



УДК 541.144

ОБРАТИМЫЙ ФОТОИНДУЦИРОВАННЫЙ ГИДРОЛИЗ
АЛЬДИМИНА РЕТИНАЛЯ
В СОЛЮБИЛИЗИРОВАННОМ БАКТЕРИОРОДОПСИНЕ

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

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

Освещение активным светом ($\lambda > 530$ нм) солюбилизированного бактериородопсина, полученного действием на пурпурные мембраны из *Halobacterium halobium* 2% Тритона X-100, приводит к обратимому гидролитическому отщеплению ретиналя. Скорость и степень темновой рекомбинации бактериородопсина и ретиналя возрастают с уменьшением концентрации детергента и с ростом концентрации ретиналя в среде. Фотоиндуцированный обратимый гидролиз альдимида в бактериородопсине использован для частичной замены в препарате остатков связанного ретиналя на остатки 4-кеторетиналя. Отщепление ретиналя значительно ускоряется в присутствии реагентов, более нуклеофильных, чем вода, например гидроксилamina. Полученные данные позволяют рассматривать обратимое расщепление альдимида ретиналя как один из возможных путей возвращения в исходное состояние промежуточных форм фотохимического цикла бактериородопсина.

Среди известных ретинальсодержащих мембранных хромопротеидов наибольшее внимание исследователей привлекают зрительный пигмент позвоночных — родопсин и так называемый бактериородопсин из галофильного микроорганизма *Halobacterium halobium* [1—3]. В обоих этих хромопротеидах ретиналь образует протонированный альдимин с ϵ -аминогруппой одного из лизиновых остатков [4—5]. Освещение родопсина активным светом приводит к 11-цис- $\rightarrow$ 11-транс-изомеризации ретиналевого остатка и к последующему гидролизу альдимида, причем образующийся апобелок — опсин — способен рекомбинировать с 11-цис-ретиналем с образованием исходного родопсина. Свою способность к рекомбинации опсин сохраняет не только в мембранах, но и в солюбилизированном состоянии [6].

В отличие от родопсина бактериородопсин, находясь в составе бактериальной мембраны, при освещении не обнаруживает никаких признаков гидролитического отщепления ретиналя. Даже при длительном интенсивном освещении так называемых пурпурных мембран, в которых бактериородопсин является единственным белковым компонентом, полностью сохраняется характерная для них полоса поглощения при 570 нм, обусловленная специфически связанным ретиналем [1]. Вместе с тем известно, что в присутствии гидроксилamina, который как нуклеофильный агент значительно более активен, чем вода, и образует с ретиналем устойчивый оксим, бактериородопсин на свету, хотя и медленно, расщепляется, причем бактериородопсин, остающийся включенным в мембрану, способен рекомбинировать с ретиналем (как с 13-цис-, так и с полностью-транс-изомером) [7, 8]. Таким образом, бактериородопсин, как и родопсин, после поглощения кванта света переходит в состояние, в котором альдимин ретиналя атакуется нуклеофильным реагентом. Однако, находясь в этом состоянии,

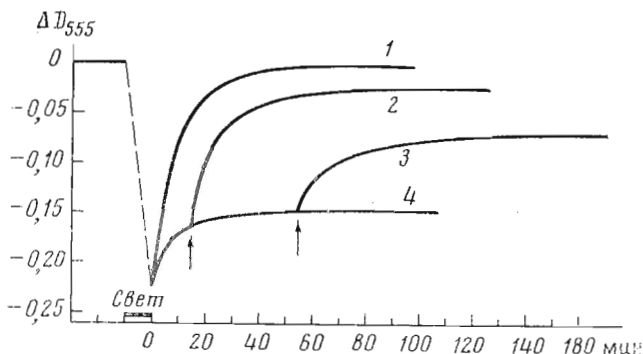


Рис. 1. Влияние добавок полностью-транс-ретинаяля на восстановление поглощения при 555 нм после освещения солюбилизованного бактериородопсина (концентрация Тритона X-100 0,1%; морфолиноэтансульфонатный буфер 0,01 М; pH 6,85; 23,5°; $D_{исх}$ 0,785). Время введения ретинаяля (5 моль на моль белка) указано стрелками. 1 — ретинаяль добавлен до освещения; 2, 3 — ретинаяль добавлен после освещения; 4 — ретинаяль не добавлен

бактериородопсин в отличие от родопсина может либо потерять ретинаяль при расщеплении альдимида, либо вернуться в исходное состояние в результате иного темнового перехода, протекающего без расщепления альдимида. Этот последний путь реализуется с большей вероятностью.

Нами показано, что у бактериородопсина вероятность фотоиндуцированного расщепления альдимида ретинаяля нуклеофильными реагентами, в том числе и водой, значительно возрастает, если пурпурные мембраны солюбилизовать неионным детергентом Тритон X-100 (2% вес/объем) в условиях, описанных в работе [9] (ср. также [10]).

В темноте такой солюбилизованный препарат вполне устойчив, и интенсивность присущей ему полосы поглощения ретиналевого хромофора при 555 нм в течение длительного времени остается неизменной (15—20°, pH 6—7). При облучении этого препарата актиничным светом ($\lambda > 530$ нм) наблюдается уменьшение полосы при 555 нм и рост широкой полосы в районе 400 нм. Если содержание детергента уменьшить разбавлением или пропусканием раствора через колонку с сефадексом G-50, то препарат приобретает способность частично восстанавливать утраченное при освещении поглощение при 555 нм (см. рис. 1, 4). Этот эффект не связан с фотохимическим циклом бактериородопсина. Действительно, хотя время жизни (τ_e) наиболее долгоживущей промежуточной формы этого цикла (формы М, согласно обозначениям, принятым в работе [11], которая обладает полосой поглощения при ~ 412 нм) при солюбилизации значительно возрастает, все же в интервале $5,5 < \text{pH} < 7,5$ при 20° оно не превышает 1 с*, тогда как у описываемого процесса τ_e измеряется минутами (см. рис. 1). С ростом концентрации детергента способность к восстановлению поглощения уменьшается, и в растворах, содержащих 1,5—2% Тритона X-100 (т. е. концентрации, используемые при солюбилизации мембран), оно почти незаметно.

Оказалось, что скорость и степень восстановления поглощения можно увеличить, вводя в среду 13-цис- или полностью-транс-ретинаяль в виде смешанных мицелл с Тритоном X-100. Наиболее эффективно введение ретинаяля до освещения; в этом случае при достаточно большом отношении ретинаяль/белок (тем больше, чем выше концентрация детергента) поглощение восстанавливается практически до исходного значения (см. рис. 1, 1). Можно вводить ретинаяль и после освещения, однако его действие проявляется тем слабее, чем более продолжительным было освещение и чем

* См. сообщение в следующем номере этого журнала.

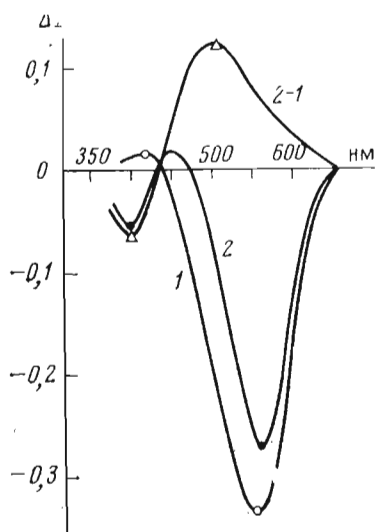


Рис. 2. Частичная замена остатков ретиналя в солюбилизованном бактериородопсине на остатки 4-кеторетиналя (концентрация Тритона X-100 0,2%; морфолинпропансульфонатный буфер 0,03 М; рН 7,2; 20°; $D_{555}^{исх}$ 0,75; 4-кеторетиналь (4 моль на моль белка) введен в раствор до облучения). Дифференциальные спектры, снятые против необлученного образца: 1 — непосредственно после 5 мин освещения лампой КГМ-30-300 через фильтр ОС-11 (2 мм); 2 — спустя 2,5 ч после освещения. Кривая 2-1 — вычисленная разность спектров 2 и 1

количествах лишь в условиях, когда фотохимический цикл осуществляется многократно. В самом деле, освещая солюбилизованный препарат одиночной вспышкой при рН 7—8,5, можно перевести в форму М не менее половины бактериородопсина. Однако после исчезновения этой формы, т. е. спустя несколько секунд, поглощение при 555 нм возвращается практически к исходному значению, отличаясь от него на доли процента. Лишь в более щелочной среде (рН 8,5—9,5), когда время жизни формы М возрастает до десятков секунд, освещение препарата одиночной вспышкой приводит к заметному необратимому уменьшению поглощения при 555 нм. Незначительная степень гидролиза альдимины после одиночной вспышки продолжительностью 3—5 мс может быть, вообще говоря, объяснена и тем, что этот гидролиз является непосредственным следствием поглощения кванта света не исходной формой бактериородопсина, а одной из промежуточных форм фотохимического цикла, возникающей спустя время, большее, чем продолжительность вспышки, и, таким образом, он представляет собой своего рода двухквантовый процесс. Против такого предположения, однако, свидетельствует то, что при непрерывном освещении степень гидролиза за данное время практически линейно зависит от интенсивности света (см. рис. 3) и, кроме того, одновременное облучение препарата и желтым, и синим светом, который поглощает форма М, не приводит к росту степени гидролиза.

больше интервал между выключением света и введением ретиналя (см. рис. 1, 2, 3).

Эти результаты можно объяснить, предположив, что освещение солюбилизованного бактериородопсина вызывает его гидролиз до ретиналя и бактериоопсина, причем последний оказывается способным к рекомбинации с ретиналем, однако лишь в течение некоторого определенного времени. Это явление можно использовать для замены в бактериородопсине остатка ретиналя на остатки его структурных аналогов. Так, при введении в среду *полностью-транс*-4-кеторетиналя после освещения и соответствующей выдержки мы обнаружили образование «4-кетобактериородопсина», обладающего полосой поглощения вблизи 510 нм (см. рис. 2). Ранее такой «4-кетобактериородопсин» был получен инкубацией с 4-кеторетиналем клеток *H. halobium*, у которых был ингибирован биосинтез ретиналя. При этом у мембран возникала полоса поглощения при 520 нм [12]. Если учесть, что солюбилизация неизменно приводит к небольшому гипсохромному сдвигу (ср. [9, 10]), совпадение максимумов λ наблюдаемых полос вполне удовлетворительно.

Итак, запуск фотохимического цикла в солюбилизованном бактериородопсине приводит к появлению такой формы белка, в которой альдимин ретиналя способен гидролизоваться. Этот гидролиз несомненно является побочным процессом, и его продукты накапливаются в заметных

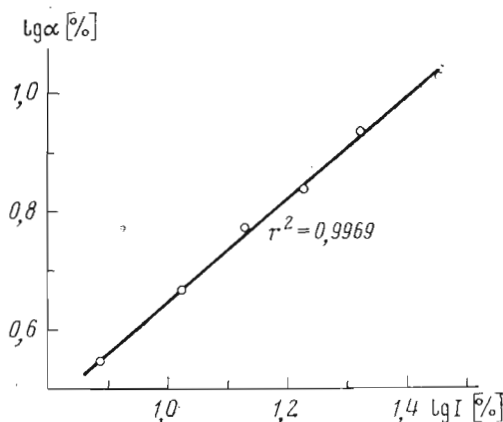


Рис. 3. Влияние интенсивности света на скорость обесцвечивания солюбилизованного бактериородопсина (концентрация Тритона X-100 2%; фосфатный буфер 0,01 М; pH 7,5; 25°; 2-минутное освещение лампой СВД-120А через фильтр ЖС-18 (2 мм); измерения при 555 нм; $\alpha = -\Delta D/D_{\text{исх}} \cdot 100\%$, где $D_{\text{исх}}$ 0,6). Исходная интенсивность света ($I = 100\%$) уменьшалась с помощью набора стеклянных фильтров НС (2 мм), коэффициент пропускания которых определялся при 555 нм. Наклон прямой составляет $0,932 \pm 0,025$

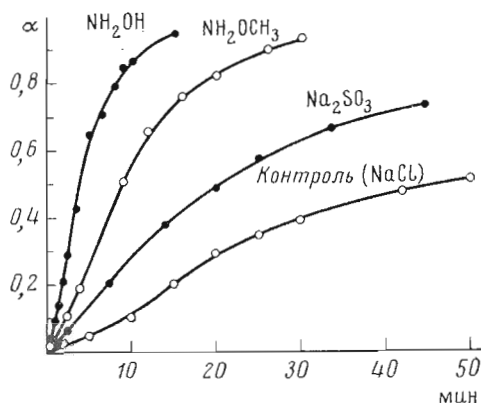


Рис. 4. Влияние нуклеофильных реагентов на индуцируемое светом обесцвечивание солюбилизованного бактериородопсина (концентрация Тритона X-100 0,4%; фосфатный буфер 0,01 М; Na-EDTA 0,01 М; pH 6,7; 20°; концентрация реагентов 0,09 М; освещение лампой СВД-120А через фильтр ЖС-18 (2 мм); измерения при 555 нм; $\alpha = -\Delta D/D_{\text{исх}}$, где $D_{\text{исх}}$ 0,9)

Несомненно, что именно гидролиз альдимида является стадией, определяющей скорость отщепления ретиналя. На это указывает значительное ускорение фотоиндуцированного выцветания солюбилизованного препарата, наблюдаемое в присутствии нуклеофильных агентов, более активных, чем вода, например гидроксиламина и его О-метильного производного (рис. 4). Такое ускорение не может быть вызвано только связыванием ретиналя в виде оксима и, следовательно, исключением рекомбинации, поскольку оно проявляется при временах облучения, существенно меньших τ_e рекомбинации. Таким образом, гидролизуемая форма бактериородопсина должна накапливаться при освещении.

Полученные результаты показывают, что одна из лабильных форм, возникающих при освещении солюбилизованного бактериородопсина,

может вернуться в исходное состояние в результате последовательно протекающих актов гидролитического расщепления и образования альдими-на ретиналя. Этот путь реализуется с малой вероятностью и с низкой скоростью. Возникает вопрос: не выступает ли при этом молекула воды как малоэффективный конкурент одной из нуклеофильных аминогрупп белка? Иными словами, не может ли обратимая миграция ретиналевого остатка между аминокруппами быть одним из элементов фотохимического цикла бактериородопсина? С другой стороны, существует несомненный параллелизм между фотоиндуцированным расщеплением альдими-на ретиналя при действии нуклеофильных реагентов на солюбилизованные и нативные мембраны. Поэтому нельзя исключить, что и гидролиз альдими-на ретиналя имеет место не только в солюбилизованных, но и в нативных мембранах, однако ускользает от наблюдения из-за того, что и скорость, и степень рекомбинации в этом случае гораздо выше. Наконец, нами было показано существование дискретных состояний бактериородопсина, различающихся кинетикой образования исходной формы из промежуточных лабильных форм фотохимического цикла (см. примечание на с. 355). Возможно, что гидролизу подвергается альдиминная группа только в одном из этих состояний белка.

Экспериментальная часть

Пурпурные мембраны, выделенные из клеток *H. halobium* штамма R₁ по методике, описанной в работе [1], солюбилизовали в 2% (вес/объем) растворе Тритона X-100 (Serva, ФРГ) в условиях, приведенных в работе [9] (инкубация не менее 6 ч при 20°; pH 6—7).

В работе использовали препараты солей марки ч. д. а. и дважды дистиллированную воду. Для приготовления буферных растворов применяли морфолиноэтансульфонат натрия и морфолинопропансульфонат натрия производства Serva (ФРГ).

Для непрерывного освещения препаратов использовали лампу накаливания с галогенным циклом КГМ-30-300 (300 Вт), снабженную фокусирующей системой и тепловым фильтром (5 см 5% раствора CuSO₄) или ртутную лампу СВД-120А (осветитель ОИ-18). Импульсное освещение производили лампой ИФК-120 (энергия разряда около 200 Дж), снабженной стеклянным тепловым фильтром. Для выделения нужной спектральной области использовали комбинацию стеклянных фильтров ЖС-12 (5 мм; со стороны лампы) и ЖС-18 (2 мм). Фильтры, использованные при непрерывном освещении, указаны в подписях к рисункам. Подсветку синим светом осуществляли осветителем ОИ-18 через узкополосный многослойный стеклянный фильтр (Carl Zeiss, ГДР), выделяющий линию Hg 405 нм. Световой адаптации солюбилизованных препаратов достигали их предварительным освещением 4—5 вспышками белого света. Спектральные измерения выполнены с помощью спектрофотометров Gilford 2400 и Beckman 25.

Для приготовления мицеллярных водных растворов ретиналей навеску альдегида в темноте растворяли в этаноле или свободном от перекисей диоксана (1 : 500), раствор упаривали досуха на ротаторном испарителе (15—20°), а остающуюся на стекле тонкую пленку при встряхивании растворяли в 2% водном растворе Тритона X-100 (1 : 100). Образцы кристаллических, хроматографически однородных 13-цис-, полностью-транс- и полностью-транс-4-кеторетиналя были любезно предоставлены Б. И. Мицнером (МИТХТ им. М. В. Ломоносова) и А. А. Димитровским (Институт биохимии им. А. Н. Баха), которым авторы выражают свою искреннюю благодарность.

Концентрацию Тритона X-100 в растворе определяли спектрофотометрически по поглощению при 280 нм. При этом поглощение коммерческого препарата принимали за 100%, а вклад поглощения белка не учитывали. Концентрацию бактериородопсина в солюбилизованных препаратах

также определяли спектрофотометрически по поглощению при 555 нм; мольный коэффициент поглощения принимали равным $6 \cdot 10^4$ моль⁻¹·см⁻¹ (ср. [3]).

ЛИТЕРАТУРА

1. Oesterhelt D., Stoeckenius W. (1971) *Nature New Biol.*, **233**, 149—152.
2. Oesterhelt D., Stoeckenius W. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 2853—2857.
3. Oesterhelt D. (1976) *Angew. Chem. (Internat. E)*, **15**, 17—24.
4. Lewis A., Spoonhower J., Bogomolni R. A., Lozier R. H., Stoeckenius W. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 4462—4466.
5. Bridgen J., Walker I. D. (1976) *Biochemistry*, **15**, 792—798.
6. Hong K., Hubbell W. L. (1973) *Biochemistry*, **12**, 4517—4523.
7. Oesterhelt D., Schuhmann L., Gruber H. (1974) *FEBS Lett.*, **44**, 257—261.
8. Oesterhelt D., Schuhmann L. (1974) *FEBS Lett.*, **44**, 262—265.
9. Heyn M. P., Bauer P.-J., Dencher N. A. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **67**, 897—903.
10. Kriebel A. N., Albrecht A. C. (1976) *J. Chem. Phys.*, **65**, 4575—4583.
11. Lozier R. H., Bogomolni R. A., Stoeckenius W. (1975) *Biophys. J.*, **15**, 955—962.
12. Sumper M., Herrmann G. (1976) *FEBS Lett.*, **69**, 149—152.

Поступила в редакцию
11.VIII.1977

REVERSIBLE PHOTOINDUCED HYDROLYSIS OF RETINAL ALDIMINE IN SOLUBILIZED BACTERIORHODOPSIN

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

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

Exposure to actinic light ($\lambda > 530$ nm) of Triton X-100 solubilized bacteriorhodopsin from *Halobacterium halobium* was found to result in a reversible hydrolysis of the retinal aldimine. Both the rate and extent of bacteriorhodopsin-retinal dark recombination increased when the detergent concentration was lowered and that of retinal raised. Photoinduced reversible cleavage of bacteriorhodopsin aldimine was utilized for partial exchange of the protein-bound retinal for 4-ketoretinal moiety. The nucleophiles more potent than water, e.g. hydroxylamine, were shown to accelerate considerably the retinal splitting off. It is supposed that reversible dissociation of the retinal aldimine is one of the possible relaxation modes for the reactive intermediates of the bacteriorhodopsin transition cycle triggered by light.
