



УДК 577.112.4.033:541.143

© 1993 Е. П. Лукашев, А. А. Кононенко,  
Н. Г. Абдулаев\*, Т. Ебрей\*\*ТОРМОЖЕНИЕ ФОТОЦИКЛА БАКТЕРИОРОДОПСИНА  
ЦИКЛОГЕКСАНДИОНОМ

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет;  
\* Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва;  
\*\* Иллинойский университет, факультет физиологии и биофизики, Урбана-Шампейн, США

Исследованы эффекты модификации 1,2-циклогександионом (СНД) аргининовых остатков белка бактериородопсина в препаратах пурпурных мембран (ПМ) *Halobacterium halobium* дикого типа и мутантного штамма D96N. Измерения с помощью рН-зависимого красителя пиранина показали, что СНД-модификация не препятствует осуществлению полного трансмембранного фотопереноса протонов, но заметно снижает скорость захвата мембранами  $H^+$  из среды. СНД вызывает отчетливое замедление кинетики репротонирования основания Шиффа, регистрируемое по абсорбционным изменениям и фототскам, связанным с распадом формы М в суспензии ПМ и мембранах, ориентированных в ПААГ. Измерения спектральных и фотоэлектрических характеристик сухих электрофоретически ориентированных пленок ПМ показали значительное усиление модифицирующего действия СНД на стадии регенерации исходной формы фотоцикла бактериородопсина, что может быть использовано для создания новых бистабильных фотохромных и фотоэлектродгенных систем для целей микроэлектроники.

Бактериородопсин, пигмент-белковый комплекс пурпурных мембран галофильных бактерий *Halobacterium halobium*, функционирует как светозависимая протонная помпа [1—3]. Он состоит из 248 аминокислот, формирующих семь  $\alpha$ -спиральных фрагментов, которые пронизывают толщу мембраны. В качестве хромофорной группировки он имеет ретиналь, соединенный с помощью протонированного основания Шиффа с остатком Lys-216. Фотоцикл бактериородопсина включает в себя последовательные переходы через различные спектрально-кинетиические интермедиаты:  $bR \rightarrow J \rightarrow K \rightarrow L \rightarrow M \rightarrow N \rightarrow O \rightarrow bR$  [2]. Обратимая *транс-цис*-изомеризация ретиналя и депротонирование-репротонирование основания Шиффа — основные события в этом цикле. Первичным акцептором протона в реакции депротонирования, которая происходит на стадии образования ключевого интермедиата М, является остаток аспарагиновой кислоты Asp-85, а донором протона на стадии распада этого интермедиата — Asp-96 [4, 5].

Определенный интерес представляет выяснение роли аргининовых остатков в функционировании бактериородопсина. Совокупность имеющихся в настоящее время данных свидетельствует о том, что по крайней мере два остатка из семи непосредственно вовлечены в перенос  $H^+$  как с донорной, так и с акцепторной стороны канала. Это прежде всего Arg-82  $\alpha$ -спирального фрагмента С, который своей положительно заряженной гуанидиновой группой, возможно, создает с двумя отрицательными группами ионизированной аспарагиновой кислоты (Asp-85

Сокращения: bR, J, K, L, M, N, O — интермедиаты фотоцикла бактериородопсина, ПМ — пурпурные мембраны, СНД — 1,2-циклогександион.

и Asp-212) комплекс, являющийся протондонором для положительно заряженного протонированного основания Шиффа [6].

Другой важный аргининовый остаток — Arg-227 G  $\alpha$ -спирали, локализованный, согласно структурным данным, на входе в канал [7]. Замещение только этих двух остатков (Arg-82 и Arg-227) на нейтральный глутамин заметно влияет на фотоцикл bR и перенос протона, в то время как замена остальных остатков (Arg-7, Arg-164, Arg-175, Arg-225 и Arg-134) изменяет кинетические параметры фотоцикла в гораздо меньшей степени [8]. Мутант по Arg-82 имеет смещенное в область нейтральных pH значение  $pK_a$  перехода в так называемую «синюю» форму бактериородопсина и заниженный процесс переноса протонов [9]. У мутанта по Arg-227 наблюдается резкое замедление стадии распада интермедиата M, которая, как отмечалось выше, сопряжена с переносом  $H^+$  с цитоплазматической стороны мембраны на депротонированное основание Шиффа [8, 9]. Механизм вовлечения Arg-227 в транспорт протона не совсем ясен.

Участие аргининовых остатков в депротонировании основания Шиффа впервые было показано Льюисом с соавт. [10]. В дальнейшем в работах Пекера [11] было обнаружено, что химическая модификация аргининов 2,3-бутандионом в присутствии боратного буфера приводит к относительно слабому (в 1,7 раз) замедлению образования интермедиата M, но к значительному (более чем в 30 раз) торможению скорости его распада. Было показано также, что обработка ПМ аргинингидрохлоридом при pH 10,5, а также гуанидингидрохлоридом или его производными [12] дает аналогичный эффект.

Получение модифицированного бактериородопсина с сильно заторможенным распадом интермедиата M имеет также вполне самостоятельный прикладной интерес. По существу речь идет о получении нового бистабильного фотохромного и фотоэлектрогенного материала с целью создания перспективных носителей оптической информации и устройств микроэлектроники [13].

Целью настоящей работы было исследование влияния на фотоцикл бактериородопсина 1,2-циклогександиона, образующего с гуанидиновыми группами аргининов в присутствии боратного буфера при pH 8—9 прочный, нейтральный по заряду комплекс [14, 15].

Действие CHD на кинетику фотоцикла бактериородопсина в суспензии ПМ в воде или ПААГ оказалось практически одинаковым. В качестве иллюстрации представлены результаты, полученные на мембранах, ориентированных в геле (рис. 1), поскольку на этом же образце параллельно измеряли фотоэлектрический ответ. Хорошо видно, что наиболее заметные изменения происходят в кинетике распада интермедиата M (рис. 1a) и генерации интермедиата O (рис. 1z). Исследования влияния гидратации на кинетику фотопереноса протона в пленках ПМ позволили авторам работы [16] сделать вывод, что образование O-формы — ключевая стадия завершения полного транспорта  $H^+$  через мембрану. Из приведенных нами данных, однако, не следует однозначно, что модификация CHD полностью блокирует образование интермедиата O в фотоцикле бактериородопсина. В работе [17] показано, что возможность спектрального обнаружения этого продукта определяется прежде всего соотношением констант его образования и распада. Мы предполагали, что в модифицированных CHD пурпурных мембранах трансмембранный перенос протонов сохраняется, несмотря на отсутствие спектральных проявлений в фотоцикле интермедиата O. Для доказательства этого были проведены эксперименты с использованием pH-чувствительного красителя пиранина в водной суспензии ПМ (рис. 2). Для удаления боратного буфера из среды препарат диализовали в течение ночи против 5 мМ раствора KCl, pH 7,0. Диализу подвергали как контрольные образцы, так и модифицированные CHD. Понижение pH суспензии до 7,0 (точки  $pK$  красителя) приводило к частичной утрате модифицирующего действия CHD, так как при pH ниже 8,0 комплекс аргинина с CHD способен к диссоциации. [15]. Однако более 50% молекул белка, как следует из кинетической кривой распада M, находятся в модифицированном состоянии и в данных условиях (рис. 2б); характерное время процесса

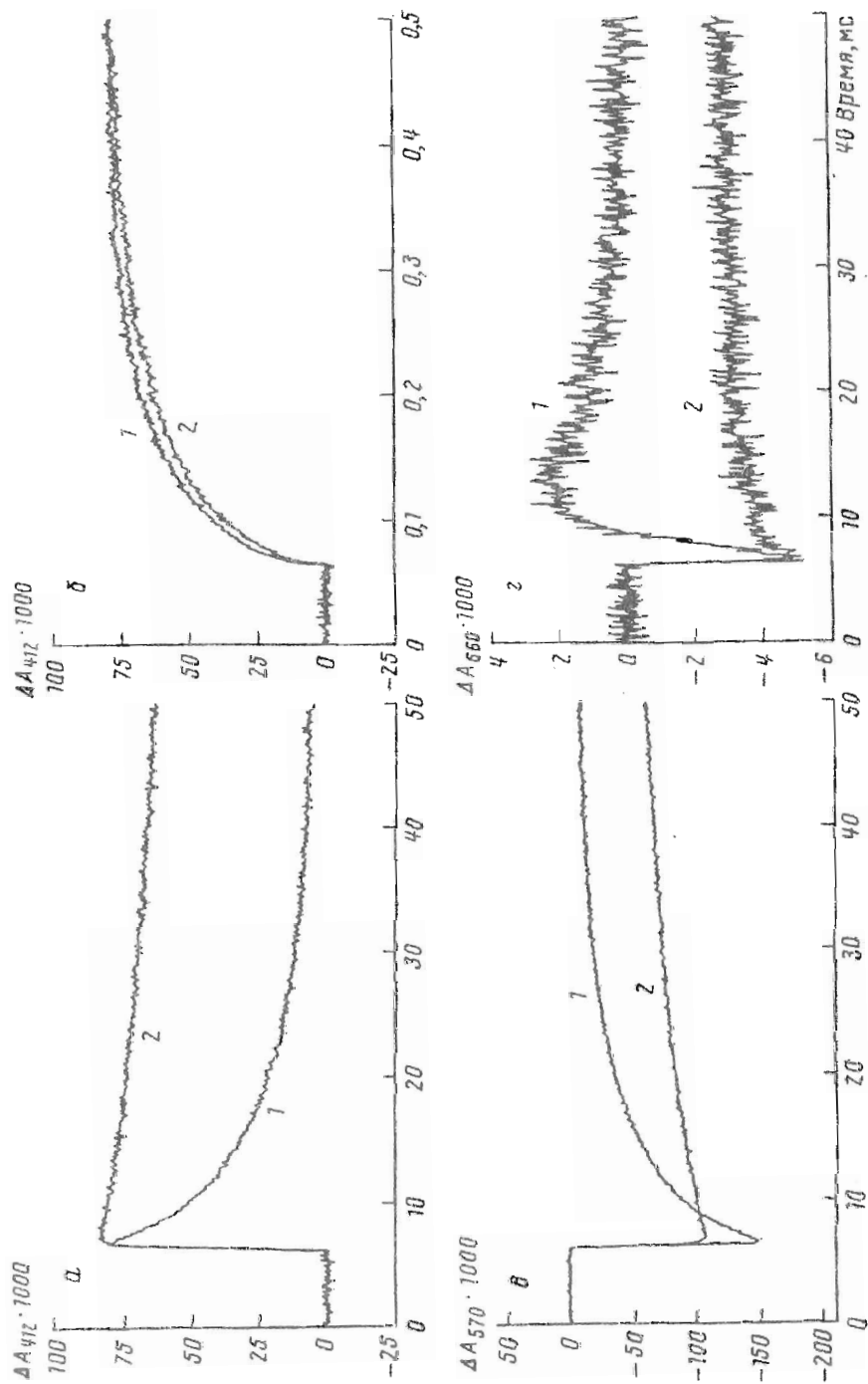


Рис. 1. Кинетика лазериндуцированных изменений ПОМ. Nalobidil, ориентированных в ПААГ. а — распад формы М, б — образование формы М, в — распад основной формы ВР, г — образование формы О. 1 — контрольные образцы, 2 — после модификации СНД. Условия: температура 20° С, 100 мМ Na-буратный буфер, рН 8,2, 100 мМ СНД, время инкубации 24 ч. Каждая кинетическая кривая получена усреднением четырех единичных сигналов

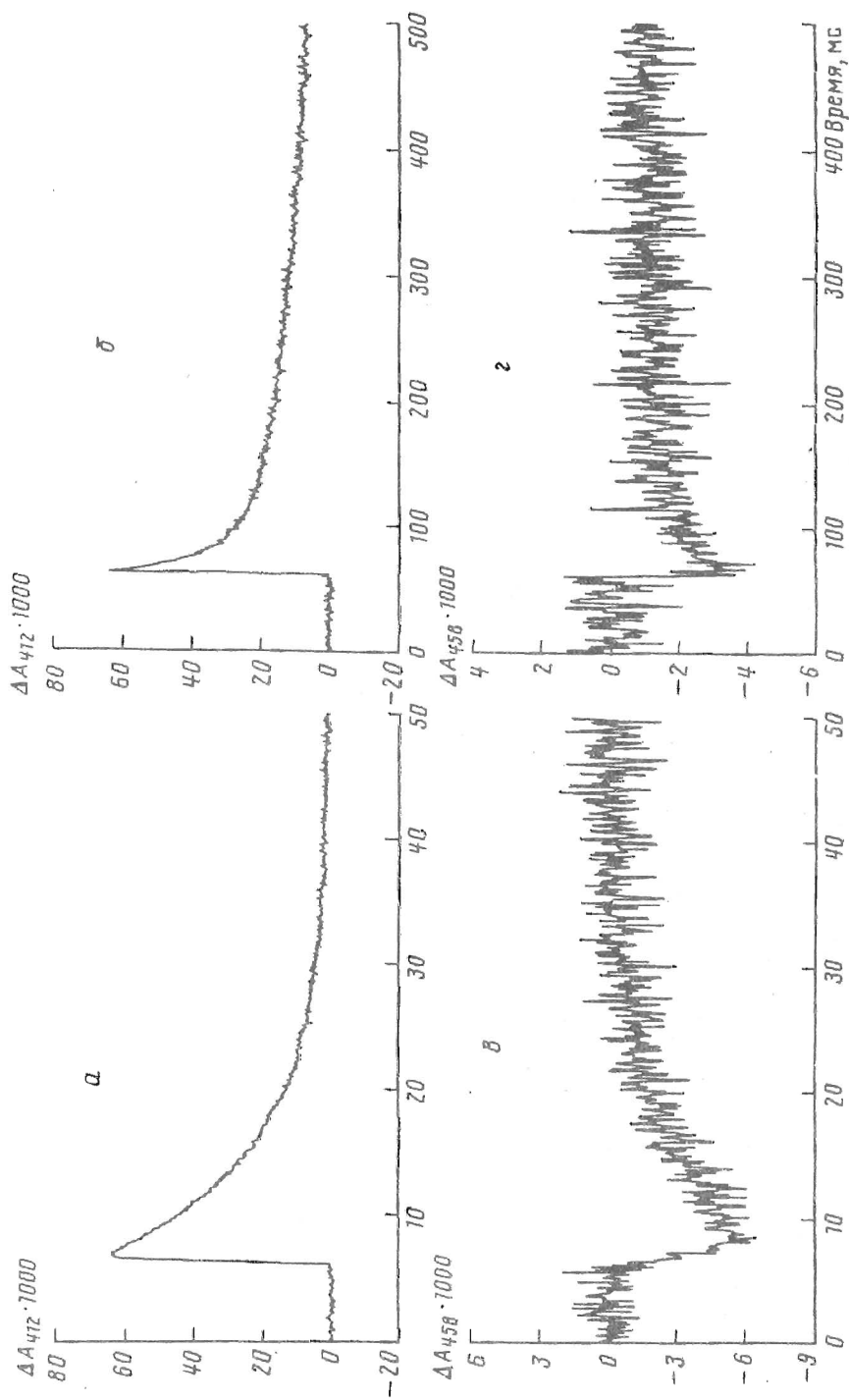


Рис. 2. Лазериндуцированные изменения поглощения бактериородопсина при 412 нм (а, б) в водной суспензии ПМ и соответствующие изменения поглощения рН-чувствительного красителя пиранина (50 мкМ) при 458 нм (в, г) (а, в — контроль, б, г — в присутствии СНД). Температура 20° С, 5 мм КСl, рН 7,0. Образец был преинкубирован с СНД в боратном буфере, который затем был удален диализом. Подробности в «Экспер. части»

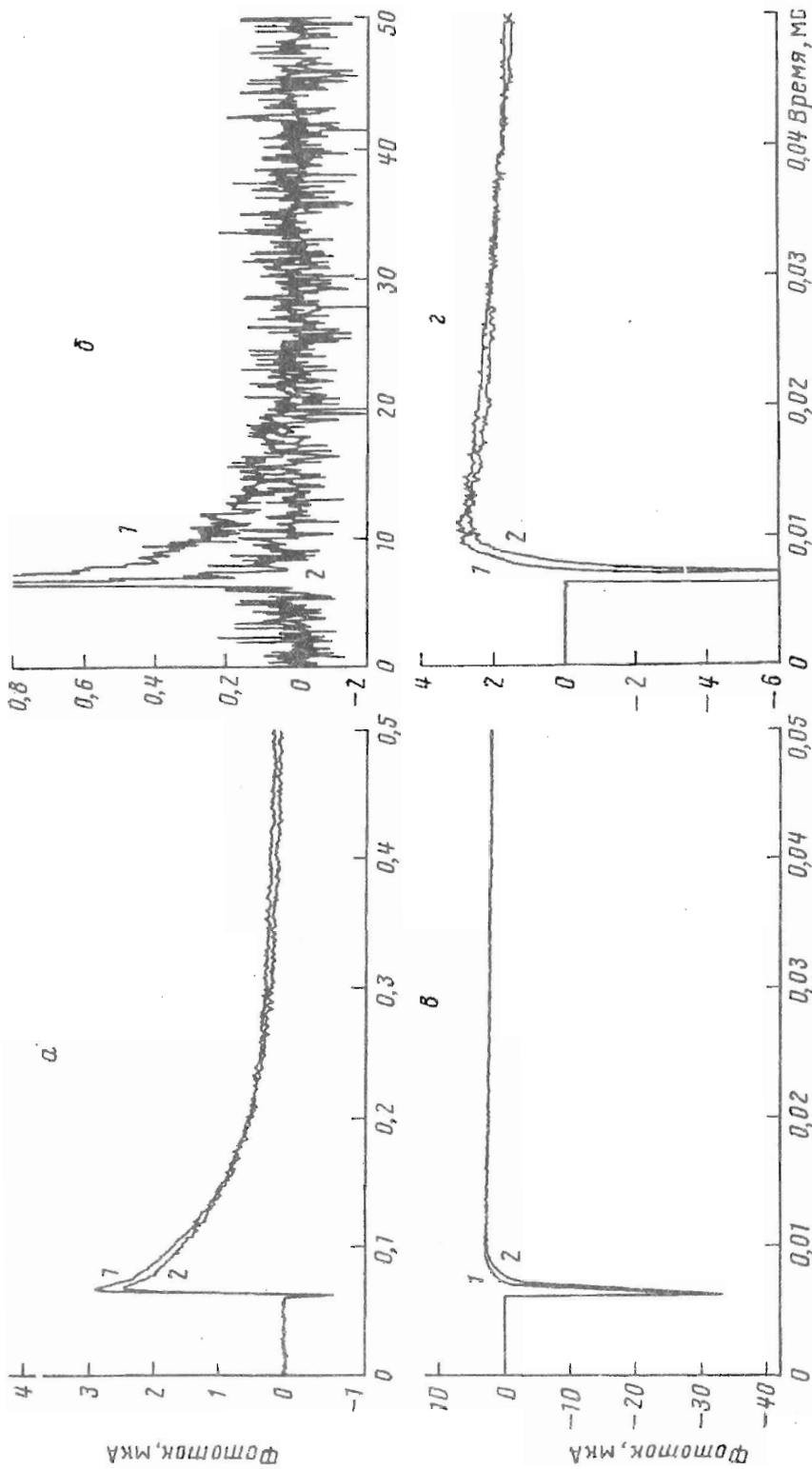


Рис. 3. Лазериндуцированные фототоки от ПМ, ориентированных в ПААГ: 1 — контроль, 2 — после модификации СНД. При измерении фототока фрагмент ПААГ с иммобилизованными ПМ помещался между двумя электродами из платинизированной платины. В системе регистрации был использован конвертор ток — напряжение с входным сопротивлением 50 Ом, собранный на базе операционного усилителя ОРА600ВМ (Вып.-Brown Corp., Tucson, AZ). Остальные условия как в подписи к рис. 1

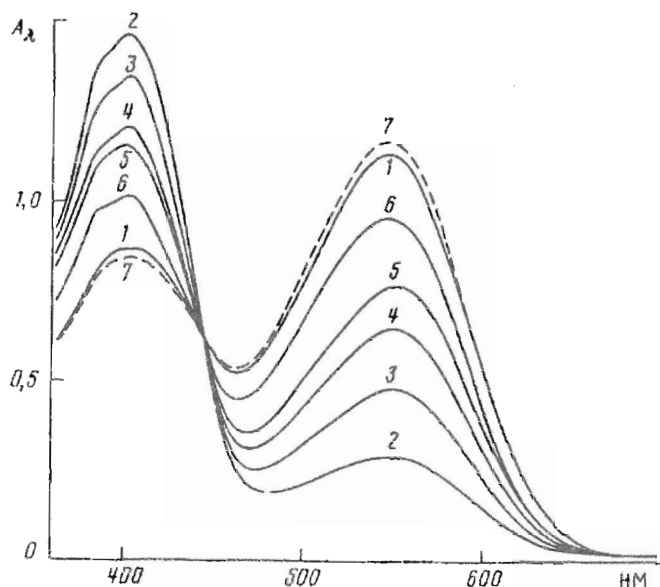


Рис. 4. Спектры поглощения бактериородопсина в сухих пленках ПМ, модифицированных СНД, измеренные после выдерживания в темноте в течение 48 ч (1) и после 10-минутного воздействия желтым светом (светофильтр ЖС-18,  $\lambda > 500$  нм,  $200 \text{ Вт/м}^2$ ): непосредственно после освещения (2) и спустя 10 мин (3), 1 ч (4), 3 ч (5) и 24 ч (6); 7 — спектр поглощения пленки, предварительно подвергнутой воздействию (10 мин) желтым светом, после немедленного 10-минутного освещения синим светом (светофильтр СС-5,  $380 \text{ нм} < \lambda < 500 \text{ нм}$ ,  $80 \text{ Вт/м}^2$ )

перехода  $M \rightarrow bR$  в этом случае существенно превышает таковое в контроле (рис. 2а). Видно, что изменение скорости распада  $M$  продукта коррелирует с изменением кинетики захвата протона (спад кривой изменений поглощения красителя).

Ранее установлено [18], что нарастание положительной фазы фототока (обычно обозначаемой  $V_2$ ) отражает изменение тока в цепи регистрации во время перехода из  $K$ - в  $L$ -состояние, в то время как его релаксация в микросекундной шкале времени связана с  $L \rightarrow M$ -переходом, а в миллисекундной шкале характеризует распад  $M$ -продукта. Полученные нами результаты измерения фототока в геле (рис. 3) также можно рассматривать как указание на сохранение способности модифицированного бактериородопсина к транспорту  $H^+$  через мембрану, поскольку ранее было показано, что фототок  $V_2$  связан с процессом выброса протона с внешней стороны мембраны и чувствителен к присутствию в среде различных ионов и буферов [19]. Уменьшение амплитуды сигнала  $V_2$  (рис. 3а) в присутствии СНД, очевидно, результат некоторого замедления скорости образования  $M$ , что следует также из оптических экспериментов (рис. 1б). В работе [19] показано, что в случае переноса одного и того же количества зарядов на одинаковое расстояние интеграл тока (площадь под кривой сигнала  $V_2$ ) остается постоянным. Это означает, что при быстром  $L \rightarrow M$ -переходе амплитуда сигнала  $V_2$  должна быть больше, чем при медленном переходе. По той же причине в присутствии СНД значительно уменьшается и амплитуда медленного миллисекундного компонента кривой фототока, коррелирующего с фазой распада  $M$  в фотоцикле (рис. 3б). Кроме того, модификация СНД приводит к незначительному торможению кинетики перехода  $K \rightarrow L$ , что проявляется в замедлении соответствующей фазы нарастания сигнала  $V_2$  (рис. 3в). В таблице суммированы результаты двухэкспоненциального разложения кинетики генерации и распада  $M$ , а также релаксации фотоэлектрического сигнала  $V_2$  в ПМ, ориентированных в ПААГ.

На рис. 4 представлены результаты экспериментов, проведенных на пленках ПМ, обработанных СНД. После высушивания на свету (см. «Экспериментальная часть») и выдерживания в темноте в течение 48 ч при  $20^\circ \text{C}$  в образцах

Кинетические параметры лазериндуцированного образования продукта М фотоцикла бактериородопсина, его распада и затухания сигнала фототока В<sub>2</sub> в препаратах пурпурных мембран *H. halobium*, ориентированных в полиакриламидном геле

| Образец              | Образование М, мкс | Распад М, мс | Сигнал В <sub>2</sub> , мкс |
|----------------------|--------------------|--------------|-----------------------------|
| Контроль $\tau_1$    | 5,9(0,3)           | 5,3(0,65)    | 5,1(0,28)                   |
| $\tau_2$             | 83,0(0,7)          | 25,4(0,35)   | 103,9(0,72)                 |
| Модифицированный СНД |                    |              |                             |
| $\tau_1$             | 24,0(0,35)         | 91,2(0,4)    | 22,3(0,16)                  |
| $\tau_2$             | 127,5(0,65)        | 800,5(0,6)   | 120,9(0,84)                 |

Примечание:  $\tau_1$  и  $\tau_2$  — время жизни. В скобках даны относительные вклады амплитуд соответствующих кинетических компонентов регистрируемых процессов.

фиксировалось некоторое распределение состояний исходной формы bR с максимумом поглощения при 560 нм и формы М с максимумом при 405 нм (рис. 4, 1). Освещение этих препаратов постоянным действующим светом ( $\lambda > 500$  нм, 200 Вт/м<sup>2</sup>) в течение 10 мин приводит к выцветанию основной полосы поглощения (рис. 4, 2), обусловленному переходом бактериородопсина в форму М. Фотопродукт, полученный таким образом, достаточно стабилен: его содержание снижается лишь до 30% при выдерживании препаратов в темноте в течение 3 ч (рис. 4, 5) и до 10% после 24-часовой темновой экспозиции (рис. 4, 6). Фоторегенерированный продукт обладает основными свойствами, характерными для формы М в пленочных препаратах ПМ [20]; дополнительная световая активация преимущественно в полосу собственного поглощения данной формы (380 нм  $< \lambda >$  430 нм, 80 Вт/м<sup>2</sup>) вызывает быстрое возвращение ее в исходное состояние bR (рис. 4, 7).

Данные по кинетике образования и спада фотопотенциалов в пленках ПМ, ориентированных с помощью электрофоретического осаждения и обработанных СНД (рис. 5), свидетельствуют о том, что воздействие зеленым и синим светом в отдельности приводит к возникновению потенциалов разного знака. Это согласуется с известными данными об особенностях электрогенных процессов в фотоцикле бактериородопсина при пониженной гидратации препаратов [16, 21] и говорит о том, что в этом случае переход М → bR сопровождается возвращением протона к основанию Шиффа с акцепторной стороны протонного канала, а не с донорной. Последующая активация тем же зеленым или синим светом (рис. 5) вызывает меньшие по величине электрические ответы, что обусловлено фотопревращениями молекул активной фракции бактериородопсина в две относительно стабильные формы — bR и М. Принимая во внимание принципиальную возможность быстрого обращения перехода за счет дополнительного светового воздействия, активирующего реакцию М → bR, предложенный в настоящей работе способ регулирования фотоцикла бактериородопсина наряду с другими известными методами, включающими генно-инженерный подход [4, 22], представляется перспективным для биотехнологических приложений. Уникальное сочетание фотохромных и фотоэлектрогенных свойств бактериородопсина открывает возможность создания нетрадиционных устройств запоминания и обработки оптической информации, других активных элементов микроэлектроники.

Влияние СНД на кинетику завершающей стадии фотоцикла было изучено также на бактериородопсине из мутантного штамма D96N, у которого остаток аспарагиновой кислоты в положении 96 замещен на непротонирующийся аспарагин. Ранее установлено [22—25], что такая замена внутреннего донора протона изменяет весь механизм репротонирования основания Шиффа. В этом случае протон поступает к ретиналю из среды, по-видимому, диффузионным путем с энергией активации, характерной для движения протона в воде [26] (прибли-

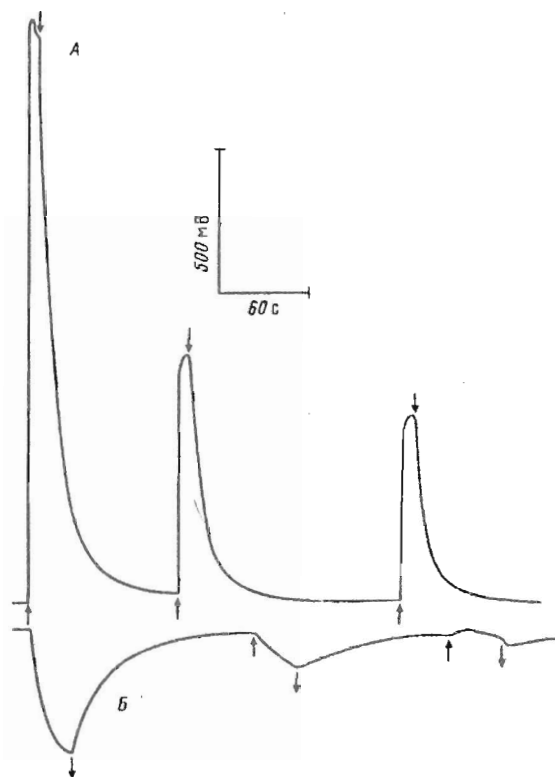


Рис. 5. Кинетическая кривая фотопотенциала, генерируемого в сухих пленках электрофоретически ориентированных ПМ, модифицированных СНД: при активации зеленым светом (светофильтр ЖС-18,  $\lambda > 500$  нм,  $200 \text{ Вт/м}^2$ ) (а) или синим светом (светофильтр СС-5,  $380 \text{ нм} < \lambda < 500$  нм,  $80 \text{ Вт/м}^2$ ) (б). Стрелками, направленными вверх и вниз, отмечены соответственно моменты включения и выключения действующего света

зительно в 5 раз ниже наблюдаемой в бактериородопсине дикого типа), и скорость этого процесса определяется величиной рН среды [27]. Как показали наши эксперименты, у мутанта D96N СНД не вызывает каких бы то ни было изменений кинетики распада формы М в фотоцикле бактериородопсина во всем изученном диапазоне значений рН — от 7,5 до 9,5. Можно предположить, что Arg-227, непосредственно не участвующий в переносе протона по донорной части канала, функционирует как противоион для депротонированного на этапе перехода М→N аминокислотного остатка Asp-96, обеспечивая тем самым быстрое и эффективное репротонирование основания Шиффа. Отсутствие Asp-96 делает кинетику распада М нечувствительной к состоянию Arg-227.

По данным наших измерений, и в модифицированном СНД бактериородопсине дикого типа энергия активации распада продукта М в интервале температур 0—35° С также оказалась близкой к таковой для диффузии  $\text{H}^+$  в воде и составляла около 4 ккал/моль. Энергия активации распада М в контроле (без СНД) равнялась  $19,8 \pm 0,3$  ккал/моль для того же интервала температур. Последнее, очевидно, означает, что лимитирующей стадией репротонирования основания Шиффа является диффузия протона на участке от Asp-96 до основания Шиффа или от внутренней стороны мембраны до этого остатка. Однако в отличие от кинетики распада М у мутанта D96N, где наблюдалась резкая зависимость от концентрации протонов в среде, у бактериородопсина дикого типа, модифицированного СНД, нами были зарегистрированы лишь небольшие изменения скорости релаксации М-формы при изменении рН среды. Так, при рН 9,8 характерные времена жизни  $\tau$  (в скобках — относительный вклад амплитуд) быстрой и мед-



ленной фаз составляли 103,4 (0,44) и 932,0 мс (0,56), а при 6,8 — соответственно 61,0 (0,40) и 621,4 мс (0,60). Таким образом, при изменении рН на 3 единицы значения  $\tau$  различались лишь на 30%, тогда как в мутанте D96N, по результатам работы [27] и нашим данным, такое же изменение концентрации водородных ионов в среде изменяло кинетические параметры распада М более чем в 50 раз. Можно сделать вывод о том, что при СНД-модификации бактериородопсина дикого типа репротонирование основания Шиффа идет по-прежнему через определенную аминокислотную группу с высоким значением рК.

Итак, изучение свойств ПМ химически модифицированных СНД позволило определенным образом детализировать представления об особенностях функционирования бактериородопсина как светозависимой протонной помпы и наметить пути получения новых материалов на основе этого светочувствительного белка, которые могли бы оказаться перспективными для биотехнических приложений.

### Экспериментальная часть

Пурпурные мембраны с бактериородопсином выделяли из клеток бактерий *H. halobium* S-9 как описано в работе [28]. Спектры поглощения измеряли на спектрофотометрах Aviv 14DS (Aviv Associated, Lakewood, NJ) и Hitachi-557 (Hitachi, Япония). Для регистрации лазериндуцированных оптических и электрических изменений была использована экспериментальная установка, описанная в работе [29]. Источником возбуждающего света был лазер Nd-YAG с  $\lambda$  532 нм, длительностью импульса 7 нс, интенсивностью приблизительно 10 Дж/см<sup>2</sup> (Quanta Ray DCR-11, Spectra Physics, Mountain View, CA). Измерения фотопотенциалов в ориентированных сухих пленках ПМ проводили по методике, описанной в работе [21]. Кинетику выхода и связывания протонов в суспензии ПМ регистрировали по изменениям поглощения при 458 нм рН-чувствительного красителя пиранина, как описано в работе [30].

Модификацию бактериородопсина осуществляли путем инкубации водной суспензии ПМ (16 мкМ по белку) в 100 мМ Na-боратном буфере при рН 8,2 в присутствии 100 мМ СНД (Sigma Chemical Co.). Время инкубации составляло 24 ч при 20° С. В отдельных экспериментах для выявления специфичности эффекта модификации избыток СНД удаляли с помощью центрифугирования ПМ в боратном буфере при рН 8,2 с последующим ресуспендированием осадка в том же буфере. Эксперименты показали, что удаление свободного СНД из раствора слабо влияет на характер фотопревращений модифицированного бактериородопсина.

Характеристические времена жизни ( $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ) и относительные вклады амплитуд ( $A_1$ ,  $A_2$ ) кинетических компонентов процессов лазериндуцированных изменений поглощения и фототока аппроксимируемых в виде суммы двух экспонент  $A(t) = A_1 e^{-t/\tau_1} + A_2 e^{-t/\tau_2}$  были определены на ЭВМ с помощью метода нелинейной регрессии по программе CURFIT [31].

Сухие пленки ПМ с модифицированным бактериородопсином, в том числе и ориентированные с помощью электрофоретического осаждения на электропроводящей подложке согласно [21], были получены путем высушивания свежеприготовленных образцов на актиничном свете ( $\lambda > 500$  нм, 200 Вт/м<sup>2</sup>) после их вымачивания в течение 1 ч в 0,5 М растворе СНД в 100 мМ боратном буфере с рН 8,2. В результате такой процедуры цвет пленки менялся с пурпурного на желтый, что соответствовало переходу из основной формы bR с поглощением при 560 нм в форму М с поглощением при 405 нм. После 48 ч темновой адаптации при 20° С такие препараты были использованы в дальнейших экспериментах. Пурпурный цвет пленки мог быть восстановлен сразу же после высушивания при повторном увлажнении образца.

Было изучено также влияние СНД на кинетику фотоцикла и фототока в ПМ, ориентированных в ПААГ и измеренных по методике, описанной в работах

[19, 29]. Модификацию ПМ в ПААГ проводили путем инкубации образца в растворе 100 мМ CHD в 100 мМ боратном буфере при pH 8,2 в течение 24 ч. Фотоиндуцированные оптические и электрические параметры измеряли в той же среде инкубации. Контрольным образцом был гель с ПМ в боратном буфере без CHD.

В работе использован мутант D96N, впервые полученный в лаборатории Д. Остерхельта [32].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Oesterhelt D., Stoerkenius W.//Nature New Biol. 1971. V. 233. № 39. P. 149—154.
2. Stoerkenius W., Lozier R. H., Bogomolni R. A.//Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 505. № 3—4. P. 215—278.
3. Birge R.//Biochim. et biophys. acta. 1990. V. 1016. № 3. P. 293—327.
4. Mogi T., Stern L. J., Marti T., Chao B. H., Khorana H. G.//Proc Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 12. P. 4148—4152.
5. Butt H. J., Fendler K., Bamberg E., Tittor J., Oesterhelt D.//EMBO J. 1989. V. 8. № 6. P. 1657—1663.
6. Braiman M. S., Mogi T., Stern L. J., Khorana H. G., Rothschild K. J.//Biochemistry. 1988. V. 27. № 23. P. 8516—8520.
7. Henderson R., Baldwin J. M., Ceska T. A., Zemlin F., Beckmann E., Downing K. H.//J. Mol. Biol. 1990. V. 213. № 4. P. 899—929.
8. Lin G. C., El-Sayed M. A., Marti T., Stern L. J., Mogi T., Khorana H. G.//Biophys. J. 1994. V. 60. № 1. P. 172—178.
9. Stern L. J., Khorana H. G.//J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 24. P. 14202—14208.
10. Lewis A., Marcus M., Erhenberg B., Crespi H.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 10. P. 4642—4646.
11. Tristram-Nagle S., Packer L.//Biochem. Int. 1981. V. 3. № 6. P. 621—628.
12. Nakasako M., Kataoka M., Tokunaga F.//FEBS Lett. 1989. V. 254. № 1—2. P. 211—214.
13. Birge R.//Ann. Rev. Phys. and Chem. 1990. V. 41. P. 683—733.
14. Liu W.-H., Feinstein G., Osuga D. T., Haynes R., Feeney R.//Biochemistry. 1968. V. 7. № 8. P. 2886—2892.
15. Parthy L., Smith E.//J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 2. P. 565—569.
16. Varo G., Keszthelyi L.//Biophys. J. 1985. V. 47. № 2. P. 243—246.
17. Chernavskii D. S., Chizhov I. V., Lozier R. H., Murina T. M., Prokhorov A. M., Zubov B. V.//Photochem. Photobiol. 1989. V. 49. P. 649—653.
18. Liu S. Y., Gowindjee R., Ebrey T. G.//Biophys. J. 1990. V. 57. № 5. P. 951—963.
19. Liu S. Y., Ebrey T. G.//Biophys. J. 1988. V. 54. № 2. P. 321—329.
20. Лукашев Е. П., Коломняко А. А., Рубин А. Б.//Биол. мембраны. 1984. Т. 1. № 1. С. 91—98.
21. Koponenko A. A., Lukashov E. P., Chumorovsky S. K., Maximychev A. V., Timashev S. F., Cherkulaev L. N., Rubin A. B., Paschenko V. Z.//Biochim. et biophys. acta. 1987. V. 892. № 1. P. 56—67.
22. Hampp N., Brauchle C., Oesterhelt D.//Biophys. J. 1990. V. 58. № 1. P. 83—93.
23. Holz M., Skulachev V. P., Khorana H. G., Kaulen A. D., Heyn M. P., Ditto H., Drachev L. A., Mogi T.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. № 7. P. 2167—2171.
24. Miercke L. J. W., Betlach M. C., Mitra A. K., Shand R. F., Fong S. K., Stroud R. M.//Biochemistry. 1991. V. 30. № 12. P. 3088—3098.
25. Thorgeirsson T. E., Midler S. J., Miercke L. J. W., Betlach M. C., Shand R. F., Stroud R. M., Kliger S. D.//Biochemistry. 1991. V. 30. № 38. P. 9133—9142.
26. Eigen L., De Maeyer M.//Z. Electrochem. 1955. B. 59. S. 986—993.
27. Miller A., Oesterhelt D.//Biochim. et biophys. acta. 1990. V. 1020. № 1. P. 57—64.
28. Becher B., Cussim J. Y.//Prep. Biochem. 1975. V. 5. № 2. P. 161—178.
29. Liu S. Y.//Biophys. J. 1990. V. 57. № 5. P. 943—950.
30. Gowindjee R., Longstaff C., Dantskhazy Z., Ebrey T. G., Rando R. R.//Biophys. J. 1988. V. 54. № 3. P. 557—562.

31. *Bevington P. R.*//Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences. N. Y.: McGraw-Hill Book Co., 1969. P. 237—239, 302—303.
32. *Soppa J., Oesterhelt D.*//J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 22. P. 13043—13048.

Поступила в редакцию  
26.X.1992  
После доработки  
3.XII.1992

*E. P. Lukashov, A. A. Kononenko, N. G. Abdulaev\*, T. G. Ebrey\*\**

## RETARDATION OF THE PHOTOCYCLE IN BACTERIORHODOPSIN BY CYCLOHEXANEDIONE

*M. V. Lomonosov Moscow State University, Department of Biology;*

*\* M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow;*

*\*\* Department of Physiology and Biophysics, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois*

Effects of the modification of the arginine residues in bacteriorhodopsin (BR) by 1,2-cyclohexanedione (CHD) were investigated in the wild type (WT) pigment and a single amino acid mutant D96N. As measurements with pyranine, a pH-sensitive dye, showed CHD-modification of BR-WT does not prevent the transmembrane proton transfer but slows down the proton uptake from the medium. CHD also slows down the reprotonation of the BR Schiff base as seen from the kinetics of absorption changes and photocurrents associated with the decay of WT pigment's M form. However, CHD does not appear to affect the M decay in the D96N mutant.

Spectral and photopotential measurements indicate that the major result of the CHD modification, the slowing of the regeneration of the initial BR (M→BR transition), becomes even more pronounced in dry orderly oriented PM-films. This can be used to advantage in the fabrication of new BR-based bistable photochromic and photoelectrogenic materials for optics and microelectronics.