



УДК 541.144

ЩЕЛОЧНАЯ ДЕНАТУРАЦИЯ БАКТЕРИОРОДОПСИНА
В ПУРПУРНЫХ МЕМБРАНАХ

Шкроб А. М., Родионов А. В.

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

Бактериородопсин в пурпурных мембранах из *Halobacterium halobium* в сильно-щелочной среде ($\text{pH} > 11,5$; 20°) подвергается денатурации, сопровождающейся исчезновением полосы поглощения при 570 нм. В денатурированном бактериородопсине в отличие от нативного наблюдается рН-зависимое ($7 < \text{pH} < 11$) равновесие образования альдимины ретиналя, а также равновесие его протонирования. Щелочная денатурация бактериородопсина в пурпурных мембранах включает по меньшей мере одну промежуточную стадию, на которой он сохраняет способность спонтанно ренатурировать в нейтральной среде. Мембраны, утратившие эту способность в ходе денатурации, быстро и практически полностью ренатируют в присутствии незначительного количества неионных детергентов (Тритон X-100, Твин 60). Анализ переходных спектральных изменений позволяет предположить, что щелочная денатурация бактериородопсина включает последовательно протекающие гидролиз и повторное образование альдимины ретиналя. Показано, что в щелочной среде причиной дестабилизации альдимины ретиналя в нативном бактериородопсине может служить его предполагаемая аномально высокая основность.

Бактериородопсин в пурпурных мембранах из *Halobacterium halobium* с увеличением рН претерпевает переход, который характеризуется появлением полосы при 460 нм в дифференциальных спектрах. Если при этом превысить некоторую пороговую степень превращения, начинается денатурация, скорость которой возрастает с увеличением рН*. В настоящей работе изложены результаты изучения механизма щелочной денатурации пурпурных мембран, свойств денатурированных мембран, а также условий, в которых они способны ренатурировать.

Щелочная денатурация пурпурных мембран при комнатной температуре обычно протекает при $\text{pH} > 11,5$. Ее наиболее характерные признаки — утрата мембранами присущей нативному бактериородопсину полосы поглощения при 570 нм и появление вместо нее широкой полосы в районе 360 нм. Нейтрализация суспензии денатурированных мембран не приводит к восстановлению поглощения при 570 нм, но сопровождается смещением коротковолновой полосы в область 390—410 нм. Подобные спектральные сдвиги наблюдаются и при повторных циклах подщелачивания и нейтрализации, причем они оказались характерными не только для мембран, подвергнутых щелочной денатурации, но и для денатурированных действием цетилтриметиламмония [1] или смешивающихся с водой органических растворителей, например этанола или диметилформамида [2] (в этом случае растворители предварительно удалялись диализом). Более детальное изучение рН-зависимых изменений спектра денатурированных мембран привело нас к выводу, что они обусловлены смещениями равновесий образования и протонирования альдимины ретиналя.

* См. сообщение в следующем номере этого журнала.

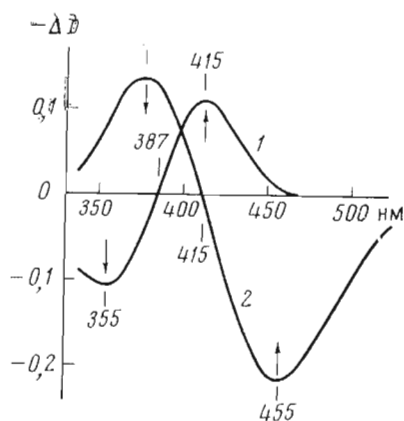


Рис. 1

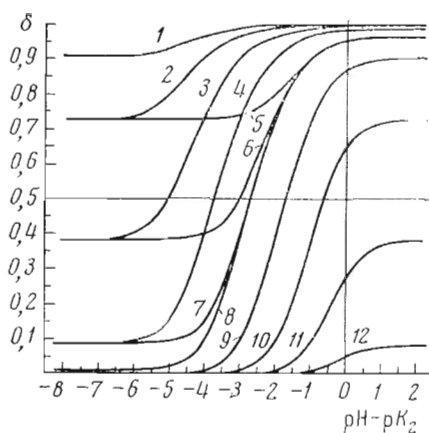


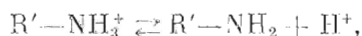
Рис. 2

Рис. 1. Образование и гидролиз альдимида ретиналя в денатурированных пурпурных мембранах. Дифференциальные спектры сняты против препарата при pH 6; направления изменений интенсивности полос указаны стрелками. Приведены спектры мембран, денатурированных при pH 8 добавлением 1,5% бромида цетилтриметиламмония (фосфат-боратный буфер 0,01 M; $D_{570}^{исх}$ 0,85). 1 — «щелочной» спектр, pH 6 → 10, снят после достижения равновесия; 2 — «кислотный» спектр, pH 10 → 6, снят непосредственно после подкисления. Положение в нм полос и изобестической точки в «щелочных» спектрах мембран, прошедших щелочную денатурацию: 362, 394, 430 (без поправок на светорассеяние), а в спектрах модельной мицеллярной системы: 352, 387, 417

Рис. 2. Теоретические кривые pH-зависимости равновесия образования альдиминов, полученные с помощью уравнения (6) для случая $K_2 < K_3$ ($\varphi = 1$). Для каждой кривой ниже указаны значения c_A^i/K_1 и K_3/K_2 : 1 — 10^7 , 10^5 ; 2 — 10^6 , 10^5 ; 3 — 10^5 , 10^5 ; 4 — 10^4 , 10^5 ; 5 — 10^3 , 10^2 ; 6 — 10^3 , 10^3 ; 7 — 10^3 , 10^4 ; 8 — 10^3 , 10^5 ; 9 — 10^2 , 10^5 ; 10 — 10^1 , 10^5 ; 11 — 10^0 , 10^5 ; 12 — 10^{-1} , 10^5

Если нейтрализованную суспензию денатурированных мембран подщелочить, то в разностном спектре быстро вырастают полосы при 355 и 415 нм. Если далее эту суспензию нейтрализовать, то разностный спектр сильно меняется: в нем появляются полосы при 380 и 455 нм, имеющие знаки, обратные соответственно коротковолновой и длинноволновой полосам «щелочного» спектра (см. рис. 1). Эти полосы быстро уменьшаются и через несколько минут полностью исчезают. Точно такие же спектральные переходы имеют место, если вместо денатурированных мембран использовать модельную систему, в которой ретиналь и октадециламин включены в мицеллы цетилтриметиламмония (ср. [3]). Несомненно, что в обоих случаях наблюдаемые эффекты обусловлены одними и теми же причинами.

Рассмотрим равновесия, связанные с реакцией альдегида и амина, приводящей к альдиминому:



Положения этих равновесий описываются совокупностью уравнений (1) — (5), где индексы при обозначениях концентраций (c) относятся к протонам (H), воде (w), альдегиду (A), протонированному (NH) и непротонированному (N) амину, протонированному (BH) и непротонированному (B) альдиминому; c_A^i и c_N^i — соответственно исходные концентрации альдегида

и амина, а K_1 , K_2 и K_3 — константы равновесия:

$$K_1 = K'_1 c_w = \frac{c_A c_N}{c_B}, \quad (1)$$

$$K_2 = \frac{c_N c_H}{c_{NH}}, \quad (2)$$

$$K_3 = \frac{c_B c_H}{c_{BH}}, \quad (3)$$

$$c_A + c_B + c_{BH} = c_A^t, \quad (4)$$

$$c_N + c_{NH} + c_B + c_{BH} = c_N^t = \varphi c_A^t. \quad (5)$$

Совместное решение этих уравнений приводит к уравнению

$$\beta = \frac{\delta}{(\varphi - \delta)(1 - \delta)} \cdot \frac{c_A^t K_2}{K_1 K_3} \cdot \frac{K_3 + c_H}{K_2 + c_H}, \quad (6)$$

где $\delta = (c_B + c_{BH})/c_A^t$ — доля альдегида, связанного в виде как протонированного, так и непротонированного альдимины. Поскольку обычно альдимины менее основны, чем образующие их амины, т. е. $K_2 < K_3$, при $pH < pK_3$ величина β (а следовательно, и δ) достигает предельного значения

$$\beta_{\text{кисл}} = \frac{c_A^t K_2}{K_1 K_3}.$$

При $pH > pK_2$ величина β также достигает предельного значения

$$\beta_{\text{щел}} = \frac{c_A^t}{K_1}.$$

В промежуточной области, при $pK_2 > pH > pK_3$, уравнение (6) упрощается до вида

$$\beta = \frac{c_A^t K_2}{K_1 c_H},$$

или, что то же,

$$\lg \frac{\beta}{\beta_{\text{щел}}} = pH - pK_2. \quad (7)$$

Таким образом, в координатах $\lg \beta$ — pH равновесия образования альдимины должно отображаться кривой, имеющей плато в области как малых, так и больших значений pH , между которыми заключен прямолинейный участок с наклоном, равным единице. Независимость β от pH на участках «кислого» и «щелочного» плато объясняется тем, что все молекулы амина и альдимины в первом случае протонированы, а во втором депротонированы.

Из уравнения (6) следует (см. рис. 2), что увеличение pH до значений, близких или превышающих pK_2 , должно привести к росту концентрации альдимины преимущественно в депротонированной форме. При последующем подкислении альдимин, накопившийся в щелочной среде, должен мгновенно протонироваться, а затем гидролизироваться до тех пор, пока его концентрация не уменьшится до равновесной. Именно этими переходами и объясняются описанные выше спектральные изменения. На примере модельной системы и мембран, денатурированных действием цетилтриметиламмония, показано, что равновесие образования альдимины ретиналя в щелочной среде хорошо описывается уравнениями (6) и (7) (см. рис. 3).

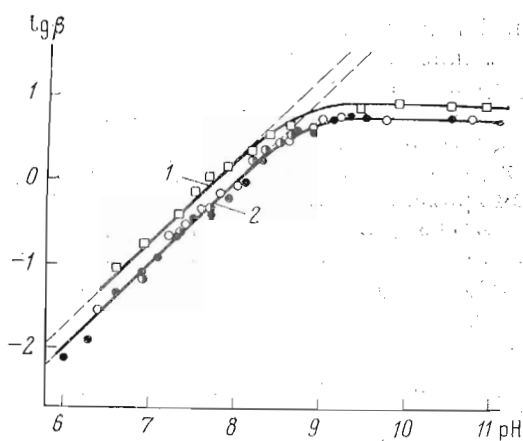


Рис. 3

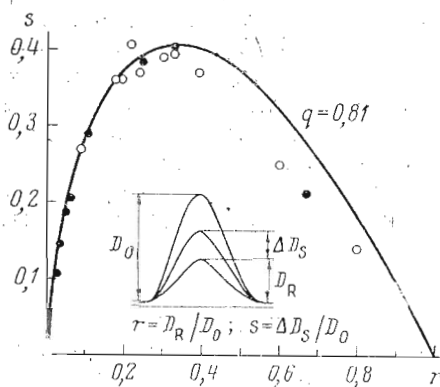


Рис. 4

Рис. 3. pH-Зависимости параметра β для модельной мицеллярной системы и пурпурных мембран, денатурированных действием цетилтриметиламмония (условия см. подпись к рис. 1). Величина δ принималась равной отношению равновесной амплитуды коротковолновой полосы «щелочного» спектра к максимальной амплитуде этой полосы, D_M . Значение D_M получено для модельной системы экспериментально при pH 10,5 в присутствии большого избытка октадециламина (5 моль на моль ретиналя), а для денатурированных мембран оно вычислялось, исходя из D_M для модельной системы и известного количества ретиналя в препарате мембран. Штриховые линии имеют наклон, равный единице. В скобках ниже приведены значения pK_2 , вычисленные с помощью уравнения (7). 1 — модельная система ($8,9 \pm 0,2$); 2 — денатурированные мембраны; данные трех опытов ($9,0 \pm 0,1$); вычислено в предположении, что $\phi = 1$

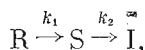
Рис. 4. Ренатурация бактериородопсина в пурпурных мембранах, частично денатурированных при pH 11,5—12 (20°). Мембраны суспендировали в 2,5 M NaCl (○) или в 50% водном глицерине (●), содержавших 0,01 M Na-EDTA. Денатурация (30 с — 30 мин) прерывалась подкислением до pH 6. Измерения ΔD_S производили через 48 ч после подкисления. Теоретическая кривая вычислена с помощью уравнений (10) и (11)

В случае мембран, подвергнутых щелочной денатурации, количественные оценки затруднены pH-зависимыми изменениями светорассеяния суспензии.

Таким образом, нативные и денатурированные мембраны существенно различаются свойствами альдиминов ретиналя в молекулах бактериородопсина. В денатурированных мембранах альдимин подобен альдими-нам, образуемым ретиналем с обычными алифатическими аминами. Этот альдимин безусловно менее основен, чем образующая его аминогруппа, поскольку его содержание возрастает с увеличением pH. При изменении pH в диапазоне 5—8 он обратно протонируется. Что же касается нативных мембран, то в них при $5 < \text{pH} < 11$ равновесия (1) и (3) полностью сдвинуты в сторону образования протонированного альдими-на [4]. В этом случае депротонирование альдими-на удастся наблюдать только как одну из стадий фотохимического цикла.

Если щелочную денатурацию пурпурных мембран прервать до ее завершения, нейтрализуя суспензию добавкой кислоты, то часть бактериородопсина мгновенно возвращается в исходное состояние из формы D460, а возможно, и из других равновесных форм, поглощающих в коротковолновой области, которые образуются в ходе денатурации. В спектре такого препарата присутствуют две полосы: одна, характерная для нативного бактериородопсина, при 570 нм и другая, широкая, в области 400 нм. С течением времени амплитуда коротковолновой полосы падает, а длинноволновой возрастает. Этот процесс, который далее мы будем называть ренатурацией, состоит из двух фаз, из которых более быстрая заканчивается примерно через 2 сут, а медленная растягивается на несколько месяцев.

Долю бактериородопсина, который непосредственно после подкисления оказывается в нативной форме, можно выразить в виде $r = D_R/D_0$, а долю бактериородопсина, ренатурировавшего в ходе быстрой фазы, — как $s = \Delta D_S/D_0$, где D_0 и D_R — соответственно амплитуды полосы при 570 нм до подщелачивания и непосредственно после подкисления, ΔD_S — прирост амплитуды этой полосы в ходе быстрой фазы ренатурации (см. рис. 4). Оказалось, что с увеличением времени денатурации, т. е. с уменьшением r , величина s проходит через максимум. Это позволяет предположить, что денатурация представляет собой процесс, включающий по меньшей мере две стадии, и может быть в первом приближении описана схемой



где R — исходная форма бактериородопсина или другая форма, находящаяся с ней в мгновенно устанавливаемом равновесии; S — промежуточный продукт денатурации, способный к спонтанной ренатурации; I — конечные продукты денатурации, неспособные ренатурировать и/или ренатурирующие очень медленно. Переходы $R \rightarrow S$ и $S \rightarrow I$ рассматриваются как реакции первого порядка, которым отвечают константы скоростей k_1 и k_2 .

В рамках этой схемы значения r и s приобретают смысл относительных количеств соответствующих форм в момент прерывания денатурации. Используя уравнения (8) и (9), известные из теории мономолекулярных консекutивных реакций (см., например, [5]), можно независимо оценить величину отношения констант скоростей $q = k_1/k_2$ из значений $r_{\text{макс}}$ и $s_{\text{макс}}$, отвечающих максимальной доле ренатурировавшего бактериородопсина:

$$s_{\text{макс}} = \frac{1}{1-q} \cdot \left(q^{\frac{q}{1-q}} - q^{\frac{1}{1-q}} \right), \quad (8)$$

$$r_{\text{макс}} = q^{\frac{q}{1-q}}. \quad (9)$$

Найденные таким образом значения q составляют соответственно 0,81 и 0,79, т. е. весьма близки между собой. Вычисленное значение q можно далее использовать для расчета величин $s_{\bar{\tau}}$ и $r_{\bar{\tau}}$, отвечающих произвольному моменту денатурации, определяемому как $\bar{\tau} = \tau/\tau_1$, где τ — реальное время денатурации, а $\tau_1 = 1/k_1$. Результаты этих вычислений, выполненных с помощью уравнений (10) и (11) при $q = 0,81$, представлены на рис. 4.

$$s_{\bar{\tau}}/r_{\bar{\tau}} = \frac{1}{1-q} \cdot (e^{(1-q)\bar{\tau}} - 1), \quad (10)$$

$$r_{\bar{\tau}} = e^{-\bar{\tau}}. \quad (11)$$

Легко видеть, что теоретическая и экспериментальная зависимости качественно сходны, хотя в области малых и больших значений r вычисленные величины s заметно больше опытных. Скорее всего, эти расхождения возникают как следствие простоты принятой кинетической схемы, а также трудностей при измерении малых значений r и s . Таким образом, полученные результаты согласуются с гипотезой о существовании промежуточных форм при щелочной денатурации бактериородопсина.

Для того чтобы локализовать область поглощения промежуточных продуктов денатурации бактериородопсина, мы исследовали в темновых условиях денатурационные изменения оптической плотности в разных участках спектра. Поскольку в ходе денатурации эти продукты должны сначала накапливаться, а затем исчезать, их вклад в оптическую плотность проходит через максимум, тогда как вклады конечного продукта и нативной формы будут соответственно монотонно возрастать и умень-

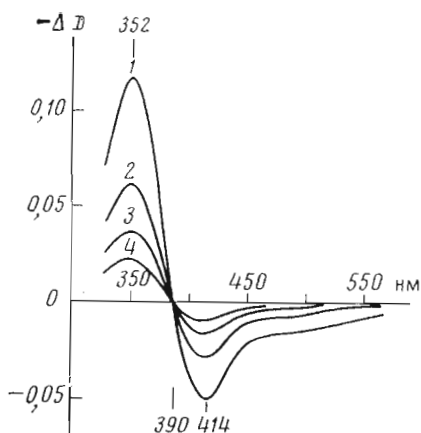


Рис. 5

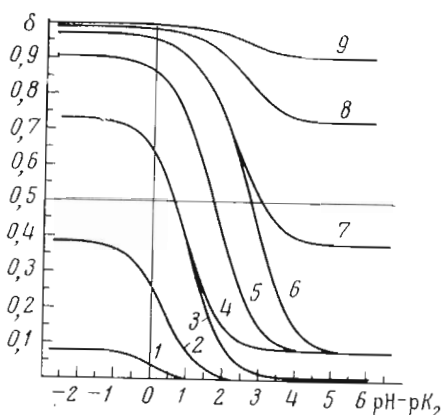


Рис. 6

Рис. 5. Переходные изменения спектра при щелочной денатурации бактериородопсина в пурпурных мембранах. Разностные спектры сняты после подщелачивания до pH 11,6 суспензии мембран в растворе 2,7 M NaCl (20°; $D_{570}^{\text{исх.}}$ 0,6) против суспензии полностью денатурированных мембран при pH 11,6. Начало съемки спектра 1 — ~ 1 мин после подщелачивания; спектры 1 — 4 сняты с интервалом 2 мин. Время съемки спектра 2 мин

Рис. 6. Теоретические кривые pH-зависимости равновесия образования альдиминов, полученные с помощью уравнения (6) для случая $K_2 > K_3$ ($\varphi = 1$). Для каждой кривой ниже указаны значения c_A^t/K_1 и K_3/K_2 : 1 — 10^{-4} , 10^{-3} ; 2 — 10^{-3} , 10^{-3} ; 3 — 10^{-2} , 10^{-3} ; 4 — 10^{-1} , 10^{-2} ; 5 — 10^{-1} , 10^{-3} ; 6 — 10^{-1} , 10^{-4} ; 7 — 10^0 , 10^{-3} ; 8 — 10^1 , 10^{-3} ; 9 — 10^2 , 10^{-3}

шаться. Оказалось, что такой максимум наблюдается только на одном участке спектра — в области 415—420 нм — и достигается спустя 1—2 мин после начала денатурации. Спектральные изменения, которые можно связать с исчезновением соответствующего промежуточного продукта, более детально были прослежены в следующем эксперименте. После подщелачивания суспензии пурпурных мембран до pH, при котором происходит денатурация, была снята серия разностных спектров против суспензии ранее денатурированных мембран, имеющей тот же pH (см. рис. 5). Оказалось, что эти спектры зеркально подобны «щелочным» спектрам, отражающим образование альдими́на ретиналя, т. е. у них совпадают положения максимумов и изобестической точки, тогда как знаки полос противоположны (ср. рис. 1). Амплитуда наблюдаемых полос быстро уменьшается, и вскоре они исчезают. Таким образом, по направлению изменений эти спектры также подобны «щелочным» спектрам. Эти данные позволяют предположить, что в обоих случаях имеет место один и тот же процесс, а именно образование альдими́на ретиналя (что касается различия в соотношении амплитуд коротковолновой и длинноволновой полос на рис. 1 и 5, то оно объясняется быстрым уменьшением амплитуды полос при денатурации, так как сканирование производилось от малых к большим длинам волн). Отсюда следует, что вскоре после подщелачивания альдимин ретиналя в бактериородопсине оказывается гидролизованым и в мембранах накапливается не связанный ковалентно ретиналь, который далее вновь образует альдимин.

На первый взгляд подобное предположение противоречит сказанному выше об увеличении устойчивости альдиминов с ростом pH. Одно из возможных объяснений заключается в том, что в этих условиях бактериородопсин претерпевает такой конформационный переход, при котором резко возрастает величина кажущейся константы гидролиза альдиминной связи K_1 , например в результате экспонирования последней в водную фа-

зу. Привлекательно, однако, интерпретировать это явление несколько иначе, сопоставив его с отмеченной выше способностью альдими́на ретиналя в нативном бактериородопсине оставаться протонированным вплоть до очень высоких рН.

Анализ уравнения (6) показывает, что в случае, когда альдимины более основны, чем образующие их амины ($K_2 > K_3$), устойчивость альдимина при подщелачивании мало изменяется вплоть до области, прилегающей к pK_3 , где они в той или иной мере дестабилизируются (см. рис. 6). Эта дестабилизация выражена тем сильнее, чем больше K_1 и чем меньше K_3/K_2 , поскольку при больших значениях K_1 устойчивость альдимина обеспечивается только их преимущественным протонированием по сравнению с аминогруппой. Таким образом, дестабилизация альдимина в этом случае может быть обусловлена не только ростом K_1 , но также депротонированием альдими́на при увеличении рН. Заметим, что депротонирование альдими́на, приводящее к его дестабилизации, может иметь своей причиной не только рост рН, но и уменьшение основности альдими́на (т. е. рост K_3) вследствие конформационных перестроек и т. п. Такого рода дестабилизация возможна при любом соотношении K_2 и K_3 . Следует также отметить, что даже незначительное уменьшение равновесного значения δ может привести к полному гидролизу альдими́на, если образующийся апобелок вскоре утрачивает способность к быстрой рекомбинации с ретиналем, приводящей к нативному бактериородопсину (ср. [6]).

Итак, уже в первые минуты после начала денатурации в бактериородопсине, по-видимому, происходит образование «нового» альдими́на ретиналя, возможно уже с другой аминогруппой. Мы полагаем, что в ходе денатурации либо бактериородопсин, содержащий «новый» альдимин, либо апобелок — бактериоопсин — претерпевают серию последовательных конформационных переходов, на каждом из которых уменьшается скорость возвращения в исходное состояние в условиях денатурации. Один из таких переходов протекает особенно медленно, и именно он в рамках рассмотренной выше кинетической схемы воспринимается как переход $S \rightarrow I$. В пользу такой точки зрения свидетельствует то, что τ_0 быстрой фазы ренатурации (~ 15 ч) значительно больше τ_0 образования альдимина в модельной системе или в денатурированных мембранах (5—30 мин) и, следовательно, стадией, определяющей скорость ренатурации, скорее всего является не собственно образование альдими́на, т. е. реакция ретиналя с аминогруппой, а некая перестройка белковой молекулы или ее комплекса с ретиналем.

Если в ходе денатурации скорость такого рода перестроек резко уменьшается, то ренатурация блокируется; иными словами, образуется форма I. Нам, однако, удалось найти катализаторы, значительно ускоряющие ренатурацию и вовлекающие в этот процесс даже форму I. Оказалось, что введение в среду после щелочной денатурации пурпурных мембран и последующей нейтрализации малого количества (~ 10 моль на моль бактериородопсина) таких неионных детергентов, как Тригон X-100 или Твин 60, значительно увеличивает и скорость, и степень ренатурации мембран, делая ее практически полной. При этом несущественно, вводится ли детергент сразу после нейтрализации или же после завершения быстрой фазы ренатурации. Нет никаких признаков того, что в таких малых концентрациях детергенты вызывают фрагментацию мембран или нарушают в них упаковку молекул белка; в частности, светорассеяние суспензии после их введения изменяется очень незначительно, равно как и характерный для тримеров бактериородопсина КД-спектр, который практически совпадает у исходных и ренатурированных мембран.

Можно предположить, что переход в нативную форму включает такие перестройки молекул белка и/или их упаковки в мембране, которые требуют промежуточного контакта с водной фазой достаточно обширных

гидрофобных участков. Обратимо адсорбируясь на этих участках, детергенты могут служить своеобразными катализаторами подобных перестроек.

В какой мере сделанное выше предположение об аномально высокой основности альдими́на ретиналя в бактериородопсине согласуется с современными представлениями о строении и функционировании этого белка? Во-первых, одной из наиболее вероятных причин увеличения pK_3 в бактериородопсине является взаимодействие протонированного альдими́на с близкорасположенным анионным центром. Между тем гипотеза о существовании такого анионного центра в ретинальсодержащих белках выдвигалась и ранее, исходя из совершенно иных соображений, а именно в попытках объяснить необычные спектральные характеристики ретиналевого хромофора (см. [7, 8] и цитированные там работы). Во-вторых, составным элементом транспортного фотохимического цикла бактериородопсина, который функционирует в мембране в качестве светозависимого протонного насоса, является перенос протона из водной фазы к депротонированному альдими́ну ретиналя [9, 10]. Такой перенос протона, по-видимому, осуществляется в результате его эстафетной передачи по цепочке протонируемых групп. Ясно, что в этом случае для эффективного переноса необходимо, чтобы альдиминная группа, являющаяся акцептором протона, была предпочтительно более основна, чем группа— донор протона. Поскольку фотохимический цикл осуществляется в бактериородопсине и в щелочной среде [10], вероятными кандидатами в доноры протона являются ϵ -аминогруппы лизиновых и оксигруппы тирозиновых остатков. Поэтому есть основания полагать, что по своей основности альдимин ретиналя должен если не превосходить эти группировки, то быть сравнимым с ними. Таким образом, существуют и другие, независимые аргументы в пользу гипотезы о высокой основности альдими́на ретиналя в бактериородопсине, и задача теперь заключается в том, чтобы проверить ее наиболее прямым методом.

Авторы глубоко благодарны акад. Ю. А. Овчинникову за помощь и советы, полученные ими при выполнении и обсуждении этой работы.

Экспериментальная часть

Пурпурные мембраны были выделены из клеток *Halobacterium halobium* штамма R_1 по методике, описанной в работе [1]. В отдельных опытах использовали лиофильно высушенные мембраны, устойчивые суспензии которых приготавливали по методике, разработанной нами. Концентрацию бактериородопсина в суспензиях пурпурных мембран определяли спектрофотометрически после их адаптации к свету (5-мин освещение лампой КГМ-30-300 (300 Вт) через тепловой фильтр (5 см 5% раствора CuSO_4) и стеклянный фильтр ЖС-18 (5 мм)). Молярный коэффициент поглощения при 570 нм принимали равным $6,3 \cdot 10^4$ моль $^{-1}$ ·см $^{-1}$ [2].

Спектральные измерения производили на спектрофотометрах Gilford 2400 (США) и Specord UV-VIS (Carl Zeiss, ГДР). В последнем случае полученные спектры трансформировали в использованную на рисунках систему координат с одновременной коррекцией нулевой линии и учетом калибровочной кривой прибора с помощью специально разработанной программы на ЭВМ Hewlett-Packard 9830/9862/9864 (США). В работе использовался также автотитратор Radiometer TTT-2/ABU-13/TTA-31 (Дания).

Для приготовления растворов использовали соли марки ч.д.а. и дважды дистиллированную воду. Без дополнительной очистки применяли препараты октадециламина (Chemapol, ЧССР), бромада цетилтриметиламмония (Merck, ФРГ), этилендиаминтетрауксусной кислоты (Serva, ФРГ), Тритона X-100 (Sigma, США) и Твина 60 (Serva, ФРГ). Образец *полностью-транс*-ретиналя в виде кристаллического комплекса с гидрохиноном был любезно предоставлен нам проф. Г. И. Самохваловым

(ВНИВИ). Состав использованных растворов приведен в подписях к рисункам.

Приготовление модельной мицеллярной системы. Навеску комплекса ретиналя с гидрохиноном (~ 50 мг) при 0° встряхивали в делительной воронке с 20 мл свободного от перекисей эфира и 5 мл 1 н. NaOH. Эфирный слой многократно промывали водой до исчезновения щелочной реакции. К 2% (вес/объем) раствору бромида цетилтриметиламмония, содержащему 0,05 М фосфатный буфер (pH 6,5) и 0,1 М NaCl, прибавляли расчетный объем $5 \cdot 10^{-4}$ М раствора хлоргидрата октадециламина. В различных опытах концентрация октадециламина после смешения составляла $(1-5) \cdot 10^{-5}$ М. Аликвоту эфирного раствора ретиналя упаривали досуха на роторном испарителе ($15-20^\circ$) и остаток, который тонкой пленкой покрывал стенки колбы, растворяли при встряхивании в ранее приготовленном растворе, содержащем октадециламин и цетилтриметиламмоний. Концентрацию ретиналя в мицеллярных растворах определяли спектрофотометрически, согласно работе [3]. Обычно готовили растворы, содержащие ретиналь и октадециламин примерно в равных концентрациях ($\varphi \approx 1$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Oesterhelt D., Stoeckenius W. (1971) *Nature New Biol.*, **233**, 149—152.
2. Oesterhelt D., Meentzen M., Schuhmann L. (1973) *Europ. J. Biochem.*, **40**, 453—462.
3. De Pont J. J. H. M., Daemen F. J. M., Bonting S. L. (1970) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **140**, 267—274.
4. Lewis A., Spoonhower J., Bogomolni R. A., Lozier R. H., Stoeckenius W. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 4462—4466.
5. Еремин Е. Н. (1976) Основы химической кинетики, с. 52—58, «Высшая школа», М.
6. Шкроб А. М., Родионов А. В., Овчинников Ю. А. (1978) *Биоорганическая химия*, **4**, 354—359.
7. Komarov V. M., Kayushin L. P. (1975) *Studia biophys.*, **52**, 107—140.
8. Honig B., Greenberg A. D., Dinur U., Ebrey T. G. (1976) *Biochemistry*, **15**, 4593—4599.
9. Oesterhelt D. (1976) *Angew. Chem. (Intern. Ed.)*, **15**, 17—24.
10. Lozier R. H., Bogomolni R. A., Stoeckenius W. (1975) *Biophys. J.*, **15**, 955—962

Поступила в редакцию,
11.VIII.1977

ALKALI-INDUCED DENATURATION OF BACTERIORHODOPSIN IN THE PURPLE MEMBRANES

SHKROB A. M., RODIONOV A. V.

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

Bacteriorhodopsin in the purple membranes from *Halobacterium halobium* undergoes denaturation in strongly alkaline media (pH > 11.5 , 20°) which is accompanied by disappearance of the absorption band at 570 nm. With denaturated bacteriorhodopsin, contrary to the native form, the pH-dependent ($7 < \text{pH} < 11$) equilibrium is observed for retinal aldimine formation as well as for protonation of the latter. Alkaline denaturation of bacteriorhodopsin in the purple membranes involves at least one stage at which the membranes retain a capability for being renatured in neutral medium (pH 6-7). On the other hand, fully denatured membranes may be quickly and quantitatively restored in the presence of negligible amounts of such non-ionic detergents as Triton X-100 or Tween 60. The analysis of transient spectral changes suggests that the bacteriorhodopsin alkaline denaturation proceeds via the retinal aldimine hydrolysis and its consecutive reformation. Abnormally high basicity of the retinal aldimine in bacteriorhodopsin is invoked to rationalize a destabilization of this grouping in alkaline media.