



УДК 541.143

РЕГУЛЯЦИЯ ЦИКЛА ФОТОХРОМНЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ
БАКТЕРИОРОДОПСИНА ЭЛЕКТРИЧЕСКИМ ПОЛЕМ*Лукашев Е. П., Возари Э., Кононенко А. А.,
Рубин А. В.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
биологический факультет**Абдулаев Н. Г.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Внешнее электрическое поле $\sim 10^7$ В·м⁻¹ замедляет распад интермедиа М фотоцикла бактериородопсина в воздушно-сухих пленках пурпурных мембран. Полученные данные указывают на возможность регуляции эффективности фотоцикла бактериородопсина, зависимой от электрического поля и действующей по принципу обратной связи.

Ранее описано [1] влияние внешнего электрического поля на стационарные концентрации промежуточных продуктов фотоцикла бактериородопсина в воздушно-сухих пленках пурпурных мембран из клеток *Halobacterium halobium*. В полях напряженностью 10^6 — 10^7 В·м⁻¹ наблюдается увеличение фотостационарной концентрации одного из этих продуктов — формы *M*, имеющей максимум поглощения около 412 нм. Известно, что эта стадия фотоцикла непосредственно связана с переносом протонов через пурпурную мембрану [2, 3]. Обнаруженный эффект скорее всего обусловлен влиянием поля на соотношение констант скоростей образования и распада формы *M*.

В работе [1] предположено, что образование формы *M* в фотоцикле сопровождается направленным смещением заряженных или поляризуемых групп, которые взаимодействуют с внутренним электрическим полем, возникающим в результате электронного возбуждения ретиналя. Поляризационная постройка и конформационные изменения функционально-активной части ретиналь-белкового комплекса могут облегчаться во внешнем поле, если эти группы смещаются в направлении действующей силы. Однако специальные эксперименты, выполненные в нашей лаборатории методом импульсной спектроскопии с временным разрешением ~ 1 нс, показали, что по крайней мере при однократном осуществлении фотоцикла бактериородопсина в пленках пурпурных мембран скорость превращения первичного фотопродукта *K* в форму *M* не зависит от приложенного поля вплоть до $\sim 10^8$ В·м⁻¹ *.

Вместе с тем настоящая работа показывает, что электрическое поле такой напряженности вызывает заметное торможение распада формы *M*, ведущего к регенерации исходного бактериородопсина. Именно этот эффект определяет сдвиг фотостационарного распределения в сторону накопления формы *M*.

Увеличение фотондуцированных изменений поглощения бактериородопсина при 420 нм (полоса формы *M*) в пленках пурпурных мембран (рис. 1) особенно четко выражено при низкой интенсивности света. Известно, что кинетика распада формы *M* зависит от фотостационарной

* Сообщение будет опубликовано в ближайшем номере журнала «Известия АН СССР», серия биол. наук.

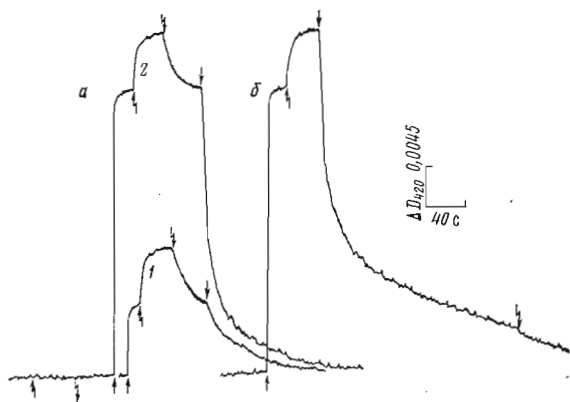


Рис. 1

Рис. 1. Кинетика фото- и электроиндуцированных изменений поглощения бактериородопсина при 420 нм в воздушно-сухих пленках пурпурных мембран (293 К). Здесь и далее зигзагообразными стрелками отмечено включение (стрелка вверх) и выключение (стрелка вниз) электрического поля ($2 \cdot 10^7$ В·м⁻¹), прямыми стрелками — включение и выключение постоянного света (а, кривая 1 — 5 Вт·м⁻²; а, кривая 2; б — 80 Вт·м⁻²)

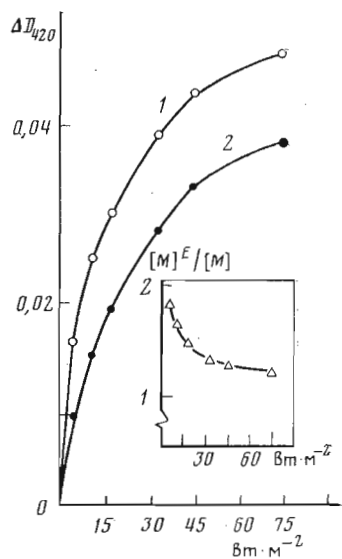


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость фотоиндуцированных стационарных изменений поглощения бактериородопсина при 420 нм от интенсивности постоянного света в присутствии (1) и в отсутствие (2) внешнего электрического поля. На вставке показана зависимость отношения изменений поглощения в присутствии и в отсутствие поля от интенсивности света

концентрации этого промежуточного продукта, по-видимому, вследствие кооперативного характера взаимодействий молекул в тримерах бактериородопсина [4]. Действительно, распад формы M при низкой интенсивности света представляет собой преимущественно однофазный процесс, однако при увеличении интенсивности света в нем появляются дополнительные быстрые фазы.

На рис. 2 показана зависимость стационарных изменений поглощения бактериородопсина при 420 нм от интенсивности света в присутствии и в отсутствие внешнего электрического поля.

Анализ кривых, отражающих распад формы M при максимальной интенсивности света 80 Вт·м⁻² (380—580 нм), свидетельствует о том, что этот процесс хорошо описывается суммой трех экспоненциальных компонентов. Разложение на экспоненты проводили путем последовательного вычитания компонентов после представления соответствующих кривых в полулогарифмических координатах. Для типичного случая характеристическое время наиболее быстрой фазы (τ_1) составляет менее 1 с; времена двух других фаз (τ_2 и τ_3) — соответственно около 7 и 50 с.

В контрольных экспериментах с импульсным возбуждением фотоцикла лампой ИСП-100-3М (~10 мкс, 3 Дж) и временным разрешением ~1 мс также наблюдается трехфазная кинетика распада формы M (рис. 3); в этих опытах было определено также значение τ_1 , равное 70 ± 5 мс.

Полученные данные согласуются с результатами аналогичных измерений, выполненных ранее в работе [5]. Авторы этой работы пришли к выводу, что сложная кинетика распада формы M обусловлена либо наличием трех различных конформационных состояний этого промежуточного продукта, либо трех различных путей его превращения.

Влияние электрического поля на кинетику релаксации фотоиндуцированных изменений в полосе поглощения формы M выявлено нами при

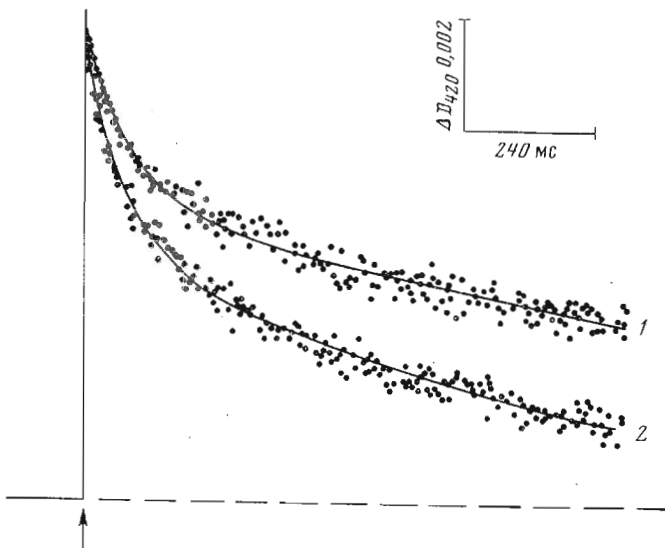


Рис. 3. Изменения поглощения бактериородопсина при 420 нм, индуцированные одиночным импульсом света ($\lambda > 520$ нм, длительность 10 мкс) в воздушно-сухих пленках пурпурных мембран во внешнем электрическом поле (1), и в его отсутствие (2). (Сплошные линии — результат обработки данных на ЭВМ; см. текст)

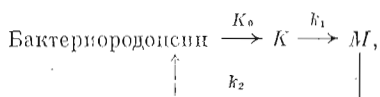
постановке эксперимента по следующей схеме. Образцы освещали синезеленым светом, а затем прикладывали электрическое поле; по достижении стационарного уровня изменений в свет выключали, регистрируя восстановление исходного поглощения в электрическом поле (рис. 16). Во внешнем поле общее время распада формы M существенно больше. Влияние поля прежде всего проявляется в значительном увеличении τ_3 — времени наиболее медленной фазы; значения τ_1 и τ_2 при этом остаются практически неизменными. В типичном случае в поле напряженностью $5 \cdot 10^7$ В·м⁻¹ кривая релаксации описывается суммой трех экспоненциальных компонентов с τ_1 70 ± 5 мс, τ_2 8 с и τ_3 120 с.

Специальные эксперименты с импульсным возбуждением подтвердили, что времена τ_1 и τ_2 мало чувствительны к внешнему полю (рис. 3). Для увеличения точности измерений мы использовали накопление сигналов с помощью модифицированного анализатора импульсов Nokia LP 4050 (32 световых импульса с частотой 0,4 Гц) с последующей обработкой данных на ЭВМ «Электроника-100» по стандартной программе разложения кривых на две экспоненты. В электрическом поле напряженностью до $5 \cdot 10^7$ В·м⁻¹ наблюдается некоторое увеличение вклада компонента с характеристическим временем τ_2 .

Следуя приведенной выше интерпретации, необходимо признать, что либо одно из состояний формы M , либо один из путей его распада находится под контролем электрического поля.

Мы изучили также кинетику темнового распада формы M при обращении направления поля в момент выключения действующего света (рис. 4). Как видно, при этом процесс ускоряется; кинетический анализ соответствующих кривых показывает, что уменьшается лишь время τ_3 , т. е. ускоряется наиболее медленная стадия превращения формы M . Это приводит к уменьшению фотостационарной концентрации формы M (рис. 5).

В соответствии с результатами наших наблюдений и данными работы [5] цикл фотопревращений бактериородопсина в воздушно-сухих пленках пурпурных мембран проходит только три основные стадии и формально может быть описан следующей схемой:



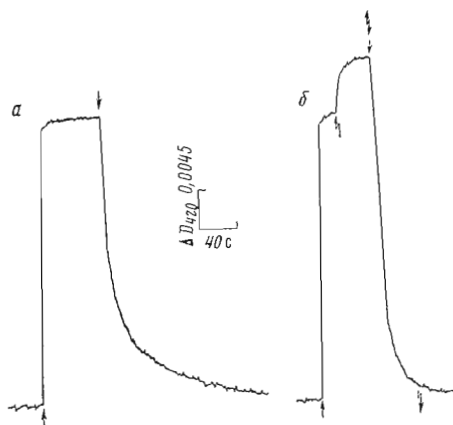


Рис. 4. Изменения поглощения бактериородопсина при 420 нм в воздушно-сухих пленках пурпурных мембран, индуцированные освещением и внешним электрическим полем: *a* — темновая релаксация изменений в отсутствие поля; *b* — то же при изменении направления поля на противоположное в момент выключения света. Двойной зигзагообразной стрелкой отмечено обращение поля. Остальные условия и обозначения см. подпись к рис. 1

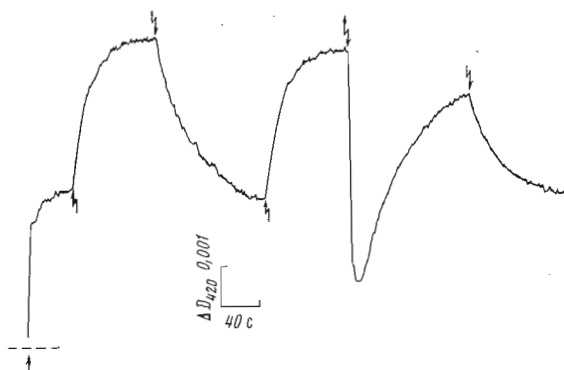


Рис. 5. Изменения поглощения бактериородопсина при 420 нм под влиянием электрического поля различного направления на фоне постоянного освещения. Условия эксперимента и обозначения см. подписи к рис. 1 и 2

где константа k_0 зависит от интенсивности действующего света, а k_1 и k_2 — константы скорости соответствующих темновых переходов.

Поскольку константа k_1 всегда больше k_2 и не зависит, как уже отмечено выше, от внешнего электрического поля, рассмотрим лишь лимитирующие стадии фотодиагона, т. е. световую стадию и наиболее медленную фазу распада формы M , чувствительную к электрическому полю. Решение системы соответствующих дифференциальных уравнений в нормированном виде приводит к следующему выражению для фотостационарной концентрации формы M : $[M] \approx k_0 / (k_0 + k_2)$.

Для отношения концентрации формы M во внешнем электрическом поле и в его отсутствие получим: $[M]^E / [M] \approx (k_0 + k_2) / (k_0 + k_2^E)$, где $[M]^E$ — концентрация формы M и константа скорости ее распада в поле. Из этой формулы следует, что при низких интенсивностях действующего света, когда $k_0 < k_2^E$, должно соблюдаться соотношение $[M]^E / [M] \approx k_2 / k_2^E$. Действительно, при низкой интенсивности света ($3 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$) отношение стационарных концентраций формы M в поле и без поля близко к 2, что практически совпадает со значением отношения времен τ_3^E / τ_3 .

Таким образом, замедление скорости распада формы M в электрическом поле, по-видимому, является основной причиной, обуславливающей

наблюдаемое в поле увеличение фотостационарной концентрации этого промежуточного продукта.

Строгое количественное описание эффекта, очевидно, требует рассмотрения конкретной модели динамики молекулярных групп, вовлеченных в процесс репротоноирования Шиффова основания (переход формы M в исходный бактериородопсин), что в настоящее время представляется затруднительным. Можно предположить, однако, что электроиндуцированная поляризация бактериородопсина приводит к изменению характера взаимодействия легкой протондонорной группы ($D-H$) и Шиффова основания ($C=N$), например, из-за изменения расстояния между ними на участке, лимитирующем общую скорость процесса. В этом случае величина эффекта должна зависеть от взаимной ориентации направления движения протона от $D-H$ к $C=N$ в бактериородопсине и вектора приложенного поля. Существенно, что в изученных нами пленках пурпурные мембраны не имели одинаковой ориентации, т. е. не располагались, например, все цитоплазматической стороной к одному из электродов. Как уже отмечено ранее [1, 6], эти образцы, по-видимому, состоят из двух приблизительно равных фракций противоположно ориентированных друг к другу мембран, стороны которых параллельны плоскостям электродов. С учетом этого факта совокупность полученных результатов (рис. 4, 4 и 5) можно объяснить, предположив, что: а) в отсутствие внешнего электрического поля перенос протона от $D-H$ к $C=N$ осуществляется в направлении, образующем некоторый угол с поверхностью мембраны (а значит, и с электродами в изученных образцах); б) группа $D-H$ способна смещаться на определенные расстояния от равновесного положения в соответствии с направлением приложенного поля. Тогда в электрическом поле того или иного возможного направления после установления стационарного состояния в обеих фракциях пурпурных мембран расстояние между $D-H$ и $C=N$ может оказаться больше такового в отсутствие поля, что приводит к общему снижению скорости распада формы M (рис. 1). В рамках принятых допущений (условия «а» и «б») при переходе между стационарными электроиндуцированными состояниями, возникающими в полях противоположной направленности, в обеих фракциях пурпурных мембран группа $D-H$, очевидно, может достигать в определенный момент времени такого положения по отношению к $C=N$, что расстояние между ними оказывается меньше равновесного в отсутствие поля. Это, по-видимому, и определяет заметное увеличение общей скорости темнового распада формы M (рис. 4) и индукционные явления на свету (рис. 5), наблюдаемые при электрической «перезарядке» пленок поляризованных пурпурных мембран. Можно надеяться, что дальнейшие эксперименты на препаратах ориентированных пурпурных мембран приведут к более точному описанию природы обнаруженных эффектов.

Изложенные результаты указывают на возможность существования молекулярного механизма регуляции эффективности фотоцикла бактериородопсина, зависящего от электрического поля и действующего по принципу отрицательной обратной связи. В физиологических условиях работа такого механизма, очевидно, могла бы поддерживать уровень мембранного протонного градиента, соответствующий энергетическим потребностям клетки, за счет уменьшения скорости завершающей стадии фотоцикла (переход формы M в исходной бактериородопсин) при возрастании напряженности электрического поля.

Результаты недавних исследований, проведенных в лаборатории Л. Пэкера [7, 8], позволяют утверждать, что влияние электрического поля обнаруживается не только в изученной нами модельной системе. В этой лаборатории в согласии с представленными здесь результатами было найдено, что фотостационарная концентрация формы M и кинетика распада этого продукта существенно зависят от электрической составляющей протонного градиента на мембранах липосом со встроенным бактериородопсином.

Итак, торможение электрическим полем перехода формы M в исходный бактериородопсин, по-видимому, следует связывать с уменьшением

эффективности взаимодействия депротонированного Шиффова основания с протонодонорными группами аминокислотных остатков, формирующих протонный канал в молекуле бактериородопсина. Это может быть вызвано индуцированными изменениями диэлектрических свойств ближайшего окружения ретиналя, влияющими на характер внутримолекулярной подвижности бактериородопсина и приводящими к локальным структурным перестройкам.

Процессы такого рода, протекающие во внешних электрических полях той же напряженности, что и фотоиндуцированные в естественных условиях, прослежены нами ранее [1] в экспериментах по термодеполаризационному анализу пленок пурпурных мембран.

Экспериментальная часть

Пурпурные мембраны из клеток *H. halobium R*, выделяли по методу Остерхельта и Стокениуса [9] с некоторой модификацией заключительной стадии. Суть последней заключается в том, что мембраны, полученные после центрифугирования в градиенте сахарозы, пропускали через колонку с сефадексом G-50 (крупный), уравновешенную с дистиллированной водой. Этот метод позволяет не только полностью освободиться от сахарозы, но и сохранить мембранный препарат в неагрегированном состоянии.

Исследованные образцы представляли собой многослойные пленки пурпурных мембран, заключенные между алюминиевыми электродами на стеклянной подложке; техника их приготовления описана в работах [1, 6]. Толщина пленок составляла 5–7 мкм, их электрическое сопротивление около 10^{12} Ом. Образцы хранили в темноте при комнатной температуре и относительной влажности 40–50%. Непосредственно перед измерениями бактериородопсин переводили в светоадаптированное состояние, освещая образцы сине-зеленым светом (об особенностях изомеризации ретиналя в сухих пленках пурпурных мембран см. [10]). Как и в работе [1], цикл фотопревращения бактериородопсина активировали сине-зеленым светом (380–580 нм, $80 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$), используя граничный светофильтр СЗС-22 и тепловой водяной фильтр. Регистрацию фотоиндуцированных переходов после непрерывного или импульсного освещения образцов в контролируемом внешнем электрическом поле проводили на многоцелевом дифференциальном спектрофотометре, сконструированном в проблемной лаборатории космической биохимии Московского университета [11]. С учетом известных данных о фоточувствительности промежуточных продуктов цикла бактериородопсина, в частности формы *M* [12], были проведены специальные эксперименты по избирательному возбуждению образцов светом 520–580 нм (используя комбинацию граничных светофильтров СЗС-22 и ОС-11) в полосе поглощения бактериородопсина в основном состоянии. Сравнение полученных результатов показало, что общее время темнового распада форм *M*, образующихся на свету 380–580 нм, актиничном для этих фотопродуктов, несколько меньше такового при селективном возбуждении (520–580 нм) исходного бактериородопсина. Вместе с тем качественный характер влияния поля на фотостационарную концентрацию форм *M* вследствие торможения их распада не обнаруживает сильной зависимости от спектрального состава использованного света.

Авторы благодарны В. П. Шинкареву за полезное обсуждение результатов.

Работа выполнена в рамках программы исследований «Родопсин», возглавляемой академиком Ю. А. Овчинниковым.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lukashov E. P., Vozary E., Kononenko A. A., Rubin A. B. *Biochim. et biophys. acta*, 1980, v. 592, p. 258–266.
2. Драчев Л. А., Каулен А. Д., Скулачев В. П. *Молекулярн. биология*, 1977, т. 11, № 6, с. 1377–1386.

3. *Stoeckenius W., Lozier R. N., Bogomolni R. A.* Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 505, p. 215-278.
4. *Korenstein R., Hess B., Markus M.* FEBS Lett., 1979, v. 102, № 1, p. 155-161.
5. *Korenstein R., Hess B.* Nature, 1977, v. 270, № 5633, p. 184-186.
6. *Borisevich G. P., Lukashev E. P., Kononenko A. A., Rubin A. B.* Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 546, p. 171-174.
7. *Quintanilha A. T.* FEBS Lett., 1980, v. 117, № 1, p. 8-12.
8. *Carmeli C., Quintanilha A. T., Packer L.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 7, № 5, p. 4707-4711.
9. *Osterhelt D., Stoeckenius W.* Nature New Biol., 1971, v. 233, p. 149-152.
10. *Korenstein R., Hess B.* FEBS Lett., 1977, v. 82, № 1, p. 7-11.
11. *Верхогуров В. Н., Кононенко А. А.* В сб.: Современные методы исследования фотобиологических процессов / Ред. Рубин А. Б., М.; Изд-во МГУ, 1974, с. 10-66.
12. *Балашов В. П., Луреин Ф. Ф.* Биофизика, 1981, т. 26, № 3, с. 557-570.

Поступила в редакцию
11.III.1982

После доработки
29.IV.1982

ELECTRIC FIELD REGULATION OF BACTERIORHODOPSIN PHOTOCROMIC CYCLE

LUKASHEV E. P., VOZARY E., KONONENKO A. A.
RUBIN A. B., ABDULAEV N. G.

*Department of Biology, M. V. Lomonosov State University, Moscow;
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Applied electrostatic field was found to slow down the decay of the *M* photointermediate in the air-dried films of *Halobacterium halobium* R₁ purple membranes. The data obtained suggest possible operation of electric field-dependent feed-back mechanism regulating efficiency of the bacteriorhodopsin photoconversion.