



УДК 541.144

СПЕКТРАЛЬНЫЙ ПЕРЕХОД БАКТЕРИОРОДОПСИНА
КАК ИНДИКАТОР ЕГО СОСТОЯНИЯ В ПУРПУРНЫХ МЕМБРАНАХ

Овчинников Ю. А., Шкроб А. М., Родислов А. В.

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

Параметры перехода бактериородопсина в форму, имеющую полосу поглощения вблизи 500 нм, весьма чувствительны к изменениям состояния этого белка в пурпурных мембранах *Halobacterium halobium*. В данном переходе, который индуцируют увеличение pH, нагревание или добавление смешивающихся с водой органических растворителей, участвуют преимущественно молекулы бактериородопсина, содержащие остаток *полностью-транс*-ретинала. Подщелачивание и/или нагревание суспензии пурпурных мембран в 50% водном глицерине сопровождается их частично обратимым превращением, при котором, с одной стороны, уменьшается ρK перехода в коротковолновую форму, а с другой — возникает неэквивалентность молекул бактериородопсина в мембране. С ростом концентрации растворителей мембраны переходят в новое состояние, отличающееся большей подвижностью отдельных участков молекулы бактериородопсина. Сопоставление данных, полученных с пурпурными мембранами и с солюбилизованным бактериородопсином, позволило выявить ряд свойств этого белка, обусловленных его включением в кристаллическую решетку пурпурной мембраны. Найдено, что *цис*-форма бактериородопсина в отличие от *транс*-формы обладает отрицательным дихроизмом, что доказывает существование у этих форм существенных различий в характере белкового окружения ретинального остатка.

Бактериородопсин — ретинальсодержащий белок из клеточной мембраны галофильного микроорганизма *Halobacterium halobium* — представляет собой первичную протонную транслоказу, которая в качестве источника энергии использует свет [1—3]. Являясь единственным белковым компонентом определенных участков мембраны (так называемых пурпурных мембран), бактериородопсин образует в них двумерную гексагональную решетку, в узлах которой расположены тримеры белка, а пустоты заполнены молекулами липидов [4]. Такая высокоупорядоченная и жесткая структура необходима для биологических мембран, и пока неясно, какую роль она играет в транспортной функции и других свойствах бактериородопсина [5]. Настоящая работа посвящена темновому спектральному переходу в бактериородопсине, который отражает изменения окружения остатка ретинала и в то же время чувствителен к изменениям состояния белковой молекулы и/или мембраны в целом. Благодаря этим особенностям указанный переход удастся использовать как своего рода индикатор при изучении влияния внешних условий на конформацию и упаковку бактериородопсина.

Привятые сокращения: C₁₈-кетон — *полностью-транс*-6-метил-8-(1',1',5'-триметилциклогексен-5'-ил-6') октатриен-3,5,7-оп-2; MES — морфолиноэтансульфокислота.

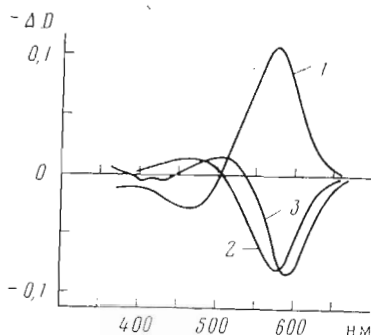


Рис. 1. Дифференциальные спектры, отвечающие переходу Д575→Д460 и световой адаптации пурпурных мембран (50% глицерин (по объему), 0,01 М фосфат-боратный буфер, $1,2 \cdot 10^{-5}$ М бактериородопсин, 20° С). Образцы в основном луче (а) и в луче сравнения (б): 1 — а) «световые», рН 10, б) «световые», рН 6,5; 2 — разность между кривой 1 и аналогичной кривой для «темновых» мембран; 3 — а) «световые», рН 6,5, б) «темновые», рН 6,5

С ростом рН суспензии пурпурных мембран бактериородопсин в них претерпевает превращение, обнаруживающееся в уменьшении полосы поглощения при 570 нм и появлении новой полосы вблизи 500 нм. В дифференциальном спектре этому переходу отвечают две полосы соответственно при 575 и 460 нм с изобестической точкой между ними около 500 нм (см. кривую 1 на рис. 1). Превращение бактериородопсина в «щелочную» форму, далее обозначаемое Д575→Д460, в широком диапазоне рН обратимо в том смысле, что уменьшение рН до 6—7 приводит к мгновенному и практически полному восстановлению исходного спектра. С увеличением рН, однако, неизменно наступает момент, когда наряду с переходом Д575→Д460 происходит превращение, которое можно условно назвать денатурацией мембран. Это превращение, сопровождаемое появлением полосы поглощения вблизи 380 нм, происходит тем быстрее, чем выше рН и температура, и, раз начавшись, оно захватывает весь бактериородопсин в мембране (процесс денатурации и свойства денатурированных мембран подробно рассмотрены в работе [6]).

По положению полос и изобестической точки в дифференциальных спектрах рН-зависимый переход Д575→Д460 идентичен изученному Остерхельтом и сотр. [7, 8] обратимому переходу, который вызывает прибавление к водной суспензии мембран таких растворителей, как диметилформамид или диметилсульфоксид. Этот последний переход, по-видимому, также рН-зависим, поскольку и здесь степень превращения возрастает с увеличением рН. Сходство между переходами, наблюдаемыми в присутствии и в отсутствие упомянутых растворителей, проявляется и в том, что в обоих случаях степень превращения тем больше, чем выше температура (ср. [9, 10]).

Исходя из того, что переход Д575→Д460, с одной стороны, рН-зависим, а с другой — очень чувствителен к внешним условиям, можно предположить, что бактериородопсин существует в двух конформационно и энергетически различающихся формах: исходной и «щелочной», причем в стабилизацию исходной формы существенный вклад вносит кулоновское взаимодействие с участием титруемых групп (ср. [11]). Отсюда следует, что переход в «щелочную» форму может быть, вообще говоря, вызван различными дестабилизирующими воздействиями, однако в области рК титруемых групп этот переход должен быть рН-зависим. Кроме того, естественно ожидать, что эффективные значения рК, оцениваемые по рН-зависимости превращения в «щелочную» форму, будут зависеть от того, какова в данных условиях разность энергий исходной и «щелочной» форм.

Этот подход был использован при изучении перехода Д575→Д460 в пурпурных мембранах, суспендированных в 50% водном глицерине. В отличие от диметилформамида и подобных ему растворителей глицерин даже в очень высокой концентрации при рН, близком к нейтральному, не вызывает указанного перехода. Вместе с тем именно в этой среде удается легко проследить за такими превращениями бактериородопсина, которые в водных суспензиях мембран обнаружить пока не удалось.

Характер наблюдаемых спектральных изменений с определенностью указывает на то, что переход Д575→Д460 связан с изменением ближайшего окружения остатка ретиналя. Между тем известно, что в пурпурных мембранах молекулы бактериородопсина могут содержать остатки ретиналя, различающиеся конфигурацией двойной связи при C₍₁₃₎-атоме. Эти молекулы далее для краткости будут называться *цис*- и *транс*-формами. Было интересно установить, различаются ли эти формы по способности вступать в переход Д575→Д460.

Ранее было показано, что содержание обеих форм в пурпурных мембранах после темновой адаптации примерно одинаково, тогда как в фотостабилизированном состоянии, достигаемом при интенсивном освещении, в мембранах присутствует только *транс*-форма [7, 12, 13]. Мембраны, адаптированные к свету («световые») и к темноте («темновые»), обладают характерным дифференциальным спектром (см. кривую 3 на рис. 1; ср. [14]), по уменьшению интенсивности которого можно судить о протекании темновой *транс*→*цис*-изомеризации. При pH 6—8,5 и 20°С этот процесс характеризуется $\tau_c \approx 20$ мин.

Если нейтральную суспензию «световых» мембран в 50% водном глицерине подщелочить до pH ≥ 10 , а затем, спустя длительное время (до 2—3 сут), установить исходное значение pH, то дифференциальный спектр полученного препарата и контрольного «темнового» образца оказывается сходным со спектром, снятым до щелочной обработки. В этом опыте подщелачивание сопровождается частичным превращением единственно присутствовавшей *транс*-формы в форму Д460. Отсюда следует, что, во-первых, обратимый переход Д575⇌Д460 не сопровождается установлением *цис-транс*-равновесия и, во-вторых, *цис-транс*-изомеризация исходного бактериородопсина в щелочной среде сильно заторможена (ср. [14]).

Далее, если подщелочить суспензии «темновых» и «световых» мембран до одинакового значения pH и снять их дифференциальные спектры против соответствующих контрольных образцов, то у «световых» мембран степень превращения в форму Д460 будет всегда больше, причем на обоих спектрах совпадают контуры полос и положение изобестической точки. Это хорошо видно на кривой 2 рис. 1, представляющей собой разность между обоими дифференциальными спектрами. Отсюда следует, что в «световом» и «темновом» препаратах в переходе Д575→Д460 участвует общая для них, а именно *транс*-форма. Возникает вопрос, является ли различие в способности вступать в этот переход внутренне присущим отдельным молекулам бактериородопсина в *цис*- и *транс*-форме или же это следствие их неэквивалентного положения в кристаллической решетке мембраны. Ответ был получен при изучении аналогичного перехода в мономерах бактериородопсина, которые образуются при сольubilизации пурпурных мембран неионным детергентом — тритоном X-100 [15—18].

Ранее превращение сольubilизированного бактериородопсина в форму типа Д460 описано не было. Попытки вызвать образование этой формы нагреванием или подщелачиванием оказались неудачными, поскольку сольubilизированные препараты при температуре выше 35°С и при pH > 9,5 необратимо денатурируют, а в области устойчивости искомое превращение не обнаруживается. Оказалось, однако, что переход в форму, спектрально подобную форме Д460, в сольubilизированном бактериородопсине происходит при действии органических растворителей: диэтилового эфира, диоксана, *n*-бутанола и т. п. На рис. 2 представлен дифференциальный спектр, возникающий при добавлении к раствору бактериородопсина небольших количеств диэтилового эфира. С увеличением концентрации растворителей наступает денатурация бактериородопсина, обнаруживаемая по появлению полосы поглощения вблизи 380 нм, однако вплоть до порога денатурации действие растворителей вполне обратимо. Это легко наблюдать, если в качестве растворителя использовать гидрофобное соединение, быстро распадающееся на гидрофильные компоненты, которые в соответствующих

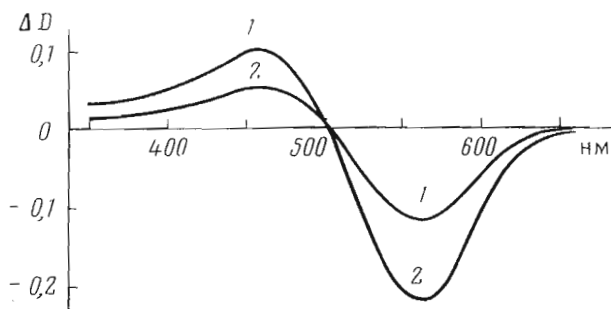


Рис. 2. Дифференциальные спектры, отвечающие индуцированному диэтиловым эфиром превращению «светового» солиобилизованного бактериородопсина (2% тритон X-100, 0,01 М MES (20° С, рН 5,5), $1,5 \cdot 10^{-5}$ М бактериородопсин). Содержание $(C_2H_5)_2O$ в растворе, находящемся в основном луче: 1 — 0,13; 2 — 0,27 М

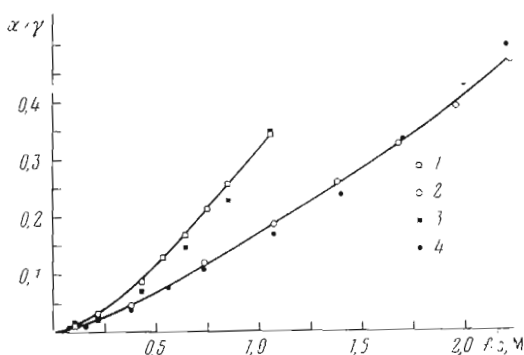


Рис. 3. Зависимость степени превращения «светового» (1, 2, γ 1) и «темнового» (3, 4, γ 0,55) солиобилизованного бактериородопсина от концентрации растворителя (условия см. в подписи к рис. 2; f — масштабный множитель). 1, 3 — n -бутанол ($f=3$), 2, 4 — диоксан ($f=1$)

концентрациях неспособны вызвать превращение бактериородопсина. Таким соединением является, например, тиоэтиловый эфир трифторуксусной кислоты.

Как и пурпурные мембраны, солиобилизованный бактериородопсин можно получить в виде «световых» и «темновых» препаратов, причем последние примерно наполовину состоят из *цис*-формы [19—20]. Дифференциальные спектры, которые отвечают переходу, вызванному растворителями, аналогичны у «темновых» и «световых» препаратов; следовательно, и здесь есть основания полагать, что в этом переходе участвует только *транс*-форма бактериородопсина. Если это так, то степень превращения можно оценивать, определяя отношение амплитуды длинноволновой полосы в дифференциальном спектре к начальному значению поглощения «светового» препарата при длине волны, отвечающей максимуму этой полосы: $\alpha = \Delta D_{\text{макс}} / D_{\text{макс}}^{\text{свет}}$. Такая оценка основана на допущении, что, во-первых, «световые» препараты содержат только *транс*-форму бактериородопсина и, во-вторых, вклад формы типа Д460 в поглощение при $\lambda_{\text{макс}}$ достаточно мал. Оказалось, что величина γ , равная отношению значений α , которые характеризуют в одинаковых условиях «темновые» и «световые» препараты, не зависит от природы и концентрации растворителя и составляет около 0,55 (см. рис. 3, а также кривую 1 на рис. 16а). Таким образом, в «темновых» препаратах только часть молекул белка способна превращаться в форму Д460. Учитывая сказанное выше, можно сделать вывод,

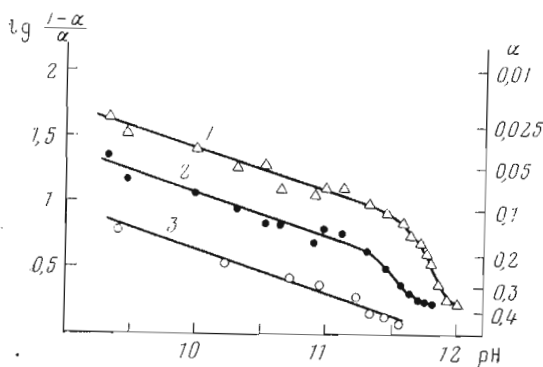


Рис. 4

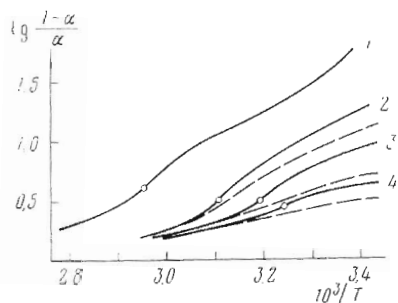


Рис. 5

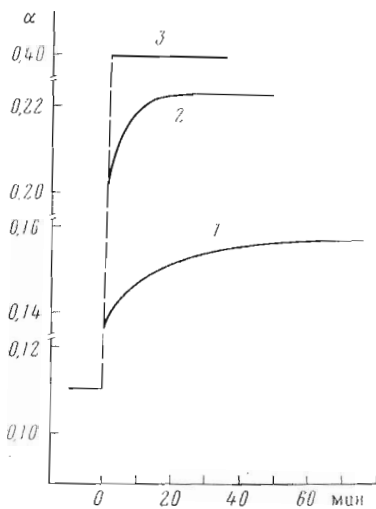


Рис. 6

Рис. 4. pH-Зависимость перехода Д575→Д460 в пурпурных мембранах (состав раствора см. в подписи к рис. 1): 1 — вклад быстрой фазы превращения в «темновых» мембранах, 2 — полное превращение в «темновых» мембранах, 3 — полное превращение в «световых» мембранах

Рис. 5. Температурная зависимость перехода Д575→Д460 в «темновых» мембранах при pH 6,5 (1), 8,5 (2), 9,5 (3) и 10,0 (4) (состав раствора см. в подписи к рис. 1); скорость нагрева 0,25° С/мин, штриховые линии отвечают повторному нагреву (см. текст)

Рис. 6. Увеличение степени превращения бактериородопсина в форму Д460 при быстром ($t_e \approx 1$ мин) нагревании «темновых» мембран от 15° С до 30 (1), 40 (2) и 60° С (3) (состав раствора см. в подписи к рис.1; pH 9,3)

что эти активные молекулы и представляют собой *транс*-форму бактериородопсина. Определенная в этих опытах доля *транс*-формы в «темновых» солюбилизованных препаратах совпадает с найденной ранее другими методами [19, 20]. Таким образом, способность *транс*-формы бактериородопсина избирательно превращаться в форму Д460 не зависит от того, включен бактериородопсин в пурпурную мембрану или нет, и определяется в основном внутримолекулярными факторами.

Дальнейшее изучение превращения Д575→Д460 в пурпурных мембранах привело к обнаружению других переходов в бактериородопсине, которые сами по себе не проявляются спектрально, но сказываются на образовании формы Д460. При этом для оценки степени превращения в форму Д460 использовался тот же метод, что и для солюбилизованных препаратов.

Было установлено, что образование формы Д460 при подщелачивании суспензии пурпурных мембран в 50% водном глицерине включает две фазы, первая из которых протекает практически мгновенно, тогда как вторая в зависимости от условий продолжается от 0,5 до 3 ч. Эти две фазы наблюдаются в широком диапазоне pH и свойственны как «темновым», так и «световым» препаратам (см. рис. 4). Хотя значения α после завершения медленной фазы у «световых» мембран примерно вдвое больше, чем у «темновых», дифференциальные спектры перехода у тех и других мем-

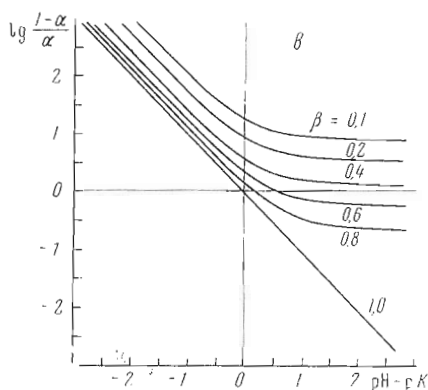
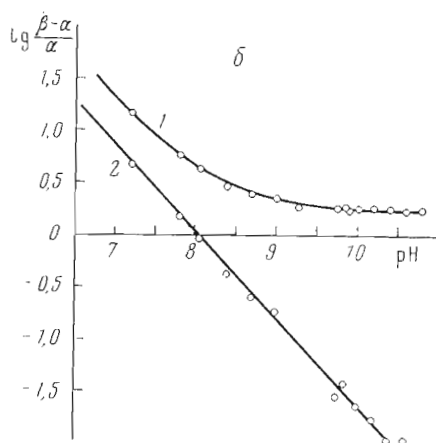
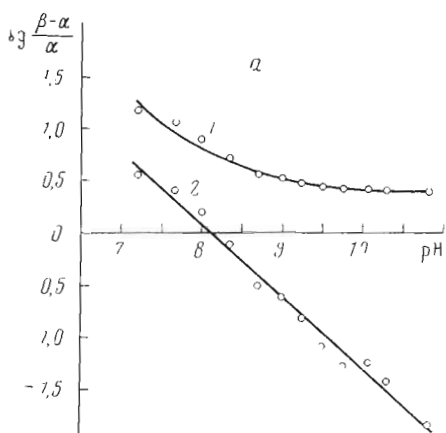


Рис. 7. pH-Зависимость перехода Д575→Д460 в «темновых» мембранах, претерпевших *T*-переход (состав раствора см. в подписи к рис. 1; подробности — в тексте; в скобках приведены наклон прямых, коэффициент корреляции, r^2 , и кажущееся значение pK). *a* — 20° С: 1 — β 1; 2 — β 0,31 ($-0,69 \pm 0,03$; 0,985; $8,1 \pm 0,1$). *b* — 40° С: 1 — β 1; 2 — β 0,36 ($-0,81 \pm 0,04$; 0,975; $7,9 \pm 0,2$). *v* — теоретические кривые титрования, вычисленные с помощью уравнения $(1-\alpha)/\alpha = [K/[H^+] + (1-\beta)]/\beta$

бран на обеих фазах полностью подобны. Таким образом, бифазность здесь отражает гетерогенность молекул бактериородопсина в мембране, непосредственно не зависящую от конфигурации остатка ретиналя.

Если суспензию мембран подкислить до pH 6–7 либо сразу после подщелачивания, либо после завершения медленной фазы, форма Д460 исчезает мгновенно и полностью и поглощение при 575 нм возвращается практически к исходному уровню. Отсюда можно заключить, что собственно превращение Д575→Д460 сопряжено с быстрыми конформационными изменениями, а медленная фаза, по-видимому, отражает переход мембран в состояние, отличающееся от исходного долей молекул *транс*-формы бактериородопсина, реально участвующих в равновесии Д575⇌Д460 при данном значении pH. Этот медленный переход можно условно назвать *H*-переходом.

По завершении *H*-перехода при некотором значении $pH = (pH)_a$, меньшем порога денатурации ($9,5 \leq (pH)_a \leq 11,5$), достигается определенная конечная степень превращения в форму Д460. Если далее суспензию мембран нейтрализовать, а затем тотчас опять подщелочить до $pH = (pH)_a$, достигается та же степень превращения, однако медленная фаза образования формы Д460 отсутствует. Ее нет и при вторичном подщелачивании до $pH < (pH)_a$, однако она наблюдается при $pH > (pH)_a$. Таким образом, мембраны, которые претерпели частичный *H*-переход, при нейтрализации как бы замораживаются в этом состоянии. Вместе с тем *H*-переход по крайней мере частично обратим. Если нейтрализованную суспензию выдержать около суток, то при ее повторном подщелачивании до $pH \leq (pH)_a$ снова наблюдается медленная фаза, хотя ее вклад в степень превращения обычно меньше, чем у исходного препарата.

Превращение в форму Д460 наблюдается, как уже отмечалось выше, не только при увеличении рН, но и при нагревании суспензии пурпурных мембран. Температурные зависимости перехода Д575→Д460 в «темновых» мембранах представлены на рис. 5 в координатах $\lg(1-\alpha)/\alpha-1/T$. В соответствии с законом Вант-Гоффа рН-зависимое равновесие в этих координатах обычно описывается набором параллельных прямых, отвечающих фиксированным значениям рН. Если же в исследованном диапазоне температур имеет место превращение, сказывающееся на термодинамических параметрах этого равновесия, то каждая из прямых распадается на два участка, соединенные переходной кривой. Такие переходные кривые, обладающие точкой перегиба, обнаруживаются на всех температурных зависимостях при $6,5 < \text{pH} < 10$, полученных для мембран, которые нагревались после предварительной инкубации при данном рН (20°C) вплоть до завершения *H*-перехода. Температура в $^\circ\text{C}$, отвечающая точке перегиба, практически линейно зависит от рН: $t_n = 119,6 - 8,33 \text{ pH}$ (коэффициент корреляции $r^2 = 0,998$). Экстраполируя эту зависимость в область более высоких значений рН, можно показать, что при $\text{pH} \approx 11,5$ точка перегиба должна располагаться вблизи 20°C . Таким образом, S-образный характер кривых 1 и 2 на рис. 4 скорее всего объясняется тем, что с ростом рН мембраны вступают в область температурозависимого перехода.

Этот переход, который можно назвать *T*-переходом, практически полностью обратим при рН 6,5—7,5, поскольку повторный нагрев суспензий после их быстрого охлаждения приводит к сходным кривым. Однако при более высоких значениях рН повторный нагрев приводит к существенно иным кривым, у которых область перехода выражена слабо или вообще отсутствует; при $t > t_n$ они практически совпадают с соответствующими участками кривых первого нагрева, а при $t < t_n$ являются естественными продолжениями этих участков. Отсюда можно заключить, что в этих условиях при быстром охлаждении *T*-переход оказывается необратимым.

Степень наблюдаемой обратимости *T*-перехода, по-видимому, зависит от температуры, при которой он происходит. На рис. 6 приведены кривые изменения α после скачкообразного ($\tau_e \sim 1$ мин) подъема температуры суспензии мембран при рН 9,3 от 15°C до заданного значения температуры, t_n . Превращение Д575→Д460 явно носит бифазный характер: при $25^\circ\text{C} < t_n < 40^\circ\text{C}$ быстрая фаза заканчивается одновременно с установлением теплового равновесия в ячейке, а медленная ускоряется с ростом температуры. С увеличением t_n это ускорение приводит к тому, что обе фазы ускользают от наблюдения. Если аналогичный опыт провести с мембранами, которые были предварительно нагреты при рН 9—10 до $t > t_n$, а затем быстро охлаждены, то медленная фаза отсутствует при любых значениях t_n . Это позволяет думать, что медленная фаза отражает *T*-переход. Если при рН > 9 нагреть мембраны выше t_n , а затем быстро охладить их до $t_n \geq t_n$, то поглощение при 575 нм растет со скоростью, не меньшей скорости установления теплового равновесия. Однако при $t_n < t_n$ обнаруживается медленная фаза, скорость которой тем меньше, чем ниже t_n . Таким образом, при быстром охлаждении действительно может произойти замораживание *T*-перехода. По-видимому, полная обратимость *T*-перехода при рН 6,5—7,5 связана с тем, что в этих условиях он совершается при высо-

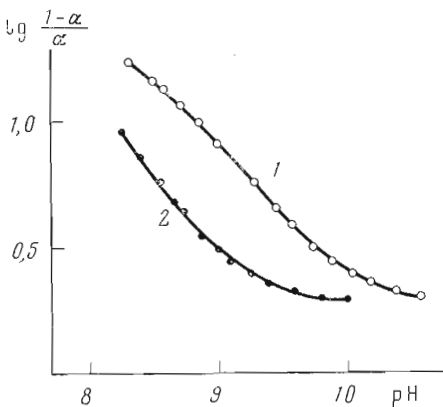


Рис. 8. рН-Зависимость перехода Д575→Д460 в «темновых» мембранах при 40°C (1) и 50°C (2) (состав раствора см. в подписи к рис. 1)

жих температурах, когда скорости как прямого, так и обратного превращения достаточно велики. Если мембраны, нагретые при рН 9,5–10, охладить, а затем нейтрализовать, то при повторном нагреве примерно через сутки вновь получаются кривые, обладающие точкой перегиба. Отсюда следует, что замораживание T -перехода не связано с необратимым повреждением мембран. Приведенные выше данные показывают, что T - и H -переходы очень сходны по своим свойствам, и весьма возможно, что в действительности и подщелачивание, и нагрев мембран промотируют в них одно и то же превращение.

Используя эффект замораживания, можно исследовать рН-зависимость равновесия $D575 \rightleftharpoons D460$ в мембранах, претерпевших T -переход. С этой целью суспензию мембран нагревали до $t > t_n$ при рН 9,5–10, а затем охлаждали до заданной температуры, после чего аликвоты быстро оттитровывали до определенных значений рН. Совокупность полученных таким образом значений α представлена на рис. 7 в виде кривых титрования, характеризующихся присутствием протяженных плато. Существование этих плато естественно объяснить тем, что в данном интервале рН только определенная доля бактериородопсина (обозначим ее β) способна превращаться в форму $D460$, между тем как при построении кривых титрования степень превращения вычислялась по отношению ко всему его количеству. Характер вносимых при этом искажений хорошо прослеживается на соответствующих теоретических кривых титрования, приведенных на рис. 7в. По-видимому, T -переход сдвигает область превращения $D575 \rightarrow D460$ в сторону меньших значений рН, тем самым «обнажая» плато, почти скрытое за порогом денатурации на кривых 1 и 2 рис. 4. Выход на плато прослеживается и на кривых, непосредственно полученных титрованием мембран при повышенной температуре, поскольку в этих условиях T -переход происходит при значениях рН, меньших, нежели при 15–20°С (см. рис. 8).

Итак, титрование «темновых» мембран, претерпевших T -переход, показывает, что бактериородопсин в них гетерогенен по своим свойствам. Можно оценить, какая его доля при 20 и 40°С участвует в переходе $D575 \rightarrow D460$. Из рис. 7 видно, что величина β , отвечающая плато на кривых титрования, составляет 0,31–0,36; если же учесть систематические ошибки измерений (см. «Экспериментальную часть»), то она возрастает до 0,35–0,42. Отсюда следует, что в переходе $D575 \rightarrow D460$ участвует несколько менее половины бактериородопсина; напомним, что это во всяком случае те его молекулы, которые содержат остаток *полностью-транс*-ретинала. С ростом температуры высота плато на кривых несколько уменьшается, однако предельная степень превращения β никогда не превышает 0,5.

Интересно сопоставить эту предельную степень превращения с величиной порога денатурации. Как температура, так и рН, отвечающие началу денатурации, варьировали в зависимости от условий в довольно широких пределах, тогда как пороговая степень превращения оказалась весьма стабильной (см. рис. 4, 5, 7 и 8; на этих рисунках точки на кривых, отвечающие наибольшей степени превращения, непосредственно предшествуют порогу денатурации). Это наводит на мысль, что сущность порога денатурации заключается в превышении некоторой определенной степени превращения.

В мембранах, претерпевших T -переход, эта критическая степень превращения при подщелачивании практически совпадает с той, которой отвечают плато на кривых титрования. Поэтому можно предположить, что молекулы бактериородопсина, которые при меньших значениях рН не участвуют в равновесии с формой $D460$, с ростом рН все же подвергаются превращению, после которого становятся неустойчивыми и денатурируют, причем упаковка мембраны вследствие этого нарушается так, что в денатурацию вовлекаются все молекулы бактериородопсина. С этой точки зрения порог денатурации отвечает началу превращения молекул белка определенного типа.

Учитывая все сказанное выше, можно ожидать, что к этому типу относятся молекулы, содержащие остаток 13-*цис*-ретиная. Такое предположение, однако, трудно согласовать с рядом данных. Во-первых, критическая степень превращения определенно меньше содержания *транс*-формы бактериородопсина в мембране. Во-вторых, при нагревании нейтральных или слабощелочных суспензий есть все основания ожидать быстрого установления равновесия *цис-транс*-изомеризации, однако порог денатурации в этих условиях существенно не изменяется. В-третьих, у «световых» мембран при титровании критическая степень превращения лишь незначительно больше, чем у «темновых» (см. рис. 4). Таким образом, пока нет оснований непосредственно связывать начало денатурации с превращениями *цис*-формы бактериородопсина, если только не предположить, что в препаратах мембран присутствуют молекулы белка, которые одновременно предпочитают содержать остаток 13-*цис*-ретиная, превращаются в «щелочную» форму в более жестких условиях и, находясь в последней, склонны к денатурации.

Сейчас кажется наиболее вероятным, что критическая степень превращения есть не что иное, как порог устойчивости кристаллической решетки мембраны при накоплении в ней «аномальных» структурных единиц. В пользу этого, в частности, свидетельствует возможность нарушения соответствия между критической и предельной степенями превращения. Так, при ударном подщелачивании суспензии «световых» мембран до высоких значений рН при пониженной температуре, когда денатурация заторможена, удается зарегистрировать превращение бактериородопсина в форму Д460 в степени, существенно большей критической (см. «Экспериментальную часть»).

Какова природа дестабилизации мембраны? Объединение бактериородопсина в тримеры и упорядоченная упаковка последних в принципе могут придать переходу Д575→Д460 кооперативный характер. Если, например, в пределах тримера этот переход проявляет высокую положительную кооперативность, в мембране будут предпочтительно присутствовать тримеры, содержащие либо форму Д460, либо исходный бактериородопсин (ср. [21, 22]). Такая возможность доступна проверке, так как тримеры последнего типа имеют специфические биполярные полосы в видимой области КД-спектра [15]. При положительной кооперативности можно было бы ожидать, что при $\alpha \approx 0,5$ амплитуда этих характерных полос уменьшится примерно вдвое, между тем как в действительности они почти исчезают (см. рис. 9а). Отсюда следует, что форма Д460 распределяется между тримерами относительно равномерно. Нельзя исключить, что на самом деле переходу Д575→Д460 свойственна отрицательная кооперативность, поскольку наклон кривых титрования заметно меньше единицы (см. рис. 7), но окончательное суждение об этом требует выяснения стехиометрии равновесия. Таким образом, к началу денатурации каждый из тримеров бактериородопсина в мембране содержит по крайней мере одну молекулу белка в форме Д460, и похоже, что денатурация — результат появления в решетке определенной доли тримеров, содержащих две или три превращенные молекулы. Если эта точка зрения верна, то близость предельной степени превращения (после *T*-перехода) к порогу денатурации можно истолковать как следствие либо отрицательной кооперативности при титровании, либо неэквивалентности молекул белка в тримерах. Существенно, что такая неэквивалентность во всяком случае не сказывается на взаимном расположении ретиналевых хромофоров, так как КД-спектры исходных мембран и мембран, претерпевших *T*-переход, идентичны при рН 6—7.

Интересно сопоставить результаты титрования пурпурных мембран, суспендированных в 50% водном глицерине и в воде. В последнем случае при 20°С степень превращения в форму Д460 остается меньшей 0,05 вплоть до рН 11,5, а при дальнейшем увеличении рН резко возрастает,

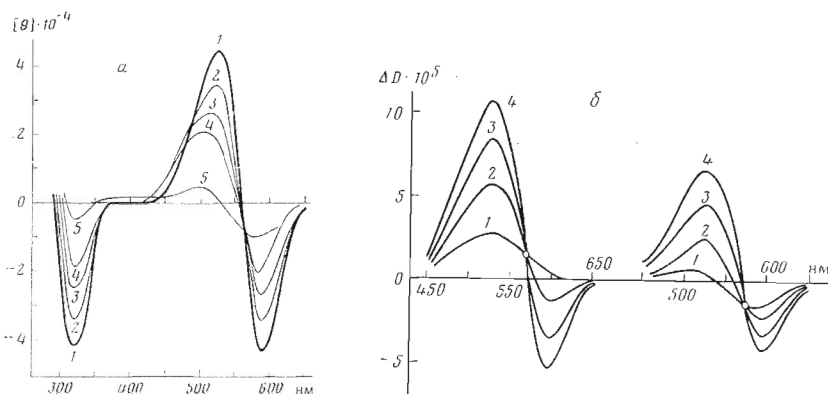


Рис. 9. КД-спектры мембранных суспензий: *a* — спектры «темновых» мембран при рН 7,0 (1), 9,5 (2), 10,5 (3), 11,3 (4) и 11,9 (5) (состав раствора см. в подписи к рис. 1; кривые 2–5 сняты после завершения *n*-перехода), *б* — изменения спектра при рекомбинации с апомембранами полностью-*транс*- (слева) и 13-*цис*-ретиналя (справа) (0,02 М MES, $3 \cdot 10^{-5}$ М бактериоопсин в апомембранах, $3,6 \cdot 10^{-5}$ М C_{13} -кетон; 20° С, рН 6,0; добавлен ретиналь до концентрации $3 \cdot 10^{-5}$ М). Кривые сняты непосредственно после введения ретиналя (1), через 10 мин (2), 30 мин (3) и 1 ч (4)

достигая при рН 12,2–12,3 порога денатурации, практически такого же, как в 50% глицерине. Та небольшая доля бактериородопсина, которая вступает в превращение при $8,5 < \text{pH} < 11,5$, по-видимому, связана с какими-то дефектами структуры мембран. Если, например, перед титрованием суспензию мембран подвергнуть обработке ультразвуком при 0° С, то с увеличением продолжительности такой обработки степень превращения в форму Д460 при $\text{pH} < 11,5$ постепенно возрастает, однако форма и положение крутого участка кривой титрования при $\text{pH} > 11,5$ заметно не меняется. Этот крутой участок расположен примерно в той же области рН, что и S-образные участки кривых на рис. 4, и можно думать, что он также обусловлен протеканием в мембранах *T*-перехода.

Итак, хотя равновесие $D575 \rightleftharpoons D460$ отражает диссоциацию определенных групп в пурпурной мембране, это не обязательно означает, что образование формы Д460 при щелочном титровании является первичным процессом. В чистом виде такая ситуация, вероятно, характерна лишь для мембран, претерпевших *T*- или *H*-переход. Обычно же, особенно в водной среде, первичными процессами, по-видимому, являются именно эти переходы, которые сами по себе на спектрах не сказываются, но сенсбилизируют равновесие $D575 \rightleftharpoons D460$ к изменениям рН. Подобная сенсбилизация может наступить либо в результате возникновения связи между депротонированием неких групп и спектром хромофора, либо при уменьшении pK_a этих групп, если такая связь существует независимо от *T*- или *H*-перехода. Весьма возможно, что эта сенсбилизация сопряжена с тем, что молекулы бактериородопсина в мембране перестают быть эквивалентными. Природа групп, депротонирование которых обуславливает образование формы Д460, пока неизвестна, хотя, если судить по величине их pK (см. рис. 7), эти группы могут быть ϵ -аминогруппами лизиновых остатков.

На КД-спектрах «темновых» мембран (см. рис. 9*a*) видно, что при достаточно больших степенях превращения в форму Д460 наблюдается остаточный отрицательный дихроизм в области поглощения оставшегося бактериородопсина. В этих условиях, во-первых, отсутствует экситонное взаимодействие ретинальных хромофоров в тримерах, которое порождает расщепление КД-полос, и, во-вторых, в оставшемся бактериородопсине должна преобладать *цис*-форма. Поэтому можно было предположить, что отдельным молекулам *цис*-формы бактериородопсина в отличие от *транс*-

Характеристика кривых зависимости степени превращения Д575→Д460 в «световых» мембранах от концентрации растворителя (20° С, рН 6,5)

Растворитель	Точка излома		Прямолинейный участок $\alpha = A\epsilon + B$ ($r^2 > 0,9$)	
	с, М	α	$A \pm 10\%$	$B \pm 15\%$
Диоксан	2,7	0,66	0,17	0,12
Диэтиловый эфир	0,40	0,41	0,53	0,19
Ди- <i>n</i> -пропиловый эфир	0,035	0,45	5,6	0,26
Ди- <i>n</i> -бутиловый эфир	0,002	0,53	60	0,43
<i>n</i> -Пропиловый спирт	1,85	0,55	0,41	-0,21
<i>n</i> -Бутиловый спирт	0,49	0,42	1,70	-0,41
<i>n</i> -Амилловый спирт	0,11	0,37	4,5	-0,15
<i>трет</i> -Бутиловый спирт	1,0	0,37	0,33	0,04
Метилэтилкетон	1,0	0,51	0,50	0,01
Метил- <i>n</i> -пропилкетон	0,31	0,49	1,37	0,06
Метилізобутилкетон	0,16	0,53	2,61	0,23
Метил- <i>n</i> -амилкетон	0,024	0,52	12	0,24

формы присущ не положительный, а отрицательный дихроизм. Это предположение удалось подтвердить следующими экспериментами.

Известно, что рекомбинация ретиналя с бактериоопсином в апомембранах протекает достаточно быстро и с высокой положительной кооперативностью [22]. Поэтому в ходе рекомбинации весьма малы как время жизни, так и стационарная концентрация «недостроенных» тримеров, содержащих одну или две молекулы бактериородопсина. Скорость и кооперативность рекомбинации можно уменьшить, проводя ее в присутствии C_{18} -кетона, который конкурирует с ретиналем при его связывании бактериоопсином [23]. На рис. 9б видно, что в этих условиях образование *транс*- и *цис*-формы бактериородопсина в конечном итоге приводит к появлению сходных биполярных полос в КД-спектре, однако в первом случае на эти полосы наложена положительная полоса, а во втором — отрицательная. Эти компоненты КД-спектра, вклад которых уменьшается к концу рекомбинации, естественно приписать «недостроенным» тримерам (ср. [24]), что косвенно подтверждает гипотезу об отрицательном дихроизме *цис*-формы. Прямое доказательство было получено при рекомбинации 13-*цис*-ретиналя с препаратами мономерного бактериоопсина, приготовленными из солибилизированного бактериородопсина или апомембран. В КД-спектре образующейся при этом *цис*-формы присутствует отрицательная полоса, совпадающая по положению с полосой поглощения ретиналевого хромофора ($\lambda_{\text{макс}}$ 543–545 нм). Если в аналогичных условиях образуется *транс*-форма, то она, как и исходный солибилизированный бактериородопсин, обладает положительным дихроизмом. Эти данные, полученные независимым методом, подтверждают сделанный выше вывод об избирательном превращении *транс*-формы бактериородопсина в форму Д460. Наряду с этим их можно рассматривать как указание на то, что *цис*- и *транс*-формы бактериородопсина различаются характером окружения и/или хиральностью конформеров ретиналевых остатков (ср. [25]).

Рассмотренные выше данные показывают, как изучение влияния рН и температуры на характер превращения Д575→Д460 позволяет выявить свойства бактериородопсина, обусловленные его включением в кристаллическую решетку мембраны. Другим примером эффективности такого подхода служат результаты, полученные при исследовании превращения Д575→Д460 в присутствии смешивающихся с водой органических растворителей.

В этих опытах наиболее характерной и общей особенностью является присутствие довольно резкого излома на кривых зависимости степени превращения от концентрации растворителя (см. рис. 10 и таблицу). Участок

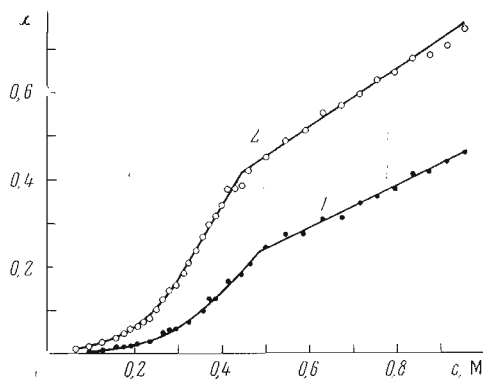


Рис. 10. Зависимость степени превращения бактериородопсина в форму Д460 от концентрации диэтилового эфира в суспензиях «темновых» (1) и «световых» (2) мембран (0,01 М MES, $1,2 \cdot 10^{-3}$ М бактериородопсин, 20° С, рН 6,2)

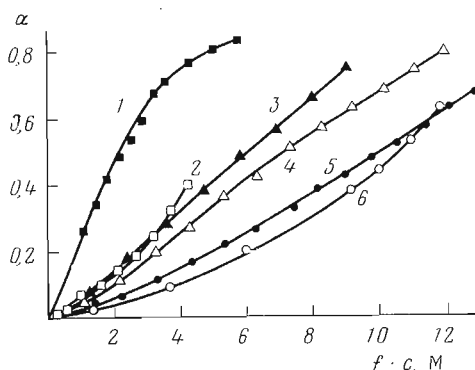


Рис. 11. Превращение «светового» солюбилизованного бактериородопсина в форму Д460 под действием органических растворителей (2% тритон X-100, 0,01 М MES, $1,2 \cdot 10^{-5}$ М бактериородопсин, 20° С, рН 6,5; f — масштабный множитель): 1 — метил-*n*-амилкетон ($f=100$), 2 — *n*-бутанол ($f=10$), 3 — тетрагидрофуран ($f=10$), 4 — метилэтилкетон ($f=10$), 5 — диоксан ($f=5$), 6 — *n*-амиловый спирт ($f=100$)

кривой левее излома всегда обладает положительной кривизной, а правее его неизменно наблюдается линейная зависимость. Концентрация растворителя, отвечающая излому, варьирует в широких пределах, сдвигаясь к меньшим значениям с ростом гидрофобности растворителя.

Присутствие такого рода излома однозначно указывает на резкое изменение свойств бактериородопсина, которое можно объяснить кооперативным внутримолекулярным превращением и/или своего рода фазовым переходом в кристаллической решетке мембраны. Нахождение белка в мембране, по-видимому, необходимо для появления излома, поскольку с солюбилизованным бактериородопсином кривые всегда получаются гладкими (см. рис. 11). Изменение свойств бактериородопсина в области излома полностью обратимо. В этом можно легко убедиться, используя летучий растворитель вроде диэтилового эфира, который нетрудно удалить, вакуумируя суспензию или продувая ее инертным газом.

С увеличением концентрации растворителя бактериородопсин в мембранах денатурирует; при этом критическая степень превращения в форму Д460 обычно существенно больше 0,5 и сильно зависит от природы растворителя. Поскольку со всеми исследованными в этих опытах раство-

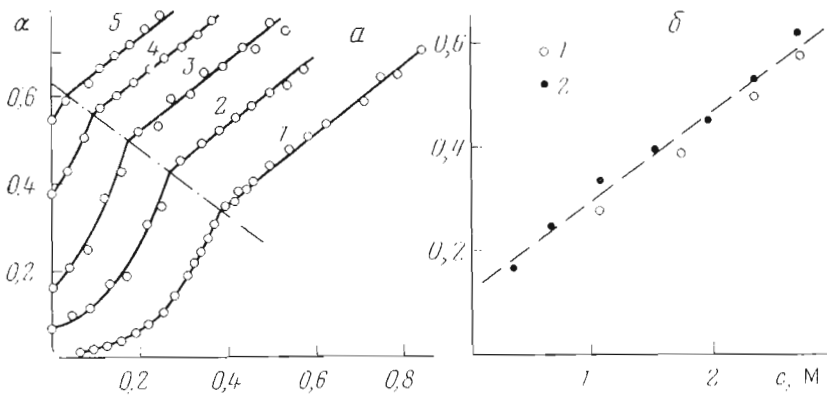


Рис. 12. Превращение бактериородопсина в форму Д460 под действием растворителей в суспензиях «световых» мембран, содержащих диоксан (условия см. в подписи к рис. 10). *a* — зависимость степени превращения от концентрации эфира при концентрации диоксана (М): 1 — 0,0; 2 — 1,07; 3 — 1,75; 4 — 2,35; 5 — 2,74; *б* — зависимость от концентрации диоксана значений α , полученных экстраполяцией прямолинейных участков кривых к нулевой концентрации диэтилового эфира (1) и метил-*n*-пропилкетона (2). Штриховая линия отвечает уравнению $\alpha = 0,17c + 0,12$ (см. таблицу)

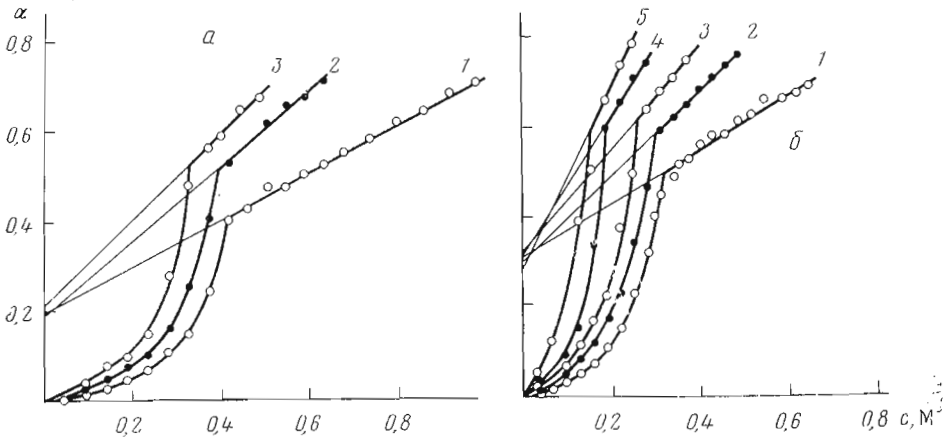


Рис. 13. Влияние NaCl на превращение бактериородопсина в «световых» мембранах в форму Д460 под действием диэтилового эфира (0,01 М фосфат-боратный буфер, $1 \cdot 10^{-5}$ М бактериородопсин, 20° С). Концентрация NaCl в М (в скобках приведено значение α , полученное экстраполяцией прямолинейного участка к нулевой концентрации эфира): *a*) 1 — 0 (0,19±0,01), 2 — 0,5 (0,18±0,03), 3 — 1,0 (0,21±0,07); *б*) 1 — 0 (0,30±0,01), 2 — 0,5 (0,29±0,01), 3 — 1,0 (0,32±0,03), 4 — (0,30±0,02), 5 — 4,0 (0,27±0,05). рН: *a* — 6,5; *б* — 8,0

рителями в денатурацию вступают уже трансформированные мембраны, ясно, что в точке излома мембраны утрачивают свойства, определяющие обсуждавшуюся выше инвариантность порога денатурации. Изменчивость порога денатурации сближает трансформированные мембраны с солюбилизованным бактериородопсином.

Сопоставляя свойства «темновых» и «световых» мембран, нетрудно видеть, что в последних степень превращения бактериородопсина в форму Д460 больше (см. рис. 10), причем до излома величина $\alpha_{\text{темн}}/\alpha_{\text{свет}}$ значительно отличается от доли *транс*-формы в «темновом» препарате, приближаясь к последней лишь на прямолинейных участках. Вероятным объяснением этому может быть различная чувствительность к растворителю *транс*-формы в решетках, содержащих только *транс*-форму или обе формы бактериородопсина. Это различие, определяемое межмолекулярными

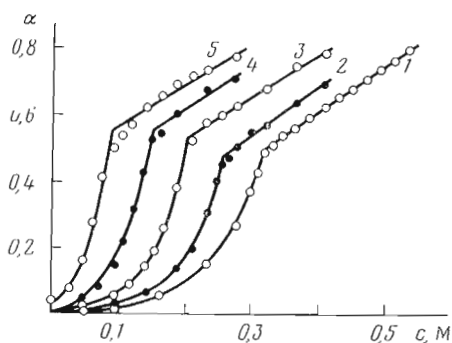


Рис. 14. Влияние pH на превращение бактериородопсина в «световых» мембранах в форму Д460 под действием метил-*n*-пропилкетона (состав раствора см. в подписи к рис. 13, в скобках приведены наклон и отсечение прямолинейных участков кривых, $r^2 > 0,9$): 1 — pH 6,5 ($1,37 \pm 0,02$; $0,06 \pm 0,01$), 2 — pH 7,0 ($1,43 \pm 0,06$; $0,11 \pm 0,02$), 3 — pH 8,0 ($1,29 \pm 0,05$; $0,27 \pm 0,01$), 4 — pH 9,0 ($1,32 \pm 0,26$; $0,36 \pm 0,06$), 5 — pH 11,0 ($1,25 \pm 0,12$; $0,44 \pm 0,02$)

взаимодействиями, по-видимому, также значительно ослабляется или вообще исчезает в точке излома.

Трансформация мембран в точке излома наступает в условиях, когда значительная часть бактериородопсина под действием растворителя превратилась в форму Д460. Поэтому нельзя непосредственно изучать свойства трансформированных мембран, содержащих только исходную форму бактериородопсина. Можно, однако, попытаться преодолеть указанную трудность, экстраполируя прямолинейные участки кривых к нулевой концентрации растворителя. Так, кривые на рис. 12а получены при добавлении диэтилового эфира к суспензиям мембран, содержащим диоксан в различных фиксированных концентрациях. Если значения α , отвечающие результатам экстраполяции, представить как функцию содержания диоксана, то полученные точки удовлетворительно ложатся на продолжение прямолинейного участка зависимости степени превращения от концентрации диоксана в отсутствие эфира (см. рис. 12б и таблицу).

На рис. 13 представлены данные о влиянии концентрации хлористого натрия при двух значениях pH на степень превращения бактериородопсина в форму Д460 с ростом концентрации диэтилового эфира. В пределах точности измерений экстраполяционные прямые пересекаются в точке, лежащей на оси ординат, причем эта точка смещается к большим значениям α с ростом pH. Этот результат позволяет заключить, что в отсутствие растворителя в трансформированных мембранах должен иметь место pH-зависимый переход Д575 → Д460, не чувствительный к ионной силе среды. Используя наборы кривых, полученных при различных pH, можно построить отвечающие этому переходу кривые титрования (см. рис. 14 и кривые 1 на рис. 15а, б). Форма этих кривых указывает на существование предельной степени превращения, причем расчет и последующая коррекция на систематические ошибки дают значения β , несколько превышающие 0,5. Наклон линеаризованных кривых титрования существенно меньше единицы, а кажущееся значение pK зависит от природы растворителя (см. кривые 2 на рис. 15а, б). Таким образом, мембраны, трансформированные растворителями, по характеру pH-зависимости перехода Д575 → Д460 напоминают мембраны, претерпевшие *T*-переход.

Данные о pH-зависимом переходе Д575 → Д460 в трансформированных мембранах интересно сопоставить с результатами изучения влияния pH на превращение в форму типа Д460, индуцируемое растворителями в солюбилизированном бактериородопсине. На рис. 16а видно, что это влияние проявляется в изменении наклона соответствующих концентрационных зависимостей, который с ростом pH от 5,5 до 8,5, подчиняясь уравнению диссоциации, увеличивается от одного предельного значения к другому (см. рис. 16б). Наклон кривой титрования примерно равен единице, что свидетельствует об отсутствии кооперативности, а величина pK близка к найденным у трансформированных мембран (см. рис. 16в). Однако, несмотря на близость значений pK титруемых групп, влияние pH на превра-

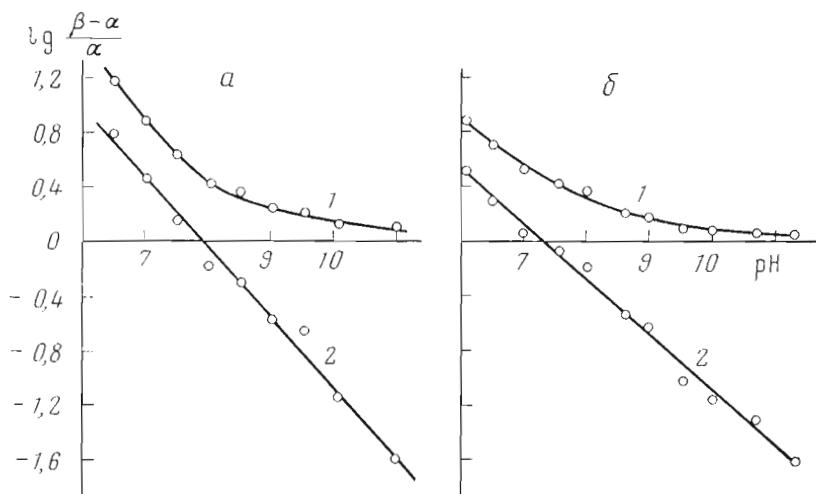


Рис. 15. Кривые титрования «световых» мембран, трансформированных диэтиловым эфиром (а) и метил-*n*-пропилкетонном (б) (состав раствора см. в подписи к рис. 13; подробности — в тексте, в скобках приведены наклон, кажущееся значение рК и r^2): а) 1 — β 1; 2 — β 0,50 ($-0,41 \pm 0,01$; $7,3 \pm 0,1$; 0,993); б) 1 — β 1; 2 — β 0,46 ($-0,51 \pm 0,02$; $7,9 \pm 0,15$; 0,989)

щение в форму Д460 при действии растворителей на трансформированные мембраны и солюбилизованный бактериородопсин имеет принципиально различный характер. В случае *солюбилизованного бактериородопсина* это превращение в отсутствие растворителя не удастся вызвать изменением рН, однако диссоциация определенных групп белка влияет на его чувствительность к растворителю. Сравнивая начальные участки кривых на рис. 14, легко видеть, что при $\text{pH} < 10$ точно так же дело обстоит с бактериородопсином в *нативных мембранах*. В то же время наклон прямолинейных участков кривых на рис. 14 не зависит от рН; это означает, что вклад растворителя в превращение у *трансформированных мембран* не чувствителен к изменениям рН и аддитивен с вкладом независимо совершающегося рН-зависимого перехода Д575→Д460. Природа этого различия пока неясна, но в основе его может лежать либо разница в природе возникающих коротковолновых форм, существующая, несмотря на их спектральное сходство (ср. [8]), либо несовпадение точек действия растворителей и/или рН на нативные мембраны и солюбилизованный бактериородопсин, с одной стороны, и трансформированные мембраны — с другой.

Данные, приведенные на рис. 13, показывают, что с ростом концентрации хлористого натрия чувствительность мембран к диэтиловому эфиру возрастает. Подобный эффект наблюдается и с другими растворителями, однако лишь при условии, что изменения концентрации соли не приводят к расслаиванию системы. Именно эта оговорка, по-видимому, объясняет кажущееся противоречие между найденной закономерностью и результатами Остерхельта и сотр. [7, 8, 26], обнаруживших, что превращение бактериородопсина в форму Д460 при насыщении водных суспензий мембран диэтиловым эфиром эффективно подавляется с ростом концентрации хлористого натрия. Скорее всего, в опытах этих авторов основной эффект NaCl заключался в уменьшении концентрации эфира в водном слое благодаря высаливанию. Интересно, что влияние солей зависит от природы катиона. Из рис. 17 видно, что и мембраны, и солюбилизованный бактериородопсин сенсбилизируются солями к растворителям, однако мембраны в естественной для них области высоких ионных сил заметно различают ионы натрия и калия. Эти данные не только указывают на вклад кулоновских взаимодействий в стабилизацию исходного состояния бактериородопсина, но и свидетельствуют о том, что характер этих взаимодей-

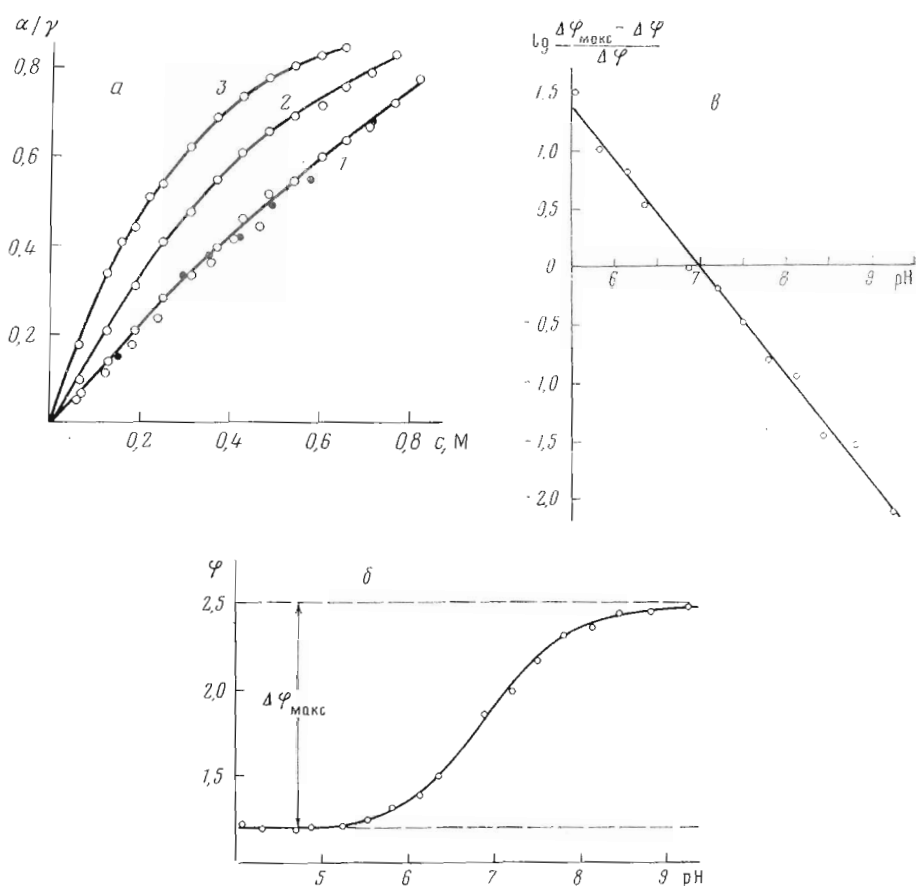


Рис. 16. Влияние pH на индуцированное диэтиловым эфиром превращение «светового» (○, $\gamma 1$) и «темпового» (●, $\gamma 0,55$) солюбилизованного бактериородопсина в форму типа Д460 (состав раствора см. в подписи к рис. 11). а — зависимость степени превращения от концентрации эфира (pH: 1 — 5,5; 2 — 6,5; 3 — 7,5); б — влияние pH на наклон (φ) начальных участков ($\alpha/\beta < 0,3$) концентрационной зависимости ($\Delta\varphi_{\text{макс}} = 1,24 \pm 0,04$); в — вычисленная кривая титрования (наклон $-0,92 \pm 0,03$, кажущееся значение pK $7,0 \pm 0,1$, $r^2 0,993$)

ствий различен в мембранных и солюбилизованных препаратах. С ростом концентрации хлористого натрия излом на кривых смещается в сторону меньших концентраций растворителя (см. рис. 13), по-видимому, благодаря увеличению коэффициента распределения растворителя в системе мембрана — водный раствор.

Есть некоторые основания полагать, что описанная выше трансформация отнюдь не единственное возможное изменение свойств пурпурных мембран под действием органических растворителей. Если, например, в качестве последних использовать длинноцепочечные спирты, то в этом случае точка пересечения продолжений прямолинейных участков кривых, полученных при разной концентрации хлористого натрия, будет расположена не на оси ординат, а справа от нее (см. рис. 18). Этот результат можно интерпретировать как следствие изменения свойств мембран в области малых концентраций растворителя. Экстраполяция при этом приводит к точке такого «предварительного» изменения.

Какова природа превращения мембран при их трансформации в точке излома? Некоторые сведения об этом были получены при изучении влияния растворителей на флуоресцентные характеристики мембранных хромофоров. На рис. 19 показано, что трансформация сопровождается резким

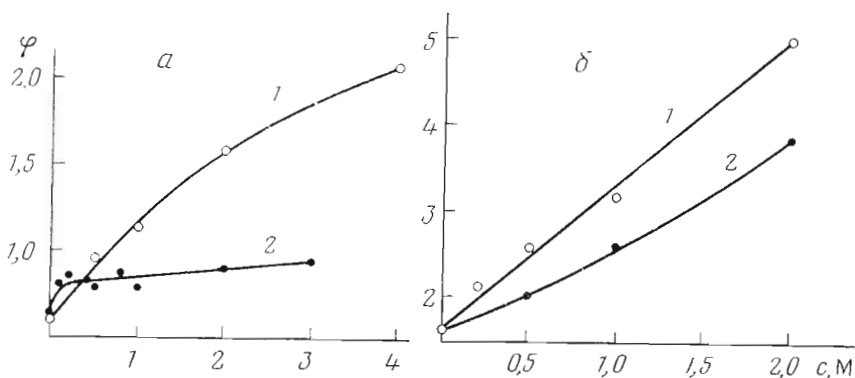


Рис. 17. Влияние NaCl (1) и KCl (2) на изменение наклона начальных участков кривых (а, ср. рис. 16) и изменение наклона прямолинейных участков кривых (б, ср. рис. 13) при индуцируемом диэтиловым эфиром превращении Д575→Д460 в «свством» соллобилизированном бактериородопсине (а) и в трансформированных мембранах (б) (составы растворов см. в подписях к рис. 11 и 13, рН 8,0)

уменьшением поляризации флуоресценции дансильной метки, ковалентно связанной с тирозиновыми остатками бактериородопсина. В то же время аналогичное изменение поляризации флуоресценции триптофановых остатков наблюдается лишь под действием длинноцепочечных спиртов или других растворителей на их фоне (см. кривую 2 на рис. 19а и 20). Отсюда следует, что наблюдаемое в точке излома уменьшение поляризации флуоресценции дансильных групп обусловлено не столько увеличением подвижности молекулы белка в целом, сколько локальным изменением конформации, которое увеличивает подвижность отдельных остатков. Таким образом, кооперативный переход при трансформации мембран не представляет собой «плавление» их кристаллической решетки.

Интересно сопоставить два описанных выше явления: трансформацию мембран при действии растворителей и существование стабильного порога щелочной денатурации мембран. И трансформация, и денатурация происходят при степенях превращения в форму Д460, заметно больших $1/3$, они инициируются очень небольшим увеличением степени превращения и захватывают все молекулы бактериородопсина в мембране. Поэтому можно думать, что оба эти процесса являются следствием накопления в решетке мембраны определенной доли «аномальных» тримеров (при трансформации эта критическая доля может зависеть от природы растворителя, молекулы которого внедряются в мембрану). Уменьшение наклона кривых в точке излома на рис. 10—14 показывает, что при трансформации мембран устойчивость бактериородопсина к растворителям возрастает. В то же время сам факт денатурации свидетельствует о том, что с мембраной произошло нечто, приведшее к дестабилизации молекул бактериородопсина. Однако это внешнее различие, возможно, отражает лишь особенности экспериментальных условий, и нельзя исключить, что дальнейшие исследования выявят сходство в природе событий, лежащих в основе этих процессов.

Совокупность приведенных выше данных подтверждает эффективность использования параметров перехода Д575→Д460 как чувствительных индикаторов состояния бактериородопсина. С помощью этого подхода удалось не только показать различие в свойствах *цис*- и *транс*-формы бактериородопсина при «темновых» превращениях, продемонстрированное и другими методами, но также выявить такие ранее неизвестные явления, как зависящие от рН, температуры и присутствия органических растворителей превращения бактериородопсина, которые приводят к неэквивалентности молекул белка в пурпурных мембранах, его специфическим конформационным изменениям и т. п. Знание этих особенностей поведения бактериородопсина позволяет более осмысленно подходить к выбору условий его химической и ферментативной модификации. Следует также подчерк-

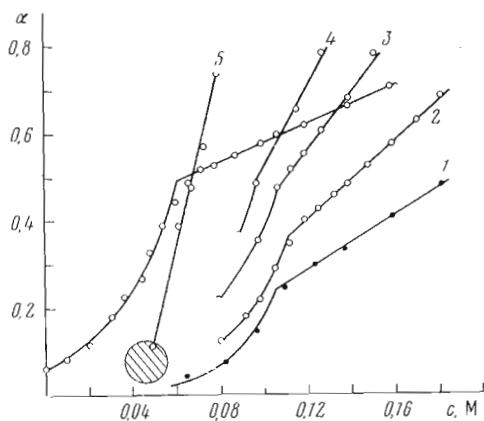


Рис. 18. Превращение бактериородопсина в форму Д460 в «световых» (○) и «темновых» (●) мембранах под действием *n*-амилового спирта (состав раствора см. в подписи к рис. 10; pH 6,5): 1, 2 — без добавок NaCl, 3 — 0,5 М NaCl, 4 — 1 М NaCl, 5 — 2 М NaCl, 6 — без добавок NaCl, 1,5 М диоксан. Заштрихованный кружок отвечает области пересечения продолжений прямолинейных участков кривых 1–5 с учетом ошибок измерений

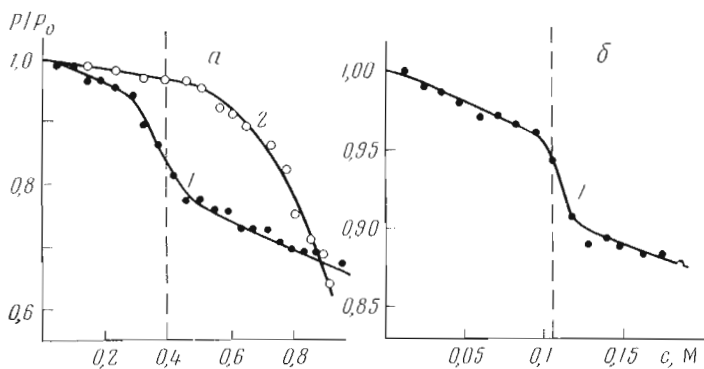


Рис. 19. Изменения поляризации (p) флуоресценции дансильной метки (1, $\lambda_{\text{возб}}$ 330 нм, $\lambda_{\text{фл}}$ 490 нм, $p_0=0,11\pm 0,01$) и триптофановых остатков (2, $\lambda_{\text{возб}}$ 280 нм, $\lambda_{\text{фл}}$ 328 нм, $p_0=0,18\pm 0,05$) в бактериородопсине при его превращении в форму Д460 в «темновых» мембранах под действием диэтилового эфира (а) и метилизобутилкетона (б) (0,01 М MES, $1\cdot 10^{-5}$ М бактериородопсина, 20° С, pH 6,5). Штриховые линии отвечают положению точки излома

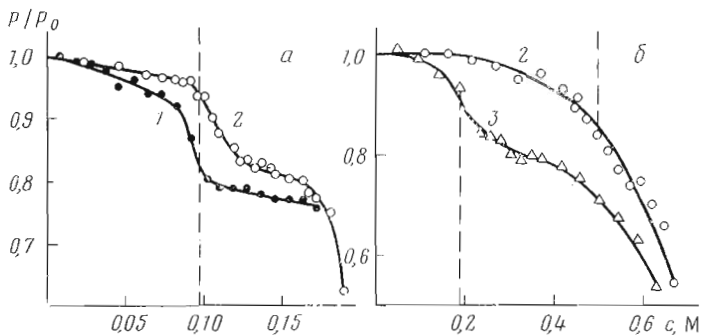


Рис. 20. Изменения поляризации флуоресценции дансильной метки (1) и триптофановых остатков (2, 3) в присутствии длинноцепочечных спиртов (условия см. в подписи к рис. 19): а — *n*-амиловый спирт, б — *n*-бутанол; кривая 3 отвечает введению добавок диэтилового эфира на фоне 0,3 М бутанола. Штриховые линии отвечают положению точки излома

нуть, что природа перехода Д575→Д460 пока неизвестна, и, как отмечалось выше, нельзя исключить, что спектральное сходство скрывает различия в природе коротковолновых форм, возникающих при воздействии на бактериородопсин разных внешних факторов. Однако основные выводы, полученные в данной работе, по-видимому, не зависят от реальности таких различий. Более того, можно надеяться, что проведенное сопоставление влияния рН, температуры, растворителей и солей на параметры данного спектрального перехода в мембранных и солиобилизованных препаратах откроет новые возможности для изучения обуславливающих его молекулярных превращений.

Экспериментальная часть

Пурпурные мембраны из клеток *Halobacterium halobium* R1 выделяли по методике, описанной в работе [1]. После центрифугирования в сахарозном градиенте фракцию, содержащую пурпурные мембраны, 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).

Для экспрессного спектрофотометрического определения содержания бактериородопсина в препаратах на начальных этапах выделения использовали следующую процедуру. К 1,5 мл суспензии мембран с поглощением при 560 нм 1–1,5 ед./см при минимальном или неактивном ($\lambda > 650$ нм) освещении прибавляли 3–5 мкл 10% этанольного раствора I_2 . После 30 с перемешивания избыток I_2 уничтожали, прибавляя небольшое количество насыщенного раствора $Na_2S_2O_3$. Такая обработка приводит к полному обесцвечиванию каротиноидов и почти не затрагивает хромофор бактериородопсина. С ее помощью также удается контролировать присутствие каротиноидов в очищенных препаратах пурпурных мембран, снимая дифференциальные спектры обработанных и необработанных суспензий (см. рис. 21).

В ряде опытов использовали лиофильно высушенные препараты мембран, хранившиеся при 0° С. Чтобы получить стабильную водную суспензию из лиофилизованного препарата, последний в течение 1 ч диспергировали с помощью гомогенизатора Даунса в 50% водном глицерине (0,5% вес/объем), а затем подвергали гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-50 (крупный), используя воду в качестве элюента. У приготовленной таким образом суспензии отношение поглощения при 280 и 560 нм составляет $1,9 \pm 0,1$, т. е. практически то же, что у исходного препарата. В отдельных опытах было показано, что лиофилизация не сказывается на исследованных свойствах мембран.

Для темновой адаптации суспензию пурпурных мембран выдерживали не менее 12 ч при рН 6,5–7 (20° С). Адаптация к свету достигалась освещением в течение 5 мин галогенной лампой КГМ-30-300 (300 Вт), снабженной фокусирующей системой, тепловым фильтром (5 см 5% $CuSO_4$) и стеклянным фильтром ЖС-17 (5 мм). «Темновые» и «световые» препараты бактериородопсина, солиобилизованного в растворе 2% тритона X-100 (Fergak, Западный Берлин), получили согласно методике, описанной в работе [19].

Растворители перед использованием очищали перегонкой. Глицерин марки х.ч. подвергали перегонке в вакууме в токе азота. Для приготовления растворов использовали MES (Serva, ФРГ), соли марки х.ч. или ос. ч. и дважды дистиллированную воду. Состав растворов указан в подписях к рисункам. Хроматографически однородные препараты C_{18} -кетона, полностью-транс- и 13-цис-ретиная, любезно предоставленные Б. И. Мицнером (МИТХТ им. М. В. Ломоносова), использовали в виде 1 мМ растворов в диоксане.

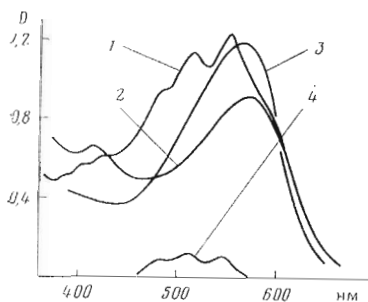


Рис. 21

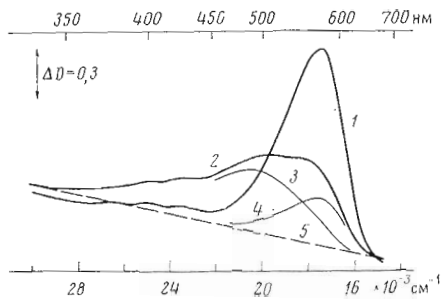


Рис. 22

Рис. 21. Использование I_2 для определения содержания бактериородопсина и каротиноидов в мембранных препаратах: 1, 2 — спектры неочищенных пурпурных мембран до и после обработки I_2 ; 3 — спектр пурпурных мембран до центрифугирования в сахарозном градиенте; 4 — разность между кривой 3 и спектром того же препарата мембран после его обработки I_2

Рис. 22. Оценка вклада формы Д460 в полосу поглощения мембранных препаратов (подробности см. в тексте; состав раствора см. в подписи к рис. 1): 1 — спектр «световых» мембран при pH 6,5; 2 — спектр, снятый непосредственно после подщелачивания до pH 12,0 при 2°С; 3, 4 — вычисленные полосы поглощения формы Д460 и исходного бактериородопсина, в сумме составляющие полосу на кривой 2; 5 — принятая при расчете линия нулевого поглощения

В работе использовали спектрофотометры 2400-2/2527/2512 (Gilford, Франция) и Spesord UV VIS (Carl Zeiss, ГДР), дихрограф Mark-3 (Jobin Ivon, Франция) и спектрофлуориметр SPF-1000 Cs (Aminco, США). Измерения pH и титрование производили с помощью pH-метра 112 (Corning, США) и автотитратора ТТТ-2/АВУ-13/ТТА-31 (Radiometer, Дания), снабженных стеклянным электродом G 2222В (Radiometer, Дания).

Для получения препаратов, содержащих дансильную метку, пурпурные мембраны обрабатывали раствором *n*-нитрофенилдиазония при pH 9, что приводило к модификации ~1 остатка тирозина на 1 моль бактериородопсина. Азогруппу в белке далее расщепляли действием $Na_2S_2O_4$, а образовавшиеся остатки аминотирозина ацилировали дансилхлоридом при pH 5,5—6. Подробнее об условиях введения дансильной метки, ее локализации в белке и других свойствах будет сообщено отдельно.

В опытах по рекомбинации ретиналя с бактериоопсином использовали апомембраны, приготовленные согласно работе [24], и препараты солюбилизованного бактериоопсина, полученные по методике, описанной в работе [22], или способом, разработанным нами. Во втором случае солюбилизованный бактериородопсин ($4 \cdot 10^{-5}$ — $5 \cdot 10^{-5}$ М) в течение суток инкубировали в темноте при pH 8,0 (0,02 М фосфат-боратный буфер) с формальдегидом (10^3 моль/моль белка). После отделения солей и избытка формальдегида гель-фильтрацией на сефадексе G-50 препарат подвергали гидроксиламинолизу (0,1 М NH_2OH , pH 8,0) при освещении описанной выше лампой через фильтры ЖС-11 (5 мм) и ЖС-18 (5 мм). Избыток гидроксилamina связывали, прибавляя ацетон до 0,2 М. Полученные таким образом препараты солюбилизованного бактериоопсина благодаря внутримолекулярным сшивкам обладают высокой устойчивостью к денатурации (ср. [18, 22]), сохраняя в полной мере способность к рекомбинации с ретиналем. Как исходный «сшитый» бактериородопсин, так и бактериородопсин, полученный рекомбинацией «сшитого» бактериоопсина с ретиналем, вступают в фотохимический цикл с квантовым выходом, близким к выходу, свойственному солюбилизованному бактериородопсину.

Концентрацию бактериородопсина в суспензиях пурпурных мембран определяли спектрофотометрически, исходя из значения ϵ 63000 моль $^{-1}$ см $^{-1}$ [17]. Для оценки систематической ошибки при вычислении степени превращения в форму Д460 был проведен специальный эксперимент. Суспен-

зию «световых» мембран в 50% водном глицерине, охлажденную до 2°С для торможения денатурации, быстро подщелачивали до pH>12 и сразу после этого снимали спектр. Двугорбую полосу на этом спектре (см. кривую 2 на рис. 22) разделяли на две компоненты, исходя из предположения, что та из них, которая отвечает исходному бактериородопсину (кривая 4), по своей форме и положению совпадает с исходной полосой поглощения (кривая 1). При этом также принимали, что с учетом светорассеяния суспензии линия нулевого поглощения может быть представлена прямой 5. Вычисленная таким образом полоса поглощения формы Д460 имеет максимум при 490—495 нм (см. кривую 3; ср. [10]). Расчет показывает, что кажущееся уменьшение величины α , обусловленное вкладом формы Д460 в поглощение при 575 нм, не превышает 10—12%. Другая систематическая ошибка, которая также приводит к уменьшению α , вызвана ростом светорассеяния суспензии с увеличением pH и составляет 2—5%. Таким образом истинное значение α примерно на 15% больше вычисленного.

ЛИТЕРАТУРА

- Oesterhelt D., Stoerkenius W. (1971) *Nature New Biol.*, **233**, 149—152.
- Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Lobanov N. A. (1979) *FEBS Lett.*, **100**, 219—224.
- Stoerkenius W., Lozier R. H., Bogomolni R. A. (1979) *Biochim. et biophys. acta*, **505**, 245—278.
- Henderson R., Unwin P. T. (1975) *Nature*, **257**, 28—33.
- Dencher N. A., Heyn M. P. (1979) *FEBS Lett.*, **108**, 307—310.
- Шкроб А. М., Родионов А. В. (1978) *Биоорган. химия*, **4**, 361—368.
- Oesterhelt D., Meentzen M., Schulmann L. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **40**, 453—463.
- Schreckenbach T., Walkhoff B., Oesterhelt D. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **76**, 499—511.
- Jackson M. B., Sturtevant J. M. (1978) *Biochemistry*, **17**, 911—915.
- Лазарев Ю. А., Шныров В. Л. (1979) *Биоорган. химия*, **5**, 105—112.
- Fischer U., Oesterhelt D. (1979) *Biophys. J.*, **28**, 211—230.
- Pettei M. J., Yudd A. P., Nakanishi K., Henselman R., Stoerkenius W. (1977) *Biochemistry*, **16**, 1955—1962.
- Sperling W., Carl P., Rafferty Ch. N., Dencher N. A. (1977) *Biophys. Struct. and Mech.*, **3**, 79—94.
- Ohno K., Takeuchi Y., Yoshida M. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, **462**, 575—582.
- Heyn M. P., Bauer P.-J., Dencher N. A. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **67**, 897—903.
- Reynolds J. A., Stoerkenius W. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 2803—2804.
- Dencher N. A., Heyn M. P. (1978) *FEBS Lett.*, **96**, 322—326.
- Овчинников Ю. А., Шкроб А. М., Родионов А. В. (1978) *Биоорган. химия*, **4**, 355—359.
- Шкроб А. М., Родионов А. В. (1978) *Биоорган. химия*, **4**, 500—513.
- Родионов А. В., Шкроб А. М. (1979) *Биоорган. химия*, **5**, 376—394.
- Becher V., Cassim J. Y. (1977) *Biophys. J.*, **19**, 285—297.
- Rehorek M., Heyn M. P. (1979) *Biochemistry*, **18**, 4977—4983.
- Ovchinnikov Yu. A., Shkrob A. M., Rodionov A. V., Mitzner B. I. (1979) *FEBS Lett.*, **97**, 15—19.
- Tokunaga F., Ebrey Th. G. (1978) *Biochemistry*, **17**, 1915—1922.
- Honig B., Kahn P., Ebrey Th. G. (1973) *Biochemistry*, **12**, 1637—1643.
- Oesterhelt D., Hess B. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **37**, 316—326.

Поступила в редакцию
7.III.1980

THE SPECTRAL TRANSITION AS INDICATOR OF BACTERIORHODOPSIN STATE IN THE PURPLE MEMBRANES

OVCHINNIKOV Yu. A., SHKROB A. M., RODIONOV A. V.

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

The equilibrium parameters of the transition into the form absorbing at 500 nm are sensitive to alterations of bacteriorhodopsin state in the purple membranes from *Halobacterium halobium*. Only bacteriorhodopsin molecules containing *all-trans* retinal

residue take part in the transition induced by heating, increase in pH, or by water-miscible organic solvents. The heating and/or alkalinization of membrane suspensions in 50% aqueous glycerol leads to a partially reversible membrane transformation which is manifested in both a decrease in pK of pH-dependent transition into the form absorbing at 500 nm and in non-equivalence of bacteriorhodopsin molecules in membrane. Another, solvent-promoted reversible transformation of the purple membrane is coupled with drastic but local labilization of bacteriorhodopsin molecule. Some properties of bacteriorhodopsin determined by its involving into the crystal lattice were revealed in the comparative experiments with the membrane and solubilized samples. Bacteriorhodopsin monomers containing 13-*cis* instead of *all-trans*-retinal are shown to have negative rather than positive dichroism, which is indicative of appreciable differences in protein environment of isomeric retinal residues.
