



УДК 541.144

ГИДРОЛИЗ АЛЬДИМИНА РЕТИНАЛЯ В БАКТЕРИОРОДОПСИНЕ,  
ИНДУЦИРОВАННЫЙ ИОНАМИ СЕРЕБРА

Родионов А. В., Шкроб А. М.

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

Бактериородопсин из пурпурных мембран *Halobacterium halobium*, солюбилизированный 2% тритоном X-100, обесцвечивается в присутствии ионов серебра. Скорость обесцвечивания значительно возрастает при освещении. В нативных пурпурных мембранах бактериородопсин может быть сенсibilизирован к ионам серебра действием неионных детергентов в сублитических количествах (5—10 моль на моль белка). В темноте индуцированное  $Ag^+$ -ионами обесцвечивание включает две фазы: быструю, в ходе которой возникают формы бактериородопсина, имеющие полосы поглощения в области 400 и 470 нм, и медленную, сопровождающуюся гидролитическим расщеплением альдимина ретиналя. Обе фазы обесцвечивания могут быть обращены с помощью комплексонов, связывающих ионы серебра. Сравнительное изучение препаратов бактериородопсина, адаптированных к свету и к темноте, приводит к выводу, что механизм взаимодействия с  $Ag^+$ -ионами сходен у молекул белка, содержащих остатки полностью-транс- и 13-цис-ретиналя, однако у последних константа нестойкости  $Ag^+$ -комплексов значительно больше. Получены данные о существовании в молекуле бактериородопсина двух центров, связывающих ионы серебра, один из которых ответствен за превращения, наблюдаемые на быстрой, а другой — на медленной фазе. Установлено, что скорость медленной фазы значительно возрастает с увеличением концентрации солей в среде, причем величина этого эффекта сильно зависит от природы катиона. Показано, что при непрерывном освещении ( $\lambda > 530$  нм) бактериородопсина в присутствии ионов серебра накапливается долгоживущая ( $\tau_{1/2} \approx 13$  с;  $2^\circ$ ) форма, имеющая полосу поглощения вблизи 360 нм. Гидролиз альдимина ретиналя в этой форме, по-видимому, обуславливает зависимое от света ускорение обесцвечивания.

Хромопротеид бактериородопсин из пурпурных мембран *Halobacterium halobium* содержит в качестве простетической группы ретиналь, образующий протонированный альдимин с  $\epsilon$ -аминогруппой остатка  $Lys^{41}$  [1—4]. Необычные спектральные характеристики и устойчивость этого альдимина в широком диапазоне pH, несомненно, обусловлены его специфическим взаимодействием с функциональными группами белка. Один из подходов к изучению природы такого взаимодействия заключается в применении реагентов, избирательно связывающихся с бактериородопсином и способных изменить свойства альдимина ретиналя. С этой точки зрения представляют интерес приведенные ниже данные о превращениях бактериородопсина, индуцированных ионами серебра. Следует сразу же отметить, что бактериородопсин не содержит остатков цистеина [1—3], и поэтому своим действием ионы серебра не могут быть обязаны образованию меркаптидов.

Привычные сокращения: полностью-транс-6-метил-8-(1',1',5'-триметилциклогексен-5'-ил-6')октагриен-3,5,7-он-2 —  $C_{18}$ -кетон; MES — морфолдиноэтансульфокислота.

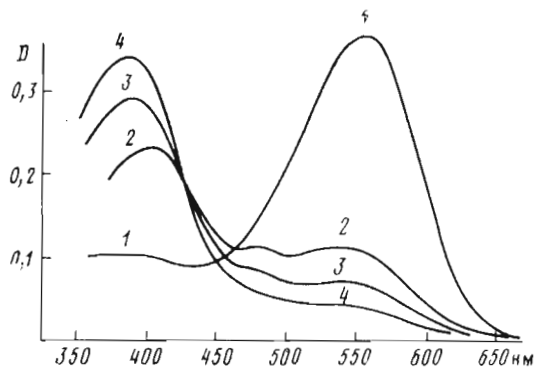


Рис. 1. Изменения спектра солюбилизованного бактериородопсина в присутствии ионов серебра (0,01 MES; 0,2% тритона X-100; pH 5,75; 20°). 1 — исходный спектр; 2, 3, 4 — спектры, снятые спустя 1, 6 и 18 мин после прибавления  $\text{AgNO}_3$  (0,02 M)

Солюбилизованный бактериородопсин, полученный действием на пурпурные мембраны тритона X-100 [5—7], в присутствии ионов серебра утрачивает свою характерную фиолетовую окраску, причем этот процесс значительно ускоряется при освещении «желтым» ( $\lambda > 530$  нм) светом. В темновых условиях индуцированные ионами серебра спектральные изменения носят бифазный характер. Первая, быстрая фаза, которая при  $\text{pH} < 6$  заканчивается менее чем за 1 с, обнаруживается по уменьшению полосы исходного ретиналевого хромоформа при 555 нм и появлению полос поглощения в области 470 и 400 нм (см. кривую 2 на рис. 1). Амплитуда быстрой фазы возрастает с увеличением концентрации  $\text{Ag}^+$ -ионов, а при постоянстве последней — с ростом pH. После завершения быстрой фазы параллельно с уменьшением полосы при 555 нм происходит падение поглощения в области 470 нм и рост коротковолновой полосы, максимум которой постепенно сдвигается к 370 нм (см. кривую 3 на рис. 1). Эта вторая фаза в зависимости от концентрации  $\text{Ag}^+$ -ионов (0,01—0,001 M) при 20° протекает за 1—100 мин и приводит к полному исчезновению полосы поглощения при 555 нм. Начальная скорость медленной фазы обесцвечивания заметно возрастает с уменьшением pH и с увеличением концентрации ионов серебра.

Данные, полученные на этом этапе исследований, позволили сделать подтвердившееся впоследствии предположение, что на быстрой фазе действия ионов серебра образуются лишенные исходной полосы поглощения комплексы  $(\text{Ag}^+)_n$ -бактериородопсин, которые подвергаются дальнейшим превращениям. Эти превращения непосредственно уже не связаны с обесцвечиванием бактериородопсина, так что медленная фаза обесцвечивания отражает указанные превращения лишь постольку, поскольку благодаря им смещаются равновесия, устанавливающиеся на быстрой фазе.

Изменения спектра бактериородопсина, индуцированные ионами серебра, могут быть обращены при удалении из среды этих ионов такими комплексообразователями, как EDTA или тиосульфат. Ранее было показано, что в солюбилизованном бактериородопсине под действием света происходит гидролиз альдиминной связи. Степень последующей рекомбинации бактериородопсина и ретиналя весьма мала при концентрации тритона X-100 около 2%, но она значительно возрастает при введении избытка ретиналя [6]. Известен также конкурентный ингибитор такой рекомбинации —  $\text{C}_{18}$ -кетон [8]. Если восстановление полосы при 555 нм, наблюдаемое при введении комплексообразователей, отражает рекомбинацию бактериородопсина и ретиналя, то, исходя из вышеизложенного, оно не должно иметь место

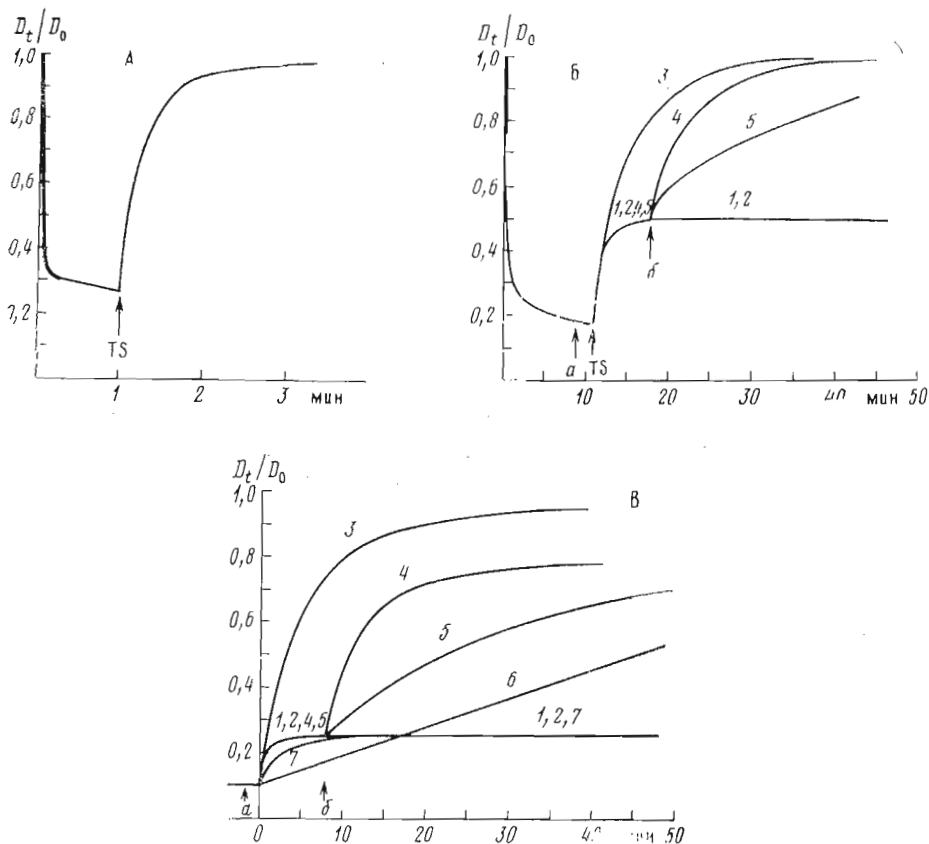


Рис. 2. Восстановление поглощения при 555 нм при действии комплексонов на «световой» солиобилизованный бактериородопсин ( $D_0$  0,7—0,9), обесцвеченный ионами серебра. Растворы содержат 0,1 М MES и 2% тригона X-100. Начало отсчета времени отвечает моменту введения ионов серебра (А, Б) или комплексона (В). Жирные линии обозначают вклад быстрой фазы обесцвечивания. TS — момент введения  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (2 моль на моль  $\text{AgNO}_3$ ); а и б — моменты введения полностью-транс-ретинала ( $6 \cdot 10^{-4}$  М) или  $\text{C}_{18}$ -кетона ( $6 \cdot 10^{-4}$  М) в этанольных растворах. А — обращение быстрой фазы обесцвечивания (рН 6,0; 0,01 М  $\text{AgNO}_3$ ). Б — обращение медленной фазы обесцвечивания (рН 4,3; 0,02 М  $\text{AgNO}_3$ ; после введения  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  в растворе 0,1 М морфолинопропансульфокислоты (рН 7,7) конечное значение рН среды 5,6): 1 — контроль; 2 — кетон (а); 3 — ретиаль (а); 4 — ретиаль (б); 5 — кетон (а), ретиаль (б). В — восстановление поглощения после обесцвечивания на свету (рН 6,0; 20°;  $1,25 \cdot 10^{-3}$  М  $\text{AgNO}_3$ ; освещение 1 мин источником А (см. «Экспериментальную часть»); кривые 6 и 7 получены при введении не тиосульфата, а EDTA в количестве соответственно 2 и 10 моль на моль  $\text{AgNO}_3$ ): 1 — контроль; 2 — кетон (а); 3 — ретиаль (а); 4 — ретиаль (б); 5 — кетон (а), ретиаль (б); 6 — ретиаль (а); 7 — кетон (а)

в присутствии 2% тригона X-100. В том же случае, когда наряду с 2% тригона X-100 среда содержит избыток ретинала, восстановление поглощения должно происходить, причем оно должно ингибироваться  $\text{C}_{18}$ -кетонам. Располагая этим тестом, можно установить, сопряжена ли какая либо фаза действия ионов серебра с гидролизом альдимида ретинала.

Обращение комплексонами быстрой фазы обесцвечивания целесообразно наблюдать при рН  $\approx 6$ , когда ее амплитуда велика, а скорость медленной фазы относительно мала. В таких условиях быстрая фаза обращается с помощью EDTA или тиосульфата практически полностью за несколько минут (см. рис. 2А), причем на скорость и степень восстановления поглощения при 555 нм не влияют добавки ни полностью-транс-ретинала, ни  $\text{C}_{18}$ -кетона. Таким образом, нет никаких признаков того, что эта фаза включает гидролиз альдимида ретинала.

Иная картина наблюдается при обращении комплексами медленной фазы обесцвечивания (см. рис. 2В). Для того чтобы за превращениями, происходящими на медленной фазе, можно было наблюдать по уменьшению оптической плотности при 555 нм, необходимо максимально уменьшить амплитуду быстрой фазы, сохраняя скорость медленной фазы достаточно большой. Эти условия выполняются при  $pH \approx 4,3$ . Поскольку эффективность комплексов в кислой среде уменьшается, непосредственно перед их введением  $pH$  увеличивали до 5,5—6,0. Кривая 1 получена при добавлении тиосульфата к препарату, в котором медленная фаза зашла достаточно далеко. Полоса поглощения при этом восстанавливается лишь частично, причем этот процесс не ингибируется  $C_{18}$ -кетонем (см. кривую 2). Восстановление поглощения, однако, становится практически полным, если до или вскоре после тиосульфата ввести в среду *полностью-транс*-ретиаль (см. кривые 3 и 4). Индуцированное ретиалем восстановление поглощения эффективно блокируется  $C_{18}$ -кетонем (см. кривую 5). Таким образом, к моменту прерывания медленной фазы обесцвечивания значительная часть бактериородопсина распадается на бактериоопсин и ретиаль, и обращение обесцвечивания в большой степени обуславливается их рекомбинацией.

Эти данные показывают, что связывание ионов серебра солиобилизованным бактериородопсином не только вызывает изменения спектра альдимида ретиналя, но и делает термодинамически выгодным его гидролиз. Если  $Ag^+$ -комплекс бактериоопсина, возникающий в результате такого гидролиза, разрушить с помощью комплексонов, то освобождающийся бактериоопсин приобретает способность рекомбинировать с ретиалем с образованием бактериородопсина. Регенерированный бактериородопсин по своим свойствам не отличается от исходного, и, следовательно, ионы серебра не вызывают необратимых изменений белковой молекулы.

Как уже отмечалось выше, обесцвечивание бактериородопсина, индуцированное ионами серебра, значительно ускоряется на свету. Этот эффект проявляется особенно четко, если концентрация  $Ag^+$ -ионов так мала ( $\leq 0,001 M$ ), что в темноте обесцвечивание идет крайне медленно. В специальных экспериментах, выполненных при малых уровнях освещенности, было показано, что в присутствии 2% тритона X-100 при 20° скорость уменьшения оптической плотности при 555 нм возрастает примерно в 5 раз, если ионы серебра в концентрации 0,001 M вводятся при  $pH$  4,3, и более чем в 40 раз при  $pH$  6. Таким образом, независимый от ионов серебра фотоиндуцированный гидролиз альдимида ретиналя [6, 9] вносит лишь незначительный вклад в наблюдаемые превращения. На рис. 2В видно, что в среде, содержащей 2% тритона X-100, полное обращение обесцвечивания, вызванного на свету ионами серебра, требует прибавления не только тиосульфата, но и ретиналя, причем регенерация бактериородопсина тормозится  $C_{18}$ -кетонем. Отсюда следует, что и здесь основной вклад в обесцвечивание вносит гидролиз альдимида ретиналя. Вместе с тем кривые 1 и 2 на рис. 2В показывают, что небольшая часть поглощения при 555 нм восстанавливается независимо от присутствия ретиналя и  $C_{18}$ -кетона. Эта составляющая, которая, по-видимому, обусловлена образованием некоторого количества обесцвеченного  $Ag^+$ -комплекса бактериородопсина, уменьшается с ростом времени облучения, вероятно, благодаря сдвигу равновесия диссоциации этого комплекса.

Вывод о том, что контакт солиобилизованного бактериородопсина с ионами серебра в конечном итоге приводит к гидролизу альдимида ретиналя, подтверждается следующим экспериментом. Если после введения ионов серебра на свету дождаться полного обесцвечивания бактериородопсина, а затем перед прибавлением тиосульфата внести в среду *полностью-транс*-4-кеторетиаль, то в ходе регенерации образуется «4-кетобактериородопсин» — хромопротеид, в котором остаток ретиналя замещен на остаток его 4-кетопроизводного. Этот хромопротеид обнаруживается по

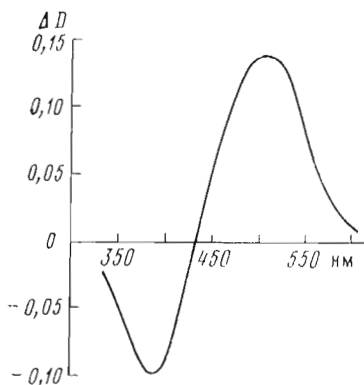


Рис. 3

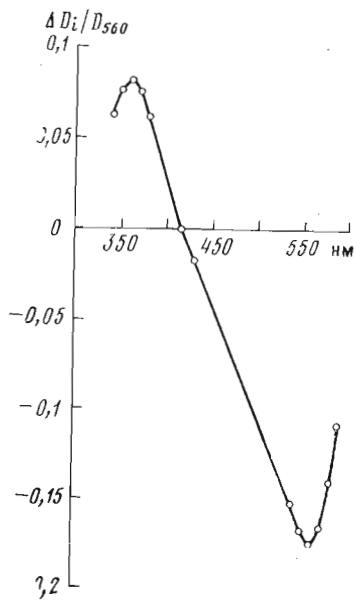


Рис. 4

Рис. 3. Дифференциальный спектр, отражающий образование «4-кетобактериородопсина». Солюбилизованный бактериородопсин ( $D_{555} 0,7$ ) был обесцвечен действием  $1 \cdot 10^{-3}$  М  $\text{AgNO}_3$  при освещении 1 мин источником А (см. «Экспериментальную часть»). Перед снятием спектра в раствор обесцвеченного бактериородопсина было введено  $4 \cdot 10^{-5}$  М полностью-транс-4-кеторетиналя в диоксановом растворе. Спектр снят через 20 мин после того, как к одному из образцов был прибавлен  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (5 моль на моль  $[\text{AgNO}_3]$ ) в виде 1 М раствора, а к образцу сравнения — равный объем воды

Рис. 4. Дифференциальный спектр, отражающий образование коротковолновой формы бактериородопсина при освещении сенсibilизированных пурпурных мембран в присутствии ионов серебра. Мембраны суспендировали в растворе 0,1 М МЕС ( $D_{570} 1,25$ ), содержащем 0,05% тритона X-100 и  $1,25 \cdot 10^{-3}$  М  $\text{AgNO}_3$  (рН 5,25; 2°). Освещение 1 мин источником Б (см. «Экспериментальную часть»). Точки на спектре отвечают изменениям оптической плотности при данной длине волны в момент прекращения освещения, которые были определены экстраполяцией соответствующих кинетических кривых ( $\tau_{1/2} \sim 13 \pm 3\text{с}$ )

характерной для него полосе поглощения в области 520 нм [6, 10] (см. рис. 3). Таким образом, оба присутствующие в среде альдегида конкурируют между собой в связывании с бактериородопсином.

В отличие от солюбилизованного препарата бактериородопсин, находящийся в нативных пурпурных мембранах, устойчив к действию ионов серебра. Его, однако, можно сенсibilизировать к этим ионам, обрабатывая мембраны незначительным количеством (5—10 моль на моль белка) неионных детергентов, в частности тритона X-100. Ранее было показано, что в столь малых количествах подобные детергенты не только не вызывают фрагментацию мембран, но и не нарушают специфического взаимодействия хромофоров в тримерах бактериородопсина [11]. При действии ионов серебра на сенсibilизированные мембраны обесцвечивание бактериородопсина также протекает в две фазы, причем наблюдаемые спектральные изменения сходны с теми, которые имеют место у солюбилизованного препарата. Скорость обесцвечивания также значительно возрастает при освещении «желтым» светом. Восстановить исходную форму бактериородопсина в обесцвеченных мембранах можно, осадив их центрифугированием, а затем после промывки водой обработав раствором 1 М тиосульфата натрия.

Изложенное выше приводит к выводу, что на свету и в темноте превращения, индуцированные ионами серебра, протекают по разным механиз-

мам. Было естественно предположить, что на свету возникает долгоживущая форма  $\text{Ag}^+$ -комплекса бактериородопсина, в которой альдимин ретиналя особенно легко подвергается гидролизу. С целью уменьшить вклад темновых превращений поиск этой формы проводился при относительно высоких значениях рН, малых концентрациях ионов серебра и пониженной температуре. Оказалось, что освещение непрерывным светом (0,5—2 мин,  $\lambda > 530$  нм) вызывает появление формы, поглощающей вблизи 360 нм, которая с  $\tau_{1/2} \approx 13$  с ( $2^\circ$ ; рН 6,2) возвращалась в исходную форму, обладающую  $\lambda_{\text{макс}}$  555 нм (или, возможно, в другую форму, находящуюся с исходной в быстро устанавливаемом равновесии) (см. рис. 4). Можно привести два аргумента в пользу того, что в указанной форме альдимин ретиналя остается нерасщепленным: во-первых, амплитуда обратимых изменений оптической плотности не зависит от присутствия  $\text{C}_{18}$ -кетона и, во-вторых, эта амплитуда резко уменьшается я, если непосредственно после освещения «желтым» светом дополнительно осветить препарат «синей» ( $\lambda_{\text{макс}}$  400 нм) вспышкой. Такого рода фотоиндуцированная релаксация коротковолновых форм бактериородопсина ранее уже была описана [7, 12]. Поскольку в присутствии ионов серебра солибилизированный бактериородопсин на свету обесцвечивается значительно быстрее, чем сенсублизированные мембраны, и в то же время в последних устанавливается гораздо более высокая фотостационарная концентрация формы с  $\lambda_{\text{макс}} \approx 360$  нм, можно сделать вывод, что именно превращения этой формы ответственны за индуцированное светом ускорение обесцвечивания. Судя по тому, что эту форму удается обнаружить только при непрерывном освещении препаратов, она образуется в качестве побочного продукта, и значительные ее количества накапливаются лишь при многократном осуществлении фотохимического цикла.

Переходя к рассмотрению механизма темнового действия  $\text{Ag}^+$ -ионов на бактериородопсин, можно в качестве исходного предположения принять, что связывание ионов серебра и вызываемые им в ходе быстрой фазы обесцвечивания перестройки окружения ретиналя протекают настолько быстро по сравнению с последующими превращениями, что концентрации всех форм, образующихся на быстрой фазе, близки к равновесным. Учитывая упомянутую выше зависимость амплитуды быстрой фазы от рН, рассмотрим две простейшие возможные схемы этого процесса:

Схема А

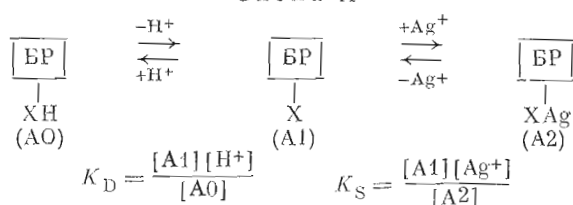


Схема Б

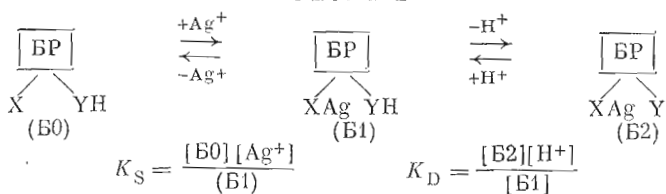


Схема А предусматривает присутствие в молекуле бактериородопсина диссоциирующей группы ХН. Будучи депротонирована, эта группа может связывать либо протон, либо ион серебра, причем последний акт сопровождается потерей поглощения при 555 нм. Нетрудно показать, что в рамках этой схемы доля бактериородопсина, обесцвечивающегося на

первой, быстрой фазе,  $\alpha$ , описывается уравнениями (1) и (2):

$$\lg \frac{\alpha}{1-\alpha} = pK_S - pAg^+ + \lg \frac{K_D}{K_D + [H^+]}; \quad (1)$$

$$\frac{1}{\varphi} = K_S + \frac{K_S}{K_D} \cdot [H^+], \quad (2)$$

где  $\alpha = \Delta D/D$  — относительное уменьшение оптической плотности при 555 нм в ходе быстрой фазы;

$$\varphi = \frac{\alpha}{(1-\alpha) \cdot [Ag^+]}$$

Схема Б также предполагает, что ион серебра связывается некой группой, которая, однако, в условиях данных экспериментов полностью депротонирована. При этом допускается, что образование комплекса  $Ag^+$ -бактериородопсин приводит к уменьшению  $pK$  другой, протонированной группы УН, которая вследствие этого может диссоциировать. Формы Б1 и Б2, согласно этой схеме, предполагаются утратившими полосу поглощения при 555 нм. В соответствии со схемой Б степень обесцвечивания в ходе быстрой фазы описывается уравнениями (3) и (4):

$$\lg \frac{\alpha}{1-\alpha} = pK_S - pAg^+ + \lg \frac{K_D + [H^+]}{[H^+]}; \quad (3)$$

$$\varphi = \frac{1}{K_S} + \frac{K_D}{K_S} \cdot \frac{1}{[H^+]}. \quad (4)$$

Сравнивая уравнения (1) и (3), нетрудно видеть, что обе схемы при фиксированном значении рН предсказывают линейную зависимость  $\lg [\alpha/(1-\alpha)]$  от  $pAg^+$  с наклоном, равным единице. Как видно из рис. 5, такая зависимость действительно соблюдается в достаточно широком диапазоне концентраций ионов серебра. Это означает, что для изменения свойств хромофора достаточно одному иону серебра быть связанным в определенном центре в молекуле бактериородопсина. Обращают на себя внимание различия кривых, которые отвечают препаратам солиобилизованного бактериородопсина, предварительно адаптированным к темноте и свету [7]. Степень обесцвечивания «световых» препаратов больше, чем «темновых», причем в некотором интервале значений  $pAg^+$  отношение  $\alpha_{\text{свет}}/\alpha_{\text{темн}}$  весьма постоянно и близко к 2.

Известно, что в пурпурных мембранах, подвергнутых темновой адаптации, примерно половина молекул бактериородопсина содержит остаток *полностью-транс*-ретиналя, а остальные — остаток его *13-цис*-изомера. После освещения мембран актиничным светом практически все молекулы бактериородопсина содержат остаток *полностью-транс*-ретиналя [13—15]. Сходная ситуация имеет место и в солиобилизованном бактериородопсине [7]. Поэтому наблюдаемое различие свойств «темнового» и «светового» препаратов естественно объяснить тем, что ионы серебра индуцируют быстрое обесцвечивание только тех молекул бактериородопсина, которые содержат остаток *полностью-транс*-ретиналя. Тогда, безотносительно к тому, верна ли схема А или Б, зависимость величины  $\alpha/(1-\alpha)$  от концентрации ионов серебра при фиксированном значении рН должна описываться уравнением

$$\frac{\alpha}{1-\alpha} = \frac{\beta}{K_{\text{эфф}}/[Ag^+] + (1-\beta)}, \quad (5)$$

где  $\beta$  — доля молекул бактериородопсина, содержащих остаток *полностью-транс*-ретиналя, а  $K_{\text{эфф}}$  — эффективное значение константы нестойкости  $Ag^+$ -комплекса бактериородопсина при данном значении рН.

В соответствии с этим уравнением в области  $[Ag^+] \ll K_{\text{эфф}}$ , где величина  $\lg [\alpha/(1-\alpha)]$  линейно зависит от  $pAg^+$ , разность ординат прямых

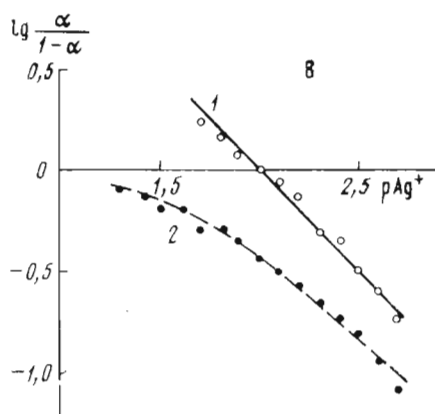
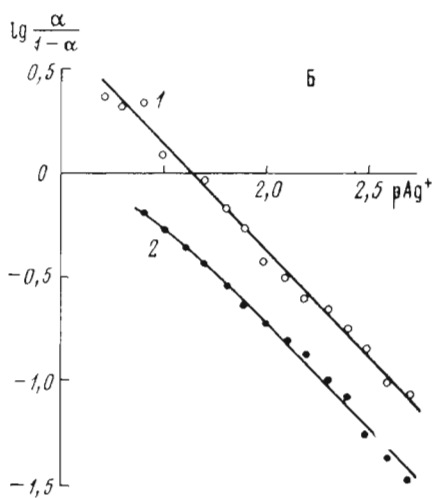
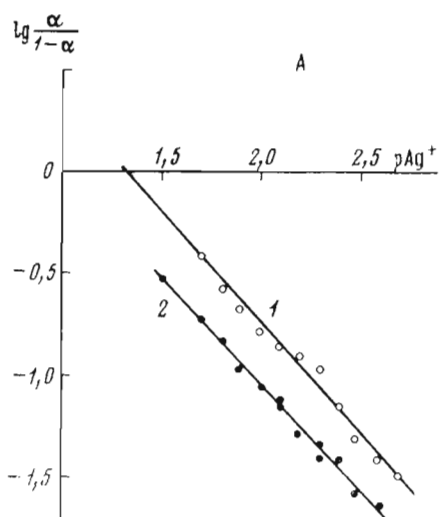


Рис. 5. Зависимость амплитуды быстрой фазы обесцвечивания «светового» (1) и «темнового» (2) солибилизованного бактериородопсина от концентрации ионов серебра (0,1 M MES; 2% тритона X-100; 20°). В скобках ниже приведены тангенсы угла наклона прямых для «световых» препаратов, проведенных методом наименьших квадратов: А — рН 4,33 ( $-1,09 \pm 0,05$ ); Б — рН 5,30 ( $-1,02 \pm 0,06$ ); В — рН 5,85 ( $-0,99 \pm 0,4$ ; штриховая линия получена с помощью уравнения (5) при  $\beta = 0,55$ )

«светового» и «темнового» препаратов при данном  $pAg^+$  должна быть равна  $-\lg \beta$ . Используя данные, приведенные на рис. 5, можно получить значение  $\beta = 0,52 \pm 0,05$ . Уравнение (5) позволяет также предсказать, что при  $\beta < 1$  зависимость  $\lg [\alpha/(1 - \alpha)]$  от  $pAg^+$  будет нелинейной в области  $[Ag^+] \geq K_{эфф}$ . Экспериментальная проверка этого предсказания была выполнена при рН 5,85. В этих условиях скорость медленной фазы обесцвечивания заметно уменьшается, что делает возможным измерение  $\alpha$  в пужном диапазоне значений  $pAg^+$ . На рис. 5В видно, что экспериментальные точки для «темнового» препарата удовлетворительно ложатся на теоретическую кривую. Величина  $pK_{эфф}$ , использованная при вычислении этой кривой, отвечает точке пересечения соответствующей «световой» кривой с осью  $pAg^+$ , а параметр  $\beta$  определен из разности ординат «световой» и «темновой» кривых в области высоких значений  $pAg^+$ . Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в описанных условиях только часть молекул бактериородопсина в «темновых» солибилизованных препаратах способна обесцвечиваться в ходе быстрой фазы взаимодействия с ионами серебра. Этот вывод можно рассматривать как косвенное подтверждение высказанной выше гипотезы о роли конфигурации ретиналевого остатка, поскольку найденная величина  $\beta$  близка к доле молекул «темнового» солибилизованного бактериородопсина, которые содержат остаток *полностью-транс*-ретиналя, ранее определенной другими методами [7].

Выбор между схемами А и Б был сделан на основе анализа рН-зависимости величины  $\phi$  при фиксированной концентрации ионов серебра.



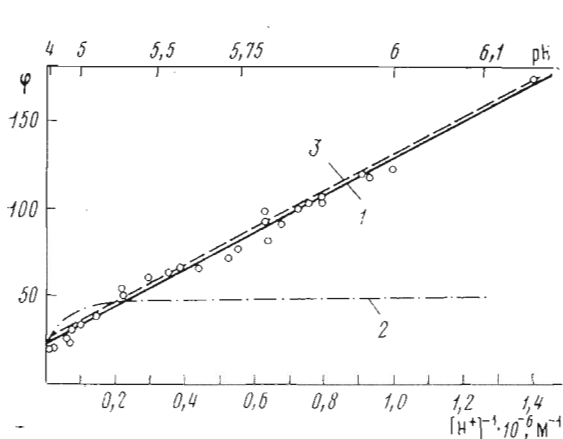


Рис. 6

Рис. 6. Влияние pH на величину параметра  $\varphi$  (см. уравнения 2 и 4) при действии ионов серебра на «световой» солибилизированный бактериородопсин (0,1 М MES; 2% тритона X-100;  $7 \cdot 10^{-3}$  М  $\text{AgNO}_3$ ;  $20^\circ$ ). Прямая 1 построена методом наименьших квадратов, кривая 2 вычислена с помощью уравнения (2), а кривая 3 — с помощью уравнения (4) при использовании данных, приведенных на рис. 5

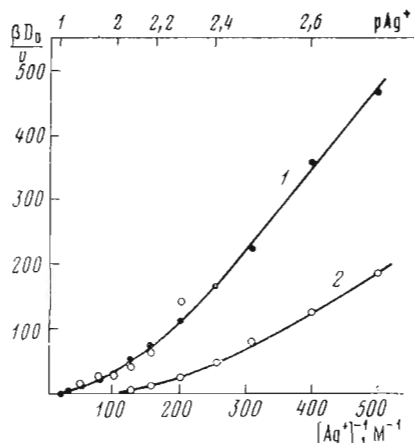


Рис. 7

Рис. 7. Влияние концентрации ионов серебра на нормализованные значения начальной скорости медленной фазы при обесцвечивании «световых» (светлые кружки,  $\beta = 1$ ) и «темновых» (темные кружки,  $\beta = 0,55$ ) препаратов солибилизированного бактериородопсина (0,1 М MES; 2% тритона X-100;  $20^\circ$ ). 1 — pH 5,85; 2 — pH 4,27

На рис. 6 эта зависимость представлена в координатах  $\varphi - 1/[\text{H}^+]$ . Кривые 2 и 3 на этом рисунке отвечают теоретическим зависимостям, вытекающим из схем А и Б, причем значения  $K_S$  и  $K_D$ , необходимые для вычисления этих кривых по уравнениям (2) и (4), получены из данных, приведенных на рис. 5, при обработке их в соответствии с уравнениями (1) и (3). Нетрудно видеть, что экспериментальная зависимость удовлетворительно описывается на основе схемы Б. Принимая эту схему как феноменологическое описание быстрой фазы обесцвечивания, получаем значения  $K_S 0,039 \pm 0,007$  М ( $pK_S 1,42 \pm 0,08$ ) и  $K_D (4 \pm 2) \cdot 10^{-6}$  М ( $pK_D 5,40 \pm 0,25$ ). Величина этих констант практически не зависит от ионной силы раствора.

Итак, сделанное выше допущение о квазиравновесном соотношении форм, образующихся на быстрой фазе обесцвечивания, не встречает противоречий при количественном рассмотрении. Поэтому было естественно предположить, что зависимость начальной скорости медленной фазы обесцвечивания от концентрации ионов серебра при фиксированном pH должна описываться уравнением, аналогичным уравнению Михаэлиса — Ментен. Иными словами, можно было ожидать, что в координатах Лайнуивера — Бэрка эта зависимость будет отображаться прямой линией. Однако данные, приведенные на рис. 7, показывают, что в действительности зависимость  $v^{-1}$  от  $[\text{Ag}^+]^{-1}$  имеет скорее параболический характер. Исходя из этих данных, можно было допустить, что скорость превращения на медленной фазе обесцвечивания зависит от концентрации молекул бактериородопсина, связавших более одного иона серебра.

Предположим, что формы Б1 и Б2 (см. схему Б) способны связать дополнительно еще один ион серебра с образованием «двойных» комплексов  $\text{B1} \cdot \text{Ag}^+$  и  $\text{B2} \cdot \text{Ag}^+$ . Очевидно, что оба иона связываются в разных точках молекулы. Поскольку схема Б оказалась пригодной для описания быстрой фазы обесцвечивания, можно думать, что присутствие иона серебра только во втором центре связывания не вызывает по крайней мере быстрого обесцвечивания бактериородопсина и не сказывается на величине  $K_S$  и  $K_D$ . В этом случае начальные скорости превращения протони-

рованных ( $B1 \cdot Ag^+$ ) и депротонированных ( $B2 \cdot Ag^+$ ) «двойных» комплексов могут быть описаны соответственно уравнениями (6) и (7), справедливыми при  $[Ag^+] \ll K_{1S}$  и  $[Ag^+] \ll K_{2S}$ :

$$v_1' = k_1 \cdot \frac{[BR]_{\text{общ}}}{K_{1S}} \cdot \frac{[H^+]}{K_D + [H^+]} \cdot \frac{[Ag^+]^2}{K_{\text{эфф}} + [Ag^+]}; \quad (6)$$

$$v_2' = k_2 \cdot \frac{[BR]_{\text{общ}}}{K_{2S}} \cdot \frac{K_D}{K_D + [H^+]} \cdot \frac{[Ag^+]^2}{K_{\text{эфф}} + [Ag^+]}, \quad (7)$$

где  $k_1$  и  $k_2$  — константы скорости;  $[BR]_{\text{общ}}$  — суммарная концентрация бактериородопсина и всех его комплексов с ионами серебра;

$$K_{1S} = \frac{[B1][Ag^+]}{[B1 \cdot Ag^+]}; \quad K_{2S} = \frac{[B2][Ag^+]}{[B2 \cdot Ag^+]};$$

$K_{\text{эфф}} = K_S \cdot \frac{[H^+]}{K_D + [H^+]}$  — эффективная константа нестойкости, описывающая превращение бактериородопсина в комплексы B1 и B2 при данном значении pH.

В эксперименте измеряется не скорость превращения «двойных» комплексов,  $v_1' + v_2'$ , а уменьшение оптической плотности при 555 нм, отражающее скорость исчезновения исходной формы бактериородопсина, т. е. скорость обесцвечивания,  $v$ . Поскольку «двойные» комплексы находятся в равновесии не только с исходным бактериородопсином, но и с комплексами B1 и B2, значения  $v_1' + v_2'$  и  $v$  связаны соотношением  $(v_1' + v_2')/v = 1 + [Ag^+]/K_{\text{эфф}}$ , из которого следует, что вклады превращения «двойных» комплексов в начальную скорость медленной фазы обесцвечивания должны описываться уравнениями (8) и (9):

$$v_1 = \frac{k_1}{K_{1S}} \cdot [BR]_{\text{общ}} \cdot K_{\text{эфф}} \cdot \frac{[H^+]}{K_D + [H^+]} \cdot \left( \frac{[Ag^+]}{K_{\text{эфф}} + [Ag^+]} \right)^2; \quad (8)$$

$$v_2 = \frac{k_2}{K_{2S}} \cdot [BR]_{\text{общ}} \cdot K_{\text{эфф}} \cdot \frac{K_D}{K_D + [H^+]} \cdot \left( \frac{[Ag^+]}{K_{\text{эфф}} + [Ag^+]} \right)^2. \quad (9)$$

Из уравнений (8) и (9) следует, что в том случае, если медленная фаза обесцвечивания в основном обусловлена превращением «двойных» комплексов, ее начальная скорость должна быть пропорциональна квадрату величины  $[Ag^+]/(K_{\text{эфф}} + [Ag^+])$  как при  $pH < pK_D$ , так и при  $pH > pK_D$ . Такая зависимость действительно всегда наблюдается в области малых концентраций ионов серебра, однако с ростом концентрации  $Ag^+$ -ионов наклон экспериментальных кривых заметно возрастает (см. рис. 8А, Б). Это отклонение, по-видимому, объясняется рассмотренным ниже солевым эффектом; оно возникает примерно при одних и тех же концентрациях ионов серебра независимо от величины  $K_{\text{эфф}}$  и не наблюдается в растворах высокой ионной силы (см. рис. 8В).

Можно было ожидать, что сопоставление pH-зависимости начальной скорости медленной фазы обесцвечивания с соответствующими зависимостями величин  $v_1$  и  $v_2$ , вычисленными с помощью уравнений (8) и (9), позволит оценить соотношение между значениями  $k_1/K_{1S}$  и  $k_2/K_{2S}$ , характеризующими «двойные» комплексы  $B1 \cdot Ag^+$  и  $B2 \cdot Ag^+$ . Однако сделать это не удалось. С ростом pH от 4 до 6 начальная скорость медленной фазы падает, причем особенно круто в интервале от 4 до 4,5 (см. кривую 1 на рис. 9). Между тем расчет показывает, что величина  $v_1$  в этом интервале остается практически постоянной, тогда как величина  $v_2$  значительно возрастает (см. кривые 2 и 3 на рис. 9). Ясно, что при любых предположениях относительно соотношения  $k_1/K_{1S}$  и  $k_2/K_{2S}$  описать экспериментальную зависимость суммой  $v_1$  и  $v_2$  невозможно. Причина этого

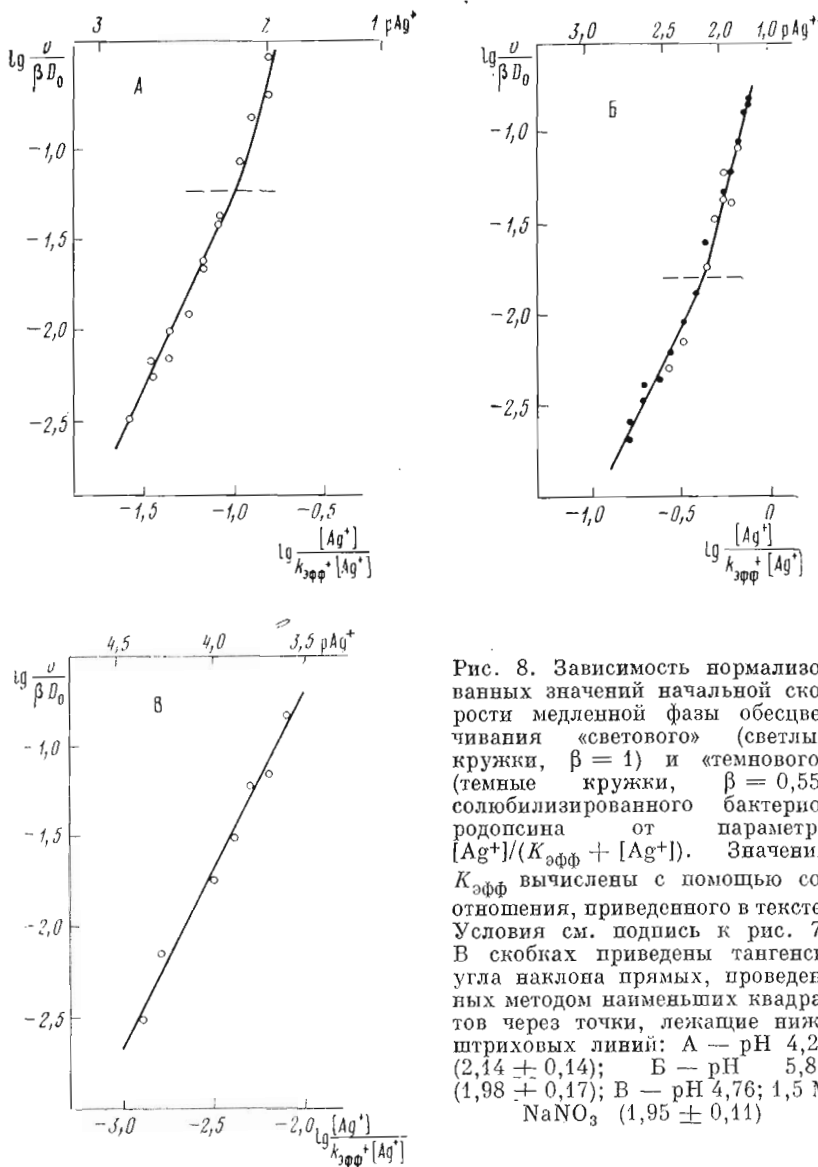


Рис. 8. Зависимость нормализованных значений начальной скорости медленной фазы обесцвечивания «светового» (светлые кружки,  $\beta = 1$ ) и «темнового» (темные кружки,  $\beta = 0,55$ ) солюбилизованного бактериородопсина от параметра  $[Ag^+]/(K_{эфф} + [Ag^+])$ . Значения  $K_{эфф}$  вычислены с помощью соотношения, приведенного в тексте. Условия см. подпись к рис. 7. В скобках приведены тангенсы угла наклона прямых, проведенных методом наименьших квадратов через точки, лежащие ниже штриховых линий: А — рН 4,27 ( $2,14 \pm 0,14$ ); Б — рН 5,85 ( $1,98 \pm 0,17$ ); В — рН 4,76;  $1,5 M NaNO_3$  ( $1,95 \pm 0,11$ )

расхождения пока неизвестна; можно лишь предположить, что константы скорости и/или константы нестойкости «двойных» комплексов в действительности зависят от рН.

Как было показано выше, сопоставляя поведение «темновых» и «световых» солюбилизованных препаратов, можно прийти к заключению, что в исследованном диапазоне условий молекулы бактериородопсина, содержащие остаток 13-цис-ретинала (назовем их *цис*-формой), не вносят заметного вклада в быструю фазу обесцвечивания. То же справедливо и в отношении медленной фазы обесцвечивания. Действительно, используя найденную величину  $\beta$ , можно пересчитать значения начальных скоростей таким образом, что при этом будут учтены лишь молекулы, содержащие остаток *полностью-транс*-ретинала (т. е. *транс*-форму). После подобного преобразования точки, отвечающие «темновым» и «световым» препаратам, укладываются на общие кривые (см. рис. 7 и 8).

Данные, полученные при изучении быстрой и медленной фаз обесцвечивания, позволяют обсудить возможный молекулярный механизм действия ионов серебра на бактериородопсин. Наиболее простое объяснение,

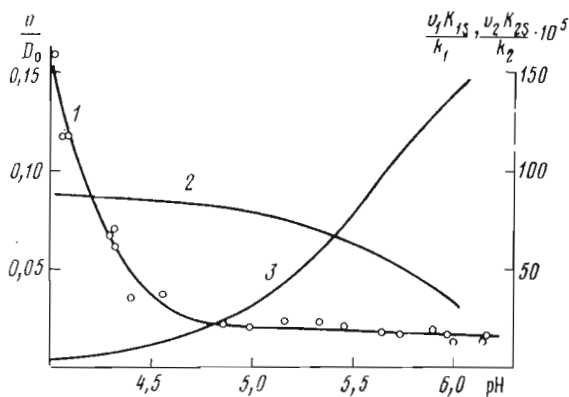


Рис. 9. Влияние pH на нормализованные значения начальной скорости медленной фазы обесцвечивания «светового» солублизованного бактериородопсина (0,1 М MES; 2% тритона X=100;  $7 \cdot 10^{-3}$  М  $\text{AgNO}_3$ ;  $20^\circ$ ). 1 — экспериментальная зависимость; 2 и 3 — кривые изменения  $v_1 K_{1S}/k_1$  и  $v_2 K_{2S}/k_2$ , вычисленные с помощью уравнений (8) и (9) при  $K_S = 0,04$  М и  $pK_D = 5,4$

по-видимому, состоит в том, что в бактериородопсине альдимин ретиналя взаимодействует с анионной группой (или группами) белка, причем это взаимодействие не только вызывает батохромный сдвиг полосы поглощения ретиналевого хромофора, но также обуславливает высокое значение  $pK_a$  альдимины и устойчивость последнего к гидролизу [11]. Если это допущение верно, то нарушение указанного взаимодействия при связывании анионными группами ионов серебра может вызывать гипсохромный сдвиг полосы поглощения протонированного альдимины, депротонирование последнего и, наконец, гидролиз альдиминной связи.

Выше было показано, что гидролиз альдимины ретиналя несомненно является конечным результатом действия ионов серебра на бактериородопсин. Но уже на первой фазе их действия наблюдаемые спектральные изменения соответствуют тем, которые можно ожидать, если в  $\text{Ag}^+$ -комплексе бактериородопсина протонированный альдимин имеет более коротковолновую полосу поглощения и меньшее значение  $pK_a$ . В самом деле, полосы поглощения в области 470 и 400 нм, возникающие на быстрой фазе обесцвечивания, естественно отнести к «новому» протонированному альдимину и к его депротонированной форме. Такая интерпретация согласуется с рассмотренной выше схемой Б, если принять, что группа УН есть не что иное, как протонированный альдимин. Заметим, что отвечающая этой группе величина  $pK_a \approx 5,4$  близка к значениям, известным для модельных альдиминов ретиналя [16].

Таким образом, есть основания полагать, что быстрая фаза обесцвечивания бактериородопсина обусловлена связыванием иона серебра анионной группой, непосредственно взаимодействующей с альдиминем ретиналя. В то же время ряд данных не может быть объяснен на основе столь простых представлений. Во-первых, если причиной дестабилизации альдимины является уменьшение его  $pK_a$ , вызванное связыванием одного иона серебра, то почему на медленной фазе, включающей гидролиз альдимины, скорость превращения определяется теми молекулами бактериородопсина, которые связали два иона серебра. Возможный ответ заключается в том, что реально прослеживается лишь превращение наиболее реакционноспособных форм, а таковыми являются «двойные» комплексы. Не исключено, однако, что в комплексах Б1 и Б2 гидролиз альдимины термодинамически невыгоден и становится возможным только после связывания второго иона серебра. Во-вторых, в рамках схемы Б, отражающей

лишь равновесные состояния, рассматриваются только два процесса: обратимое связывание ионов серебра и депротонирование альдимида, т. е. реакции, которые должны протекать с очень большой скоростью. Между тем по мере роста рН скорость быстрой фазы уменьшается, и при рН 6,0 ( $pAg^+ 2,13$ ;  $20^\circ$ ) она составляет уже  $0,18 \text{ с}^{-1}$ . Следовательно, быстрая фаза обесцвечивания несомненно включает рН-зависимую стадию, которая может протекать с вполне измеримой скоростью. Эта стадия скорее всего связана с конформационными превращениями молекулы белка. Поэтому можно предположить, что связывание иона серебра приводит к изменению свойств альдимида не только (или, быть может, не столько) благодаря локальному взаимодействию с анионным центром, но и вследствие обусловленных им глобальных изменений окружения остатка ретиналя.

Можно думать, что эти изменения связаны с уменьшением сродства белковой молекулы к полиеновой цепи ретиналевого остатка. Ранее было показано, что такие аналоги ретиналя, как  $C_{18}$ -кетон или *полностью-транс*-ретинол, образуют с бактериоопсином комплексы, занимаая в молекуле белка, по-видимому, то же место, что и ретиналь [8]. Не вызывает сомнений, что эти комплексы возникают только за счет нековалентных взаимодействий молекулы полиена с белковым окружением. Оказалось, что ионы серебра в концентрации  $0,5\text{--}1 \text{ мМ}$  мгновенно разрушают подобные комплексы. Этот эффект легко проследить по исчезновению как bathochromного сдвига полосы поглощения полиенового хромофора, так и индуцированного кругового дихроизма, характерных для связанных с бактериоопсином аналогов ретиналя [8]. Указанные комплексы образуются вновь, если  $Ag^+$ -ионы удалить из раствора с помощью комплексонов, например тиосульфата натрия. Ионы других металлов в столь малых концентрациях гораздо менее активны. Таким образом, похоже, что быстрая фаза обесцвечивания бактериородопсина и разрушение нековалентных комплексов аналогов ретиналя с бактериоопсином вызывается специфическим связыванием иона серебра одним и тем же центром в молекуле белка. Отсюда следует, что ионы серебра должны не только дестабилизировать альдимида ретиналя в бактериородопсине, но и блокировать образование последнего из бактериоопсина и ретиналя на стадии возникновения их нековалентного комплекса.

Это предположение было подтверждено экспериментами с так называемыми апомембранами, которые получают фотоиндуцированным гидроксиламинолизом альдимида ретиналя в цитозольных мембранах [17]. Оказалось, что ионы серебра в концентрации  $0,1\text{--}1 \text{ мМ}$  действительно тормозят регенерацию бактериородопсина в апомембранах, наблюдаемую при введении в их суспензию ретиналя. Используя методику, описанную в работе [8], удалось показать, что это торможение является конкурентным и характеризуется величиной  $K_1^{Ag} = (4,5 \pm 2) \cdot 10^{-4} \text{ М}$ . Поскольку  $K_1^{Ag}$  не что иное, как константа нестойкости  $Ag^+$ -комплекса бактериоопсина, ее значение можно также оценить из данных о влиянии ионов серебра на устойчивость упомянутых выше нековалентных комплексов аналогов ретиналя. Равновесие между комплексами бактериоопсина с этими аналогами и с  $Ag^+$ -ионами можно описать уравнением (10), справедливым, если концентрация свободного бактериоопсина пренебрежимо мала:

$$\frac{1}{\gamma} = 1 + \frac{K_1^I}{K_1^{Ag} [I]_0} \cdot [Ag^+], \quad (10)$$

где  $\gamma$  — доля бактериоопсина, связанного с полиеном I;  $[I]_0$  — общая концентрация полиена;  $K_1^I$  — константа нестойкости комплекса с полиеном;  $K_1^{Ag}$  — константа нестойкости  $Ag^+$ -комплекса.

При использовании в качестве конкурентов ионов серебра  $C_{18}$ -кетона и его 5-*цис*-изомера, значения  $K_1^I$  для которых были определены ранее [8], были найдены значения  $K_1^{Ag}$ , равные соответственно  $(4 \pm 1) \cdot 10^{-4}$  и

$(6 \pm 1) \cdot 10^{-4}$  М, т. е. близкие к приведенному выше. Эти данные несомненно свидетельствуют в пользу того, что связывание иона серебра исключает возможность нормального взаимодействия молекулы полиена с комплементарным ей участком бактериоопсиа. Дальнейшие исследования термодинамики связывания ионов серебра как с бактериородопсином, так и с бактериоопсином будут способствовать выяснению факторов, определяющих энергетику этого взаимодействия.

Другой актуальной задачей сейчас является установление природы групп, ответственных за связывание ионов серебра, равно как и положения этих групп в белковой глобуле. Скорее всего в связывании  $\text{Ag}^+$ -ионов участвуют карбоксильные группы остатков аспарагиновой и/или глутаминовой кислоты. В этой связи обращает на себя внимание то обстоятельство, что два остатка аспарагиновой кислоты —  $\text{Asp}^{36}$  и  $\text{Asp}^{38}$  — находятся в непосредственной близости к альдимиону ретиналя [2]. Вместе с тем исключительная специфичность действия ионов серебра заставляет предположить, что в том центре, который ответствен за быструю фазу обесцвечивания,  $\text{Ag}^+$ -комплекс имеет мультидентатный характер. Можно допустить, что в этом комплексе в координационную сферу иона серебра входит S-атом одного из метиониновых остатков, к которым  $\text{Ag}^+$ -ионы, как известно, имеют высокое сродство.

Выше отмечалось, что квадратичная зависимость скорости медленной фазы обесцвечивания от концентрации ионов серебра может быть интерпретирована как указание на существование второго центра связывания этих ионов. Мало вероятно, что оба эти центра связывания имеют одинаковую катионную специфичность; поэтому были основания ожидать, что, хотя только  $\text{Ag}^+$ -ионы способны индуцировать первую фазу обесцвечивания, условием протекания его второй, медленной фазы может быть дополнительное связывание не только ионов серебра, но и других катионов, которые условно можно назвать «посторонними». Таким образом, изучение катионной специфичности катализа медленной фазы может быть одним из подходов к выяснению роли второго центра связывания ионов серебра.

Допустим, что связывание «посторонних» катионов способно обусловить протекание медленной фазы обесцвечивания, но в то же время не влияет на связывание  $\text{Ag}^+$ -иона в том центре, от которого зависит быстрая фаза. В этом случае при малой фиксированной концентрации ионов серебра начальная скорость медленной фазы и концентрация «постороннего» катиона должны быть связаны соотношением типа уравнения Михаэлиса — Ментен. С другой стороны, при достаточно большой фиксированной концентрации «постороннего» катиона можно ожидать, что аналогичное соотношение будет соблюдаться и для ионов серебра. Соответствующие эксперименты были выполнены с одно-, двух- и трехзарядными катионами (см. рис. 10 и 11). Оказалось, что в присутствии малых количеств ионов серебра введение в среду нитратов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Tl}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Sc}^{3+}$  действительно приводит к ускорению медленной фазы обесцвечивания бактериородопсина и практически не сказывается на амплитуде его быстрой фазы. Тем не менее этот эффект по своей природе отличен от ожидавшегося. Так, при  $\text{pH} < 5$  величина  $d \lg (v/D_0)/d \lg [\text{M}]$ , характеризующая зависимость начальной скорости медленной фазы от концентрации «постороннего» катиона, неизменно оказывается значительно больше единицы, между тем как при соблюдении уравнения Михаэлиса — Ментен она не может превышать единицу. С однозарядными катионами при  $\text{pH} > 5,5$  указанный параметр близок к единице (см. кривую 2 на рис. 10 А и кривые 2 и 3 на рис. 10 Б). Однако и в этих условиях влияние «посторонних» катионов отличается от ожидавшегося, поскольку даже при высокой концентрации  $\text{Na}^+$ -ионов (до 1,5 М  $\text{NaNO}_3$ ) скорость медленной фазы пропорциональна не первой степени, а квадрату концентрации ионов серебра, как это предсказывается уравнениями (8) и (9) при  $[\text{Ag}^+] \ll K_{\text{эф}}$ . Таким

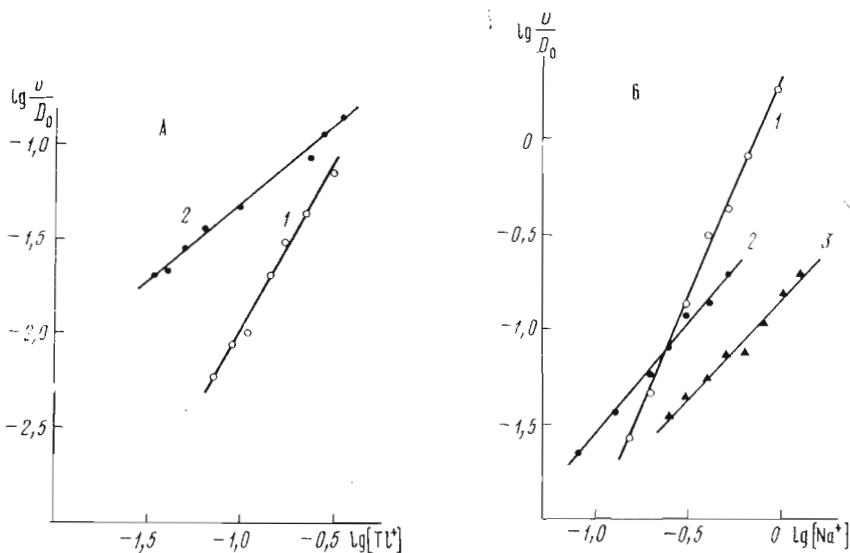


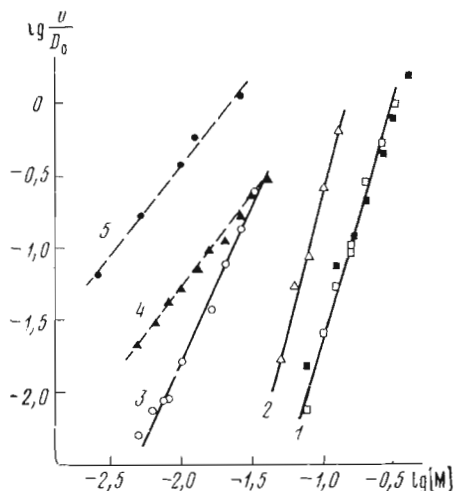
Рис. 10. Влияние однозарядных катионов на нормализованные значения начальной скорости медленной фазы обесцвечивания «светового» солюбилизованного бактериородопсина (0,01 М MES; 2% тритона X-100; 20°). В скобках ниже приведена концентрация  $\text{AgNO}_3$  в мМ и тангенс угла наклона прямых, проведенных методом наименьших квадратов. А — ионы таллия: 1 — рН 4,87 (2,5;  $1,72 \pm 0,05$ ); 2 — рН 5,70 (5,0;  $0,81 \pm 0,07$ ). Б — ионы натрия: 1 — рН 4,65 (2,5;  $2,42 \pm 0,04$ ); 2 — рН 5,70 (5,0;  $1,20 \pm 0,04$ ); 3 — рН 6,5 (5,0;  $1,05 \pm 0,06$ )

образом, есть основания полагать, что наблюдаемое в этих опытах ускорение медленной фазы не обусловлено взаимодействием «посторонних» катионов со вторым центром связывания ионов серебра.

Какими бы причинами ни было вызвано обнаруженное явление, оно препятствует выяснению катионной специфичности центра, ответственного за протекание медленной фазы. В попытках исключить его влияние было изучено действие наиболее эффективных катионов, в частности  $\text{Sc}^{3+}$ , на начальную скорость медленной фазы при постоянной ионной силе раствора, создаваемой солями малоэффективных катионов в достаточно высокой концентрации. Оказалось, однако, что в этих условиях происходит обесцвечивание бактериородопсина, не зависящее от присутствия ионов серебра (см. кривые 4 и 5 на рис. 11). Этот процесс по своему механизму, по-видимому, отличен от действия  $\text{Ag}^+$ -ионов, так как его скорость в довольно широком диапазоне пропорциональна не квадрату, а практически первой степени концентрации ионов скандия.

Хотя вопрос о катионной специфичности второго центра связывания пока остается открытым, данные, полученные в описанных выше экспериментах, оказались весьма полезными при изучении механизма действия ионов серебра на *цис*-форму бактериородопсина. Непосредственно наблюдать превращения *цис*-формы удалось при использовании высоких концентраций ионов серебра. В области низких рН скорость обесцвечивания *транс*-формы при этом столь велика, что этот процесс заканчивается очень быстро и не препятствует наблюдению превращений *цис*-формы (ср. кривые 1 и 3 на рис. 12). Экстраполируя медленную составляющую кривой 1 к моменту введения ионов серебра, можно оценить долю бактериородопсина в «темновом» препарате, который участвует в этом медленном процессе. Эта доля, как и следует ожидать для *цис*-формы, составляет около 0,45. При больших значениях рН и высоких концентрациях ионов серебра *транс*-форма полностью обесцвечивается уже в ходе быстрой фазы. В этих условиях можно наблюдать, как с ростом концентрации  $\text{Ag}^+$ -ионов начальная степень обесцвечивания «темновых» препаратов становится су-

Рис. 11. Влияние многозарядных катионов на нормализованные значения начальной скорости медленной фазы обесцвечивания «светового» солиобилизованного бактериородопсина (0,1 М MES; 2% тритона X-100;  $2,5 \cdot 10^{-3}$  М  $\text{AgNO}_3$ ; pH 4,65; 20°). В скобках ниже приведены тангенсы угла наклона прямых, проведенных методом наименьших квадратов: 1 —  $\text{Cd}^{2+}$  ( $3,48 \pm 0,11$ ; точки, отмеченные черным квадратом, получены при pH 5,70 в присутствии  $5 \cdot 10^{-3}$  М  $\text{AgNO}_3$ ); 2 —  $\text{Cu}^{2+}$  ( $3,85 \pm 0,25$ ); 3 —  $\text{Sc}^{3+}$  ( $2,16 \pm 0,10$ ). Кривые 4 и 5 отражают зависимость начальной скорости от концентрации  $\text{Sc}^{3+}$  в отсутствие ионов серебра: 4 — pH 4,35; 1,5 М NaCl ( $1,27 \pm 0,10$ ); 5 — pH 4,70; 1,5 М  $\text{NaNO}_3$  ( $1,26 \pm 0,13$ )



щественно больше  $\beta$  (см. кривую 2 на рис. 12). Таким образом, есть основания полагать, что индуцированное ионами серебра обесцвечивание *цис*-формы бактериородопсина также включает как быструю, так и медленную фазы. Точное определение величины  $K_{\text{эфф}}$  для *цис*-формы встречает значительные технические трудности, однако можно утверждать, что она в сопоставимых условиях на 1,5—2 порядка больше, чем у *транс*-формы.

С ростом концентрации ионов серебра начальная скорость медленной фазы обесцвечивания *цис*-формы значительно увеличивается. Изложенные выше данные не дают основания предполагать, что  $\text{Ag}^+$ -ионы катали-

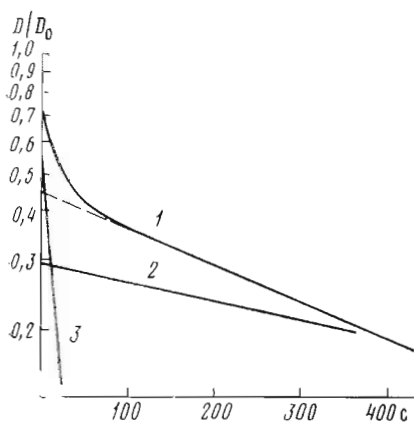


Рис. 12

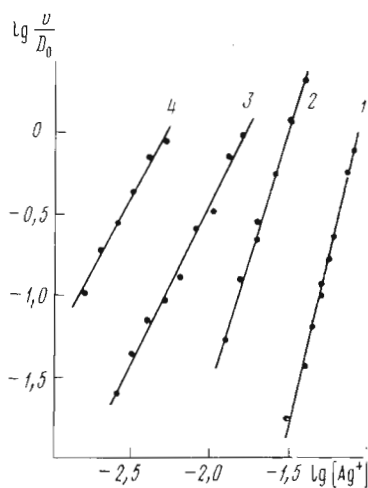


Рис. 13

Рис. 12. Индуцированное ионами серебра обесцвечивание *цис*-формы бактериородопсина в «темновых» солиобилизованных препаратах (0,1 М MES; 2% тритона X-100;  $3,9 \cdot 10^{-2}$  М  $\text{AgNO}_3$ ; 20°). 1 — pH 4,40; 2 — pH 6,35; 3 — контроль (превращение «светового» препарата при pH 4,40)

Рис. 13. Влияние концентрации ионов серебра и ионной силы раствора на нормализованные значения начальной скорости медленной фазы обесцвечивания *цис*-формы бактериородопсина в «темновых» солиобилизованных препаратах (0,05 М MES; 2% тритона X-100; pH  $4,30 \pm 0,05$ ; 20°). В скобках ниже приведены тангенсы угла наклона прямых, проведенных методом наименьших квадратов: 1 — без добавок  $\text{NaNO}_3$  ( $4,27 \pm 0,05$ ); 2 — 0,15 М  $\text{NaNO}_3$  ( $3,29 \pm 0,08$ ); 3 — 0,45 М  $\text{NaNO}_3$  ( $1,99 \pm 0,10$ ); 4 — 1,50 М  $\text{NaNO}_3$  ( $1,90 \pm 0,11$ )



зируют установление темнового равновесия между *цис*- и *транс*-формами бактериородопсина. Поэтому зависимость скорости медленной фазы от концентрации ионов серебра можно рассматривать как указание на то, что этот процесс не определяется *цис* → *транс*-изомеризацией ретиналевых остатков. Указанная зависимость характеризуется величиной  $d \lg (v/D_0)/d \lg [Ag^+] > 4$  (см. кривую 1 на рис. 13); это заставляет предположить, что, присутствуя в высоких концентрациях, ионы серебра ускоряют медленную фазу подобно «посторонним» катионам. Чтобы исключить этот эффект, аналогичные концентрационные зависимости были определены в присутствии нитрата натрия. Оказалось, что с ростом концентрации  $NaNO_3$  величина  $d \lg (v/D_0)/d \lg [Ag^+]$  уменьшается, достигая предельного значения, близкого к 2 (см. кривые 2—4 на рис. 13). Таким образом, в отсутствие побочных эффектов скорость превращения *цис*-формы бактериородопсина также оказывается пропорциональной квадрату концентрации ионов серебра, что позволяет предположить общность механизмов обесцвечивания *цис*- и *транс*-форм. Дальнейшие исследования позволяют установить, является ли причиной значительных различий в величине  $K_{эфф}$  у *цис*- и *транс*-форм бактериородопсина разное сродство центра связывания к ионам серебра (т. е.  $K_S$ ) или же разная основность образующегося  $Ag^+$ -комплекса (т. е.  $K_D$ ). Наиболее вероятным сейчас представляется, что центр связывания серебра формируется при определенной конформации белковой молекулы, энергия перехода в которую различна у *цис*- и *транс*-формы.

Авторы глубоко благодарны академику Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание к их работе и ценные советы при обсуждении результатов.

### Экспериментальная часть

Пурпурные мембраны выделяли из клеток *Halobacterium halobium* R<sub>1</sub> по методике, описанной в работе [1]. Мембраны солибилизировали в 2% (вес/объем) растворе тритона X-100 (Serva, ФРГ) в условиях, приведенных в работе [5]. Время инкубации с детергентом при 20° (рН 6—7) составляло не менее 6 ч. Апомембраны приготавливали согласно работе [17] и освобождали их от избытка гидроксиламина гель-фильтрацией на сефадексе G-50 при рН 8,2. Содержание бактериородопсина в препаратах апомембран определяли спектрофотометрически после его превращения в бактериородопсин как в работе [8].

В работе использовали препараты солей марки ч. д. а. или х. ч. и дважды дистиллированную воду. Состав растворов приведен в подписях к рисункам. Для забуферивания применяли MES (Serva, ФРГ), которая слабо связывает ионы серебра. Возможность применения этого буфера была проверена специальными экспериментами, в которых определялось влияние его концентрации на амплитуду быстрой фазы обесцвечивания солилизированного бактериородопсина при добавлении 7 мМ  $AgNO_3$  в интервале рН 4—6. При рН 4—4,5 MES в концентрации от 10 до 450 мМ не влияла на амплитуду быстрой фазы, а при рН 5,7—5,9 в присутствии 100 мМ MES она уменьшалась не более чем на 20%. Дальнейшее увеличение концентрации MES, однако, приводило к значительному уменьшению амплитуды быстрой фазы из-за образования  $Ag^+$ -комплексов депротонированных молекул MES.

Хроматографически гомогенные препараты C<sub>18</sub>-кетона, его 5-*цис*-изомера и полностью-*транс*-ретиналя были любезно предоставлены нам Б. И. Мицпером (МИТХТ им. М. В. Ломоносова), а образец кристаллического полностью-*транс*-4-кеторетиналя — А. А. Димитровским (Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва). Все эти вещества использовались в виде этанольных растворов, причем после их введения

концентрация этанола в препаратах, содержавших белок, не превышала 1,5%.

Спектральные измерения выполнены с помощью спектрофотометров Gilford 2400/Sefram 242-F (США/Франция) и Specord UV VIS (ГДР). Термостатирование образцов осуществляли с точностью  $\pm 0,2^\circ$ . В работе использовали рН-метр Corning 112 (США) и автотитратор Radiometer TTT-2/ABU-13/ТТА-31 (Дания). Электрод сравнения соединяли с измерительной ячейкой с помощью нитратного мостика. Обработка результатов измерений осуществлялась с помощью разработанного нами набора программ GRAPLOT на ЭВМ Tektronix 31 (opt. 009)/4661 (США).

Для освещения препаратов использовали ртутную лампу высокого давления ДРШ-500М снабженную фокусирующей системой, тепловым фильтром (10 см 5% раствора  $\text{CuSO}_4$ ) и стеклянными фильтрами ЖС-17 (5 мм) и ЖС-18 (5 мм) — источник А, либо лампу ДРШ-250-2М с аналогичным набором фильтров и включающей волоконный световод оптической системой, которая позволяла ввести луч в кюветное отделение спектрофотометра, — источник Б. На время освещения препарата окно фотоумножителя перекрывалось фотозатвором. Для импульсного освещения использовали лампу ИФК-120 в комбинации со стеклянными фильтрами ЖС-17 и ЖС-18 («желтые» вспышки) или ФС-7 («синие» вспышки).

«Темновые» солибилизованные препараты приготавливали действием тритона Х-100 на пурпурные мембраны, предварительно адаптированные к темноте, в течение не менее 12 ч. Для получения «световых» препаратов растворы «темнового» бактериородопсина освещали серией белых вспышек [7]. При вычислении степени превращения бактериородопсина на быстрой фазе обесцвечивания использовали значение  $D_{555}$ , отвечающее «световому» препарату, которое составляло 1,13 от соответствующей величины для «темнового» препарата. Начальная скорость медленной фазы обесцвечивания всюду приведена в единицах оптической плотности в минуту.

Влияние ионов серебра на начальную скорость регенерации бактериородопсина в апомембранах изучали в условиях, описанных в работе [8], в диапазоне концентраций  $\text{AgNO}_3$  0,1—1 мМ и ретиналя 0,01—0,02 мМ. Вытеснение  $\text{C}_{18}$ -кетона и его 5-цис-изомера из комплексов с бактериородопсином наблюдали в суспензиях апомембран (5 мкМ бактериородопсина) в растворе 50 мМ MES (рН 6,4;  $20^\circ$ ) при изменении концентрации  $\text{Ag}^+$ -ионов в пределах 0,5—10 мМ. Концентрацию этих комплексов определяли спектрофотометрически по амплитуде положительной полосы в области 415 нм в дифференциальных спектрах, полученных согласно работе [8].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Oesterhelt D., Stoeckenius W. (1974) *Nature New Biol.* 233, 149—152.
2. Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Lobanov N. A. (1977) *FEBS Lett.*, 84, 1—4.
3. Bridgen J., Walker I. (1976) *Biochemistry*, 15, 792—796.
4. Lewis A., Spoonhower J., Bogomolni R. A., Lozier R. H., Stoeckenius W. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71, 4462—4466.
5. Heyn M. P., Bauer P.-J., Dencher N. A. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 67, 897—903.
6. Овчинников Ю. А., Шкроб А. М., Родионов А. В. (1978) *Биоорганическая химия*, 4, 354—359.
7. Шкроб А. М., Родионов А. В. (1978) *Биоорганическая химия*, 4, 500—513.
8. Ovchinnikov Yu. A., Shkrob A. M., Rodionov A. V., Mitzner B. I. (1978) *FEBS Lett.*, in press.
9. Kriebel A. N., Albrecht A. C. (1976) *J. Chem. Phys.*, 65, 4576—4583.
10. Sumper M., Herrmann G. (1976) *FEBS Lett.*, 69, 149—152.
11. Шкроб А. М., Родионов А. В. (1978) *Биоорганическая химия*, 4, 360—368.
12. Литвин Ф. Ф., Балашов С. П. (1977) *Биофизика*, 22, 1111—1114.
13. Oesterhelt D., Meentzen M., Schuhmann L. (1973) *Eur. J. Biochem.*, 40, 453—463.
14. Pettei M. J., Yudd A. P., Nakanishi K., Henselman R., Stoeckenius W. (1977) *Biochemistry*, 16, 1955—1959.

15. Sperling W., Carl P., Rafferty Ch. N., Dencher N. A. (1977) *Biophys. Struct. Mech.*, 3, 79—94.
16. De Pont J. J. H. H., Daemen F. J. M., Bonting S. L. (1970) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 140, 267—274.
17. Oesterhelt D., Schuhmann L., Gruber H. (1974) *FEBS Lett.*, 44, 257—261.

Поступила в редакцию  
17.VII.1978

## Ag<sup>+</sup>-INDUCED HYDROLYSIS OF THE RETINAL ALDIMINE IN BACTERIORHODOPSIN

RODIONOV A. V., SHKROB A. M.

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

Bacteriorhodopsin from *Halobacterium halobium* solubilized with 2% Triton X-100 is bleached in the presence of Ag<sup>+</sup>-ions. The rate of the process increases considerably upon illumination. In the native purple membranes bacteriorhodopsin can be sensitized to Ag<sup>+</sup>-ions by the action of non-ionic detergents (5-10 moles per mole of protein). In the dark conditions the Ag<sup>+</sup>-induced bleaching includes the fast stage which proceeds with the formation of two intermediates having absorption maxima near 400 and 470 nm, and the slow one followed by hydrolytic splitting of the retinal aldimine. Both stages can be reversed with the aid of the Ag<sup>+</sup>-binding complexones. Bacteriorhodopsin molecules containing both all-*trans*- and 13-*cis*- retinal residues react with Ag<sup>+</sup>-ions by the same mode, but the Ag<sup>+</sup>-complex of the *cis*-form has considerably higher dissociation constant. Experimental data indicate the existence of two Ag<sup>+</sup>-binding sites in bacteriorhodopsin molecule, one of which being responsible for transitions at the fast stage and the second for the slow stage. The rate of the latter increases considerably with increase of salt concentration in the medium, the nature of cation influencing strongly the effect. It has been shown that continuous illumination ( $\lambda > 530$  nm) of bacteriorhodopsin in the presence of Ag<sup>+</sup>-ions induces the formation of steady-state amounts of the long-lived intermediate ( $\tau_{1/2} \sim 13$  sec, 2°,  $\lambda_{\max}$  360 nm). The hydrolysis of retinal aldimine in this form appears to be responsible for the light-dependent acceleration of bleaching.

---