



УДК 577.322.2 : 541.124

КООПЕРАТИВНОСТЬ ПЕРЕХОДА СОЛЮБИЛИЗИРОВАННОГО
БАКТЕРИОРОДОПСИНА В КИСЛОТНУЮ ПУРПУРНУЮ ФОРМУ
ПОД ДЕЙСТВИЕМ АНИОНОВ Cl^- *Драчев А. Л., Драчев Л. А., Каулен А. Д.,
Хитрина Л. В.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского*

Исследован спектральный переход солибилизованного в лаурилсахарозе бактериородопсина из синей кислотной формы в кислотную пурпурную. Его рСl-зависимость в координатах Хилла линейна и имеет наклон между 2 и 3. Кооперативность этого перехода в пурпурных мембранах связана с поглощением трех анионов Cl^- каждой молекулой бактериородопсина.

При нейтральных значениях рН после адаптации к свету водная суспензия пурпурных мембран имеет максимум поглощения 568 нм, который после выдерживания препаратов в темноте смещается к 558 нм («нейтральные» пурпурные формы) [1, 2]. В детергентах и после изготовления протеолипосом эти пурпурные формы могут быть более коротковолновыми [3—7]. Например, для мономеров бактериородопсина в тритоне максимумы поглощения нейтральных пурпурных форм равны соответственно 553 и 549 нм [7]. Добавление кислот к водной суспензии мембран ведет к последовательным переходам бактериородопсина в формы с максимумами 605 нм (БР605, синяя кислотная форма [1, 8]) и 565 нм (БР565, кислотная пурпурная форма [8—12]). Переход «нейтральной» пурпурной формы в БР605 рН-зависим, переход БР605 → БР565 определяется поглощением анионов, которые по своему влиянию на переход форм располагаются в ряд: $\text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^-$ [2, 8—13].

В предшествующей работе [8] нами было показано, что в суспензии пурпурных мембран переход БР605 → БР565 не определяется поглощением протона (в смешанных растворах $\text{HCl} + \text{KCl}$ большая часть перехода может быть проведена повышением концентрации только KCl , когда изменения рН не превышают 0,1) и происходит под действием анионов (для Cl^- с кооперативностью 3 по данным анализа в координатах Хилла). Остался нерешенным вопрос: с чем связана кооперативность — со свойствами отдельной молекулы бактериородопсина или их взаимодействием в триаде?

Лаурилсахароза является единственным известным в настоящее время детергентом, позволяющим исследовать превращения синей и пурпурной кислотных форм в мономерном состоянии [8, 14].

По литературным данным [14], в 2% лаурилсахарозе бактериородопсин переходит в мономерное состояние. В наших экспериментах в 1 М HCl в 2% лаурилсахарозе после интенсивного взбалтывания присутствовал только положительный максимум в хромофорной области спектра кругового дихроизма (последний является стандартным тестом на переход бактериородопсина из триад в мономерное состояние [6]). Однако в течение десятков минут наблюдалась некоторая агрегация образцов. В 5% лаурилсахарозе как в 0,01 М HCl (синяя кислотная форма), так и в 1 М HCl (кислотная пурпурная форма) всегда наблюдался спектр кругового дихроизма с одним положительным максимумом в хромофорной области (рис. 1).

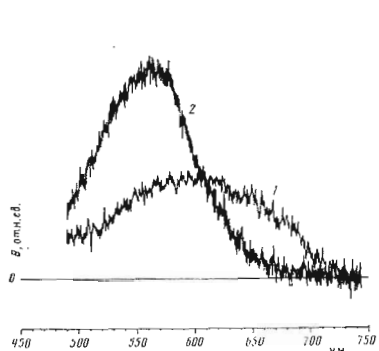


Рис. 1

Рис. 1. Спектры кругового дихроизма бактериородопсина, солибилизованного в 5% лаурилсахарозе. Среда инкубации кроме 5% лаурилсахарозы содержит 0,01 (1) или 1 М HCl (2)

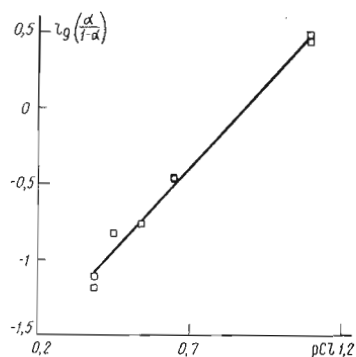


Рис. 2

Рис. 2. рСl-Зависимость перехода синей кислотной формы в кислотно-пурпурную в растворах HCl для солибилизованного бактериородопсина. Значения рСl определены расчетным способом по методу Робинсона и Бейтса [8, 18]

Проведено исследование перехода синей кислотной формы солибилизованного бактериородопсина в пурпурную форму в растворах HCl. рСl-Зависимости этого перехода в 2 и 5% лаурилсахарозе совпадают. Коэффициент Хилла равен 2,2 для расчетных значений рСl (рис. 2) и 2,6 для таблицы коэффициентов активности из работы [15]. Для пурпурных мембран эти значения соответственно равны 2,7 и 3,2 [8]. Таким образом, и для мономерного бактериородопсина сохраняется кооперативность исследуемого перехода. Некоторое снижение коэффициента Хилла может быть связано с «разбалтыванием» структуры хромопротеида при переходе из кристаллической упаковки в мембране в мицеллы детергента. Таким образом, кооперативность связана с поглощением каждой молекулой бактериородопсина пурпурной мембраны трех анионов Cl^- в процессе перехода BR605 \rightarrow BR565.

Интересно отметить, что для перехода форм в галородопсине также показана кооперативность по Cl^- с близким коэффициентом Хилла (3,5—4) [16].

Авторы глубоко благодарны проф. В. П. Скулачеву за ценные советы и интерес, проявленный к работе; Г. П. Лепневу за изготовление малогабаритных рН-электродов и полезное обсуждение; Н. Г. Абдулаеву (ИБХ АН СССР) и В. Л. Воейкову за синтез и очистку препаратов лаурилсахарозы, А. М. Аругоняну за помощь в снятии спектров кругового дихроизма.

Экспериментальная часть

Бактериородопсин выделяли по методике Остерхельта и Стокеннуса [1, 17]. Пурпурные мембраны солибилизовали в 2 или 5% лаурилсахарозе согласно работе [14].

Спектры кругового дихроизма снимали на дихрографе Mark III (Jobin Ivon, Франция). Остальные спектральные измерения и построение в координатах Хилла проводили как описано ранее [8].

Определение рСl проводили расчетным образом, как указано в работе [8], по методу Робинсона и Бейтса [18], пренебрегая влиянием лаурилсахарозы на коэффициенты активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Oesterhelt D., Stoeckenius W. // Nature New Biol. 1974. V. 233. № 39. P. 149—152.
2. Stoeckenius W., Lozier R. H., Bogomolni R. A. // Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 505. № 3. P. 215—278.
3. Heyn M. P., Bauer P.-J., Dencher N. A. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1975. V. 67. N 3. P. 897—903.
4. Hwang S.-B., Stoeckenius W. // J. Membrane Biol. 1977. V. 33. № 3. P. 325—350.
5. Шкроб А. М., Родионов А. В., Овчинников Ю. А. // Биооргани. химия. 1978. Т. 4. № 3. С. 354—359.

6. Dencher N. A., Heyn M. P. // FEBS Lett. 1978. V. 96. № 2. P. 322—326.
7. Casadio R., Stoeckenius W. // Biochemistry. 1980. V. 19. № 14. P. 3374—3381.
8. Драчев А. Л., Драчев Л. А., Каулен А. Д., Хитрина Л. В., Чекулаева Л. Н. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 12. С. 1606—1610.
9. Fischer U., Oesterhelt D. // Biophys. J. 1979. V. 28. № 2. P. 211—230.
10. Mowery P. C., Lozier R. H., Chae Q., Tseg Y.-W., Taylor M., Stoeckenius W. // Biochemistry. 1979. V. 18. № 19. P. 4100—4107.
11. Драчев Л. А., Каулен А. Д., Скулачев В. П., Хитрина Л. В., Чекулаева Л. Н. // Биохимия. 1981. Т. 46. № 5. С. 897—903.
12. Drachev L. A., Kaulen A. D., Khitrina L. V., Skulachev V. P. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 117. № 3. P. 461—470.
13. Edgerton M. E., Moore T. A., Greenwood C. // FEBS Lett. 1978. V. 95. № 1. P. 35—39.
14. Naito T., Kito Y., Kobayashi M., Hiraki K., Hamanaka T. // Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 637. № 3. P. 457—463.
15. Рабинович В. А., Алексеева Т. Е. // Электрохимия. 1973. Т. 9. № 10. С. 1434—1436.
16. Schobert B., Lanyi J. K., Gragoe E. J., Jr. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. № 24. P. 15158—15164.
17. Oesterhelt D., Stoeckenius W. // Meth. Enzymol. 1974. V. 31. P. 667—678.
18. Robinson R. A., Bates R. G. // Anal. Chem. 1973. V. 45. № 9. P. 1666—1669.

Поступила в редакцию
28.VII.1987

**COOPERATIVITY OF SOLUBILIZED BACTERIORHODOPSIN
TRANSITION TO THE PURPLE ACIDIC FORM
UNDER Cl⁻ INFLUENCE**

DRACHEV A. L., DRACHEV L. A., KAULEN A. D., KHITRINA L. V.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology
and Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University*

The spectral transition of laurylsucrose-solubilized bacteriorhodopsin from the acidic blue form to the acidic purple form has been studied. Its pCl-dependence in Hill coordinates is linear, Hill coefficient being between 2 and 3. Cooperativity of this transition in the purple membranes is connected with the uptake of three Cl⁻ anions by each bacteriorhodopsin molecule.