



УДК 577.322.4:547.962.4.04

СОСТОЯНИЕ ОСТАТКОВ ТИРОЗИНА И ТРИПТОФАНА  
В БАКТЕРИОРОДОПСИНЕ И БАКТЕРИООПСИНЕ

Алдашев А. А., Ефремов Е. С.

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

Методами флуоресценции, КД- и УФ-спектроскопии исследовано состояние тирозиновых и триптофановых остатков в бактериородопсине, бактериоопсине и комплексах бактериоопсина с различными аналогами ретиналя.

Показано, что в бактериородопсине доступен pH-титрованию лишь один остаток  $\text{Trp}^{26}$  с  $pK$   $10,6 \pm 0,3$ . В бактериоопсине в том же диапазоне pH титруются 3–4 тирозиновых остатка. Остатки триптофана в бактериородопсине недоступны ионам  $\text{Cs}^+$  и  $\text{I}^-$  — тушителям флуоресценции и находятся главным образом в центральной гидрофобной области мембраны на среднестатистическом расстоянии 22 Å от поверхности. На основании анализа эффективности миграции энергии в комплексах бактериоопсина с различными структурными аналогами ретиналя сделан вывод, что в нативных мембранах флуоресценция остатков триптофана сильно потушена из-за сближенности с пептидными группами соседних  $\alpha$ -спиральных сегментов; при этом степень миграционного тушения  $\text{Trp}$ -ретиналя не превышает 20%. По изменению спектральных параметров ароматических остатков показано разупорядочивание структуры мембраны при переходе от пурпурных мембран к апомембранам. Обсуждена роль хромофорной группы в стабилизации структуры мембраны.

Фотохимическая активность галофильных бактерий *Halobacterium halobium* связана с белком пурпурных мембран — бактериородопсином [1]. Его молекулы сгруппированы в тримеры и образуют правильную гексагональную решетку в мембране, причем каждая молекула состоит из семи  $\alpha$ -спиральных тяжей, пронизывающих мембрану почти перпендикулярно ее плоскости [2]. Поглощение квантов света хромофором бактериородопсина — ретиналем, образующим основание Шиффа с  $\epsilon$ -аминогруппой липидного остатка, приводит к направленному переносу протонов из цитоплазмы во внешнюю среду. Создаваемый при этом электрохимический градиент используется клеткой для синтеза АТФ, активного транспорта метаболитов, а также, возможно, и для фототаксиса [3].

Появившиеся в последние годы теории, объясняющие трансмембранный перенос протона, основаны либо на участии системы водородных связей в белке [3, 4], либо на разделении заряженных групп с запасанием необходимой энергии для переноса протона [5]. При этом, очевидно, большую роль должны играть конформационные изменения в структуре белка, сопряженные с изменениями в состоянии хромофора. Установление полной первичной последовательности бактериородопсина [6–8] и особенностей его укладки в мембране дает хорошую основу для исследования пространственного строения белка, выяснения роли отдельных аминокислотных остатков в переносе протона и установления механизма функционирования его как протонного насоса. В частности, как следует из анализа моделей укладки первичной структуры полипептидной цепи бактериородопсина [7], данных химической модификации [9, 10], исследования быстрой кинетики интермедиатов фотохимического цикла [11, 12], тирозиновые и триптофановые остатки в белке имеют существенное значение как для стабилизации внутренних гидрофобных областей мембраны, так и для протекания фотохимического цикла. Ряд авторов предполагают, что тирозиновый остаток может выступать в качестве донора протона у алдимины ретиналя [10–13]. С другой стороны, сопоставление состояния белка в нативной пурпурной мембране и в апомембране, содержащей лишешный хромофора бактериородопсин, дает возможность полнее выя-

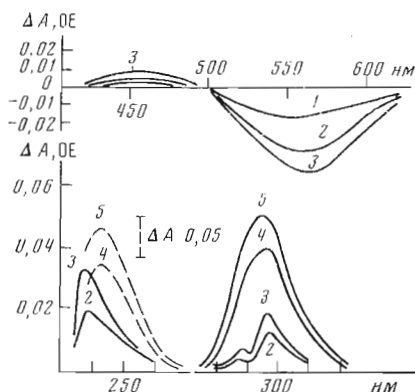


Рис. 1

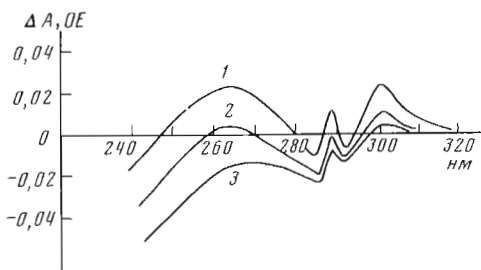


Рис. 2

Рис. 1. Дифференциальные спектры поглощения бактериородопсина при pH 9,3 (1), 10,8 (2), 11,5 (3) и бактериопсина при pH 10,8 (4), 11,5 (5). В кювете сравнения pH 6,4. Концентрация белка 0,17 мг/мл в 0,01 М трис-HCl-буфере

Рис. 2. Дифференциальные спектры поглощения бактериородопсина при титровании в кислую область до pH 3,0 (1), 3,5 (2), 3,8 (3). Условия см. рис. 1

вить роль хромофорной группы для структурной организации мембраны. Пока в этом отношении свойства апомембран исследованы недостаточно. Известно лишь, что вторичная структура белка в апомембране сохраняется почти неизменной [14] и добавление ретиналя [14, 15] приводит к восстановлению свойств пурпурной мембраны.

В настоящей работе методами флуоресценции, спектрофотометрии и КД исследовано состояние тирозиновых и триптофановых остатков в пурпурных и апомембранах, а также в мембранах с различными встроенными структурными аналогами ретиналя с целью выяснения особенностей микроокружения этих остатков в мембране и структурных различий нативных и апомембран.

В предложенной на основании данных первичной структуры и протеолизического расщепления пурпурных мембран схеме упаковки полипептидной цепи белка [7, 16] предполагается, что лишь небольшая часть ароматических остатков экспонирована в окружающую среду или находится вблизи поверхности мембраны. В рамках этой модели наиболее вероятно, что остатки триптофана должны преимущественно находиться в гидрофобной части мембраны и всего 3—4 остатка тирозина из 11 могут находиться в приповерхностной зоне мембраны. Для проверки этого предположения было проведено спектрофотометрическое pH-титрование пурпурных и апомембран.

В дифференциальных спектрах поглощения водной суспензии пурпурных мембран при щелочных значениях pH появляются отрицательная (560—570 нм) и положительная (460 нм) полосы хромофора вследствие гипсохромного сдвига хромофора в спектре поглощения (рис. 1), а при титровании в кислую области pH — полосы 640 и 540 нм из-за bathохромного сдвига полосы поглощения хромофора (не показано). При этом как для кислого, так и для щелочного перехода на спектральных кривых имеются изобестические точки соответственно при 580 и 500 нм. В области 230—320 нм, где поглощают в основном ароматические аминокислотные остатки, отчетливо проявляются полосы, характерные для остатков тирозина и триптофана. Возникающие при щелочном титровании полосы 297 и 240 нм относятся к остаткам тирозина в ионизованном состоянии, а полоса 288 нм — к остаткам триптофана вследствие гипсохромного сдвига полосы поглощения при их переходе в более полярное окружение [17]. В апомембранах проявляются лишь полосы ионизованного тирозина, а признаки перехода триптофанов в полярное окружение отсутствуют (рис. 1). Спектры в диапазоне длин волн 280—320 нм при кислом переходе (рис. 2) напоминают дифференциальные спектры глобулярных белков

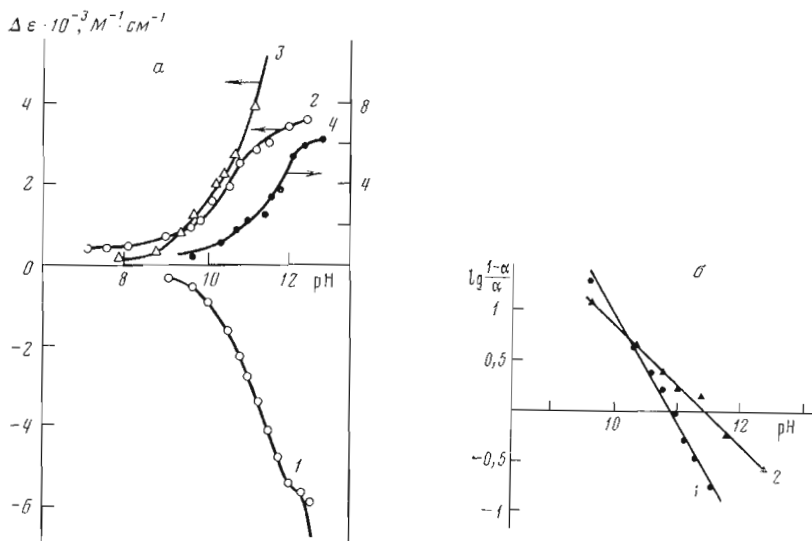


Рис. 3. *a* — кривые pH-зависимости поглощения бактериородопсина и бактериоопсина в УФ- и видимой области спектра: бактериородопсин, длина волны регистрации 570 нм (1), 297 нм (2); бактериоопсин при 295 нм (3) и ретинилбактериоопсин при 297 нм (4). Условия см. рис. 1. *б* — анализ титрования остатка тирозина в координатах Хилла.  $\lg((1-\alpha)/\alpha) = rK + n \cdot \text{pH}$ , где  $\alpha = \Delta A / \Delta A_{\text{макс}}$ ,  $\Delta A$  — изменения в спектре поглощения при ионизации тирозина,  $\Delta A_{\text{макс}}$  — максимальное изменение поглощения при полной ионизации тирозина,  $n$  — число титруемых остатков. 1 — бактериородопсин, 2 — бактериоопсин, длина волны регистрации 297 нм.  $r^2 > 0,99$

при переходе от нейтральных к кислым значениям pH или полученные при добавлении мочевины [18]. В таких случаях обычно появляются отрицательные пики 292–294 и 285–286 нм, обусловленные гипсохромным смещением спектра за счет изменения полярности окружения остатков триптофана или изменения их взаимодействия с пептидными группами белка в результате структурного перехода. Положительная полоса при 300 нм (рис. 2) свидетельствует о появлении отрицательного заряда или нейтрализации положительного заряда вблизи некоторого триптофанового остатка (ов) при этом pH-зависимом переходе (эффект может быть обусловлен, например, карбоксильными группами). Следует отметить, однако, что спектры поглощения при низких pH сильно искажены светорассеянием, и поэтому данное заключение имеет лишь качественный характер.

Рассмотрим более подробно pH-титрование остатков тирозина, проявляющееся в щелочной области pH. На рис. 3 представлены зависимости интенсивности полосы 297 нм от pH для нативных мембран, апомембран и мембран с восстановленным боргидридом натрия Шиффовым основанием ретиналя у остатка  $\text{Lys}^{216}$  [19, 20]. Здесь же показано изменение поглощения хромофора при 570 нм в тех же координатах.

Ранее нами впервые было показано, что в пурпурных мембранах в диапазоне pH 9–11,5 титруется лишь один тирозиновый остаток [21]. Впоследствии этот результат был подтвержден в работе [22]. В апомембранах в том же диапазоне pH титруется, судя по величине экстинкции полосы 295 нм, 3–4 тирозиновых остатка. Однако в этом случае нет отчетливой сигмоидной формы кривой титрования как в случае нативных мембран, что свидетельствует об увеличении числа титруемых тирозиновых остатков с близкими значениями  $rK$ .

Анализ кривых титрования бактериородопсина в координатах Хилла показал, что в бактериородопсине титруется один остаток Туг с  $rK = 10,6 \pm 0,3$  (см. рис. 3б).

Таким образом, наблюдающиеся различия в pH-титровании нативных и апомембран должны быть главным образом отнесены за счет изменений в структуре мембраны, происходящих при разрыве альдиминной связи

ретинала в присутствии гидроксилamina, а также при экстракции оксима ретинала из апомебран.

Существенно при этом, что, как видно из рис. 3а, изменения в спектрах поглощения тирозиновых остатков симбатны с изменениями в спектре поглощения хромофора. Основной переход в щелочной области ( $pH > 11,5$ ) был детально проанализирован в ряде работ [22, 23]. Сравнительно небольшие изменения поглощения хромофора в диапазоне  $pH$  8,5–11,5 были объяснены дефектами кристаллической решетки мембраны [23]. По-видимому, возможны и другие объяснения взаимосвязанных изменений поглощения хромофора и остатка тирозина. Как известно, переходы хромофора в кислой и щелочной областях  $pH$  зависят от ряда факторов:  $pH$ , температуры, добавок органических растворителей, детергентов, ионной силы растворов и т. д. Предполагается, в частности, что эффект добавления соли на сдвиг равновесия определяется влиянием электрического заряда сорбированных на поверхности мембраны катионов [24]. Вероятно, ионизация остатка(ов) тирозина также смещает это равновесие в направлении преобладания «щелочной» формы хромофора. Не исключено также, что если имеется более чем один участок связывания ретинала в мембране [25], то лишь часть хромофоров оказывается подвержена влиянию ионизации данного остатка тирозина. Очевидно, что представляет интерес идентификация этого тирозинового остатка.

Хотя по данным Богомолни и др. [41] во время фотохимического цикла происходит ионизация тирозинового остатка с  $pK$  10,5, а по приведенным здесь данным ионизация остатка с таким же  $pK$  влияет на поглощение хромофора, мы еще не можем сделать вывод о непосредственном контакте тирозинового остатка с хромофорной группой и тем более о его роли как донора протола для хромофора.

Высокая чувствительность структуры бактериородопсина к внешним воздействиям, таким, как изменения  $pH$ , температуры, ионной силы растворителя, добавок органических растворителей и детергентов и т. д., не исключает возможность опосредованных эффектов ионизации тирозина на состояние хромофора.

Нами исследованы мембраны с хромофором, восстановленным боргидридом натрия на свету, в которых ретинил ковалентно связан с  $Lys^{216}$ . Как и в нативных мембранах, в ретинилбактериоопсине  $pH$ -титрование доступен лишь один тирозиновый остаток, но его  $pK$  сдвинуто в щелочную область ( $pK$  11,5, см. рис. 3б, линия 2). Столь большое изменение значения  $pK$  можно объяснить либо конформационными переходами, в результате которых этот остаток тирозина или сближается с отрицательно заряженной группой или около него исчезает отрицательный заряд. Но поскольку исследования препаратов бактериородопсина, восстановленных боргидридом натрия на свету, показали, что структура их мало отличается от нативных мембран, то, по-видимому, участок связывания хромофора и его ориентация в этом случае те же самые, что и для ретинала в бактериородопсине [3, 26]. Поэтому такой сдвиг  $pK$  можно объяснить исчезновением положительного заряда около тирозина при восстановлении альдиминной связи боргидридом натрия. Возможно, что этот положительный заряд был локализован на протонированном альдимине. Тогда, согласно теории Танфорда [27], увеличение  $pK$  на 0,9 единицы  $pH$  соответствует исчезновению положительного заряда на расстоянии  $5 \pm 1 \text{ \AA}$  от ионизованной группы. В везикулах этот тирозин уже не титруется.

Ранее [24] нами была исследована серия препаратов бактериородопсина, модифицированных тетранитрометаном. При нитровании трех тирозиновых остатков на свету в спектре поглощения наблюдается сдвиг полосы хромофора к 530 нм. В то же время в дифференциальном спектре поглощения полоса 297 нм, соответствующая тирозинату, при  $pH$ -титровании не появляется вплоть до  $pH$  11,8. Для препаратов, модифицированных в темноте, где титруются в сумме три остатка, сдвига в спектре поглощения хромофора не наблюдается, но, как и в нативных пурпурных мембранах, титруется один остаток тирозина при тех же значениях  $pH$ . Исходя из этих данных, можно заключить, что при модификации тетранитроме-

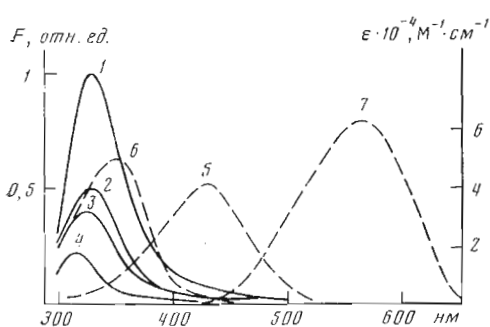


Рис. 4

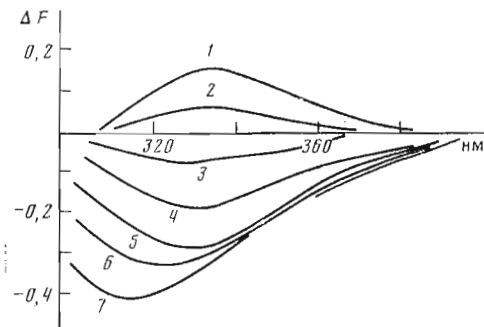


Рис. 5

Рис. 4. Корректированные спектры триптофановой флуоресценции белка (1-4) и спектры поглощения аналогов ретиналя (5-7) в комплексах с бактериоопсином: 1 - бактериоопсин; 2 - комплекс с диметиламинохалконом; 3 - с оксимом ретиналя; 4 - бактериородопсин; 5 - поглощение диметиламинохалкона в комплексе; 6 - оксима ретиналя в комплексе; 7 - поглощение хромофора в бактериородопсине. Площади под кривыми пропорциональны квантовым выходам флуоресценции

Рис. 5. Дифференциальные спектры флуоресценции бактериородопсина при рН 4,0 (1), 3,5 (2), 8,0 (3), 9,0 (4), 10,0 (5), 11,8 (6),  $\Delta F$  - изменение интенсивности флуоресценции в относительных единицах. Исходное рН 6,4. Концентрация белка 0,03 мг/мл в 0,01 М трис-НСl-буфере,  $\lambda_{возб}$  280 нм

таном на свету модифицируется тот самый остаток тирозина с  $pK$   $10,6 \pm 0,3$  и этот остаток локализован в непосредственной близости от хромофора. Лемке и Остерхельт [10] модифицировали тетранитрометаном на свету в аналогичных условиях препараты бактериородопсина, исследование которых показало, что модификация только одного из остатков тирозина приводила к гипсохромному сдвигу поглощения хромофора к 530 нм. Им удалось отнести этот остаток к  $Tyr^{26}$ .

В бактериоопсине при  $pH \sim 12$  уже титруется 3-4 остатка тирозина (рис. 3а). В бактериородопсине имеется три локализованных на поверхности тирозиновых остатка,  $Tyr^{64}$ ,  $Tyr^{131}$ ,  $Tyr^{133}$ , и один остаток, доступный химической модификации тетранитрометаном -  $Tyr^{26}$  [10, 28], а титруется с  $pK$  10,6 только один (вероятно,  $Tyr^{26}$ ). Скорее всего, у остальных остатков тирозина, находящихся на поверхности мембраны,  $pK$  гидроксильной группы завышено близлежащими отрицательно заряженными группами. Переход в бактериоопсин сопровождается конформационными изменениями, в результате которых происходит пространственное разобщение тирозиновых остатков и отрицательных зарядов, что и наблюдается нами по снижению  $pK$  этих остатков.

Состояние триптофановых остатков, как уже упоминалось выше, меняется как при кислом, так и при щелочном переходе. При этом в обоих случаях окружение триптофановых остатков становится более полярным. Спектр собственной белковой флуоресценции бактериородопсина имеет аномально коротковолновый максимум при 317 нм (рис. 4, спектр 4). Основной вклад в флуоресценцию дают триптофановые остатки, поскольку положение максимума флуоресценции не зависит от длины волны возбуждения. Такой необычной коротковолновой флуоресценцией могут обладать лишь триптофановые остатки, находящиеся в неполярном окружении. При добавлении ионов  $Cs^+$  и  $I^-$  тушения флуоресценции не наблюдалось. Следует отметить, однако, что в работе Богомоли и др. [11] было указано положение максимума флуоресценции пурпурных мембран в районе 350 нм и показано небольшое тушение флуоресценции ионами  $Cs^+$ . Кроме того, на основании исследования быстрой кинетики ими была продемонстрирована гетерогенность белковой флуоресценции в диапазоне от 300 до 385 нм. Расхождение с нашими данными в отношении максимумов флуоресценции, по-видимому, обусловлено тем, что в работе [11] не проводилось коррекции спектров, а также различием штаммов галобактерий.

Флуоресцентные параметры донорно-акцепторных пар \*

Акцептор	Поглощенные акцептора ( $\lambda_{\text{макс}}$ , нм)	$Q_{\text{Тгр}}$ в комплексе	Интеграл перекрытия, $I \cdot 10^{13}$	$R_0$ , Å	$E_0$	$E_M$	$\frac{E_0}{E_M}$	$R_X$ , Å
Ретиналь	570	$0,011 \pm 0,003$	0,051	20,7	0,86			
$S_{18}$ -Кетон	410	$0,009 \pm 0,002$	0,85	33	0,91			
$S_{14}$ -Альдегид	260	$0,033 \pm 0,005$			0,67			
Диметиламино-халкон	430	$0,033 \pm 0,006$	0,15	25,1	0,67	0,59	0,08	23,7
Оксим ретиналя	350	$0,026 \pm 0,003$	0,85	33	0,71			
Ретинил-Lys <sup>216</sup>	362	$0,009 \pm 0,001$	0,41	29,3	0,92	0,56	0,36	28,2
Ацетат витамина А	330	$0,031 \pm 0,007$	0,45	30	0,69	0,43	0,26	31,5

\*  $Q$  — квантовый выход флуоресценции;  $R_0$  — расстояние, при котором эффективность переноса составляет 50%;  $R_X$  — расстояние между донорно-акцепторной парой;  $E_0$  — эффективность тушения флуоресценции белка;  $E_M$  — эффективность переноса энергии донора на молекулу акцептора (определено только для флуоресцирующих акцепторов). Ретинил-Lys<sup>216</sup> имеет в спектре поглощения тонкую структуру, 362 нм — положение основного пика.

Из исследованной нами pH-зависимости дифференциальных спектров флуоресценции (рис. 5) отчетливо проявляется гетерогенность микроокружения триптофановых остатков. В области низких значений pH возрастает флуоресценция триптофановых остатков с максимумом 335 нм, а при щелочном переходе происходит тушение остатков в жестком гидрофобном окружении ( $\lambda_{\text{макс}}$  315–325 нм). Из этих данных видно, что основной вклад в флуоресценцию обусловлен триптофановыми остатками, находящимися в гидрофобном окружении, флуоресценция же триптофановых остатков в слабополярном окружении сильно потушена.

Для оценки местонахождения восьми триптофановых остатков в мембране был проведен расчет эффективности миграции энергии от триптофановых остатков к сорбированному на поверхности мембраны флуоресцентному зонду АНС. При титровании суспензии апомембран раствором АНС его флуоресценция с максимумом при 505 нм увеличивалась незначительно даже при молярных соотношениях АНС/белок 35:1, в то же время собственная флуоресценция тушилась достаточно эффективно. На основании эффективности тушения триптофановых остатков ( $E=0,35$ ) [25] было найдено, что среднее расстояние триптофановых остатков от поверхности мембраны составляет 22 Å.

Малоинтенсивная собственная флуоресценция бактериородопсина с максимумом 317 нм, вероятно, обусловлена в основном одним остатком триптофана. Более эффективное тушение этого остатка триптофана в везикулах, ориентированных цитоплазматической стороной наружу (эффективность миграции равна 0,55), свидетельствует о том, что этот остаток находится несколько ближе к цитоплазматической поверхности. Расстояние его от поверхности было найдено равным 19,3 Å. Эти расчеты подтверждают наше предположение о локализации основной части остатков триптофанов в бактериородопсине в глубине мембраны (на расстоянии от поверхности ~22 Å).

Дополнительным тестом, подтверждающим этот вывод, стал эксперимент по связыванию ионов  $Tb^{3+}$  с апомембранами. Ионы  $Tb^{3+}$  преимущественно связываются с карбоксильными группами, которых много (особенно в С-концевой части белка) на поверхности мембраны. Отсутствие сенсibilизированной флуоресценции  $Tb^{3+}$  при добавлении к апомембранам свидетельствует об отсутствии в местах связывания этих ионов на поверхности мембраны триптофановых остатков.

Очень низкий квантовый выход флуоресценции нативных мембран ( $0,011 \pm 0,003$ ) с очевидностью свидетельствует о том, что большинство из 8 триптофановых остатков сильно затушены. Обесцвечивание пурпурных мембран на свету в присутствии гидроксиламина приводит к сдвигу максимума флуоресценции к 330 нм (рис. 4) и возрастанию квантового выхода

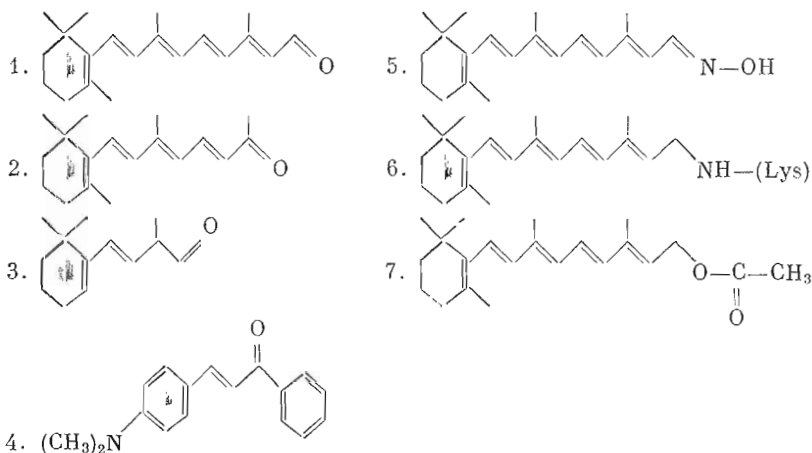
неэкстрагированных (содержащих оксим ретиналя) апомембран до  $0,026 \pm \pm 0,003$ , а в экстрагированных (без оксима ретиналя) — до  $0,1 \pm 0,01$  (табл. 1).

Причиной столь эффективного (более чем 10-кратного) тушения флуоресценции триптофановых остатков вряд ли может быть тушение ионными группами ( $\text{COO}^-$ ,  $\text{NH}_3^+$ ), поскольку в области pH, соответствующей депротонированию  $\text{NH}_3^+$ - и протонированию  $\text{COO}^-$ -группы, не происходит ожидаемых изменений интенсивности флуоресценции (в кислой области pH происходит возрастание флуоресценции с максимумом 335 нм на 15%, хотя  $\text{COOH}$ -группа — более эффективный тушитель триптофановой флуоресценции, чем ионизованный карбоксил).

Коротковолновая флуоресценция триптофановых остатков, находящихся в гидрофобном окружении, начинает меняться лишь при значениях pH, соответствующих началу денатурации белка ( $\text{pH} > 11,0$ ).

Эффективная миграция энергии триптофановых остатков на ретиналь в пурпурных мембранах могла бы объяснить резкое падение квантового выхода этих остатков.

Для того чтобы ответить на вопрос, насколько миграция энергии обуславливает снижение квантового выхода остатков триптофана в бактериородопсине, мы исследовали препараты бактериородопсина, в которых хромофор был заменен на ряд его аналогов:



где 1 — полностью-*E*-ретиналь, 2 —  $\text{C}_{18}$ -кетон, 3 —  $\text{C}_{11}$ -альдегид, 4 — диметиламинохалкон, 5 — оксим ретиналя, 6 — ретинил-(лизин), 7 — ацетат витамина А.

Эффективность миграции энергии ( $E$ ) от триптофановых остатков на соответствующую хромофорную группу определялась двумя способами: по уменьшению квантового выхода донора ( $E_0$ ) и по возрастанию флуоресценции акцептора ( $E_M$ ). В первом случае расчет  $E_0$  производился по формуле

$$E_0 = 1 - \frac{Q}{Q_0}, \quad (1)$$

где  $Q$  — квантовый выход остатков триптофана при наличии безызлучательного переноса энергии на акцептор.

В случае флуоресцирующих хромофорных аналогов (диметиламинохалкон, ацетат витамина А, ретинил) эффективность миграции  $E_M$  определялась по скорректированным спектрам возбуждения или по так называемой сенсibilизированной флуоресценции акцептора [29] в соответствии с уравнением

$$E_M = \frac{Q_A^{\lambda_d} - Q_A^{\lambda_A} f_A}{Q_A^{\lambda_A} f_d}, \quad (2)$$

где  $Q_A^{\lambda A}$  — квантовый выход акцептора на длине волны, где нет поглощения донора (т. е. при прямом возбуждении акцептора),  $Q_A^{\lambda D}$  — квантовый выход акцептора на длинах волн, где поглощает донор (т. е. в условиях переноса энергии от донора к акцептору),  $f_D$ ,  $f_A$  — доли поглощенного света соответственно донорной и акцепторной группой.

Поскольку уменьшение квантового выхода донора может быть обусловлено и другими, кроме миграции энергии, процессами тушения, разность в величинах эффективности миграции энергии по квантовому выходу донора и сенсбилизации флуоресценции акцептора отнесена нами к эффективности немиграционного тушения.

Оценка расстояния ( $R_X$ ) от остатков Trp до хромофорной группы проводилась по уравнению

$$R_X = R_0 \sqrt{\frac{1}{E} - 1}, \quad (3)$$

где  $R_0$  — расстояние между донором и акцептором энергии при 50% эффективности переноса. При расчете параметра  $R_0$  [29] принято, что  $Q$  (квантовый выход донора) = 0,20,  $n$  (показатель преломления) = 1,5 и  $K^2$  (коэффициент, учитывающий взаимную ориентацию донора и акцептора) =  $2/3$  (как для случая их беспорядочной ориентации), интеграл перекрывания ( $I$ ) полосы флуоресценции донора и полосы поглощения акцептора рассчитан для скорректированных спектров флуоресценции.

Спектры флуоресценции и поглощения для некоторых комбинаций донорных и акцепторных групп приведены на рис. 4, а ряд экспериментальных и рассчитанных параметров дан в табл. 1.

Прежде всего обращает на себя внимание тот факт, что расстояния между триптофановыми остатками и хромофорной группой, рассчитанные на основе миграционного тушения, достаточно близки между собой и в среднем составляют 28–30 Å (в случае диметиламинохалкона оно несколько меньше — 23,7 Å, что, вероятно, обусловлено наличием более чем одного участка связывания для этого флуоресцентного зонда).

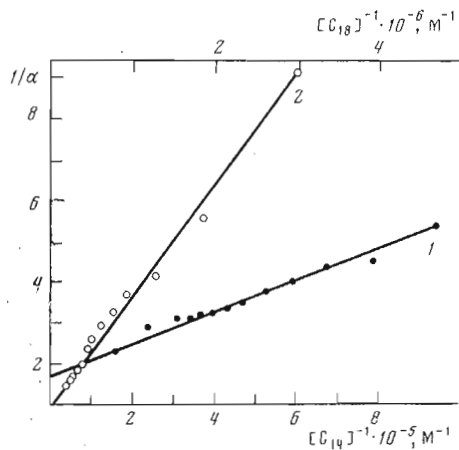
Для бактериородопсина расстояние остаток триптофана — ретиналь не может быть непосредственно рассчитано, поскольку из-за низкого квантового выхода ретиналя ( $Q=0,003$ ) [30] измерение его сенсбилизированной флуоресценции затруднено. Однако можно с уверенностью принять это расстояние равным 28–30 Å, как и для других хромофоров, в частности для ретинил-Lys<sup>216</sup> (табл. 1), поскольку в соответствии с последними данными [19, 20] наиболее вероятная локализация хромофора в нативных мембранах оказывается именно у этого остатка лизина и по своим параметрам этот ретинилбактероопсин напоминает бактериородопсин. Такое расстояние, согласно уравнению 3, должно отвечать эффективности миграционного тушения ( $E_M$ ) = 0,135.

Подтверждением этого вывода служат также данные по флуоресценции бактериородопсина, солюбилизованного в неионном детергенте β-октил-D-глюкозиде. После солюбилизации квантовый выход собственной флуоресценции белка увеличивается до 0,071, а при обесцвечивании солюбилизованного бактериородопсина в гидроксиламине — до 0,092. В случае обесцвеченных препаратов можно пренебречь миграцией энергии с остатков триптофана на ретинальоксим, поскольку он равномерно распределен в основном в мицеллах детергента, о чем свидетельствует отсутствие полосы оксима ретиналя в спектрах КД. Это соответствует  $E_0 = 1 - 0,071/0,092 = 0,22$ .

Таким образом, мы приходим к выводу, что эффективность миграции энергии с остатков триптофана на ретиналь сравнительно невелика (14–30%), степень же немиграционного тушения составляет 60–75%. Дополнительным свидетельством отсутствия эффективной миграции энергии с остатков триптофана на хромофор является отсутствие корреляции между степенью тушения и величиной интеграла перекрывания флуоресценции донора и поглощения акцептора (табл. 1, рис. 4). Особенно наглядно это проявляется в случае комплекса бактериоопсин — C<sub>14</sub>-альде-



Рис. 6. Определение констант связывания  $C_{18}$ -кетона (1) и  $C_{14}$ -альдегида (2) с бактериоопсином по тушению собственной флуоресценции белка в координатах Клотца (см. «Экспер. часть»).  $\alpha = \Delta F/F_{\text{макс}}$ ;  $r^2 > 0,99$ . Условия см. подпись к рис. 5.  $K_{d1}, 1,9 \cdot 10^{-7}$  М,  $K_{d2}, 1,4 \cdot 10^{-5}$  М



гид, в котором практически нет перекрывания спектра поглощения со спектром флуоресценции триптофанов, но в то же время флуоресценция белка достаточно эффективно затухает ( $K_d = 1,4 \cdot 10^{-5}$  М, рис. 6),

$$E_0 = 1 - \frac{0,033}{0,10} = 0,67.$$

Из рис. 4 и табл. 1 видно, что аналоги с хорошим перекрытием спектров поглощения и флуоресценции (оксим ретиналя, ацетат витамина А) тушат флуоресценцию белка гораздо слабее, чем аналоги с меньшим интегралом перекрывания и чем нативный хромофор, у которого интеграл перекрывания на порядок меньше. Для флуоресцирующих аналогов была оценена эффективность переноса энергии по скорректированным спектрам возбуждения флуоресценции. Оказалось, что во всех рассмотренных случаях перенос энергии, рассчитанный по спектрам возбуждения, меньше, чем эффективность переноса по тушению флуоресценции триптофановых остатков. Это означает, что кроме переноса энергии флуоресценции донора на акцептор имеют место иные процессы, влияющие на квантовый выход триптофановых остатков, т. е. немиграционное тушение ( $E_0 - E_M$ ) (см. табл. 1). При этом характерно, что диметиламинохалкон, который локализуется преимущественно в липиде [31], при связывании с апомембранами имеет самое низкое значение немиграционного тушения триптофанов (0,08). Самая большая величина немиграционного тушения (0,36) в ретинилбактериоопсине (табл. 1).

На основании вышеизложенного очевидно, что наибольшая степень немиграционного тушения в нативном бактериородопсине составляет 0,60–0,75. Однако в этом случае возникает вопрос: почему  $C_{14}$ -альдегид, слабо связываясь с апомембранами (см.  $K_d$ , рис. 6), сильно тушит флуоресценцию триптофанов (0,67), гораздо сильнее, чем ретинил в ретинилбактериородопсине ( $E_0 - E_M = 0,36$ )? Станным кажется также, что при сильном сходстве ретинилбактериоопсина с бактериородопсином имеется большое различие в значениях немиграционного тушения триптофановых остатков ретинилом и ретиналем. Причина, по-видимому, заключается в том, что имеется конкуренция миграционного и немиграционного процессов тушения. В одних случаях предпочтительна миграция энергии, в других — немиграционное тушение.

Диметиламинохалкон локализуется преимущественно в липиде, и его участок связывания не перекрывается с участком связывания хромофора в бактериородопсине [31]. Для него наблюдается самое большое из всех аналогов значение эффективности переноса энергии с остатков триптофана, несмотря на гораздо меньший интеграл перекрывания. Изучение комплексов бактериоопсина с диметиламинохалконом и другими аналогами показало, что только встраивание в участок связывания хромофора индуцирует такие переходы в структуре белка, при которых основная часть триптофанов сближается с тушащими группами.

В работе Каллиски и др. [32], напротив, утверждается, что перенос энергии от триптофановых остатков на ретиналь составляет 80%. Возможно, причина расхождения заключается в том, что авторы в расчете эффективности миграции использовали значение квантовой эффективности цикла 0,25. Между тем эта величина была определена для возбуждения в пределах основной полосы с максимумом 570 нм, а не для возбуждения при 265 нм, как это делалось в данной работе.

Вероятно, природа переходов в области 260–280 и 560–570 нм различна, и трудно ожидать в этом случае одинаковых значений квантовой эффективности. Кроме того, известные из литературы величины квантовой эффективности колеблются от 0,30 до 0,79 [3]. Если вместо значения 0,25 использовать, например, 0,75, то эффективность миграции энергии, рассчитанная по данным Каллиски и др. [32], будет составлять 0,20, как и в нашей работе.

Кроме того, в расчеты этих авторов [32] входит величина поглощения хромофора при 265 нм, которая до сих пор точно не определена, поскольку не известна доля поглощения белка в этой области и вклад светорассеяния.

Таким образом, эффективное тушение флуоресценции триптофановых остатков в бактериородопсине не может быть объяснено только миграцией энергии на хромофор и тушение  $\text{NH}_2$ - и  $\text{COO}^-$ -группами. Мы полагаем, что флуоресценция триптофановых остатков, находящихся в нативных мембранах в гидрофобном окружении, потушена за счет пептидных групп белка. По данным электронной дифракции [2],  $\alpha$ -спиральные сегменты бактериородопсина упакованы весьма плотно. Расстояние между центрами соседних  $\alpha$ -спиральных столбов составляет 10–12 Å. Поскольку гидрофобные боковые цепи  $\alpha$ -спиралей ориентируются в сторону от оси спирали [33], то с учетом среднего диаметра  $\alpha$ -спирали (10 Å) можно сделать вывод, что индолные кольца триптофановых остатков неизбежно должны тесно контактировать с соседними  $\alpha$ -спиральными сегментами, в результате чего их флуоресценция может быть сильно потушена. По изменению флуоресцентных спектров апомембран при включении аналогов ретиналя (рис. 4) удается наблюдать гетерогенность триптофановых остатков, которая проявлялась уже при титровании белка (рис. 6) и была отмечена Богомолин и др. [11] при изучении фотохимического цикла бактериородопсина. При образовании нековалентного комплекса с аналогами тушатся главным образом триптофановые остатки, имеющие максимум 330 нм, а в ковалентных комплексах с ретиналем и ретинилом — также и остатки с максимумом 320 нм (рис. 4). Флуоресценция триптофановых остатков с  $\lambda_{\text{макс}}$  317 остается неизменной. Следовательно, в контакте с пептидными группами белка находятся и переносят энергию на хромофор триптофановые остатки с флуоресценцией при 320–330 нм.

Однако возможно, что изначально гетерогенность триптофановых остатков в апомембране отсутствует, но в результате конформационных изменений при встраивании ретиналя и его аналогов триптофановые остатки переходят в более гидрофобное окружение. Наличие в бактериородопсине популяции триптофановых остатков с максимумом 317 нм, доступной ионам  $\text{Ag}^+$ , все же свидетельствует в пользу предположения о гетерогенности остатков триптофана в бактериородопсине. Тогда триптофановые остатки с максимумом при 317 нм должны находиться в таком участке бактериородопсина, конформация которого не меняется при переходе в бактериородопсин, и в то же время достаточно далеко от участка связывания хромофора, так что исключается перенос энергии с этих остатков на хромофор.

Если бактериородопсин сольбилизовать в цетилтриметиламмонийбромиде (СТАВ) или в додецилсульфате натрия и нагреть до 50–60° С, препарат обесцвечивается, максимум в спектре испускания белка сдвигается к 340 нм и квантовый выход собственной флуоресценции белка возрастает на 30% (табл. 2) по сравнению с бактериородопсином. Это подтверждает наше предположение о том, что даже в бактериородопсине трип-

## Изменение параметров собственной флуоресценции белка как индикатор нарушения пространственной структуры бактериородопсина

Параметр	Нативный белок	Ковалентный комплекс	Нековалентный комплекс	Солюбилизованный в неионном детергенте	Бактериородопсин	Денатурированный бактериородопсин *
$\lambda_{\text{возб}}$ , нм	317	317	325	330	330	340
Квантовый выход, $Q$	$0,011 \pm 0,003$	$0,009 \pm 0,002$	$0,03 \pm 0,007$	$0,071 \pm 0,005$	$0,1 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,02$

\* Бактериородопсин солюбилизовали в додецилсульфате натрия при температуре 50° С 15 мин.

тофановые остатки находятся в гидрофобном окружении. Солюбилизация с последующей тепловой денатурацией приводит к нарушению не только третичной, но и вторичной структуры бактериородопсина. При этом триптофановые остатки становятся доступными растворителю, что подтверждается батохромным сдвигом в спектре флуоресценции и возрастанием доступности триптофановых остатков ионам-тушителям I<sup>-</sup>.

Анализ поляризационных спектров собственной флуоресценции бактериородопсина позволяет оценить вклад остатков тирозина в спектрах испускания пурпурных мембран [34], неэкстрагированных апомембран (содержащих оксим ретиналя) и экстрагированных апомембран (без оксима). Коротковолновый максимум в спектре флуоресценции бактериородопсина позволяет предположить сильный вклад флуоресценции остатков тирозина. Отношение анизотропии флуоресценции на коротковолновом краю спектра, где должен быть сильный вклад тирозинов, к анизотропии на длинноволновом краю, где излучают только остатки триптофана, будет сильно зависеть от длины волны возбуждения, если в спектре флуоресценции есть значительный вклад от остатков тирозина. Для бактериородопсина это отношение  $r_{340}/r_{315}$  от длины волны возбуждения зависит мало (рис. 7, кривая 1). В этом случае собственная флуоресценция бактериородопсина, имеющая максимум 317 нм, обусловлена лишь 1–2 остатками триптофана. Высокое значение отношения анизотропии при возбуждении в максимуме к анизотропии при возбуждении на длинноволновом краю спектра поглощения  $r_{280}/r_{300}=0,37$  свидетельствует о сильной миграции энергии с остатков тирозина на эти триптофаны. После разрыва альдиминной связи в гидроксиламине отношение  $r_{340}/r_{315}$  уже зависит от длины волны возбуждающего света (рис. 7, кривая 2). Таким образом, в неэкстрагированных апомембранах свимается тушение не только с остатков триптофана, но и с части остатков тирозина. В экстрагированных апомембранах такой зависимости нет (рис. 7, кривая 3), т. е. после экстракции остатки тирозина опять тушатся, вероятно, из-за усиления процессов миграции энергии на триптофановые остатки. Действительно, отношение  $r_{280}/r_{300}=0,34$ , что свидетельствует о сильном переносе энергии с тирозинов на триптофановые остатки и между триптофановыми остатками в бактериородопсине.

Из полученных данных следует, что при переходе от нативных мембран к апомембранам при сохранении вторичной структуры белка [14] происходит значительное изменение в третичной структуре, проявляющееся в увеличении числа титруемых остатков тирозина, возрастании квантового выхода и сдвиге спектра испускания собственной флуоресценции белка, а также, по данным Хендерсона [26], в нарушении гексагональной решетки мембраны. Характерным признаком структурных различий нативных и апомембран является наличие или отсутствие гиперхромного эффекта полосы поглощения ароматических остатков, о чем упоминалось ранее [35]. В нативных мембранах величина молярного коэффициента экстинкции составляет  $93\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  при 280 нм, тогда как ожидаемое поглощение от 8 остатков триптофана и 11 тирозинов в сумме не превышает 58 000 в случае их полярного окружения

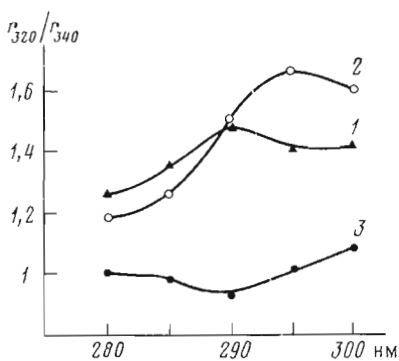


Рис. 7

Рис. 7. Зависимость анизотропии поляризации флуоресценции в максимуме и на длинноволновом краю полосы излучения от длины волны возбуждающего света для пурпурных мембран (1), апомембран с неэкстрагированным оксимом ретиналя (2) и экстрагированных апомембран (3). Условия см. рис. 5.

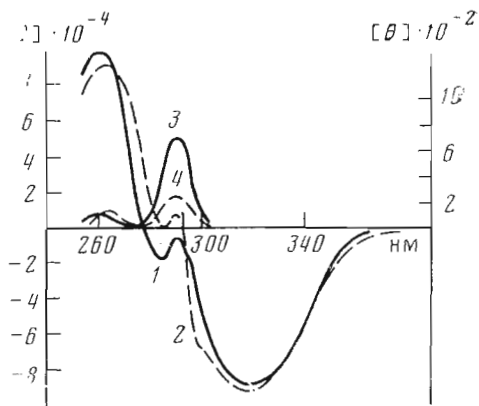


Рис. 8

Рис. 8. Спектры КД в ближней УФ-области для бактериородопсина при pH 6,1 (1) и 10,8 (2) и для бактериоопсина при pH 6,4 (3), 11,0 (4). Концентрация бактериородопсина 0,44 мг/мл, бактериоопсина 2,6 мг/мл в 0,01 М трис-НСl.  $[\theta]$  — эллиптичность в град·см<sup>2</sup>/дмоль

и 78 000 — для неполярного. Различие экспериментальной и рассчитанной величин должно быть отнесено к особому состоянию ароматических остатков в мембране. Возможно, это следствие их жесткого микроокружения или наличия взаимодействий между остатками триптофана.

В апомембранах гиперхромизм выражен слабее ( $\epsilon_{280}$  82 000 М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>, данные Бичер и др. [35]). Ситуация аналогична для пурпурных мембран, солиubilизированных в неионном детергенте β-октил-D-глюкозиде. В нековалентных комплексах бактериоопсина с аналогами ретиналя гиперхромизм не достигает величины, соответствующей пурпурным мембранам, хотя выше, чем в апомембранах (для комплекса бактериоопсин-С<sub>18</sub>-кетон  $\epsilon_{280}$  9000 М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>), а в комплексе с диметиламинохалконом, локализующимся преимущественно в липидной области мембраны, гиперхромный эффект вообще отсутствует. По-видимому, в апомембранах и в нековалентных комплексах структура мембраны отличается от нативной в отношении укладки полипептидной цепи и окружения ароматических остатков, в то время как вторичная структура белка при этом практически не меняется [14].

В спектрах кругового дихроизма (рис. 8) полосы ароматических остатков при 290 нм в апомембранах имеют существенно меньшую эллиптичность, чем в нативных мембранах, что свидетельствует о переходе по крайней мере части этих остатков в более изотропное окружение.

Депротонирование одного остатка тирозина в нативных мембранах отчетливо проявляется в спектрах КД по полосе 297 нм и доказывает его явно асимметричное микроокружение. В то же время в апомембранах титрование 3–4 тирозиновых остатков в диапазоне pH 6,0–12,5 не сопровождается подобными изменениями в спектре КД (рис. 8). Это подтверждает различие титруемых остатков в бактериоопсине и бактериородопсине. Все эти факты согласуются с представлением о более рыхлой структуре апомембран по сравнению с нативными мембранами. Это различие проявляется в большей проницаемости апомембран для катионов [36], увеличении числа титруемых остатков тирозина, уменьшении гиперхромного эффекта ароматических остатков, возрастании квантового выхода и сдвига максимума собственной флуоресценции белка за счет уменьшения тушения флуоресценции пептидными группами и в уменьшении наведенного эффекта КД в апомембранах в полосе поглощения ароматических остатков.

Наиболее вероятным представляется такое изменение структуры белка при переходе от бактериородопсина к батериоопсину, при котором происходит пространственное разобщение  $\alpha$ -спиральных столбов, пронизывающих мембрану, или изменение их углов наклона по отношению к плоскости мембраны.

Ранее был разработан метод получения высокоориентированных пленок бактериородопсина на подложках [37] и определена ориентация  $\alpha$ -спиральных столбов, которая оказалась близка к нормали к плоскости мембраны ( $<27^\circ$ ). Мы использовали эту методику для приготовления ориентированных пленок апомембран. Изучение спектров ИК-линейного дихроизма показало значительное увеличение угла наклона  $\alpha$ -спиральных столбов к нормали в батериоопсине по сравнению с бактериородопсином:  $50$  и  $30^\circ$  соответственно. Таким образом, в батериоопсине наличие разупорядочивание пространственной структуры белка, связанное с изменением ориентации  $\alpha$ -спиральных столбов. Поскольку определялась суммарная ориентация  $\alpha$ -спиральных сегментов, к сожалению, нельзя сказать, сколько  $\alpha$ -спиральных столбов и в какой степени изменили свою ориентацию.

Результаты настоящей работы с очевидностью свидетельствуют о важной роли хромофорной группы в поддержании пространственной структуры бактериородопсина. При этом необходимо, чтобы хромофор или его аналог был ковалентно связан с  $\epsilon$ -аминогруппой лизина. Нековалентные комплексы не способны образовывать высокоупорядоченную структуру, аналогичную структуре, которую бактериородопсин имеет в пурпурных мембранах.

Чувствительным индикатором состояния бактериородопсина в мембране являются ароматические остатки. Положение максимума флуоресценции и квантовый выход флуоресценции триптофановых остатков может быть использован в качестве теста на изменение этого состояния (табл. 2).

### Экспериментальная часть

Пурпурные мембраны из клеток *H. halobium* выделяли по методике, описанной в работе [1]. После центрифугирования в градиенте плотности сахарозы фракцию пурпурных мембран освобождали от сахарозы ультрафильтрацией с повторным разбавлением (1:20) 0,01 М раствором EDTA и последующей гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 (крупный).

Апомембраны получали обесцвечиванием пурпурных мембран в 0,2 М гидроксиламине (рН 9). Апомембраны отмывались от гидроксилamina гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 (крупный). Экстрагированные апомембраны получали экстракцией оксима ретиналя из лиофилизированных апомембран гексаном либо петролейным эфиром [38].

Бактериородопсин, солибилизированный в  $\beta$ -октил-*D*-глюкозиде, получали по методике, описанной в работе [39]. К суспензии пурпурных мембран (0,02 мМ) прибавляли 0,4 М раствор детергента до концентрации 4,1 мМ и выдерживали 12 ч при  $5^\circ$  С. Концентрацию бактериородопсина определяли спектрофотометрически, используя значение коэффициента молярной экстинкции  $\epsilon_{370}$   $63\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Концентрацию апомембран определяли по концентрации бактериородопсина, образующегося при добавлении к суспензии раствора *полностью-Е*-ретиналя.

Ориентированные пленки бактериородопсина и батериоопсина для измерения ИК-линейного дихроизма получали изопотенциальным центрифугированием с высушиванием на подложках из кварца и флюорита при ускорении 10 000g (ротор SW 25.2) на ультрацентрифуге Beckman L5-50 по методике, описанной в работе [37]. Поляризационные спектры ИК снимали на двухлучевом ИК-спектрометре Perkin-Elmer 180 (США) в однолучевом режиме с использованием поляризационного элемента AgBr. Измерения поглощения проводили при углах наклона образца к вектору электрического поля световой волны  $\alpha_0=0, 15, 30, 45, 60^\circ$  для

горизонтально и вертикально поляризованного света. Из спектра образца вычитали спектр подложки.

Препараты бактериородопсина, модифицированные тетранитрометаном на свету, получали согласно методике, описанной Лемке и Остерхельтом [10]. К 0,1 мМ раствору пурпурных мембран в 0,1 М трис-НСl-буфере при рН 8,0 в объеме 10 мл добавляли 26 мкл 10% раствора тетранитрометана при температуре 25°С и комнатном освещении. Через 30 мин реакцию останавливали впрыскиванием реакционной смеси в 10-кратный объем 1% меркаптоэтанола. Мембраны отмывали 4 раза водой и осаждали на центрифуге при ускорении 150 000g в течение 45 мин. Модификацию наблюдали по сдвигу максимума в спектре поглощения к 532 нм, количество метки определяли спектрофотометрически по полосе 430 нм при рН 9,2 ( $\epsilon_{430}$  4200 М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>). Модификации подвергалось три остатка тирозина.

Полностью-Е-ретиаль и его аналоги (см. структурные формулы 1–7) добавляли к суспензии апомембран в виде этанольных растворов с концентрацией 1–5 мМ и инкубировали 5–10 мин, после чего регистрировали спектры.

Спектры поглощения снимали на спектрофотометре Beckman Acta MVI (США), спектры КД — на дихрографе Mark III (Jobin Ivon, Франция). Корректированные спектры испускания и возбуждения флуоресценции получали на двухлучевом спектрофлуориметре Aminco SPF 1000CS (США) и однолучевом Hitachi 650-60 (Япония). Измерения рН проводили на рН-метре 3550 (Beckman, США) с комбинированным электродом. Титрование осуществляли непосредственно в кювете образца 1 М раствором NaOH или HCl с помощью 10-мкл шприца (Hamilton, США). В кювету сравнения добавляли эквивалентное количество воды.

Квантовые выходы собственной флуоресценции белка определяли относительно триптофана в воде, квантовый выход которого принимали равным 0,2–0,01 [40].

Константы связывания аналогов ретиналя с апомембранами находили из уравнения Клотца:  $1/\alpha = 1 + K_d/c$  [29], где  $K_d$  — константа диссоциации,  $c$  — молярная концентрация,  $\alpha$  — отношение изменения интенсивности флуоресценции белка при связывании аналога к максимальному тушению флуоресценции при полном связывании белка в комплекс с аналогом ретиналя.

Флуоресцентный зонд диметиламинохалкон был синтезирован А. М. Шкробом (ИБХ АН СССР), C<sub>16</sub>-кетон и C<sub>14</sub>-альдегид были любезно предоставлены А. В. Родионовым (ИБХ АН СССР), ацетат витамина А — И. М. Яковлевой (ВНИВИ МЗ СССР). Препараты бактериородопсина, восстановленные NaBH<sub>4</sub> на свету, как и препараты везикул бактериородопсина, ориентированных цитоплазматической стороной наружу, были приготовлены В. И. Закисом (ИБХ АН СССР).

В работе частично использовали препараты, модифицированные тетранитрометаном на свету и в темноте, предоставленные А. И. Сотвиченко (ИБХ АН СССР).

В работе использовали морфолиноэтансульфокислоты, трис, EDTA и додецилсульфат натрия (Serva, ФРГ),  $\beta$ -октил-D-глюкозид (Calbiochem, Швейцария) и АНС (1,8-анилинонафталинсульфокислота, магниевая соль, Piers, США), соли марки х.ч. или ос.ч., дважды дистиллированную воду.

Авторы выражают глубокую благодарность академику Ю. А. Овчинникову, члену-корр. В. Ф. Быстрову за внимание к работе и критические замечания, В. И. Цетлину и А. М. Шкробу за помощь и обсуждение результатов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Oesterhelt D., Stoeckenius W. Nature New Biol., 1971, v. 233, № 39, p. 149–152.
2. Henderson R., Unwin P. N. T. Nature, 1975, v. 257, № 5521, p. 28–32.
3. Stoeckenius W., Lozier R. H., Bogomolni R. A. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 505, № 3, p. 215–278.
4. Stoeckenius W. Acc. Chem. Res., 1980, v. 13, № 10, p. 337–344.
5. Lanyi J. K., McDonald R. E. Biochemistry, 1976, v. 15, № 22, p. 4608–4614.

6. Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Фейгина М. Ю., Назимов И. В., Лобанов Н. А. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 11, с. 1573–1574.
7. Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Lobanov N. A. FEBS Lett., 1979, v. 100, № 2, p. 219–224.
8. Khorana H. G., Gerber C. E., Herling W. C., Gray C. P., Anderegg R. J., Nihel K., Bieman K. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, № 10, p. 5046–5050.
9. Konishi T., Packer L. FEBS Lett., 1978, v. 92, № 1, p. 1–4.
10. Lemke H.-D., Oesterhelt D. Eur. J. Biochem., 1981, v. 115, № 3, p. 595–604.
11. Bogomolni R. A., Stabbs L., Lanji J. K. Biochemistry, 1978, v. 17, № 6, p. 1037–1041.
12. Hess B., Kuschnitz D. FEBS Lett., 1979, v. 100, № 2, p. 334–340.
13. Crespi H. L., Ferraro J. R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 91, № 2, p. 575–583.
14. Becher B., Cassim J. Y. Biophys. J., 1977, v. 19, № 2, p. 285–298.
15. Oesterhelt D., Schuhmann L. FEBS Lett., 1974, v. 44, № 3, p. 262–265.
16. Engelman D. M., Henderson R., McLachlan A. D., Wallace B. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 4, p. 2023–2027.
17. Kronman M. J., Jaroszczo J., Sage G. W. Biochim. et biophys. acta, 1972, v. 285, № 1, p. 145–166.
18. Donovan J. W. In: Physical principles & techniques in protein chemistry/Ed. Leach S. I. N. Y.: Acad. Press, 1969, part A, 101–170.
19. Родионов А. В., Баурамаишвили Д. И., Руделин А. Б., Фейгина М. Ю., Шкроб А. М., Овчинников Ю. А. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1328–1334.
20. Lemke H.-D., Oesterhelt D. FEBS Lett., 1981, v. 128, № 2, p. 255–260.
21. Efremov E. S., Sotnichenko A. I., Aldachev A. A., Surin A. M., Miroshnikov A. I. Proc. 2 FRG – USSR Symp. Peptide Protein Chemistry/Munich, FRG, 1978, p. 71–73.
22. Muccio D. D., Cassim J. Y. J. Mol. Biol., 1979, v. 135, № 3, p. 595–605.
23. Шкроб А. М., Родионов А. В. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 3, с. 360–368.
24. Edgerton M. E., Moor T. A., Greenwood C. FEBS Lett., 1978, v. 95, № 1, p. 35–39.
25. Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Цетлин В. И., Киселев А. В., Закус В. И. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 9, с. 1427–1429.
26. Henderson R. Annu. Rev. Biophys. Bioeng., 1977, v. 6, p. 87–109.
27. Tanford C., Roxby R. Biochemistry, 1972, v. 11, № 11, p. 2192–2198.
28. Katre N. V., Stround R. M. FEBS Lett., 1982, v. 136, № 1, p. 170–174.
29. Владимирова Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980.
30. Govindjee R., Becher B., Ebrey T. G. Biophys. J., 1978, v. 22, № 1, p. 67–77.
31. Адашев А. А., Родионов А. В., Ефремов Е. С., Шкроб А. М. Тезисы III СССР – ФРГ симп. химии пептидов и белков. Махачкала, 1980, с. 34.
32. Kalisky O., Feitelson J., Ottoleggi M. Biochemistry, 1981, v. 20, № 1, p. 205–209.
33. Ramachandran G. N., Sasisekharan V. Adv. Protein Chem., 1968, v. 23, p. 283–483.
34. Кузнецова И. М. Использование собственной УФ-флуоресценции для изучения внутримолекулярной подвижности в белках методом вращательной деполяризации. Автореф. канд. дис. Ин-т цитологии. Минск, 1982.
35. Becker B., Tokunaga F., Ebrey T. G. Biochemistry, 1978, v. 17, № 12, p. 2293–2300.
36. Shieh P., Packer L. Biophys. J., 1979, v. 25, № 2, p. 310a.
37. Clark N. A., Rothschild K. J., Luippold D. A., Simon B. A. Biophys. J., 1980, v. 31, № 1, p. 65–96.
38. Tokunaga F., Ebrey T. G. Biochemistry, 1978, v. 17, № 10, p. 1915–1922.
39. Dencher N. A., Heyn M. P. FEBS Lett., 1978, v. 96, № 2, p. 322–326.
40. Teal F. W. J., Weber G. Biochem. J., 1957, v. 65, № 3, p. 476–482.

Поступила в редакцию  
15.VII.1982

## THE STATE OF TYROSINE AND TRYPTOPHAN RESIDUES IN BACTERIORHODOPSIN AND BACTERIOOPSIN

ALDASHEV A. A., EFREMOV E. S.

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

The state of Tyr and Trp residues in bacteriorhodopsin, bacterioopsin, and bacterioopsin complexes with a number of retinal analogs has been studied by fluorescence, CD- and UV-spectroscopy. In bacteriorhodopsin Tyr<sup>26</sup> has a pK 10,6±0,3 and is accessible from the outer membrane surface. In bacterioopsin, 3–4 Tyr residues are titratable in the same pH range. The Trp residues in bacteriorhodopsin and bacterioopsin are inaccessible for fluorescence quenchers Cs<sup>+</sup> and I<sup>-</sup> and are buried in the hydrophobic core of membrane at an average distance of 22 Å from the surface. An examination of the Trp fluorescence quenching in bacterioopsin complexes with various structural analogs of retinal and energy transfer studies revealed that in bacteriorhodopsin the fluorescence is quenched mainly due to contacts between Trp residues and peptide bonds of neighbouring α-helical rods. Membrane structure disordering due to bacteriorhodopsin→bacterioopsin transformation was monitored via changes in the spectral parameters of aromatic amino acids residues. The role of chromophoric group of bacteriorhodopsin in stabilization of the purple membrane structure was discussed.