



# БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 7 \* № 7 \* 1981

УДК 547.963.4:537.533.35

## ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ПУРПУРНЫХ МЕМБРАНАХ ИЗ *HALOBACTERIUM HALOBIUM* ПРИ ТЕМПЕРАТУРНОЙ И ЩЕЛОЧНОЙ ДЕНАТУРАЦИИ

*Шныров В. Л., Тараковский Ю. С., Боровягин В. Л.*

*Институт биологической физики Академии наук СССР, г. Пущино*

Показано, что при нагревании пурпурных мембран из *Halobacterium halobium* при 75–90° С происходит частичное разрушение вторичной структуры бактериородопсина, а сами мембранны фрагментируются и замыкаются в пузырьки. При более высоких температурах происходит полное разрушение пурпурных мембран. При щелочной обработке пурпурные мембранны фрагментируются и замыкаются в пузырьки точно так же, как при нагревании, однако регулярность упаковки бактериородопсина, сохраняющаяся при нагреве до высоких температур, в этом случае исчезает.

Изучение денатурации бактериородопсина различными физическими методами может дать дополнительную информацию о локализации этого светочувствительного белка в пурпурной мембране галофильных бактерий. Так, в работах [1, 2] на основании калориметрических и спектрофотометрических данных было высказано предположение, что теплопоглощение, регистрируемое в интервале 20–100° С, связано с перестройками надмолекулярной организации пурпурных мембран, а более интенсивное теплопоглощение в узкой температурной области около 100° С обусловлено денатурацией их белкового компонента. Термоденатурация бактериородопсина в мембране носит по меньшей мере двухстадийный характер [1, 2] и в некоторых чертах подобна их щелочной денатурации [3]. Спектральное сходство рН- и термоиндуцированных превращений пурпурных мембран выявило целесообразность дальнейшего комплексного исследования этих двух процессов.

В настоящей работе описаны результаты сравнительного исследования термо- и рН-индуцированных изменений структуры пурпурных мембран из *Halobacterium halobium* спектроскопическими и электронно-микроскопическими методами в сочетании с микрокалориметрией.

При нагревании суспензии пурпурных мембран в их спектре поглощения начиная с 40° С наблюдаются изменения, связанные с переходом исходной спектральной формы Д570 (здесь и далее спектрально различные формы будем обозначать символом Д с числом, которое равно длине волн максимума полосы поглощения с точностью 5 нм) в спектральную форму Д500 (рис. 1, 1–3). Этот переход до температуры ~85° С полностью обратим. При дальнейшем повышении температуры бактериородопсин необратимо превращается в новую спектральную форму Д380 (рис. 1, 4–7). Измерения кругового диахромизма суспензии пурпурных мембран позволили

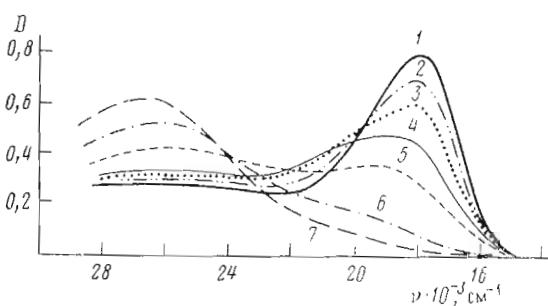


Рис. 1

Рис. 1. Спектры поглощения суспензии пурпурных мембран в 0.05 М фосфатном буфере (рН 7,0): 1 – 20, 2 – 70, 3 – 80, 4 – 90, 5 – 95, 6 – 100, 7 – 103° С

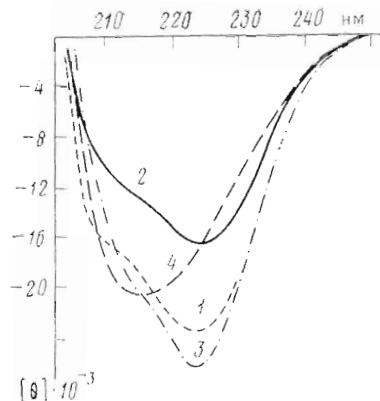


Рис. 2

Рис. 2. КД-спектры суспензии пурпурных мембран (1,96 мг/мл) в области полосы поглощения пептидных групп: 1 – контроль (0,05 М фосфатный буфер, рН 7), 2 – образец 1, подвергнутый тепловой денатурации, 3 – контроль (дистиллированная вода), 4 – образец 3, оттитрованный до рН 12

определить содержание  $\alpha$ -спиралей в бактериородопсине. В исходном препарате оно составляло ~75% (ср. [4]), а после инкубации при 100° С в течение 10–30 мин доля  $\alpha$ -спиралей необратимо снижается до 50–55% (рис. 2, 1, 2). Сопоставляя изменения КД с кривой теплопоглощения (рис. 3), можно заключить, что частичная деспирализация бактериородопсина при нагревании происходит до основного пика теплопоглощения с максимумом вблизи 100° С (ср. [1, 2]).

Электронно-микроскопическое исследование методом замораживания-скалывания показало, что пурпурные мембранны в суспензиях любой концентрации выглядят как плоские пластины, ориентированные преимущественно параллельно друг другу (рис. 4). На репликах, полученных при достаточно малых углах оттенения, хорошо выявляется регулярная упаковка белковых молекул на Р-поверхностях (гидрофобная поверхность расщепленной половины мембранны, прилежащей к нуклеонду бактерии) и регулярный рельеф на комплементарных к ним Е-поверхностях. Зависимость четкости Е-рельефа от угла оттенения реплики показана на рис. 4 в.

При нагревании суспензии пурпурных мембран до 60–65° С плоские мембранны в основном превращаются в полусфера, а незначительная их

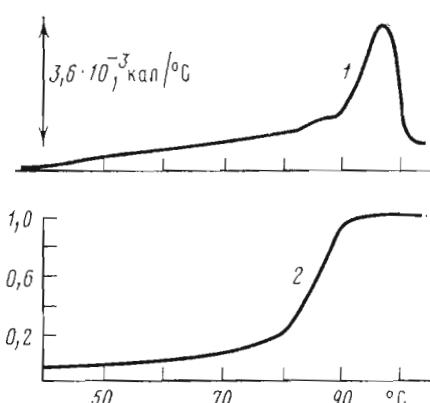


Рис. 3. Температурный переход в суспензии пурпурных мембран (0,05 М фосфатный буфер, рН 7,0): 1 – микрокалориметрическая запись, 2 – нормированное изменение эллиптичности при 220 нм. Концентрация бактериородопсина в калориметрическом эксперименте 5,66 мг/мл

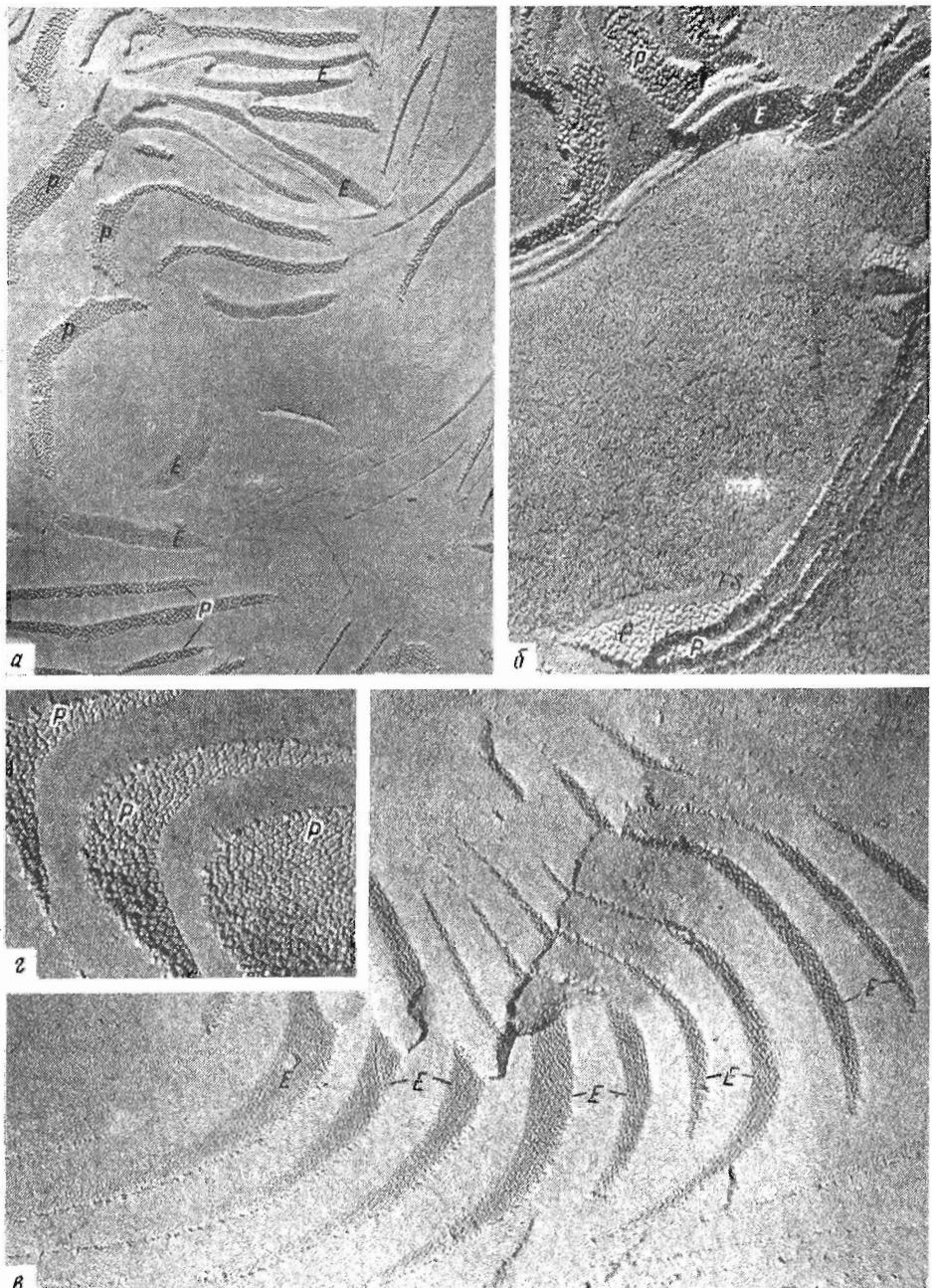
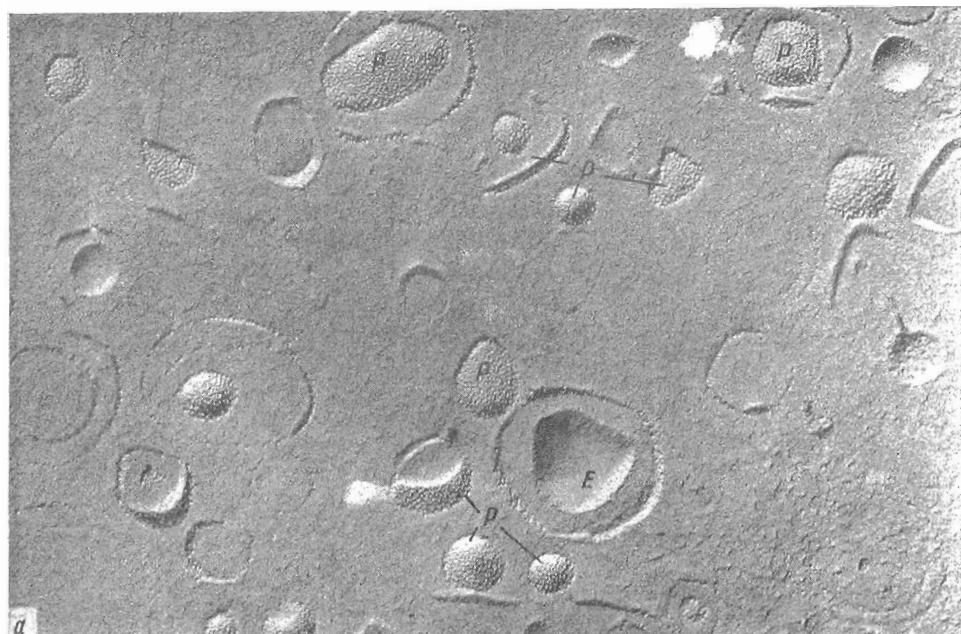
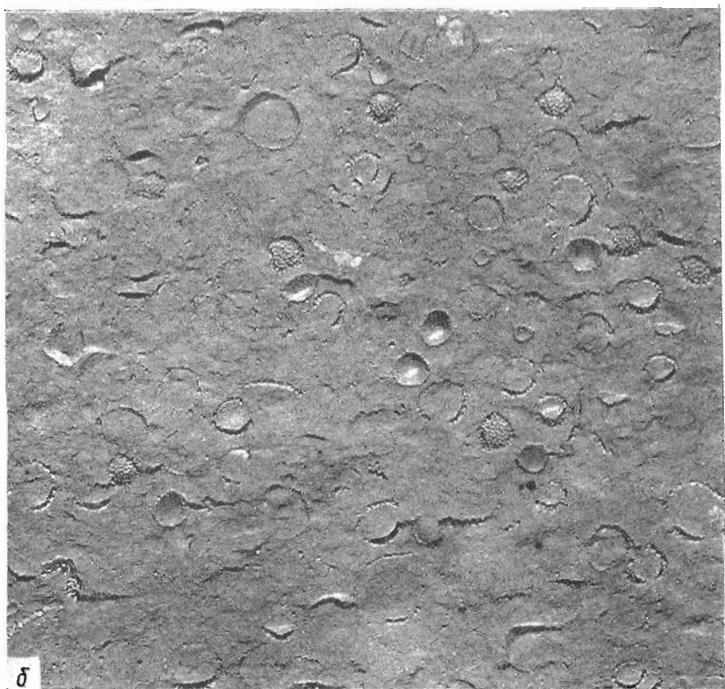


Рис. 4. Платиноуглеродные реиплики суспензии пурпурных мембран до (а, б) и после (в, г) обработки ультразвуком (ультразвуковой диспергатор УЗДН-1, 22 кГц, 0,3 А, 5 мин.). Рельеф на Р- и Е-гидрофобных поверхностях различен. Видна гладкая внешняя гидрофильная поверхность (ES) пурпурной мембранны, обнаруживаемая после испарения льда с поверхности скола (б). Увеличения: а – 54 000, б – 115 000, в, г – 144 000

часть замыкается в сферические пузырьки. При 75–85° С все мембранны фрагментируются и большая часть фрагментов замыкается в пузырьки (рис. 5 а). Инкубация суспензии при 90° С сопровождается дальнейшей фрагментацией мембран и замыканием всех фрагментов (рис. 5 б). При образовании полусфер и замкнутых пузырьков пурпурные мембранны всег-



*a*



*b*

Рис. 5. Реплики пурпурных мембран после нагрева суспензии до 80° (а) и 90° С (б).  
Увеличение: 60 000

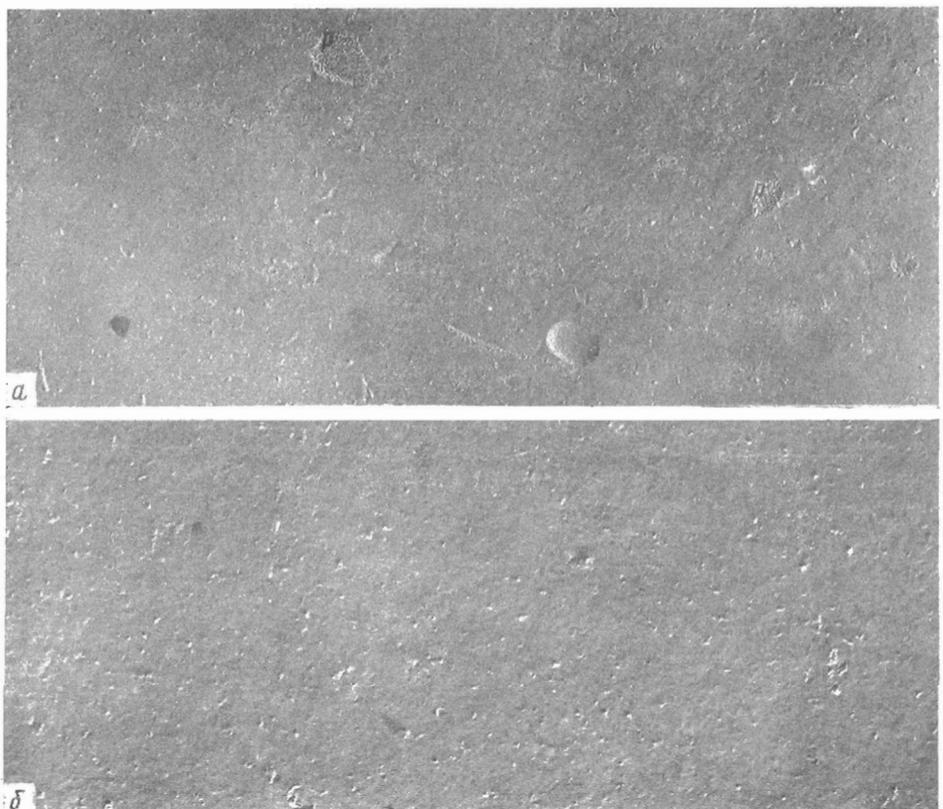


Рис. 6. Реплики пурпурных мембран после прогрева при 100° С в течение 5 (a) и 20 мин (δ). Увеличения: a - 60 000, δ - 65 000

R. st. Справочника E. A. и А. Р., к ст. 1040

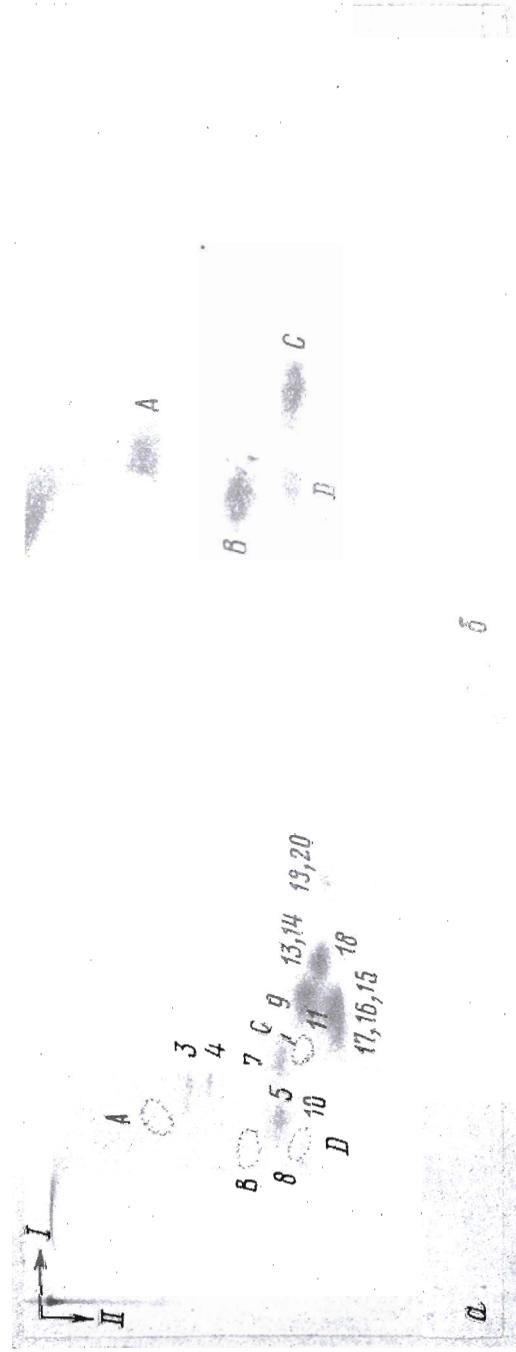


Рис. 3. Разщепление белков монодимером S0S субъединицами ферментом S0S в системе Меслена — Богочада [16].  
а — гель после окрашивания, А, В, С, Д — эти же радиоактивные с ферментом (ii);  $\phi$  — радиоизотопный белок того же геля

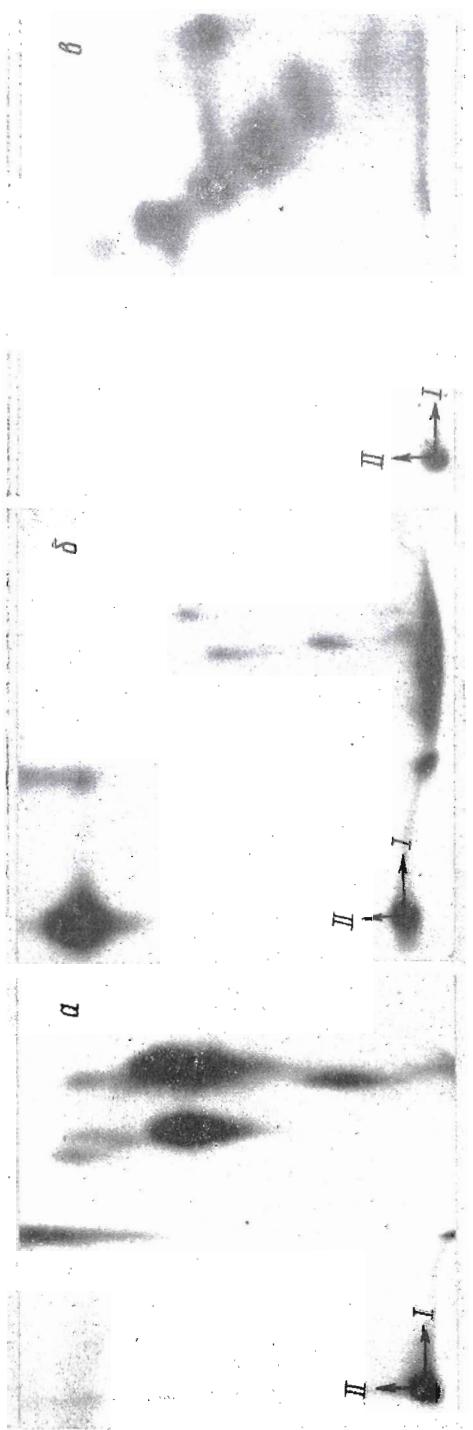


Рис. 4. Радиоавтографы триптических пептидных карт рибосомных белков, получаемые после подибрования белка S5 (a), продукта модификации (δ), белка S7 (ε), I — электрофорез, II — хроматография

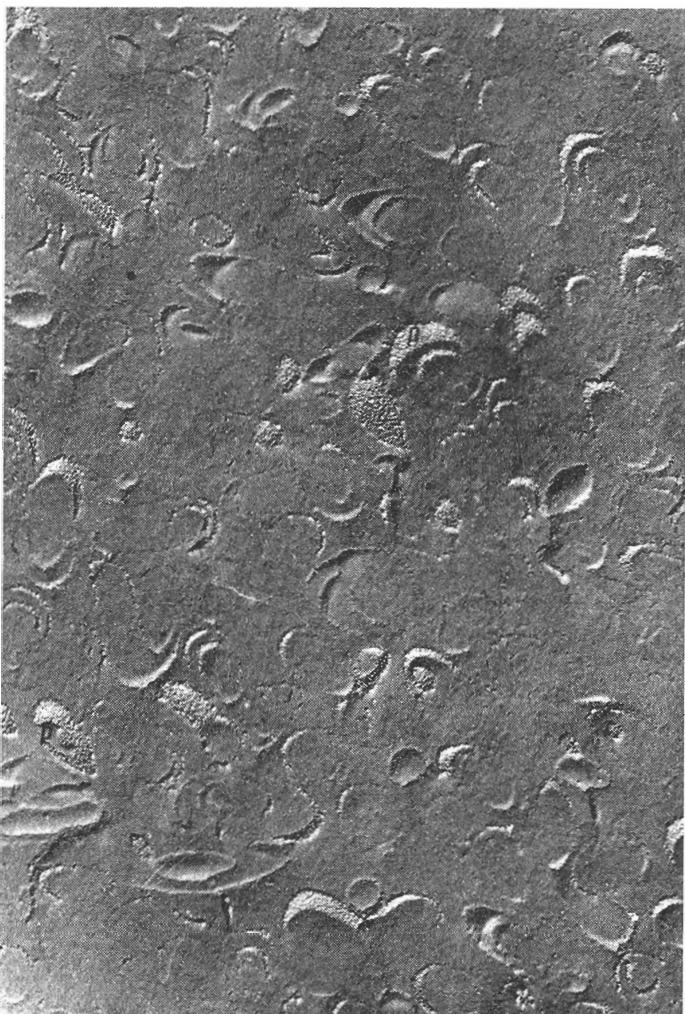


Рис. 7. Реплика пурпурных мембран после их инкубации при  $\text{pH} 12$ . Увеличение 65 000

да ориентированы цитоплазматической (нуклеоидной) поверхностью наружу. При инкубации разбавленных суспензий при  $100^\circ\text{C}$  в течение 5—10 мин сохраняется лишь небольшая доля пузырьков (рис. 6 а), а более продолжительный нагрев сопровождается полным разрушением мембран (рис. 6 б).

При щелочной денатурации пурпурных мембран, так же как и при их тепловой денатурации, наблюдаются обратимая ( $\text{D}570 \rightleftharpoons \text{D}500$ ) и необратимая (накопление продукта  $\text{D}370$ ) стадии [3], однако формы КД-полос денатурированных образцов существенно различны (рис. 2, 2, 4), а в ИК-спектре препарата, денатурированного щелочью, не наблюдается характерного при тепловой денатурации расщепления полосы Амид 1. Электронно-микроскопическое изучение показало, что пурпурные мембранны при  $\text{pH} > 12$  фрагментируются и замыкаются в сферические пузырьки точно так же, как и при высоких температурах (рис. 7), однако при этом не удается наблюдать четкий регулярный рельеф на Р-поверхностях мембран, обычно выявляемый при нагреве вплоть до  $90^\circ\text{C}$ . Регулярность упаковки бактериородопсина на Р-поверхностях нарушалась также в области обратимого  $\text{pH}$ -зависимого перехода  $\text{D}570 \rightleftharpoons \text{D}500$  ( $7 < \text{pH} < 12$ ) [3].

Мы полагаем, что изменения структуры мембран обусловлены денатурационными переходами в участках пептидной цепи бактериородопсина, локализованных вблизи цитоплазматической поверхности пурпурной мембраны. Эти участки, по-видимому, определяют регулярность упаковки белка, которая в свою очередь придает определенную жесткость плоским пурпурным «блляшкам» в бактериальной мембране. При денатурации таких ключевых участков жесткость белкового кристалла нарушается, мембрана фрагментируется, а фрагменты стремятся принять сферическую замкнутую конфигурацию, характерную для фрагментов биологических мембран различного происхождения. При этом однозначность ориентации мембран в замкнутых пузырьках указывает на асимметрию распределения белка именно у цитоплазматической поверхности мембраны. Асимметрия свойств поверхностей пурпурных мембран показана и в других работах [5, 6]. Можно допустить, что денатурационные эффекты, обнаруженные в настоящей работе, обусловлены также асимметричной локализацией основных блоков пептидной цепи бактериородопсина в поперечном сечении мембранны [7], о чем свидетельствует резкое различие рельефов, выявляемых при различных углах оттенения на комплементарных Р- и Е-поверхностях сколов этих мембран (рис. 4), результаты обработки протеолитическими ферментами [8, 9], а также эксперименты по расщеплению замороженных мембран на две половины, когда практически вся молекула бактериородопсина (около 25 000 дальтон) остается на цитоплазматической половине пурпурной мембранны [6, 10].

### Экспериментальная часть

Пурпурные мембранны из *Halobacterium halobium* получали по модифицированной методике [11]. Полученную фракцию пурпурных мембран в течение 1 сут диялизовали против бидистиллята и затем переводили в 0,05 М фосфатный буфер (рН 7,0). Спектры КД записывали на спектрополяризиметре J-20 (Jasco, Япония) в 0,1-мм кюветах, а спектры поглощения — на спектрофотометре «Specord UV-VIS» (Carl Zeiss, ГДР) в 0,5-см кюветах. Температуру кювет поддерживали с помощью ультратермостата с точностью 0,5° С. Калориметрические измерения проводили на сканирующем адиабатическом микрокалориметре ДАСМ-1М (СССР). Все измерения осуществляли при скорости нагрева 1° С/мин. Пурпурные мембранны перед измерениями адаптировали к темноте (ср. [2]). Образцы для электронной микроскопии замораживали во фреоне-22, далее переносили их в жидкий азот и скальывали на усовершенствованной установке JEE-4В (Япония). Платиноуглеродные реплики, полученные описанным ранее методом [12], просматривали в электронном микроскопе JEM-7A (Япония).

### ЛИТЕРАТУРА

1. Jackson M. B., Sturtevant J. M. Phase transition of the purple membranes of *Halobacterium halobium*.— Biochemistry, 1978, v. 17, № 5, p. 911–915.
2. Лазарев Ю. А., Шныров В. Л. Исследование тепловой денатурации бактериородопсина из *Halobacterium halobium*.— Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 1, с. 105–112.
3. Шкраб А. М., Родионов А. В. Щелочная денатурация бактериородопсина в пурпурных мембранны.— Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 3, с. 361–368.
4. Henderson R., Unwin P. N. T. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy.— Nature, 1975, v. 257, p. 28–33.
5. Neugebauer D. Ch., Zingsheim H. P. The two faces of the purple membrane. Structural differences revealed by metal decoration.— J. Mol. Biol., 1978, v. 123, № 2, p. 235–246.
6. Fisher K. A., Yanagimoto K., Stoeckenius W. Oriented adsorption of purple membrane to cationic surfaces.— J. Cell Biol., 1978, v. 77, № 2, p. 611–621.
7. Borovjagin V. L., Plakunova V. G. Freeze-fracture studies of *Halobacterium halobium* membranes.— In: Cell membrane receptors for drugs and gormons: multidisciplinary approach. New York, Raven Press, 1978, p. 261–270.

8. Абдулаев Н. Г., Киселев А. В., Овчинников Ю. А. Действие протеолитических ферментов на пурпурные мембранны *Halobacterium halobium*.— Биоорган. химия, 1976, т. 2, № 8, с. 1148—1150.
9. Абдулаев Н. Г., Киселев А. В., Фейгина М. Ю., Овчинников Ю. А. Изучение асимметричной ориентации бактериородопсина в пурпурной мемbrane *Halobacterium halobium*.— Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 5, с. 709—710.
10. Fisher K. A., Stoeckenius W. Freeze-fractured purple membrane particles: protein content.— Science, 1977, v. 197, № 4298, p. 72—74.
11. Oesterhelt D., Stoeckenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*.— Nature New Biol., 1971, v. 233, p. 149—152.
12. Боровягин В. Л., Северина Е. П., Тараховский Ю. С. К вопросу об интерпретации структуры гидрофобной области биологических мембран.— Докл. АН СССР, 1976, т. 227, № 5, с. 1228—1230.

Поступила в редакцию  
5.XII.1980

**STUDY OF STRUCTURAL ALTERATIONS IN PURPLE MEMBRANES  
OF *HALOBACTERIUM HALOBIUM* AT HEAT  
AND ALKALINE DENATURATIONS**

SHNYROV V. L., TARAKHOVSKY Yu. S., BOROVYAGIN V. L.

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

Heating of the purple membranes from *Halobacterium halobium* at 75—90° C inflicts partial destruction of the bacteriorhodopsin secondary structure and also leads to membrane fragmentation and formation of vesicles. At higher temperature a complete destruction of the purple membranes occurs. Alkaline treatment, similarly to heating, produces membrane fragmentation and vesicle formation; however, regular packing of bacteriorhodopsin preserved at elevated temperatures, disappear after the alkali action.