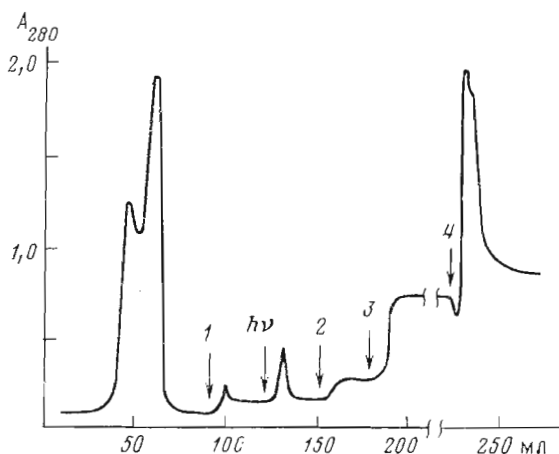


Рис. 12. Аффинная хроматография трехфрагментного комплекса родопсина (F_1 , F_2 , F_3) на колонке (1,5×5 см) с конканавалин-А-сефарозой при 4°С в 0,1 М трис-НСl-буфере (рН 7,0), содержащем 0,1 М цетавлон, 1 М NaCl, 1 мМ MnCl₂, 1 мМ CaCl₂, 2 мМ дитиотреит и 50 мМ гидроксилламин [8]: 1 – замена цетавлона на холат натрия, $h\nu$ – засвечивание родопсина на колонке; 2 – увеличение рН буфера до рН 8,0; 3 – добавление дитиотреита до концентрации 50 мМ (разрыв на оси абсцисс соответствует инкубированию в течение 14 ч); 4 – элюирование фрагментов родопсина F_2 и F_3 . Скорость элюирования 50 мл/ч

положении 7 (строка 9 таблицы), что соответствует остатку Cys²⁶⁴ в молекуле родопсина. Таким образом, в образовании димера FTh2 участвуют остатки Cys²⁶⁴.

Исходя из имеющихся данных о родопсине, в настоящее время трудно определить, является ли образование димера FTh2 следствием соответствующего расположения молекул родопсина в фоторецепторной мембране или это результат воздействия детергента и освещения. Согласно литературным данным, образование димера и олигомеров родопсина наблюдается при некоторых условиях подготовки образца к электрофорезу (концентрация белка более 2 мг/мл, нагревание до 100°С, солиubilизация в инкубационном буфере на свету) [12]. Сообщалось также, что засвечивание фоторецепторных дисков приводит к кластеризации молекул родопсина [21]. Кроме того, получены двумерные кристаллы родопсина лягушки, в которых родопсин присутствует в виде димера [22]. Многочисленные данные о топографии мембранных белков, пронизывающих мембрану и осуществляющих активный транспорт, свидетельствуют о том, что они имеют тенденцию образовывать димерные структуры с осью симметрии, перпендикулярной плоскости мембраны [23].

В заключение, зная расположение дисульфидной связи в молекуле родопсина, следует рассмотреть данные о светоиндуцируемой диссоциации в детергентах двух- и трехфрагментных комплексов родопсина [8, 11]. Существуют данные о том, что диссоциация двухфрагментных комплексов, солиubilизированных в цетавлоне, бромиде додецилтриметиламмония, тритоне X-100, является следствием денатурации молекулы родопсина в этих детергентах. В холате натрия и дигитонине, например, такой диссоциации не происходит [12].

Для выяснения роли детергентов в поддержании конформации родопсина фоторецепторные диски последовательно инкубировали с химотрипсином и термолизинном, образующий мембраносвязанный комплекс, состоящий из фрагментов F_1 , F_2 и F_3 , солиubilизировали в темноте при 4°С в буфере, содержащем цетавлон, полученный раствор наносили на колонку с конканавалин-А-сефарозой (рис. 12) [8]. После элюирования липидов проводили замену цетавлона на холат натрия. При засвечивании родопсина, присоединенного к конканавалин-А-сефарозе, не происходило сущест-

венной диссоциации фрагментов. Колонку далее уравнивали буфером, содержащим дитиотреит, и после инкубирования в течение ночи при 4° С промывали тем же буфером. В результате получена пептидная фракция, которую диализовали против воды, лиофилизировали и обессоливали на сефадексе LH-60. N-Концевыми остатками присутствовавших в этой фракции пептидов являлись Arg, Ala и Lys, что соответствует фрагментам родопсина F₂ и F₃. Таким образом, в холате натрия не происходит светондуцируемой диссоциации трехфрагментного комплекса родопсина. Разделение фрагментов может быть достигнуто при восстановлении дисульфидной связи между фрагментами F₁ и F₂.

Следует отметить, что если солиubilизацию дисков и все последующие операции проводить только в холате натрия, разделения фрагментов после обесцвечивания и инкубации с дитиотреитом не происходит. Это, по-видимому, связано с тем, что при солиubilизации дисков в холате натрия остается часть липидов, участвующих в стабилизации молекулы родопсина в мембране.

Экспериментальная часть

Фоторецепторные диски выделяли по методике, описанной в работе [24]. Все операции проводили при слабом красном освещении в атмосфере аргона при 4° С. Фосфатный буфер, используемый при выделении препаратов мембран, пропускали через колонку с Chelex-100 (Bio-Rad, США) для удаления следов тяжелых металлов, катализирующих перекисное окисление липидов. Все буферы перед употреблением вакуумировали. Ориентацию дисков подтверждали ограниченным протеолизом [8] и аффинной хроматографией на конканавалин-А-сефарозе.

У полученных препаратов мембран отношение поглощения при 280 и 500 нм составляло 1,9—2,0 (ср. [3]). Концентрацию родопсина оценивали, исходя из известной величины молярного коэффициента поглощения в 0,1 М цетавлоне ϵ_{500} 40 000 М⁻¹·см⁻¹ [3]. Ограниченный протеолиз родопсина в дисках проводили в условиях, описанных в работе [8]. Родопсин в дисках засвечивали в течение 30 мин двумя ртутными лампами ДРШ-250 с расстояния 40 см через фильтр ЖС-16, пропускающий свет с длиной волны более 500 нм. Обесцвечивание контролировали спектрофотометрически при 500 нм, отбирая аликваты и растворяя их в темноте в 0,1 М К⁺-фосфатном буфере (рН 7,0), содержащем 50 мМ цетавлон и 50 мМ гидроксид-амин. Количество необесцвеченного родопсина составляло менее 5%.

В работе без дополнительной очистки использовали папаин, химотрипсин (Wortington, Англия), протеназу из *St. aureus* V8 (Miles, Англия), термолизин, холат натрия (Sigma, США), EDTA, дитиотреит, цетавлон, SDS, кумасси R-250, акриламид, бисакриламид (Serva, ФРГ), бромциан, реагент Элмана, трифторуксусную кислоту, N-этилмалеимид (Pierce, США), Affi Gel 501, AG 501X8 (Bio-Rad, США), конканавалин-А-сефарозу 4В, сефадексы LH-60, LH-20, G-25, G-50 (Pharmacia, Швеция), ацетонитрил, трис (Merck, ФРГ), дивтергент 3-14 (Calbiochem, ФРГ), под[1-¹⁴C]ацетамид (57 Ки/моль), под[2-¹⁴C]уксусную кислоту (54 Ки/моль), N-этил[2,3-¹⁴C]малеимид (21 Ки/моль) (Amersham, Англия) и мочевины марки ос. ч. Немеченую нодуксусную кислоту дважды перекристаллизовывали из гептана. Муравьиную кислоту марки х. ч. очищали перегонкой в вакууме над безводным сульфатом меди в токе аргона. Для хроматографии использовали свежеперегнаный абсолютный этанол. Разделение пептидов и их обессоливание на сефадексах LH-20 и LH-60 проводили в системе муравьиная кислота — этанол, 3 : 7. Пептиды идентифицировали с помощью N-концевого анализа, в отдельных случаях — ступенчатой деградации по Эдману (два-три шага).

Модификация остатков цистеина алкилирующими реагентами

К 2 мл суспензии дисков в 0,1 М К⁺-фосфатном буфере (рН 6,7), содержащей 0,1 мкмоль родопсина, в темноте добавляли 10 мкмоль N-этил[2,3-¹⁴C]малеимида, смесь выдерживали при перемешивании 4 ч, затем

добавляли 100 мкмоль немеченого реагента и инкубировали еще 4 ч. От избытка реагента освобождались центрифугированием (30 мин, 18 000 об/мин) с последующей промывкой осадка или гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50, уравновешенным 0,1 М K^+ -фосфатным буфером (рН 6,7). Модификацию родопсина иод[1- ^{14}C]ацетамидом (20 моль/моль белка) проводили в 0,1 М трис-НСl-буфере (рН 7,8) по аналогичной методике. Время инкубации реакционной смеси до и после добавления немеченого реагента (100 моль/моль белка) составляло 30 мин. В случае засвеченного родопсина реакцию также проводили в темноте, поскольку имеются указания на то, что продолжительное освещение влияет на степень модификации сульфгидрильных групп [12].

Полноту модификации тиольных групп проверяли титрованием с помощью реагента Эллмана [25].

Карбоксиметилирование родопсина. Диски суспендировали в темноте в 0,3 М трис-НСl-буфере, содержащем 2 мМ EDTA (рН 7,8), добавляли подуксусную кислоту (700 моль/моль белка), смесь продували аргоном, выдерживали при перемешивании 30 мин, затем добавляли SDS (до 5%) и мочевины (до 8 М) и оставляли инкубироваться 2 ч при 20° С. Карбоксиметилированный родопсин осаждали добавлением к реакционной смеси равного объема этанола, центрифугировали, осадок трижды промывали этанолом, растворяли в муравьиной кислоте и обессоливали на колонке с сефадексом LH-60.

Бромциановое расщепление карбоксиметилированного родопсина и его фрагментов проводили в 70% муравьиной кислоте при 100-кратном избытке реагента в течение 24 ч при 20° С в атмосфере аргона. Для разделения бромциановых пептидов на водорастворимую и нерастворимую фракции к их раствору в 20% муравьиной кислоте при 4° С по каплям добавляли 10% раствор аммиака до рН 5–7. Полученный осадок отделяли центрифугированием и дважды промывали водой. Супернатант объединяли, лиофилизировали, остаток растворяли в муравьиной кислоте и обессоливали на сефадексе LH-20.

Электрофорез в полиакриламидном геле протеолитических фрагментов родопсина и бромциановых пептидов проводили в присутствии 0,1% SDS и 8 М мочевины соответственно в 12,5 и 15% полиакриламидном геле по методу, описанному в работе [26]. Бромциановые пептиды растворяли в стеклянных ампулах в 0,3 М трис-НСl-буфере (рН 9,0), содержащем 8 М мочевины и 5% SDS, ампулы закрывали диализной мембраной (Dialysis Tubing, Benzoylated, Sigma, США) и в перевернутом состоянии погружали на 15–20 ч в буфер для нанесения образцов. Электрофореграммы окрашивали серебром [27], а при работе с крупными мембранными фрагментами — кумасси R-250 [28]. В качестве стандартов при калибровке электрофореграмм использовали родопсин (M 39 кДа), фрагменты его термолитического расщепления FTh1 (1–240) (M 26,9 кДа) и FTh2 (241–327) (M 9,6 кДа), а также крупные бромциановые пептиды родопсина B-4 (M 4,3 кДа), B-10 ($\sim M$ 5,4 кДа) и B-(12+13) (M 5,7 кДа), любезно предоставленные И. Д. Артамоновым. Для определения радиоактивности полосу геля разрезали на зоны шириной 1 мм, гель растворяли в 200 мкл 30% перекиси водорода, содержащей 1% аммиака, путем инкубирования в течение 6 ч при 50° С. Радиоактивность измеряли в сцинтилляторе Unisolve 100 (Koch Light, США) на счетчике SL-30 (Intertechnique, Франция).

Аффинная хроматография SH-содержащих пептидов на сорбенте Affi Gel 501 выполнена в 0,1 М трис-НСl-буфере (рН 7,0), содержащем 0,2 М NaCl, 0,1% SDS и 2 мМ EDTA (буфер А). Продукты ферментативного или бромцианового расщепления карбоксиметилированного родопсина растворяли в 0,5 М трис-НСl-буфере (рН 9,0), содержащем 8 М мочевины и 5% SDS, диализовали против буфера А и пропускали через колонку с аффинным сорбентом. Практически все пептиды элюировались со свободным объемом колонки, что свидетельствовало об отсутствии в них сульфгидрильных групп. Смесь подкисляли до рН 8,5, добавляли дитиотреит до концентрации 90 мМ и инкубировали 15–20 ч. От восстанавливающего

агента освобождались гель-фильтрацией на сефадексе G-25 в буфере А. Пептиды наносили на колонку с аффинным сорбентом (пять циклов), колонку промывали буфером А, иммобилизованные пептиды элюировали тем же буфером, содержащем 20 мМ дитиотреит. Дитиотреит удаляли, как описано выше.

Определение аминокислотной последовательности проводили на жидкостном секвенаторе 890 С (Beckman, США) по программе 112974 (полибреп) и на твердофазных секвенаторах APS-240 (Rank Hilger, Англия) и Mini-15 (Sequemat, США) по программам, взятым из описания к приборам. 2-Амино-5-тиазалиноны превращали в 2-фенил-3-тиогидантоины нагреванием в 1 н. HCl при 70° С в течение 10 мин. Идентификацию фенилтиогидантоиновых производных аминокислот проводили с помощью ВЭЖХ на анализаторе МР-100 (Sequemat, США), масс-спектрометрически [29], а также при помощи аминокислотного анализа после их гидролиза в 47% HI [30] до свободных аминокислот. Для определения радиоактивности на каждом шаге фракции, содержащие соответствующие 2-амино-5-тиазалиноны, упаривали в токе сухого азота, растворяли в 1 мл абсолютированного метанола и отбирали $1/10$ часть на измерение радиоактивности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wald G., Brown P. J. Gen. Physiol., 1951–1952, v. 35, № 2, p. 797–821.
2. Heller J. Biochemistry, 1968, v. 7, № 8, p. 2914–2920.
3. Hargrave P. A. J. Progres Retinal Res., 1982, v. 1, № 1, p. 1–51.
4. Kimble E. A., Ostroy S. E. Biochim. et biophys. acta, 1973, v. 325, № 2, p. 323–331.
5. McDowell J. H., Williams T. P. Vision Res., 1976, v. 16, № 4, p. 643–646.
6. Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Фейгина М. Ю., Артамонов И. Д., Золотарев А. С., Костина М. Б., Богачук А. С., Мирошников А. И., Мартьянов В. И., Куделин А. Б. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 10, с. 1424–1427.
7. Ovchinnikov Yu. A. FEBS Lett., 1982, v. 148, № 2, p. 179–191.
8. Мартьянов В. И., Костина М. Б., Фейгина М. Ю., Мирошников А. И. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 6, с. 734–745.
9. Ostroy S. E. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 463, № 1, p. 91–125.
10. De Grip V. J., Van de Laar G. L. M., Daemen F. J. M., Bonting S. L. Biochim. et biophys. acta, 1973, v. 325, № 2, p. 315–322.
11. Pober J. S., Stryer L. J. J. Mol. Biol., 1975, v. 95, № 3, p. 477–481.
12. Fung B. K.-K., Hubbell W. L. Biochemistry, 1978, v. 17, № 24, p. 4396–4402.
13. Gonenne A., Ernst R. Anal. Biochem., 1978, v. 87, № 1, p. 28–38.
14. Bairamashvili D. I., Drachev A. L., Drachev L. A., Kaulen A. D., Kudelin A. B., Martynov V. I., Skulachev V. P. Eur. J. Biochem., 1984, in press.
15. Торчинский Ю. М. Сера в белках. М.: Наука, 1977.
16. McKenzie M. A., Smith M. B., Wake R. G. Biochim. et biophys. acta, 1963, v. 69, № 1, p. 222–239.
17. Webster D. M., Thompson E. O. P. Austral. J. Biol. Sci., 1982, v. 35, № 1, p. 125–133.
18. Chen J. S., Hubbell W. L. Membrane Biochem., 1978, v. 1, № 1, 2, p. 107–131.
19. Steele J. C. H., Jr., Nielsen T. B. Anal. Biochem., 1978, v. 84, № 1, p. 218–224.
20. Bretscher M. S. Nature New Biol., 1971, v. 231, № 25, p. 229.
21. Каламгаров Г. Р., Раевский А. В., Салигра И. С., Пивоварова Т. С., Островский М. А., Левченко Л. А., Лихтенштейн Г. И. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 6, с. 775–779.
22. Corless J. M., McCaslin D. R., Scott B. L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., 1982, v. 75, № 4, p. 1116–1120.
23. Klingenberg M. Nature, 1981, v. 290, № 5806, p. 449–454.
24. Smith M. G., Stubbs G. W., Litman B. J. Exp. Eye Res., 1975, v. 20, № 2, p. 211–217.
25. Habeeb A. F. S. A. Methods Enzymol., 1972, v. 25, part B, p. 457–464.
26. Swank R. T., Munkers K. D. Anal. Biochem., 1971, v. 39, № 2, p. 462–477.
27. Oakley B. R., Kirsch D. R., Morris N. R. Anal. Biochem., 1980, v. 105, № 2, p. 361–363.
28. Firbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H. Biochemistry, 1971, v. 10, № 13, p. 2606–2617.
29. Назимов И. В., Левина Н. Б., Богданова И. А., Розынов Б. В. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 2, с. 192–199.
30. Inglis A. S., Nicholls P. W., Rowburgh C. M. Austral. J. Biol. Sci., 1971, v. 24, № 5, p. 1247–1250.

Поступила в редакцию
20.X.1983

**CHEMICAL MODIFICATION OF SULFHYDRYL GROUPS IN RHODOPSIN.
LOCALIZATION OF THE DISULFIDE BRIDGE POSITION**

KUDELIN A. B., SHEMYAKIN V. V., KHOROSHILOVA N. I., OVCHINNIKOV Yu. A.

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

Chemical modification of sulfhydryl groups in cattle rhodopsin was carried out with a number of alkylating reagents. It was demonstrated that Cys¹⁴⁰ and Cys³¹⁶ of the native protein reacted with N-ethylmaleimide or iodoacetamide in the dark, while after illumination additional two, Cys³²² and Cys³²³, became susceptible to iodoacetamide. In the inverted photoreceptor membranes, pretreated with thermolysin, Cys¹⁸⁵ and Cys¹⁸⁷ were found to react in the dark. The presence of a disulfide bridge in rhodopsin was established and localized to Cys¹¹⁰ and Cys¹⁶⁷ residues. Under certain conditions fragment 241-327, the product of rhodopsin limited digestion with thermolysin, was demonstrated to form dimers as a consequence of disulfide bridge formation between a pair of Cys²⁶⁴ residues.