



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 4 * № 4 * 1978

УДК 541.144

МНОЖЕСТВЕННОСТЬ ФОРМ РЕЛАКСИРУЮЩИХ МОЛЕКУЛ БАКТЕРИОРОДОПСИНА

Шкроб А. М., Родионов А. В.

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

В диапазоне $1 \text{ с} < \tau_e < 5 \cdot 10^2 \text{ с}$ исследованы релаксационные изменения оптической плотности, наблюдаемые после освещения одиночными вспышками ($\sim 2 \text{ мс}$) супензий пурпурных мембран из *Halobacterium halobium* ($8,5 < \text{рН} < 11$), а также полученных из них солюбилизованных препаратов бактериородопсина ($7 < \text{рН} < 9,5$). Анализ релаксационных кривых приводит к выводу о существовании нескольких форм бактериородопсина, имеющих полосу поглощения вблизи 410 нм, которые различаются константами скорости возвращения в исходное состояние. Изучены особенности цистранс-изомеризации ретиналевых остатков в солюбилизированном бактериородопсине и специфическое взаимодействие последнего с некоторыми многозарядными катионами.

Как известно, мембранный ретинальсодержащий хромопротеид бактериородопсин выполняет в клетках *Halobacterium halobium* функцию светозависимого протонного насоса [1—4]. В молекуле бактериородопсина ретиналь образует протонированный альдимин с ε -аминогруппой одного из лизиновых остатков. Когда квант света поглощается ретиналевым хромофором, это приводит к циклическому процессу, включающему, с одной стороны, последовательно протекающие депротонирование и протонирование альдимина, а с другой — выброс протона из молекулы белка и его последующее поглощение из среды. Альдимин ретиналя в бактериородопсине депротонирован в одном из наиболее долгоживущих промежуточных продуктов фотохимического цикла — в так называемой форме *M*, полоса поглощения которой расположена вблизи 410 нм [4, 5].

Переход бактериородопсина из формы *M* в исходное состояние заведомо не является одностадийным процессом. В частности, этот переход включает по меньшей мере два события: протонирование альдимина ретиналя и связывание протона из внешней среды. Если существуют группы, являющиеся посредниками при переносе протона из среды к альдимину, то эти события не происходят одновременно. В данном случае скорость протонирования альдимина в форме *M* зависит от степени протонирования группы, непосредственно передающей ему протон. Если же таких посредников нет, то скорость протонирования прямо зависит от активности протонов в среде. Нельзя также исключить, что собственно протонирование альдимина сцеплено с конформационным переходом в белке и скорость этих сопряженных процессов изменяется в зависимости от того, протонированы или нет определенные функциональные группы, возможно даже не участвующие в переносе протона к альдимину. Таким образом, изучение влияния рН на кинетику исчезновения формы *M* может дать

важные сведения о молекулярном механизме фотохимического цикла бактериородопсина и сопряженного с ним трансмембранный переноса протона. Особый интерес в этой связи представляет область высоких значений рН, где именно протонирование альдимина может оказаться стадией, лимитирующей скорость суммарного процесса возвращения бактериородопсина из формы M в исходное состояние (ср. [6, 7]).

Поскольку протонирование альдимина ретиналя в бактериородопсине сильно сказывается на положении и амплитуде его полосы поглощения, превращения формы M удобно прослеживать по изменению оптической плотности препаратов после их освещения одиночными вспышками актиничного света. В данной работе все эксперименты выполнены в условиях насыщающего освещения, так что изменение интенсивности вспышки в 1,5–2 раза практически не сказывалось на полученных результатах. Использованная аппаратура не позволяла наблюдать процессы, имеющие $\tau_e < 1$ с.

Рассмотрим вначале результаты изучения бактериородопсина, находящегося в составе пурпурных мембран, где он присутствует в виде тримеров, упакованных в двумерную гексагональную решетку [8]. Анализ кривых изменения оптической плотности при 410 и 570 нм, полученных после освещения пурпурных мембран в щелочной среде, показал, что эти кривые не могут быть описаны экспоненциальной зависимостью. Они, однако, хорошо аппроксимируются суммой трех экспонент, причем ошибка аппроксимации на начальных участках не превосходит 2%, а на конечных — 5%. Поскольку τ_e , характеризующие эти экспоненты, не зависят от длины волны зондирующего луча, в качестве рабочей гипотезы можно принять, что найденный тип эмпирического уравнения имеет определенный физический смысл, а именно отражает параллельное протекание трех независимых процессов, подчиняющихся кинетике реакций первого порядка. Далее будет показано, что эта гипотеза не сталкивается с противоречиями при интерпретации полученных данных, однако окончательное ее подтверждение безусловно требует дальнейших исследований с применением независимых методов.

Из представленных на рис. 1 и 2 рН зависимостей $\lg \tau_e$ каждого из трех процессов видно, что в интервале более двух единиц рН скорости самого быстрого и самого медленного из них линейно зависят от активности протонов, тогда как наклон кривых, отвечающих процессу, занимающему по скорости промежуточное положение, лишь незначительно меньше единицы. Таким образом, эти процессы можно рассматривать либо как реакции связывания протонов, каждая из которых имеет собственную константу скорости, практически не зависящую от рН, либо как мономолекулярные реакции, кажущиеся константы скорости которых зависят от рН, например, отражая степень диссоциации функционально важной группы вдали от значения ее рК. В любом случае отсюда следует, что бактериородопсин после вспышки может находиться в трех дискретных состояниях, которые в порядке увеличения времени их жизни называются формами *A*, *B* и *C*.

Вклады, вносимые формами *A*, *B* и *C* в суммарное изменение оптической плотности, оценивались экстраполяцией соответствующих компонент кинетических кривых к нулевому времени, т. е. к моменту вспышки, и выражались в виде доли от исходного поглощения при 585 нм (при этой длине волны изменения оптической плотности максимальны). Используя данные об этих вкладах, полученные при разных длинах волн зондирующего луча, можно построить кривые, эквивалентные дифференциальным спектрам, полученным в момент наибольшего содержания форм *B* и *C*. На рис. 3 и 4 видно, что спектр, отвечающий форме *B*, практически совпадает со спектрами, известными для формы *M* (ср. [9, 10]), тогда как спектр формы *C* отличается от них как положением изобистической точки, так и структурой коротковолновой полосы. Вид полученных спектров

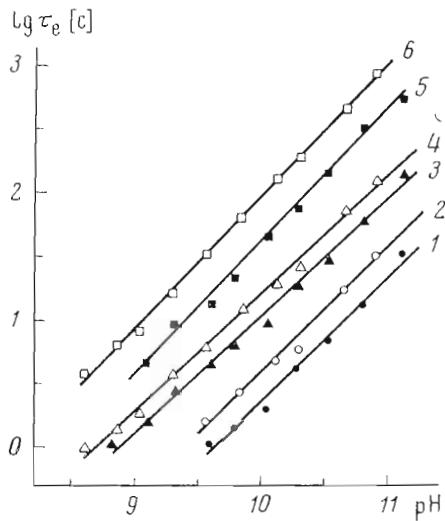


Рис. 1

Рис. 1. pH-Зависимости τ_e релаксационных переходов в пурпурных мембранах, суспендированных в растворе 2,5 М NaCl (0,04 М фосфат-боратный буфер; белые вспышки; измерения при 585 нм). В скобках ниже приведены наклоны кривых и τ_e в мс ($\pm 0,3$ мс), вычисленные экстраполяцией для pH 7. Переход A: 1 — 15° ($0,985 \pm 0,050$; 2,5); 2 — $5,5^\circ$ ($0,994 \pm 0,055$; 4,0). Переход B: 3 — 15° ($0,925 \pm 0,030$; 18,0); 4 — $5,5^\circ$ ($0,927 \pm 0,025$; 27,8). Переход C: 5 — 15° ($1,050 \pm 0,030$; 29,5); 6 — $5,5^\circ$ ($1,040 \pm 0,015$; 74,0). Энергии активации переходов в интервале 2—20° в ккал/моль ($\pm 0,7$ ккал/моль): A — 13,1; B — 12,8; C — 16,2

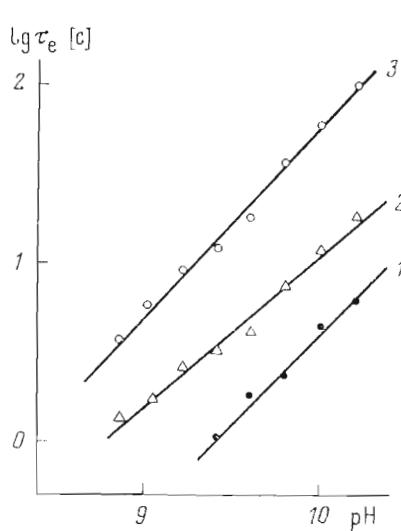


Рис. 2

Рис. 2. pH-Зависимости τ_e релаксационных переходов в пурпурных мембранах, суспендированных в 50% водном глицерине при 15° (0,01 М фосфатный буфер; 0,01 М Na-EDTA; белые вспышки; измерения при 585 нм). В скобках ниже приведены наклоны кривых и τ_e в мс ($\pm 0,3$ мс), вычисленные экстраполяцией для pH 7: 1 — переход A ($1,030 \pm 0,070$; 0,3); 2 — переход B ($0,855 \pm 0,070$; 4,3); 3 — переход C ($1,085 \pm 0,040$; 2,7)

одинаков при использовании в качестве среды 50%-ного водного глицерина и раствора 2,5 М NaCl. Что касается формы A, то построение ее полного спектра сопряжено в данных опыта со значительными техническими трудностями, и пока можно только утверждать, что по положению максимумов полос и изобesticкой точки он близок к спектру формы B. Длинноволновые максимумы на всех спектральных кривых расположены вблизи 585 нм. Похоже, что формы A и B представляют собой разновидности формы M, различающиеся временами жизни (ср. [11, 12]), тогда как форма C, судя по спектру, является ранее неизвестным промежуточным продуктом фотохимического цикла бактериородопсина.

pH-Зависимости вкладов форм A, B и C при 585 нм были определены для пурпурных мембран, суспендированных в растворе 2,5 М NaCl, поскольку в этой среде подщелачивание до pH 10,5—11 еще не сопровождается в заметной степени переходом в состояние D460*. Эти вклады отражают долю бактериородопсина, превращенного в соответствующую форму. На рис. 5 видно, что с ростом pH вклады форм A и B проходят соответственно через максимум и минимум, оба расположенные вблизи pH 9,8, в то время как вклад формы C монотонно увеличивается. В диапазоне $9,6 < \text{pH} < 11$, где можно было определить вклады всех трех форм, их сумма практически постоянна, несмотря на то что сами вклады изменяются в широких пределах.

* См. сообщение в одном из следующих номеров этого журнала.

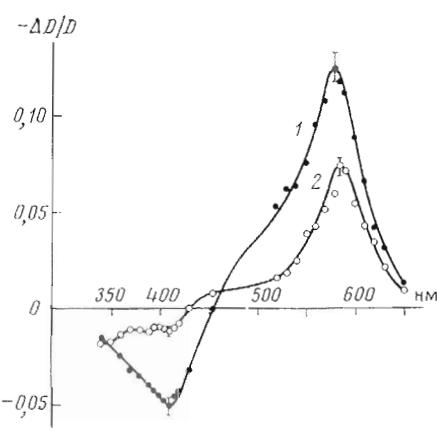


Рис. 3

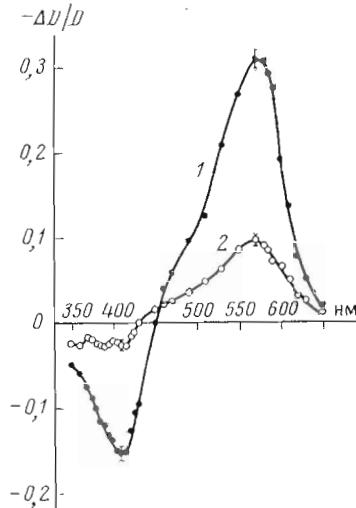


Рис. 4

Рис. 3. Дифференциальные спектры релаксационных переходов в пурпурных мембранах, супендированных в растворе 2,5 М NaCl (0,01 М фосфат-боратный буфер; pH 9,4; 5,5°; белые вспышки; D_{570} 1,15). 1 — переход B ($\tau_e 3,9 \pm 0,8$ с); 2 — переход C ($\tau_e 24,5 \pm 5,0$ с)

Рис. 4. Дифференциальные спектры релаксационных переходов в пурпурных мембранах, супендированных в 50% водном глицерине (0,01 М фосфатный буфер; 0,01 М Na-EDTA; pH 10,5; 15°; «желтые» вспышки; D_{570} 1,05). 1 — переход B ($\tau_e 3,3 \pm 0,3$ с); 2 — переход C ($\tau_e 13,6 \pm 1,3$ с)

Приведенные выше результаты получены при освещении суспензии пурпурных мембран вспышками белого света. При использовании «желтых» ($\lambda > 530$ нм) вспышек времена релаксации и спектры, отвечающие формам A , B и C , остаются практически неизменными, однако сумма вкладов этих форм возрастает от $\sim 0,3$ до $\sim 0,5$ (см. табл. 1), оставаясь постоянной во всем доступном для измерений диапазоне pH. То, что сумма вкладов при этом оказывается больше известного квантового выхода формы M , равного $\sim 0,3$ [13, 14], скорее всего обусловлено большой продолжительностью вспышки (несколько миллисекунд) по сравнению с временем жизни возбужденного состояния. Что же касается зависимости суммы вкладов от спектрального состава вспышки, то она несомненно

Таблица 1

Влияние спектрального состава синхронных вспышек на вклады переходов A , B и C в пурпурных мембранах*

| Светофильтры | | Вклады переходов волях от D_{585} | | | |
|--------------|-----------|-------------------------------------|-------|-------|---------|
| Вспышка 1 | Вспышка 2 | A | B | C | $A+B+C$ |
| ЖС-18 | ЖС-18 | 0,191 | 0,180 | 0,105 | 0,476 |
| | | 0,119 | 0,411 | 0,090 | 0,320 |
| ЖС-18 | ФС-7 | 0,111 | 0,129 | 0,094 | 0,334 |
| | — | 0,099 | 0,080 | 0,084 | 0,263 |
| ЖС-18 | ФС-7 ** | 0,114 | 0,102 | 0,086 | 0,302 |

* Использованы стандартные стеклянные светофильтры указанного типа толщиной 2 мм. Измерения выполнены при 585 нм (5,6°, pH 10,65). Состав раствора: 2,5 М NaCl; 0,01 М фосфат-боратный буфер; 0,01 М Na-EDTA. Средние для всей серии опытов значения τ_e (с): $A = 8,2 \pm 0,9$; $B = 31,1 \pm 2,8$; $C = 208 \pm 11$.

** В этом опыте вспышка 2 произведена с задержкой 2 с.

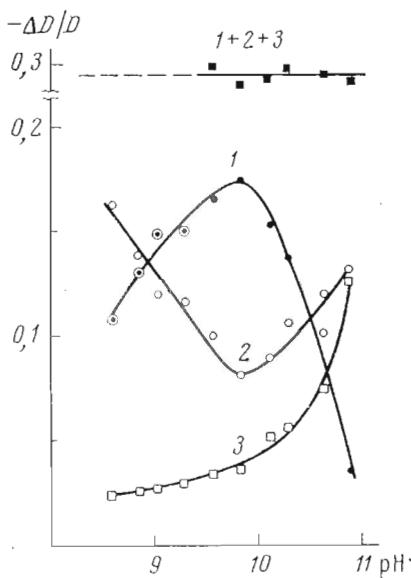


Рис. 5

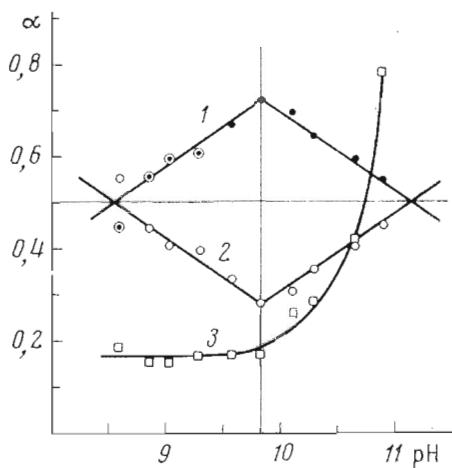


Рис. 6

Рис. 5. pH-Зависимости вкладов релаксационных переходов в пурпурных мембранах, суспендированных в растворе 2,5 М NaCl (0,01 М фосфат-боратный буфер; 5,5°; белые вспышки; D_{570} 0,95; измерения при 585 нм). Кривые 1, 2 и 3 — переходы A, B и C соответственно; 1+2+3 — суммарная кривая для всех трех переходов

Рис. 6. pH-Зависимости, приведенные на рис. 5, представлены в долях от суммарного превращения: 1 — суммарная доля переходов A и C; 2 — переход B; 3 — относительный вклад перехода C в суммарную долю переходов A и C. На рис. 5 и 6 точки на кривых 1, обведенные кружками, вычислены из предположения о постоянстве суммарного превращения во всем исследованном диапазоне pH

вызвана тем, что некоторая доля форм A, B и C возвращается в исходное состояние вследствие фотохимической реакции, инициируемой поглощением коротковолнового излучения во время вспышки (ср. [6]). Действительно, из табл. 1 видно, что по соотношению и сумме вкладов освещение белой вспышкой подобно синхронному освещению «желтой» (светофильтр ЖС-18) и «синей» (светофильтр ФС-7) вспышками. Комбинируя белую и «синюю» вспышки, можно увеличить относительную интенсивность коротковолнового света. В этом случае сумма вкладов меньше, чем при освещении белыми вспышками. «Синие» вспышки эффективны, даже если они производятся с задержкой 1—4 с; отсюда следует, что их действие направлено именно на формы A, B или C, а не на какие-либо не обнаруженные нами короткоживущие формы фотохимического цикла. Форма C, по-видимому, наименее чувствительна к действию коротковолнового излучения. В его присутствии вклад этой формы уменьшается не более чем на 20%, тогда как вклады форм A и B падают почти наполовину.

Скорость фотоиндуцированной релаксации форм A, B и C по меньшей мере на порядок больше скорости их «нормальной» релаксации. Это позволяет предположить, что после поглощения кванта коротковолнового излучения в бактериородопсине реализуется иной механизм протонирования альдимина или иной тип сопряженного с протонированием конформационного перехода (ср. [24]).

pH-Зависимости вкладов форм A, B и C, полученные с использованием белых и «желтых» вспышек, качественно сходны между собой. Поэтому есть основания полагать, что общий характер перераспределения вкладов отдельных форм не определяется влиянием pH на фотоиндуцированную релаксацию. Колоколообразные кривые типа кривой 1 на рис. 5 часто

наблюдаются при изучении рН-зависимости активности ферментов [15], причем выпуклому колоколу, описывающему долю активных молекул фермента, отвечает вогнутый колокол, соответствующий неактивным молекулам. Исходя из этой аналогии, можно допустить, что в бактериородопсинах, как и в ферментах, существует отвечающее некоторому «активному» состоянию распределение протонирования среди набора функционально важных групп, которое реализуется в ограниченном диапазоне рН. Те молекулы, в которых это распределение реализовалось, и представляют собой форму *A*, вклад которой на рис. 5 описывается выпуклой колоколообразной кривой. Что же касается остальных молекул, то они находятся либо в форме *B*, вкладу которой отвечает вогнутый колокол, либо в форме *C*. Таким образом, бактериородопсин на самом деле «активен», т. с. участвует в релаксационных переходах, находясь в состояниях, отвечающих и выпуклому, и вогнутому колоколам.

В простейшем случае выпуклый и вогнутый колокола были бы дополнительны друг другу, т. е. при любых значениях рН сумма ординат лежащих на них точек была бы постоянна и равна общей доле релаксирующих молекул. Однако в действительности это не так, поскольку определенный вклад вносит форма *C*. Исходя из явно выраженной асимметрии кривой *I* на рис. 5, можно предположить, что молекулы бактериородопсина, в которых распределение протонированных групп отвечает выпуклому колоколу, в зависимости от рН с той или иной вероятностью оказываются либо в форме *A*, либо в форме *C*. Иными словами, предполагается, что доля молекул, отвечающая выпуклому колоколу, есть суммарный вклад форм *A* и *C*. На рис. 6 суммарный вклад форм *A* и *C* (кривая *I*) и вклад формы *B* (кривая *2*) представлены в виде доли от суммы вкладов всех трех форм. Жирные прямые линии на этом рисунке призваны подчеркнуть высокую симметрию распределения точек как относительно линии, соединяющей экстремумы, так и относительно линии $\alpha = 0,5$. Такая симметрия вряд ли случайна и может рассматриваться как аргумент в пользу правильности сделанного выше предположения.

Причина, по которой с ростом рН увеличивается относительный вклад формы *C* (см. кривую *3* на рис. 6), пока неизвестна. В рамках изложенных выше представлений выпуклый колокол описывает содержание частично протонированного набора диссоциирующих групп. Возможно, что с ростом рН начинают преобладать именно такие комбинации протонированных и депротонированных групп, которые обусловливают реализацию формы *C*. Не исключено, однако, что увеличение вклада этой формы связано с диссоциацией неких групп, не входящих в набор, который определяет существование рассмотренных выше колоколообразных зависимостей.

С уменьшением рН возрастает вклад формы *B*, и можно думать, что в нейтральной среде ($2,5 \text{ M NaCl}$, $5-15^\circ$) эта форма в пурпурных мембранах будет доминирующей. Экстраполируя кривые *3* и *4* на рис. 4 к рН 7, можно получить значения τ_e , ожидаемые для этой формы при $5,5^\circ$ и 15° , равные соответственно 28 и 18 мс.

Заметим, что вывод о доминировании формы *B* при рН 7, равно как и приведенные выше рассуждения о природе кривых на рис. 5, основываются на допущении, что формы *A*, *B* и *C* образуются в результате превращений бактериородопсина, инициируемых поглощением одного кванта. Между тем, учитывая относительно большую продолжительность вспышки, нельзя исключить, что какая-либо из этих форм возникает в результате поглощения второго кванта одним из промежуточных продуктов цикла, поглащающих в длинноволновой области, в частности формами *N* ($\lambda_{\max} 530 \text{ nm}$) и *O* ($\lambda_{\max} 640 \text{ nm}$) [4]. Так это или нет, покажут дальнейшие исследования с использованием более коротких вспышек.

Приведенные выше результаты относятся к бактериородопсину, находящемуся в виде тримеров в нативных пурпурных мембранах. Естественно,

век вопрос, сохраняется ли множественность кинетически различающихся форм у бактериородопсина при нарушении структуры мембран, в частности при их солюбилизации неионным детергентом Тритоном X-100. При действии этого детергента происходит фрагментация пурпурных мембран, проявляющаяся резким уменьшением светорассеяния их суспензий, а также нарушение взаимодействия ретиналевых хромофоров в тримерах [16]. Многие свойства бактериородопсина сохраняются при солюбилизации — например, специфическая полоса поглощения в видимой области спектра, претерпевающая лишь незначительный гипсохромный сдвиг, а также способность вступать в фотохимический цикл. Вместе с тем солюбилизованный препарат обладает рядом особенностей, связанных с *цис*-*транс*-изомеризацией остатков ретиналя.

Благодаря обратимой *цис*-*транс*-изомеризации двойной связи при С₍₁₃₎-атоме в альдимине ретиналя только половина бактериородопсина в пурпурных мембранах после темновой адаптации содержит соответствующую *транс*-форму. При освещении мембран белым или «желтым» ($\lambda > 530$ нм) светом устанавливается фотостационарное состояние, в котором содержание *транс*-формы увеличивается вплоть до ~100% [17—19]. Аналогичного эффекта можно добиться, освещая мембранны серий белым или «желтым» вспышками. За процессом установления темнового равновесия можно следить по изменениям характерного дифференциального спектра предварительно освещенных и адаптированных к темноте мембран.

Судя по появлению сходного дифференциального спектра непрерывное или импульсное освещение белым светом пурпурных мембран, солюбилизованных Тритоном X-100 после их темновой адаптации, также приводит к росту доли *транс*-формы ретиналевых остатков в бактериородопсине. Адаптацию к свету солюбилизованных препаратов лучше производить при импульсном, а не при непрерывном освещении, так как в последнем случае в заметной степени происходит фотоиндуцированный гидролиз альдимина ретиналя [20, 21].

Важная особенность солюбилизованных препаратов заключается в том, что в них *цис*-*транс*-изомеризация остатков ретиналя не происходит под действием «желтого» света. Если освещения 4—5 вспышками белого света обычно бывает достаточно для достижения максимальных спектральных изменений, сопровождающих накопление *транс*-формы, то даже серия из 20—30 «желтых» вспышек оказывается совершенно неэффективной. Столь же неэффективна комбинация «желтых» вспышек с запаздывающими на 0,2—1 с «синими» ($400 \text{ нм} < \lambda < 480 \text{ нм}$) вспышками. Учитывая, что продолжительность вспышек составляла несколько миллисекунд, можно предположить, что в молекулах солюбилизированного бактериородопсина, содержащих остаток 13-*цис*-ретиналя, изомеризация последнего происходит при поглощении кванта света не исходной формой белка, а одним из короткоживущих промежуточных продуктов свойственного этим молекулам фотохимического цикла, имеющим полосу поглощения в коротковолновой области спектра. Нечувствительность фотоиндуцированной *цис*-*транс*-изомеризации к «желтым» вспышкам делает весьма удобным изучение фотохимического цикла в солюбилизованном бактериородопсине как в его «световой», так и в «темновой» форме.

При изучении релаксационных переходов в «световом» солюбилизированном бактериородопсине было найдено, что с ростом pH изменения оптической плотности с $\tau_e > 1$ с после освещения «желтыми» вспышками наблюдаются начиная с pH 7. Полученные кривые хорошо описываются суммой двух экспонент. pH-Зависимости значений $\lg \tau_e$ этих экспонент, приведенные на рис. 7, имеют наклон, близкий к единице. Таким образом, есть основания полагать, что и в солюбилизированном бактериородопсине есть по меньшей мере две кинетически различающиеся формы, названные формами B_s и C_s в порядке увеличения τ_e . Из температурной зависимости τ_e (см. рис. 8) следует, что переходы этих форм характеризуются

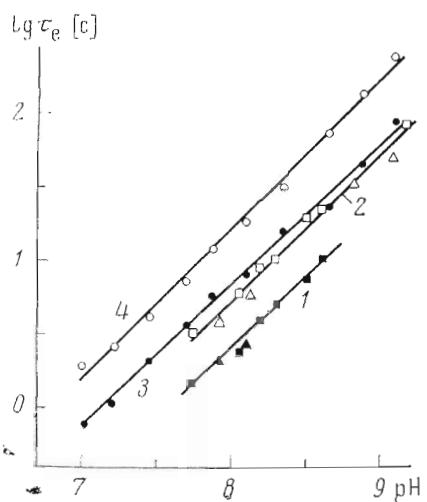


Рис. 7

Рис. 7. pH-Зависимости τ_e релаксационных переходов в солюбилизированном бактериородопсине (0,01 М фосфат-бортатный буфер; «желтые» вспышки; измерения при 555 нм). В скобках ниже приведены наклоны кривых. Переход B_s : 1 — 15° ($0,977 \pm 0,060$); 3 — 4,5° ($0,958 \pm 0,025$); переход C_s : 2 — 15° ($1,003 \pm 0,034$); 4 — 4,5° ($1,017 \pm 0,024$). Точки на кривых 7 и 2, отмеченные символами \triangle и \blacktriangle , относятся к опыту, в котором среда содержала 2,5 М NaCl

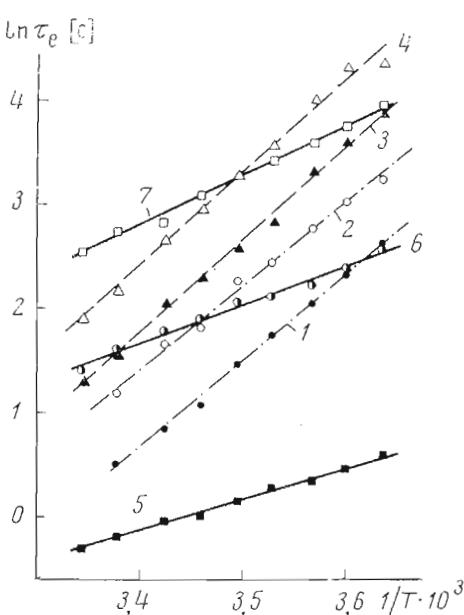


Рис. 8

Рис. 8. Температурные зависимости τ_e релаксационных переходов в солюбилизированном бактериородопсине («желтые» вспышки; измерения при 555 нм). В скобках ниже приведены энергии активации в ккал/моль ($\pm 0,5$ ккал/моль) и использованный буфер (0,01 М). Переход B_s : 1 — pH 8,14 (16,5; Tricine); 3 — pH 8,63 (17,6; TAPS). Переход C : 2 — pH 8,14 (16,0; Tricine); 4 — pH 8,63 (17,7; TAPS). Кривые 5, 6 и 7 относятся соответственно к переходам A_{sm} (5,9), B_{sm} (7,5) и C_{sm} (9,4), наблюдаемым в присутствии $2,2 \cdot 10^{-3}$ М $Ga(NO_3)_3$ при pH 5,32 (MES)

ближими энергиями активации (16—18 ккал/моль). Сравнение «световых» и «темновых» препаратов показало, что при одинаковых pH и температуре у них практически совпадают соотношения вкладов обеих форм, однако сами вклады у «темновых» препаратов в 1,7—2 раза меньше. Таким образом, похоже, что в «темновых» препаратах только часть бактериородопсина участвует в том фотохимическом цикле, одна из стадий которого наблюдается в этих экспериментах. Вероятно, что к ней принадлежат те молекулы белка, которые содержат остатки *полностью-транс*-ретиналя. Можно также предположить, что фотохимические циклы, в которых участвуют молекулы бактериородопсина, различающиеся конфигурацией остатков ретиналя, не имеют общих промежуточных продуктов.

Дифференциальные спектры, отвечающие формам B_s и C_s , которые приведены на рис. 9, сходны между собой и близки по расположению изобистической точки и коротковолновой полосы к спектру формы B (ср. кривые 1 и 4) и соответственно к спектру формы M . Длинноволновые полосы в спектрах форм B_s и C_s сдвинуты в сторону меньших длин волн на 20—25 нм, т. е. примерно так же, как сдвинута полоса поглощения солюбилизированного препарата по сравнению с пурпурными мембранными.

С ростом pH вклад формы B_s проходит через максимум, а вклад формы C_s монотонно возрастает (см. рис. 10). Непостоянство суммы вкладов

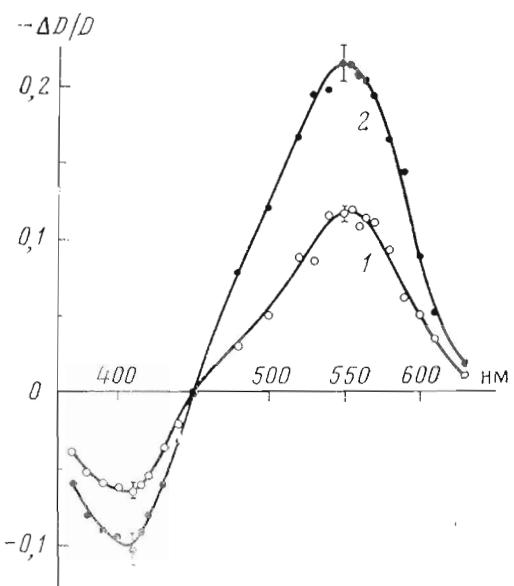


Рис. 9

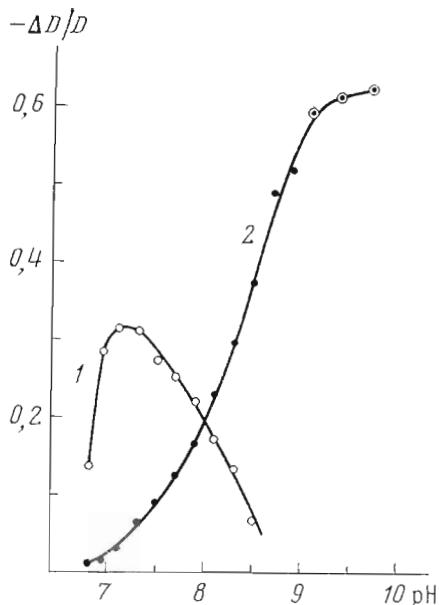


Рис. 10

Рис. 9. Дифференциальные спектры релаксационных переходов в солюбилизированном бактериородопсине ($0,01\text{ M}$ фосфатный буфер; $0,01\text{ M}$ Na-EDTA; $\text{pH } 8,2; 8,3$; $D_{555} 0,9$). 1 — переход B_s ($\tau_e 4,95 \pm 0,65\text{ s}$); 2 — переход C_s ($\tau_e 10,20 \pm 0,35\text{ s}$)

Рис. 10. pH-Зависимости вкладов релаксационных переходов в солюбилизированном бактериородопсине при $5,5^\circ$ ($0,01\text{ M}$ фосфат-боратный буфер; измерения при 555 нм ; $D_{555} 0,9$). 1 — переход B_s ; 2 — переход C_s . При $\text{pH} > 9$ переход B_s не обнаруживается и значительно возрастает вклад необратимых процессов. Точки на кривой 2, обведенные кружками, отвечают отношению начального уменьшения оптической плотности после вспышки к оптической плотности до вспышки без учета необратимых переходов

B_s и C_s и ее значительное уменьшение вблизи $\text{pH } 7$ скорее всего связаны с тем, что наряду с формами B_s и C_s в солюбилизированном бактериородопсине возникает третья, короткоживущая форма (которую условно можно назвать формой A_s), причем ее доля уменьшается при $\text{pH} > 7$.

С ростом температуры вклад долгоживущей формы C_s возрастает (см. рис. 11). Поскольку вклад формы B_s в определенном диапазоне температуры при этом остается практически постоянным, есть основания полагать, что увеличение содержания C_s может происходить за счет не только формы B_s , но и короткоживущей формы A_s . Наличие плато на кривых 1 и 2 рис. 11, отвечающих форме B_s , позволяет локализовать область температурозависимого перераспределения вкладов B_s и C_s .

В определенных условиях, а именно в присутствии некоторых много-зарядных катионов, релаксационные изменения оптической плотности прямо указывают на присутствие трех дискретных форм в солюбилизированном бактериородопсине. К таким ионам, сильно замедляющим релаксационные переходы, принадлежат трехзарядные ионы металлов III группы ($\text{Al}, \text{Ga}, \text{In}, \text{Sc}, \text{Y}$, лантаниды), а также $\text{Th}^{4+}, \text{Cr}^{3+}, \text{Fe}^{3+}, \text{Fe}^{2+}$ и Cu^{2+} . Их действие в наибольшей степени проявляется в нейтральной среде, поскольку при снижении pH , по-видимому, уменьшаются константы связывания с белком. Ионы щелочноземельных металлов, а также $\text{Zn}^{2+}, \text{Cd}^{2+}, \text{Pb}^{2+}, \text{Mn}^{2+}, \text{Ni}^{2+}, \text{Co}^{2+}$ и Tl^{+} в данных экспериментах не обнаружили активности (действие Ag^+ и Hg^{2+} отличное по своему характеру от действия упомянутых выше ионов, будет описано в одной из последующих публикаций).

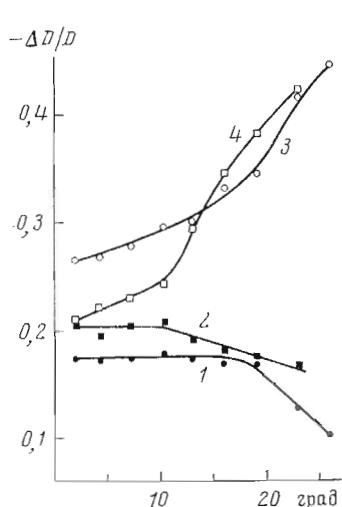


Рис. 11

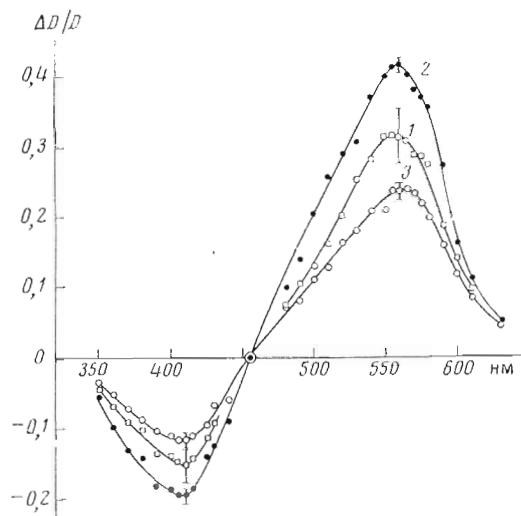


Рис. 12

Рис. 11. Температурные зависимости вкладов релаксационных переходов в солюбилизированном бактериородопсине. Условия опыта см. подпись к рис. 7. Переход B_s : 1 — pH 8,14; 2 — pH 8,63. Переход C_s ; 3 — pH 8,14; 4 — pH 8,63

Рис. 12. Дифференциальные спектры релаксационных переходов в солюбилизированном бактериородопсине в присутствии $2,5 \cdot 10^{-3}$ М $InCl_3$ (0,01 М MES; pH 5,45; 20°; $D_{555} 0,45$). 1 — переход A_{sm} ($\tau_e 1,27 \pm 0,15$ с); 2 — переход B_{sm} ($\tau_e 8,3 \pm 0,7$ с); 3 — переход C_{sm} ($\tau_e 30,8 \pm 2,0$ с)

Более детально были изучены релаксационные переходы в присутствии In^{3+} , Ga^{3+} , Fe^{3+} и Cu^{2+} . Эксперименты в основном проводились при pH 5,5, когда гидролиз соответствующих солей был относительно невелик. Эффекты, вызванные катионами, полностью исчезают при введении Na-EDTA, причем в случае In^{3+} и Cu^{2+} это происходит мгновенно, тогда как ингибирование действия Ga^{3+} и Fe^{3+} следует бифазной кинетике.

Релаксационные кривые, полученные при pH $\sim 5,5$ в присутствии In^{3+} , Ga^{3+} , Fe^{3+} и Cu^{2+} , могут быть удовлетворительно описаны суммой не двух, а только трех экспонент. Изменения концентрации этих ионов сказываются лишь на сумме вкладов экспонент, но не на отношениях этих вкладов и величинах τ_e ; последние, однако, заметно зависят от природы иона (см. табл. 2). Таким образом, полученный для каждого иона

Таблица 2

Значения τ_e для релаксационных переходов A_{sm} , B_{sm} , C_{sm}
в солюбилизированном бактериородопсине в присутствии ионов
металлов *

| Катион | τ_e , с | | |
|-----------|-----------------|------------------|------------------|
| | A_{sm} | B_{sm} | C_{sm} |
| Cu^{2+} | $1,04 \pm 0,02$ | $4,66 \pm 0,76$ | $21,26 \pm 0,68$ |
| Ga^{3+} | $1,99 \pm 0,11$ | $8,06 \pm 0,42$ | $29,56 \pm 0,92$ |
| In^{3+} | $2,19 \pm 0,38$ | $10,63 \pm 1,00$ | $44,19 \pm 3,75$ |

* Состав раствора: 0,01 М MES (pH 5,5); 0,005 М соли соответствующего катиона. $D_{555} 0,9$. Температура 15°. Освещение «желтыми» вспышками после адаптации к свету.

набор трех значений τ_e нечувствителен к положению равновесия связывания данного иона и при прочих равных условиях, по-видимому, является характеристическим для комплекса ион — бактериородопсин. Исходя из этого, можно заключить, что и здесь представление релаксационных кривых в виде суммы трех экспонент отражает существование трех кинетически различающихся форм (назовем их формами A_{sm} , B_{sm} и C_{sm}). Соответствующие им дифференциальные спектры представлены на рис. 12. Эти спектры сходны со спектрами формы M . Сумма вкладов всех трех экспонент в области максимума длинноволновой полосы с ростом концентрации ионов становится практически равной единице. Это означает, что в данных условиях отсутствуют какие-либо ускользающие от регистрации быстрые релаксационные переходы, связанные с протонированием альдимина ретиналя.

Пока неизвестно, есть ли что-либо общее между кинетически различающимися формами солюбилизированного бактериородопсина, наблюдающимися в присутствии и в отсутствие ионов металлов. По некоторым свойствам переходы этих форм явно различаются. Так, например, возвращение форм A_{sm} , B_{sm} и C_{sm} в исходное состояние характеризуется примерно в 2—2,5 раза меньшими энергиями активации и слабой зависимостью скоростей от pH (в интервале $4 < \text{pH} < 7$ $d \lg \tau_e / d \text{pH} \approx 0,3$).

Таким образом, анализ релаксационных кривых приводит к представлению о существовании нескольких форм бактериородопсина, спектрально близких или даже тождественных форме M , но различающихся константами скорости релаксации. Этот вывод относится как к пурпурным мембранам, так и к солюбилизированным препаратам. Какова природа различий между этими формами? Из возможных причин множественности форм — различий в протонировании функционально важных групп, в конформации «активного центра», в конфигурации $C=C$ и $C=N$ -связей альдимина ретиналя и т. д. — первая в настоящее время кажется наиболее вероятной. Такая точка зрения основана на несомненной зависимости вкладов отдельных форм от pH среды. Как именно реализуется эта зависимость, пока неясно. Рассмотрим два предельных случая: 1) соотношение форм определяется только равновесным протонированием набора групп в исходной форме бактериородопсина и не может изменяться на стадии превращения формы M ; 2) это соотношение определяется равновесным протонированием соответствующих групп в форме M . Во втором случае можно ожидать, что в ходе релаксации равновесие протонирования будет непрерывно сдвигаться в сторону короткоживущих форм. Поскольку признаков такого рода сдвигов обнаружить не удалось, первая из этих возможностей кажется более вероятной, однако эта проблема требует дальнейшего изучения. Нельзя, например, исключить, что равновесие протонирования вообще нечувствительно к тому, находится ли бактериородопсин в исходной форме или в форме M .

Остается также открытым вопрос о природе тех групп, протонирование которых определяет соотношение вкладов отдельных форм. Учитывая положение экстремумов на рис. 5 и 6, можно предположить, что эти группы представляют собой ε -аминогруппы лизиновых и/или оксигруппы тирозиновых остатков. Однако эти кривые относятся к мембранам, на поверхности которых расположены отрицательно заряженные фосфатные и сульфогруппы, принадлежащие монокулам липидов. Труднооцениваемое влияние локальных поверхностных зарядов, естественно, затрудняет идентификацию групп по величине их р K . Ситуация осложняется еще и тем, что пока неясно, можно ли прямо соотносить формы A , B и C в пурпурных мембранных с формами A_s , B_s и C_s в солюбилизированных препаратах.

Особый интерес представляет установление природы формы C . Все остальные обнаруженные нами формы по отвечающим им дифференциальным спектрам очень близки форме M , между тем как форма C обладает

существенно иным спектром. Вклад этой формы возрастает в области высоких значений рН, непосредственно примыкающей к порогу щелочной денатурации пурпурных мембран, в ходе которой, по-видимому, происходит гидролиз альдимина ретиналя [22]. Поэтому возможно, что образование формы С тоже связано с какими-то ковалентными перестройками (гидролизом альдимина ретиналя, миграцией альдегидного остатка между аминогруппами и т. п.), а ее превращения включают стадию образования исходного альдимина.

В заключение необходимо отметить, что перераспределение форм бактериородопсина наблюдается при $\text{pH} > 7$. В нейтральной среде, по-видимому, доминируют те формы, в которых большая часть или даже все группы, ответственные за это перераспределение, находятся в протонированном состоянии. Есть ли какой-то внутренний смысл в том, что стадия протонирования альдимина ретиналя в обычных условиях протекает, когда вышеупомянутые группы протонированы? Пока их функциональная роль неизвестна. Вероятно, самым смелым является предположение, что именно эти группы образуют цепочку, по которой протоны движутся из среды к депротонированному альдимину ретиналя. В этом случае должна существовать область значений рН, где группа, являющаяся непосредственным донором протона для альдимина, полностью протонирована. В пределах данной области скорость протонирования альдимина может не зависеть от рН среды. Вне этой области поступление протонов к группе-донору может оказаться стадией, ограничивающей скорость протонирования альдимина. Возможно, что именно этот эффект ответствен за существование форм, время жизни которых увеличивается с ростом рН. Если эта концепция верна, то дальнейшее изучение свойств этих форм, по-видимому, открывает возможность определить число и природу групп, переносящих протон к альдимину ретиналя.

Авторы выражают глубокую благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание к их работе и ценные советы при обсуждении результатов.

Экспериментальная часть

Пурпурные мембранны выделяли из клеток *Halobacterium halobium* R₁ по методике, описанной в работе [23]. Мембранны солюбилизировали в 2% (вес/объем) растворе Тритона X-100 (Serva, ФРГ) в условиях, приведенных в работе [16]. Время инкубации с детергентом при 20° (рН 6–7) составляло не менее 6 ч.

В работе использовали препараты солей марки ч. д. а. и дважды дистиллированную воду. Для приготовления буферных растворов применяли морфолиногексансульфокислоту (MES), N-триксоксиметил-метил-3-пропансульфокислоту (TAPS) и N-триксоксиметилметилглицин (Tricine) (Serva, ФРГ). Состав растворов указан в подписях к рисункам.

Все спектральные измерения выполнены с помощью спектрофотометра Gilford 2400/Sefram 242-F (США/Франция). Термостатирование образцов осуществляли с точностью $\pm 0,2^\circ$. В работе использовали автотитратор Radiometer TTT-2/ABU-13/TTA-31 (Дания) и рН-метр Corning 112 (США), снабженные стеклянными электродами Radiometer типа В. Для 50% водного глицерина приведены значения рН, отвечающие калибровке по водным буферным растворам. Аппроксимацию релаксационных кривых суммой экспонент осуществляли с помощью специально разработанного нами набора программ на ЭВМ БЭСМ-6 («Фортрал-Дубна») и DIEHL-alphatronic 332 (ФРГ). В основе этих программ лежит минимизация суммы квадратов отклонений с применением метода сопряженных градиентов.

Адаптацию препаратов пурпурных мембран (оптическая плотность при 570 нм — 0,5—1,2) к свету осуществляли 5-минутным освещением лампой с галогенным циклом КГМ-30-300 (300 Вт), снабженной фокусирующей системой, тепловым фильтром (5 см 5% раствора CuSO_4) и стеклянным фильтром ЖС-48 (5 мм). Для импульсного освещения использовали лампу ИФК-120 (энергия разряда в разных опытах от 100 до 150 Дж), снабженную специальным стеклянным тепловым фильтром. При освещении «желтыми» вспышками дополнительно устанавливали стеклянные фильтры ЖС-12 или ЖС-17 (5 мм) в комбинации с фильтром ЖС-48 (5 мм; со стороны образца). В случае «синих» вспышек использовали либо фильтр ФС-7 (2,5 мм; см. табл. 1), либо фильтр СС-4 (2,5 мм) в комбинации с фильтром ЖС-4 (2,5 мм). Интервал между вспышкой и началом регистрации релаксационной кривой составлял 1,3—1,5 с.

ДОБАВЛЕНИЕ ПРИ КОРРЕКТУРЕ

В опытах, выполненных совместно с Л. А. Драчевым (Межфакультетская проблемная лаборатория им. А. Н. Белозерского, МГУ), показано, что в солюбилизированном бактериородопсине после освещения одиночной вспышкой действительно образуется короткоживущий промежуточный продукт с полосой поглощения в области 400 нм. Время жизни этой формы ($\tau_e \sim 5$ мс), названной условно в статье формой A_s , практически не зависит от pH, а ее вклад с ростом pH уменьшается. С помощью флуоресцентного индикатора метилумбеллиферона при $7 \leq \text{pH} \leq 8,5$ было найдено, что поглощение протонов из внешней среды после вспышки включает фазы, величины τ_e которых сравнимы с временами жизни как долгоживущих форм B_s и C_s , так и короткоживущей формы A_s . Результаты этих экспериментов будут подробно рассмотрены в одном из последующих сообщений.

ЛИТЕРАТУРА

- Oesterhelt D., Stoeckenius W. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **70**, 2853—2857.
- Racker E., Stoeckenius W. (1974) J. Biol. Chem., **249**, 662—663.
- Барский Е. Л., Драчев Л. А., Каулэн А. Д., Кондратий А. А., Либерман Е. А., Остроумов С. А., Самуилов В. Д., Семёнов А. Ю., Скулачев В. П., Ясайтие А. А. (1975) Биоорган. химия, **1**, 113—126.
- Lozier R. H., Bogomolni R. A., Stoeckenius W. (1975) Biophys. J., **15**, 955—962.
- Lewis A., Spoonhower J., Bogomolni R. A., Lozier R. H., Stoeckenius W. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **71**, 4462—4466.
- Oesterhelt D., Hess B. (1973) Eur. J. Biochem., **37**, 316—326.
- Yoshida M., Ohno K., Takeuchi Y., Kagawa Y. (1977) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **75**, 1111—1117.
- Henderson R., Unwin P. T. (1975) Nature, **257**, 28—33.
- Всеволодов Н. Н., Рихирева Г. Т., Костиков А. П. (1974) Биофизика, **19**, 942—946.
- Sherman W. V., Slifkin M. A., Caplan S. R. (1976) Biochim. et biophys. acta, **423**, 238—248.
- Slifkin M. A., Caplan S. R. (1975) Nature, **253**, 56—58.
- Eisenbach M., Bakker E. P., Korenstein R., Caplan S. R. (1976) FEBS Lett., **71**, 228—232.
- Goldschmidt C. R., Kalisky O., Rosenfeld T., Ottolenghi M. (1977) Biophys. J., **17**, 179—183.
- Becher B., Ebrey T. G. (1977) Biophys. J., **17**, 185—191.
- Диксон М., Уэбб Э. (1966) Ферменты, с. 106—116, «Мир», М.
- Heyn M. P., Bauer P. J., Dencher N. A. (1975) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **67**, 897—903.
- Dencher N. A., Rafferty C. N., Sperling W. (1976) Abstr. of the EMBO workshop on transduction mechanism of photoreceptors, Juelich, BRD, Oct. 4—8, p. 54.
- Pettei M. J., Yudd A. P., Nakanishi K., Henselman R., Stoeckenius W. (1977) Biochemistry, **16**, 1955—1962.
- Oesterhelt D., Meentzen M., Schuhmann L. (1973) Eur. J. Biochem., **40**, 453—463.
- Kriebel A. N., Albrecht A. C. (1976) J. Chem. Phys., **65**, 4575—4583.

21. Шкроб А. М., Родионов А. В., Овчинников Ю. А. (1978) Биоорган. химия, 4, 354—359.
22. Шкроб А. М., Родионов А. В. (1978) Биоорган. химия, 4, 360—368.
23. Oesterhelt D., Stoeckenius W. (1974) Nature New Biol., 233, 149—152.
24. Karvaly B., Daneshazy Z. (1977) FEBS Lett., 76, 36—40.

Поступила в редакцию
26.VIII.1977

THE STATE MULTIPLICITY IN RELAXING MOLECULES OF THE BACTERIORHODOPSIN

SHKROB A. M., RODIONOV A. V.

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

Bacteriorhodopsin both in the native purple membranes from *Halobacterium halobium* and in the membranes solubilized with Triton X-100 (2% w/v) has been excited by «yellow» ($\lambda > 530$ nm) flashes in alkaline media. Analysis of the O. D. relaxation curves ($1 \text{ sec} \leq \tau_e \leq 5 \cdot 10^2 \text{ sec}$) gives evidence of the existence of up to three discrete forms of relaxing bacteriorhodopsin which differ in their kinetic constants and in pH-dependences of their contributions. The *cis-trans* isomerism of retinal residues in solubilized bacteriorhodopsin has been studied, as well as the specific interactions of the latter with some polyvalent cations.