



УДК 576.8

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕПЛОВОЙ ДЕНАТУРАЦИИ  
БАКТЕРИОРОДОПСИНА ИЗ *HALOBACTERIUM HALOBIVM*

Лазарев Ю. А., Шныров В. Л.

Институт биологической физики Академии наук СССР,  
г. Пущино Московской области

Методами микрокалориметрии и оптической спектрофотометрии в видимой и инфракрасной областях исследована тепловая денатурация бактериородопсина из *Halobacterium halobium* в водной суспензии пурпурных мембран при pH 6,4—10 в интервале температур 20—100°. Из калориметрических и оптических данных следует, что процесс денатурации двухстадийный. Первая стадия, не затрагивающая конформации белка, сопровождается, по-видимому, нарушением упорядоченности упаковки мембраны. На второй стадии происходит денатурация бактериородопсина. При этом вместо доминирующей  $\alpha$ -спиральной конформации возникает упаковка типа  $\beta$ -структуры. Проведена оценка энтальпии перехода для обеих стадий.

Исследование тепловой денатурации белков явилось одним из весьма плодотворных подходов к пониманию механизма стабилизации их пространственной структуры. За последние годы достигнута определенная ясность в вопросе об относительном вкладе в устойчивость белковой структуры внутримолекулярных и межмолекулярных взаимодействий [1—3]. Успехи в исследовании белковых растворов расширили возможности для изучения взаимодействий, определяющих устойчивость более сложных систем, в частности протеолипидных комплексов.

Настоящая работа посвящена исследованию тепловой денатурации бактериального родопсина, выделенного из галофильных бактерий *Halobacterium halobium*. Пурпурные мембраны, включающие в себя бактериородопсин как единственный белок, привлекают пристальное внимание исследователей прежде всего как система трансформации энергии световых квантов в мембранный потенциал [4]. Структура пурпурных мембран стала предметом многосторонних исследований. Было установлено, что молекулярный вес бактериородопсина 25 000, содержание фосфолипидов составляет около 10 молекул на 1 молекулу белка (25% по весу), а хромофором является ретиналь, связанный с  $\epsilon$ -аминогруппой одного из лизиновых остатков в виде шиффа основания [5]. Согласно данным рентгеноструктурного анализа и электронной дифракции [6—8], бактериородопсин состоит из семи  $\alpha$ -спиральных фрагментов, вытянутых поперек мембраны. Протяженность каждого из этих фрагментов  $\sim 45$  Å. Этого достаточно для образования протон-транспортного пути, пересекающего всю толщину бактериальной мембраны. На долю  $\alpha$ -спиральной части приходится  $\sim 75$ % полипептидной цепи. Молекулы бактериородопсина собраны в тримеры, каждый из которых образован 21  $\alpha$ -спиральным фрагментом. На поперечном сечении тримера эти фрагменты располагаются на двух concentриче-

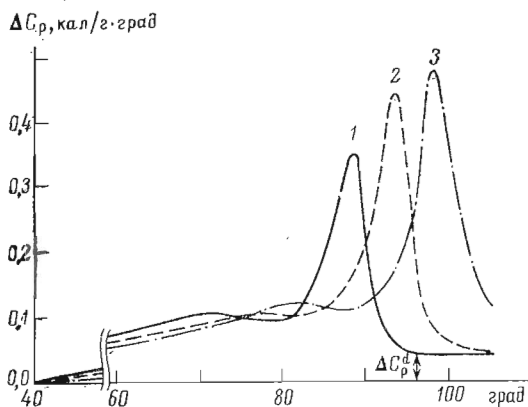


Рис. 1. Температурная зависимость избыточной парциальной теплоемкости водной суспензии пурпурных мембран. pH: 1 — 10; 2 — 9; 3 — 7,05

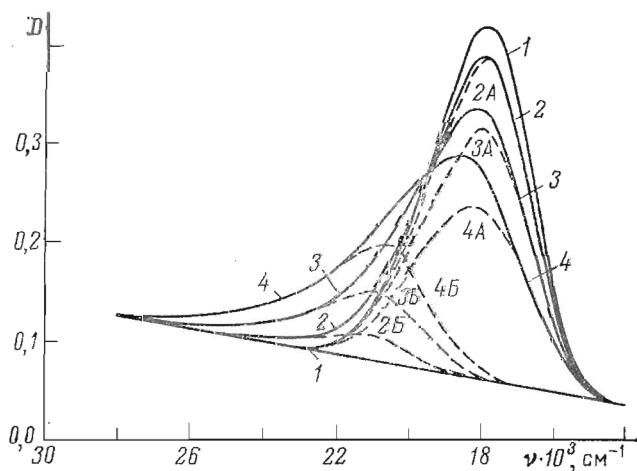


Рис. 2. Полоса поглощения водной суспензии пурпурных мембран при различных температурах (pH 9); 1 — 25; 2 — 57; 3 — 66; 4 — 74°. Пунктиром показано разделение полосы на составляющие компоненты (объяснение в тексте)

ских окружностях: на внешней — 12 тяжей и на внутренней — 9. Полость в центре тримера заполнена фосфолипидом.

На рис. 1 представлены кривые теплопоглощения суспензии пурпурных мембран. Процесс теплопоглощения начинается при температуре  $\sim 40^\circ$ , медленно нарастает и в области  $70-80^\circ$  достигает первого максимума. Далее с интервалом  $\sim 20^\circ$  следует второй пик теплопоглощения, более узкий, чем первый, после которого кривая выходит на линейный участок. Обоим максимумам на кривой теплопоглощения соответствует отчетливое изменение в состоянии хромофора. С повышением температуры исходная полоса поглощения в видимом спектре с максимумом  $560 \text{ нм}$  уширяется и сдвигается в меньшим длинам волн, причем это изменение контура полосы, как видно из рис. 2, сопровождается появлением изобестической точки. Применяя известный способ разложения спектрального контура на компоненты по Алленцеву [9], можно показать, что смещенная полоса представляет собой суперпозицию двух компонент с максимумами  $560$  и  $490 \text{ нм}$ , форма которых практически не изменяется в исследуемом диапазоне температур. Повышение температуры сопровождается «перекачкой» интен-

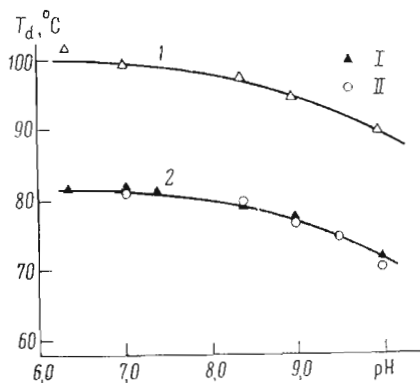


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость температуры денатурации бактериородопсина от pH. 1 — вторая стадия (микрокалориметрические данные), 2 — первая стадия (I — микрокалориметрические, II — оптические данные)

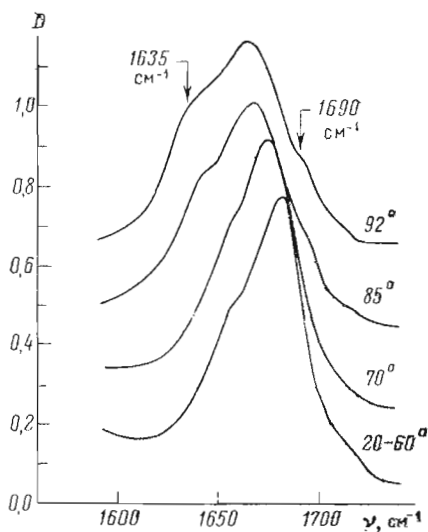


Рис. 4

Рис. 4. Полоса поглощения Амид 1 в ИК-спектре суспензии пурпурных мембран в D<sub>2</sub>O при различных температурах (pD 9)

сивности из полосы поглощения с максимумом 560 нм в полосу с максимумом 490 нм. Поэтому можно предположить, что мы имеем дело с двумя различными состояниями хромофора — «формой 560» и «формой 490». Можно провести корреляцию между образованием «формы 490» и первой стадией изменения теплопоглощения. Появление «формы 490» соответствует началу теплопоглощения. Постепенное возрастание теплопоглощения происходит симбатно с увеличением интенсивности полосы поглощения с максимумом 490 нм. Первый максимум на кривой теплопоглощения совпадает с серединой перехода «формы 560» в «форму 490» (температура, при которой константа равновесия  $K_p$  перехода «форма 560»  $\rightleftharpoons$  «форма 490» равна единице). Эта корреляция сохраняется во всем исследованном диапазоне pH (рис. 3). По всей видимости, данные и микрокалориметрических и оптических измерений отражают один и тот же процесс обратимого структурного превращения. При более высоких температурах, когда появляется второй (узкий) пик теплопоглощения, поведение системы приобретает иной характер. Изобестическая точка в спектре поглощения «размывается», и возникает полоса поглощения с максимумом 370 нм, соответствующая другому состоянию хромофора — «форме 370». Эта вторая стадия сопровождается существенными изменениями ИК-спектра пурпурных мембран, особенно отчетливо проявляющимися в области полосы Амид 1, которая соответствует валентным колебаниям пептидных CO-групп [10]. Полоса Амид 1, форма которой на протяжении первой стадии теплопоглощения оставалась неизменной, в области узкого пика теплопоглощения деформируется (рис. 4). В этих условиях в ней появляются компоненты в области 1635 и 1690 см<sup>-1</sup>, характерные для полипептидных цепей, упакованных в  $\beta$ -структуру [10]. Охлаждение суспензии не приводит к восстановлению  $\alpha$ -спиральной конформации белка, что указывает на отсутствие обратимости. Вместе с тем сам процесс денатурации проходит в квазиравновесном режиме. Каждая точка на кривой перехода представляет собой устойчивое равновесное состояние, в котором система может находиться, не обнаружив-

**Оптические и микрокалориметрические значения энтальпий  
тепловой денатурации бактериородопсина**

рН	$\Delta H$ , ккал/моль			
	Стадия 1		Стадия 2	
	Эффективная из спектрофото- метрии	Истинная из калориметрии	Эффективная из спектрофото- метрии	Истинная из калориметрии
6,4	—	140	210	74
7,05	30	130	211	71
8,4	28	120	216	70
9,0	27	110	214	68
10,0	24	100	254	58

вая заметных изменений в течение нескольких часов (3—4 ч). Как видно из рис. 1, денатурация бактериородопсина сопровождается небольшим увеличением удельной теплоемкости. Этот скачок удельной теплоемкости  $\Delta C_p^d$  хорошо воспроизводим, причем его величина не зависит от рН.

Таким образом, тепловая денатурация бактериородопсина, как следует из микрокалориметрических и оптических измерений, представляет собой сложный, по меньшей мере двухступенчатый процесс. Первая стадия, предшествующая денатурации белка, охватывает широкую область температур (полуширина перехода  $\Delta T_{1/2} \sim 30^\circ$ ). По кривой теплопоглощения переход несколько напоминает предденатурационный эффект, наблюдающийся в белковых растворах [11], однако выражен он более отчетливо. Вторая стадия протекает в узком температурном диапазоне ( $\Delta T_{1/2} \sim 5^\circ$ ). Энтальпия перехода  $\Delta H_\alpha$ , как известно [1], может быть получена из выражения

$$\Delta H_d = \int_{T_0}^T \Delta C_p dT. \quad (1)$$

Однако в нашем случае определение этого термодинамического параметра для обоих переходов непосредственно из кривых теплопоглощения затруднено, поскольку эти стадии перекрываются: второй переход начинается задолго до окончания первого. Чтобы термодинамически охарактеризовать каждую из стадий, мы приняли некоторые допущения, основанные на следующих фактах. Во-первых, до температуры, отвечающей первому максимуму ( $T_{d1}$ ), перекрывание полос теплопоглощения пренебрежимо мало. Во-вторых, согласно экспериментальным данным, первый максимум теплопоглощения во всем исследованном диапазоне рН совпадает с серединой перехода «форма 560»  $\rightleftharpoons$  «форма 490». Основываясь на оптических данных, можно предположить, что мы имеем дело с гомогенной системой, испытывающей на первой стадии равновесный переход между двумя состояниями. В такой системе в условиях обратимости процесса на середину перехода между двумя состояниями будет приходиться половина всей поглощенной тепловой энергии. Тогда энтальпия перехода для этой системы может быть найдена, если известна только часть площади, ограниченная микрокалориметрической кривой до ее максимума, из выражения

$$\Delta H_{d1} = 2 \int_{T_0}^{T_{d1}} \Delta C_p dT. \quad (2)$$

Расчитанные по уравнению (2) значения энтальпии перехода на первой стадии приведены в таблице. Наряду со значениями энтальпии, полученными из микрокалориметрических измерений, эффективные значения энтальпии были рассчитаны с помощью уравнения Вант-Гоффа из оптических кривых перехода (рис. 5). Как видно из таблицы, между микрокалориметрическими и эффективными значениями энтальпий перехода существует

весьма большое различие. Поскольку такая разница (почти в 4 раза) никак не может быть отнесена за счет погрешностей, вызванных принятой нами экстраполяцией в определении  $\Delta H_{d1}$ , следует искать другие источники указанного расхождения. Рассмотрим некоторые из них. Согласно Ламри, Билтонену и Брандсу [12], уменьшение эффективных значений  $\Delta H_d$  по сравнению с микрокалориметрическими может произойти за счет нарушения исходной концепции о переходе между двумя состояниями из-за вклада промежуточных стадий. Однако в нашем случае эти промежуточные стадии не обнаруживаются в оптическом спектре и не следуют явно из анализа микрокалориметрических данных. Более того, кривые перехода,

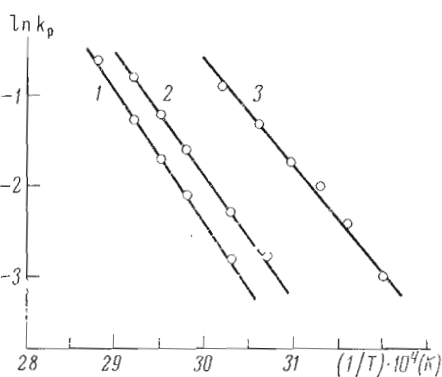


Рис. 5. Зависимость константы равновесия ( $K_p$ ) первой стадии теплового перехода в бактериородопсине от температуры при различных значениях рН: 1 — 7,05; 2 — 8,4; 3 — 10

получающиеся из оптических и микрокалориметрических измерений, совпадают. Этот факт наводит на мысль, что кроме наличия промежуточных стадий, возможно, существуют иные причины, обуславливающие разницу значений энтальпии, полученных из оптических и микрокалориметрических измерений. Блюменфельд [13] обратил внимание на то, что в некоторых условиях различие между эффективными и калориметрическими значениями энтальпии может возникать и в системе, осуществляющей переход между двумя состояниями. Это происходит, если температурное воздействие не только смещает равновесие в системе, но и влияет непосредственно на исходное и конечное состояния. В результате такого воздействия сами состояния (исходное и конечное) не сохраняются постоянными в процессе перехода, а изменяются в зависимости от температуры. Нам представляется вполне вероятным, что при сохранении спектральных характеристик структурные параметры «формы 560» и «формы 490» не остаются неизменными в том широком температурном диапазоне, в котором наблюдается первый переход. В этой связи естественно возникает вопрос: что представляет собой «форма 490» и чем она отличается от исходной «формы 560»? Полоса поглощения с максимумом 490 нм возникает не только при нагревании пурпурных мембран, но и при их титровании в области рН  $> 11$  [14], введении в среду органических растворителей [5], а также при обезвоживании пурпурных мембран. Судя по тому, что контур полосы Амид 1 при переходе в «форму 490» остается неизменным, этот переход не затрагивает существенно конформацию бактериородопсина.

Для оценки теплопоглощения на второй стадии денатурации бактериородопсина необходимо провести разделение перекрывающихся полос теплопоглощения. Поскольку такое разделение пока не удалось сделать достаточно корректно, в своих последующих оценках мы вынуждены основываться на некоторых допущениях. Учитывая данные, известные для белковых растворов [1], можно считать, что скачок теплоемкости  $\Delta C_p^d$  происходит на стадии денатурации. Кроме того, исходя из спектральных данных, можно предположить, что на второй стадии осуществляется переход между тремя состояниями: «форма 560»  $\rightleftharpoons$  «форма 490»  $\rightleftharpoons$  «форма 370». В этом случае можно провести разделение полос по известным кривым перехода (см. рис. 6). Полученные таким способом численные значения энтальпии для второй стадии приведены в таблице. Как следует из анализа полученных данных, найденная величина удельного теплопоглощения  $\Delta h_{d2} = \Delta H_{d2}/M \sim 2,5$  кал/г, где  $M$  — молекулярный вес бактериородопсина, приблизительно в 3,5 раза меньше значений, обычно наблюдаемых при

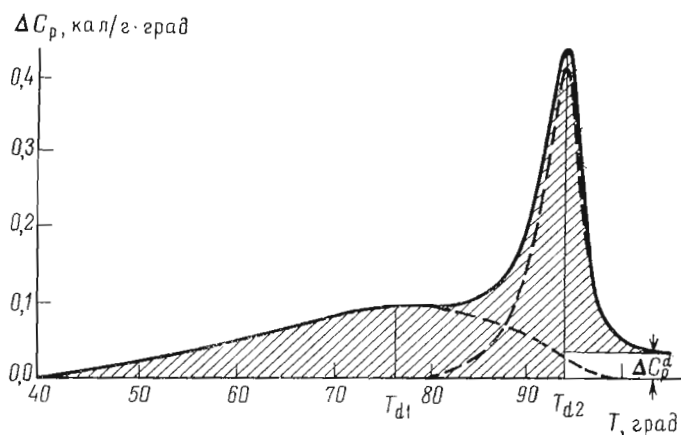


Рис. 6. Пример разделения микрокалориметрической записи процесса тепловых переходов в бактериородопсине на две стадии (рН 9)

тех же температурах для водорастворимых белков. Нам представляется, что основную причину столь низких значений удельного теплопоглощения на второй стадии денатурации бактериального родопсина следует искать в образовании агрегационной  $\beta$ -структуры. Действительно, образование агрегационной  $\beta$ -структуры, как показано в работе [2], сопровождается резким снижением энтальпии перехода. Согласно этой работе, энтальпию перехода можно представить в виде

$$\Delta H_{d2} = \Delta H_0 + \gamma \Delta H_{agg}, \quad (3)$$

где  $\Delta H_0$  — энтальпия перехода  $\alpha$ -спирали в неупорядоченное клубкообразное состояние,  $\Delta H_{agg}$  — энтальпия перехода из неупорядоченного состояния в более компактное — агрегационное, а  $\gamma$  — параметр, зависящий от структуры белковой молекулы и межмолекулярного взаимодействия. Так как слагаемые  $\Delta H_{ag}$  имеют противоположный знак, величина  $\Delta H_{d2}$  с ростом второго из них уменьшается. Из прямых экспериментальных измерений [2] следует, что в результате образования агрегационной структуры величина  $\Delta H_{d2}$  может уменьшиться по сравнению с  $\Delta H_0$  в 3—4 раза. Истинная величина  $\Delta H_0$  для бактериородопсина не может быть получена из прямых микрокалориметрических измерений. Однако ее можно оценить приближенно, если по аналогии с белковыми растворами предположить, что истинные и эффективные значения энтальпии близки, поскольку образование агрегационной  $\beta$ -структуры практически не влияет на температуру денатурации белка  $T_d$  и интервал перехода  $\Delta T_{1/2}$  [2]. Если это так, то процесс агрегации не будет влиять на эффективное значение, которое принимается равным  $\Delta H_0 = 4RT_d^2/\Delta T_{1/2}$ , где  $R$  — газовая постоянная. Так, например, при рН 9,0  $T_d = 368$  К, а  $\Delta T_{1/2} = 5$ ; в этом случае  $\Delta H_0 = 215$  ккал/моль. Найденная величина  $\Delta H_0$  оказывается в 3 раза больше величины  $\Delta H_{d2}$ , полученной непосредственно из калориметрических измерений. Удельная эффективная энтальпия в этом случае  $\Delta h_0 = \Delta H_0/M \sim 9$  ккал/г, т. е. по порядку величины близка к значениям, характерным при тех же температурах для денатурации водорастворимых белков [1]. Вероятно, величина  $\Delta H_0$  приближается к истинному значению теплопоглощения, характеризующему разрушение  $\alpha$ -спиральной структуры бактериородопсина при переходе в неупорядоченное состояние. Если это так, то можно заключить, что компонента энтальпии денатурации, отражающая переход в неупорядоченное состояние, не претерпевает сильных изменений при встраивании белка в мембранную структуру.

Удельное теплопоглощение на второй стадии температурного перехода приблизительно линейно зависит от температуры (выпадает только точка при рН 10). Наклон этой прямой, как и для водорастворимых глобулярных белков [1], оказывается равным скачку удельной теплоемкости — 0,033 кал/г·град. По-видимому, и в случае бактериородопсина теплопоглощение есть функция только температуры, а не рН раствора. Измеренный скачок теплоемкости  $\Delta C_p^d$ , как следует из сопоставления с литературными данными, в 4 раза меньше соответствующих величин, наблюдаемых для водорастворимых белков. Ранее Приваловым и Хечинашвили [1] при исследовании белковых растворов была обнаружена линейная зависимость между скачком удельной теплоемкости  $\Delta C_p^d$  и общим числом контактов неполярных групп в белковой глобуле. Эта зависимость при экстраполяции ее к нулевому вкладу гидрофобных взаимодействий давала остаточную величину  $\Delta C_p^d = 0,02$  кал/г·град (авторы приписывают ее вкладу водородных связей). Как нетрудно заметить, эта остаточная величина весьма близка к значению  $\Delta C_p^d$  для бактериородопсина. По-видимому, денатурационный переход в бактериородопсине не сопровождается выходом боковых гидрофобных групп в водное окружение и гидратацией межпептидных водородных связей.

В заключение необходимо отметить, что термодинамический анализ денатурации бактериородопсина в пурпурных мембранах осложнен ее необратимостью, связанной с образованием агрегационной структуры. Преодоление этой трудности составит задачу наших дальнейших исследований.

### Экспериментальная часть

Пурпурные мембраны из *Halobacterium halobium* штамм R<sub>1</sub> получены по обычной методике [4]. Фракцию пурпурных мембран диализовали в течение суток против бидистиллята, а затем в течение того же времени — против буферных растворов (в области значений рН 6,4—8,0 использовали 0,05 М фосфатный буфер, а в области значений рН 8,2—10 — 0,05 М боратный буфер). Микрокалориметрические измерения выполнены на адиабатном дифференциальном сканирующем микрокалориметре ДАСМ-1М (СЖБ БП АН СССР) при скорости сканирования 1°/мин. Чувствительность калориметра при этом составляла  $2 \cdot 10^{-5}$  кал/град, точность регистрации температуры была не ниже  $\pm 0,1^\circ$ . Спектры поглощения в видимом и инфракрасном диапазонах регистрировали соответственно на спектрофотометрах Spcord UV VIS и UR-20 (Carl Zeiss, Иена, ГДР). При измерении спектров в видимом диапазоне применяли герметичные кварцевые кюветы толщиной 1 см, помещенные в ячею, температуру в которой поддерживали с помощью ультратермостата с точностью  $\pm 0,5^\circ$ . Для уменьшения влияния рассеянного света кювету размещали непосредственно вблизи входного окошка приемника излучения. Измерение ИК-спектров выполнено с использованием кремниевых фильтров и термостатируемых флуоритовых кювет (толщина слоя 80 мкм), позволяющих проводить измерения в интервале 0—100°. Непосредственно перед измерениями суспензию пурпурных мембран, предварительно выдержанную в темноте в течение суток, нагревали до 60—70°, а затем охлаждали до 20°. При регистрации ИК-спектров для уменьшения поглощения воды в области полосы Амид 1 буферные смеси приготавливали на основе D<sub>2</sub>O.

Приносим глубокую благодарность канд. биол. наук Л. Н. Чекулаевой за любезно предоставленную культуру *Halobacterium halobium*, канд. физ.-мат. наук Н. Н. Хечинашвили за помощь в проведении микрокалориметрических измерений, а также проф. Л. А. Блюменфельду, д-ру физ.-мат. наук В. Я. Малееву и канд. физ.-мат. наук Н. Г. Есиповой за полезную дискуссию и ценные советы при выполнении этой работы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Privalov P. L., Khechinashvili N. N. (1974) *J. Mol. Biol.*, **86**, 665—684.
2. Maleev V. Ya., Gasan A. I. (1974) *Biopolymers*, **13**, 2409—2422.
3. Есипова Н. Г., Макаров А. А., Волькенштейн М. В., Монаселидзе Д. Р., Мгеладзе Г. Н., Шерман М. Б. (1976) *Докл. АН СССР*, **227**, 981—983.
4. Oesterhelt D., Stoerkenius W. (1971) *Nature New Biol.*, **233**, 149—152.
5. Oesterhelt D., Meentzen M., Schuhmann L. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **40**, 453—463.
6. Henderson R. (1975) *J. Mol. Biol.*, **93**, 123—138.
7. Blaurock A. E. (1975) *J. Mol. Biol.*, **93**, 139—158.
8. Henderson R., Unwin P. N. T. (1975) *Nature*, **257**, 28—32.
9. Фок М. В. (1972) *Тр. ФИАН*, **59**, 3—24.
10. Miyazawa T. (1962) in: *Poly Amino Acids, Polypeptides and Proteins* (Stahmann M. S., ed.), pp. 204—211, Univer. Wisconsin Press, Madison.
11. Privalov P. L., Khechinashvili N. N., Atanasov B. P. (1971) *Biopolymers*, **10**, 1865—1890.
12. Lumry R., Biltonen R., Brunts I. (1966) *Biopolymers*, **4**, 917—925.
13. Блюменфельд Л. А. (1974) в кн.: *Проблемы биологической физики*, с. 71—94, «Наука», М.
14. Шкроб А. М., Родионов А. В. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 360—368.

Поступила в редакцию  
6.VII.1978

### A STUDY OF HEAT DENATURATION OF BACTERIORHODOPSIN FROM *HALOBACTERIUM HALOBIUM*

LAZAREV Yu. A., SHNYROV V. L.

*Institute of Biological Physics, Academy of Sciences  
of the USSR, Pushchino*

Microcalorimetric and optical spectrophotometric (visible and infrared region) investigations were carried out of heat denaturation of bacteriorhodopsin in aqueous suspensions of purple membranes at different pH (from 6.4 to 10) over the temperature range from 20 to 110°. Both methods indicated that denaturation is two-stage process. The first stage does not affect the conformation of the protein and seems to cause a disruption of the membrane regular lattice. At the second one, denaturation of the membrane protein takes place which is accompanied by the appearance of  $\beta$ -pleated sheet type structure instead of  $\alpha$ -helix. The enthalpy for the two stages was estimated.