



УДК 577.322.2:541.121

ВЛИЯНИЕ АНИОНОВ НА СПЕКТРАЛЬНЫЙ ПЕРЕХОД  
БАКТЕРИОРОДОПСИНА ПРИ НИЗКИХ ЗНАЧЕНИЯХ pHДрачев А. Л., Драчев Л. А., Каулен А. Д.,  
Хитрина Л. В.Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
Межфакультетская проблемная лаборатория молекулярной биологии  
и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского

Чекулаева Л. Н.

Институт биофизики Академии наук СССР, г. Пущино Московской обл.

Исследован спектральный переход бактериородопсина в суспензии пурпурных мембран из синей формы (БР605) в кислотную пурпурную (БР565) в растворах HCl и HCl+KCl. Этот переход не зависит от pH и происходит только под действием анионов. pH-зависимость степени перехода БР605 $\rightleftharpoons$ БР565 в координатах Хилла линейна и имеет наклон, близкий к 3. Обсуждается кооперативность перехода триад. Кинетика быстрых фотоответов использована как критерий различия пурпурных форм бактериородопсина, характерных для нейтральной и кислой сред.

Бактериородопсин — пигмент специфического бесхлорофильного фотосинтеза у экстремальной галофильной бактерии *Halobacterium halobium*. Его выделяют в составе пурпурных мембран — овальных чешуек размером ~0,5–1 мкм. Бактериородопсин — единственный протенид в этих мембранах — образует двумерную гексагональную кристаллическую решетку, в узлах которой расположены белковые тримеры. В нейтральной среде после адаптации к свету бактериородопсин имеет максимум поглощения 568 нм, который после выдерживания препаратов в темноте сдвигается до 558 нм («нейтральные» пурпурные формы) [1, 2]. Снижение pH ведет к переходу бактериородопсина в форму с максимумом поглощения при 605 нм (БР605) [1], положение которого при освещении препарата не изменяется [3]. При дальнейшем добавлении кислот происходит сдвиг максимума до 565 нм; у этой, «кислотной» пурпурной формы (БР565) цикл адаптации к свету и к темноте выражен слабо [4] или совсем отсутствует [3]. Переход «нейтральной» пурпурной формы бактериородопсина в синюю форму БР605 pH-зависим, причем рK этого перехода снижается с ростом концентрации катионов [2–7]. Что касается перехода БР605 в «кислотную» пурпурную форму БР565, то он протекает с поглощением аниона [3]. Данная работа посвящена детальному исследованию ионной зависимости этого последнего перехода.

В 0,01 М растворе HCl бактериородопсин в пурпурных мембранах находится в синей форме, его электрический ответ на вспышку света при этом включает только отрицательную фазу. Переход бактериородопсина в эту форму сопровождается исчезновением в фотохимическом цикле интермедиата M412 [6, 7] (рис. 1а, в). Критерием перехода синей формы в «кислотную» пурпурную форму БР565 кроме смещения максимума поглощения хромофора может быть дальнейший рост отрицательной фазы электрического ответа (при отсутствии положительных фаз) и появление багоинтермедиата, по своей кинетике соответствующего отрицательной фазе электрического ответа [6, 7]. Как видно из рис. 1б, прибавление KCl при pH ~2 вызывает появление пурпурной формы, а одновременно в ответ на вспышку света начинает образовываться M412 (рис. 1а). Это означает, что в присутствии KCl появляется «нейтральная» пурпурная форма, поскольку рK ее перехода в форму БР605 снижается с ростом концентрации ка-

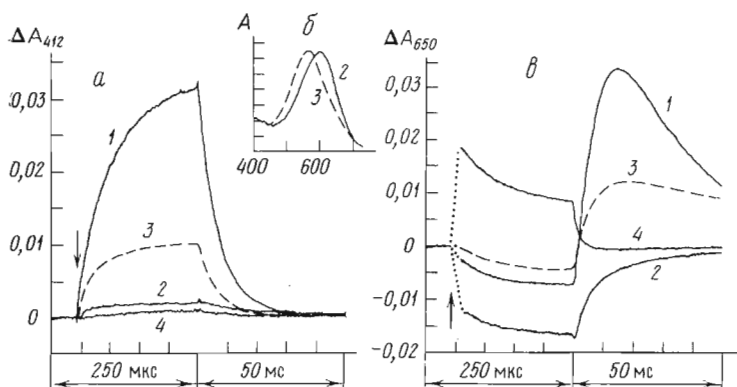


Рис. 1. Изменения оптической плотности суспензии пурпурных мембран при 412 (а) и 650 нм (б) в ответ на лазерную вспышку (момент вспышки показан стрелкой; участки кривых, не разрешаемые при измерениях, изображены пунктиром; спектры поглощения мембран — на вставке б). Среда: 1 — бидистиллированная вода, pH суспензии доведен до 3,8; 2 — 0,01 М HCl; 3 — 0,01 М HCl+0,4 М KCl; 4 — 0,4 М HCl

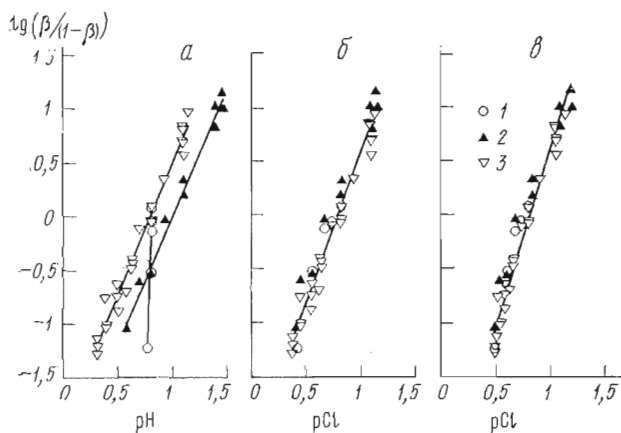


Рис. 2. Зависимость степени перехода  $BR605 \rightleftharpoons BR565$  от pH и pCl. Методика расчета величин pH и pCl приведена в «Экспер. части» (а и б — метод 1, в — метод 2). Среда: 1 — 0,2 М HCl+KCl; 2 — HCl+KCl (в соотношении 1 : 1); 3 — HCl

гнонов [5, 6]. С другой стороны, небольшая амплитуда изменений поглощения при 412 нм в ходе фотохимического цикла и промежуточный характер кинетика батоинтермедиата (рис. 1б) свидетельствуют и о появлении «кислотной» пурпурной формы BR565. В работе Остерхельта и др. [3] показано, что по своему влиянию на переход  $BR605 \rightarrow BR565$  анионы располагаются в ряд  $F^- < Cl^- < Br^- < I^- < ClO_4^-$ . Эти авторы, однако, прибавляли соли к суспензии пурпурных мембран при pH 2, поэтому они фактически имели дело одновременно с двумя переходами: из синей формы в «кислотную» пурпурную и из синей в «нейтральную» пурпурную форму.

Чтобы избавиться от «нейтральной» пурпурной формы, мы исследовали переход  $BR605 \rightarrow BR565$ , увеличивая концентрацию HCl или одновременно HCl и KCl (в соотношении 1 : 1). В некоторых опытах этот переход наблюдали под действием KCl в присутствии 0,2 М HCl (рис. 2). Во всех указанных условиях гипсохромный сдвиг максимума поглощения бактериородопсина в исследуемом диапазоне концентраций, судя по данным кинетики фотоиндуцированных спектральных изменений, определялся переходом в «кислотную» пурпурную форму.

В координатах Хилла pCl-зависимости степени перехода совпадают в растворах разного состава, в то время как зависимости от pH в этих случаях различны (рис. 2). Далее при добавлении KCl к раствору 0,2 М HCl

pH последнего изменяется на сотые доли, тем не менее переход происходит. Таким образом, переход БР605→БР565 происходит только под действием анионов и не определяется поглощением H<sup>+</sup>-иона. Прямая, отражающая pCl-зависимость логарифма отношения концентраций форм БР605 и БР565, имеет наклон 2,7 (рис. 2б), если коэффициенты активности ионов H<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup> вычислять как указано в «Экспериментальной части» (метод 1). При использовании таблицы «реальных» [8] коэффициентов активности отдельных ионов («Экспериментальная часть», метод 2) соответствующий наклон равен 3,2 (рис. 2в). Хотя последний вариант определения коэффициентов более спорен и менее разработан теоретически и экспериментально, полученный наклон и в этом случае близок к 3. В настоящее время трудно сказать, отражает ли этот наклон кооперативность перехода в тримерах бактериородопсина или поглощение трех анионов Cl<sup>-</sup> одной молекулой протенда. Выбор между этими объяснениями можно было бы сделать, исследовав поведение мономеров бактериородопсина в протеолипосомах [9] или в растворах детергентов [10]. Однако в протеолипосомах переход в сиюю форму неполон и наблюдается частичная денатурация белка. Эта денатурация в растворе 0,01 М HCl была большей, чем в 1 М HCl. Бактериородопсин, солиubilizированный тритоном X-100, в растворах 0,01–1 М HCl денатурирован полностью. При солиubilизации октил-β-D-глюкозидом происходит постепенная денатурация бактериородопсина после добавления HCl. Известно также, что диссоциация пурпурных мембран октил-β-D-глюкозидом при снижении pH до 5 ухудшается, а в присутствии 0,14 М NaCl прекращается совсем [10]. Поэтому степень агрегации бактериородопсина в растворах HCl в присутствии этого детергента требует дополнительного исследования. В результате описанные выше исследования превращений бактериородопсина в пурпурных мембранах крайне затруднительны на препаратах, в которых тримеры этого белка разрушены.

Авторы глубоко благодарны члену-кор. АН СССР проф. В. П. Скулачеву (МГУ, Лаборатория молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского) и ст. н. с. Г. П. Лепневу (химический факультет ЛГУ, лаборатория электрохимии стекла) за помощь, ценные советы и интерес, проявленный к работе.

### Экспериментальная часть

*Получение препаратов бактериородопсина.* Бактериородопсин выделяли по методике Остерхельта и Стокениуса [1, 11] из штамма *H. halobium* 353-П. Протеолипосомы получали как описано ранее [12], а затем выдерживали 4 сут в бидистиллированной воде. Для получения мономеров пурпурные мембраны илкупировали 48 ч в темноте в присутствии 2% тритона X-100 или 2% октил-β-D-глюкозида при комнатной температуре и pH 6,5 [10].

*Оптические измерения.* Кинетику быстрых изменений поглощения суспензии пурпурных мембран ( $8,3 \cdot 10^{-6}$  М бактериородопсин) в ответ на вспышку света измеряли на импульсном спектрофотометре [13]. Фотохимический цикл возбуждали неодимовым лазером модулированной добротности ( $\lambda$  532 нм,  $t_{1/2}$  15 нс, энергия зеленого светового импульса 80 мДж). Спектры поглощения суспензии мембран ( $\sim 10^{-6}$  М бактериородопсин) снимали на спектрофотометре Spesord UV-VIS, устанавливая кюветы вблизи фотоумножителя. При построении кривых в координатах Хилла вклад рассеяния в поглощение вычитали графическим методом, а затем для вычислений брали отношение оптической плотности при двух длинах волн аналогично предложенному в работе [14]:

$$Q = \frac{A_{625}}{A_{565}}, \quad \beta = \frac{Q(c) - Q(1)}{Q(0,01) - Q(1)},$$

где  $\beta$  — доля бактериородопсина в форме БР605,  $Q(0,01)$ ,  $Q(1)$ , — соответственно величины  $Q$  для суспензий пурпурных мембран в растворах 0,01 М HCl, 1 М HCl или 1 М HCl+1 М KCl;  $Q(c)$  — характеристика суспензии в данном растворе.

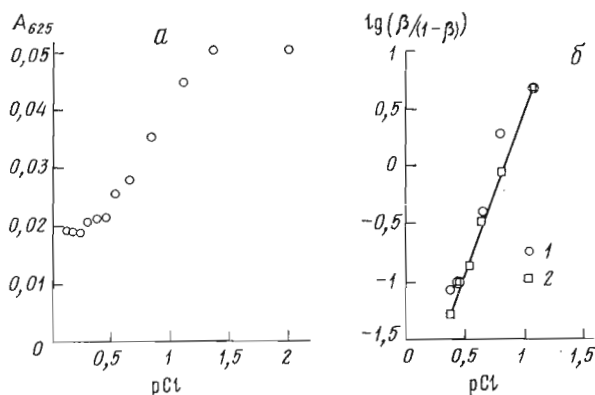


Рис. 3. Изменения оптической плотности при 625 нм при переходе БР605 $\rightleftharpoons$ БР565 (а); эти же данные, представленные в координатах Хилла (б). При вычислении величины  $\beta$  использованы значения  $A_{625}$  (1) и  $Q$  (2). Среда — растворы HCl

Специальные опыты показали, что значения  $\beta$ , вычисленные из величин  $Q$  и из значений  $A_{625}$ , ложатся на одну и ту же зависимость, однако в первом случае разброс меньше (рис. 3).

*Определение pH и pCl.* В используемых растворах потенциал электрода сравнения оказывает существенное влияние на измерения pH с помощью pH-метра. Коррекция показаний с учетом изменений этого потенциала затруднительна [15]. В данной работе pH и pCl вычисляли из концентраций HCl и KCl по формулам

$$\begin{aligned} \text{pH} &= \lg c_{\text{H}^+} \cdot \gamma_{\text{H}^+}, \\ \text{pCl} &= \lg c_{\text{Cl}^-} \cdot \gamma_{\text{Cl}^-}, \end{aligned}$$

где  $c_{\text{H}^+}$  и  $c_{\text{Cl}^-}$  — соответственно молярные концентрации, а  $\gamma_{\text{H}^+}$  и  $\gamma_{\text{Cl}^-}$  — коэффициенты активности протона и Cl<sup>-</sup>-аниона. Значения коэффициентов активности рассчитывали с помощью двух методов.

1. Для вычислений коэффициентов активности HCl ( $\gamma_{\text{HCl}}$ ) и KCl ( $\gamma_{\text{KCl}}$ ) в смесях было использовано правило Харнеда о линейном изменении логарифмов коэффициентов активности в изоляльных смесях электролитов [16]:

$$\begin{aligned} \lg \gamma_{\text{HCl}} &= \lg \gamma_{\text{HCl}(0)} - \alpha_{\text{HCl}} \cdot m_{\text{KCl}}, \\ \lg \gamma_{\text{KCl}} &= \lg \gamma_{\text{KCl}(0)} - \alpha_{\text{KCl}} \cdot m_{\text{HCl}}, \end{aligned}$$

где  $m_{\text{HCl}}$  и  $m_{\text{KCl}}$  — моляльности HCl и KCl в смеси,  $\gamma_{\text{HCl}(0)}$  и  $\gamma_{\text{KCl}(0)}$  — коэффициенты активности HCl и KCl при концентрации каждого раствора, равной суммарной моляльности HCl и KCl в смеси (т. е. для изоляльной серии активность одного электролита в отсутствие другого),  $\alpha_{\text{HCl}}$  и  $\alpha_{\text{KCl}}$  — коэффициенты пропорциональности в уравнении Харнеда [16].

Коэффициенты активности отдельных ионов в растворах HCl и в смешанных растворах HCl и KCl определяли, как было предложено Робинсоном и Бейтсом [17]:

$$\begin{aligned} \ln \gamma_{\text{Cl}^-} &= y_{\text{HCl}} \cdot \ln \gamma_{\text{HCl}} + y_{\text{KCl}} \cdot \ln \gamma_{\text{KCl}} + 0,5h \cdot \ln a_w, \\ h &= y_{\text{KCl}} \cdot h_{\text{KCl}} + y_{\text{HCl}} \cdot h_{\text{HCl}}, \\ a_w &= y_{\text{HCl}} \cdot a_w^{\text{HCl}(0)} + y_{\text{KCl}} \cdot a_w^{\text{KCl}(0)}, \\ \lg \gamma_{\text{H}^+} &= 2 \lg \gamma_{\text{HCl}} - \lg \gamma_{\text{Cl}^-}, \end{aligned}$$

где  $y_{\text{HCl}}$  и  $y_{\text{KCl}}$  — мольные доли электролитов ( $y_{\text{HCl}} + y_{\text{KCl}} = 1$ ),  $h_{\text{HCl}} = 8$  и  $h_{\text{KCl}} = 1,9$  — гидратные числа HCl и KCl [18],  $a_w^{\text{HCl}(0)}$  и  $a_w^{\text{KCl}(0)}$  — активность воды в растворах HCl или KCl при концентрациях, равных суммарной моляльности смеси [19].

2. Для растворов HCl использовали таблицу коэффициентов активности  $\text{Cl}^-$  [8]. Для смешанных растворов HCl и KCl коэффициенты активности  $\gamma_{\text{Cl}^-}$  вычисляли линейной интерполяцией:

$$\gamma_{\text{Cl}^-} = y_{\text{HCl}} \cdot \gamma_{\text{Cl}^-}^{\text{HCl}(0)} + y_{\text{KCl}} \cdot \gamma_{\text{Cl}^-}^{\text{KCl}(0)},$$

используя в качестве  $\gamma_{\text{Cl}^-}^{\text{HCl}(0)}$  и  $\gamma_{\text{Cl}^-}^{\text{KCl}(0)}$  табличные значения коэффициентов активности аниона  $\text{Cl}^-$  соответственно для растворов HCl или KCl при концентрации каждого, равной суммарной моляльности смеси [8].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Oesterhelt D., Stoerkenius W. Nature New Biol., 1971, v. 233, № 39, p. 149–152.
2. Stoerkenius W., Lozier R. H., Bogomolni R. A. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 505, № 3, p. 215–278.
3. Fischer U., Oesterhelt D. Biophys. J., 1979, v. 28, № 2, p. 211–230.
4. Mowery P. C., Lozier R. H., Chae Q., Tseg Y.-W., Taylor M., Stoerkenius W. Biochemistry, 1979, v. 18, № 19, p. 4100–4107.
5. Edgerton M. E., Moore T. A., Greenwood C. FEBS Lett., 1978, v. 95, № 1, p. 35–39.
6. Драчев Л. А., Каулен А. Д., Скулачев В. П., Хирпина Л. В., Чекулаева Л. Н. Биохимия, 1981, т. 46, № 5, с. 897–903.
7. Drachev L. A., Kaulen A. D., Khitrina L. V., Skulachev V. P. Eur. J. Biochem., 1981, v. 117, № 3, p. 461–470.
8. Рабинович В. А., Алексеева Т. Е. Электрохимия, 1973, т. 9, № 10, с. 1434–1436.
9. Cassadio R., Stoerkenius W. Biochemistry, 1980, v. 19, № 14, p. 3374–3381.
10. Dencher N. A., Heyn M. P. FEBS Lett., 1978, v. 96, № 2, p. 322–326.
11. Oesterhelt D., Stoerkenius W. Methods in Enzymol., 1974, v. 31, p. 667–678.
12. Хирпина Л. В., Драчев Л. А., Каулен А. Д., Чекулаева Л. Н. Биохимия, 1982, т. 47, № 11, с. 1763–1772.
13. Драчев Л. А., Каулен А. Д., Скулачев В. П., Хирпина Л. В. Биохимия, 1981, т. 46, № 6, с. 998–1005.
14. Renthall R., Wallace B. Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 592, № 3, p. 621–625.
15. Камман К. Работа с поноселективными электродами. М.: Мир, 1980, с. 53.
16. Харнед Г., Оуэн Б. Физическая химия растворов электролитов. М.: Изд-во иностр. лит., 1952.
17. Robinson R. A., Bates R. G. Analit. chem., 1973, v. 45, № 9, p. 1666–1669.
18. Робинсон Р. А., Стокс Р. Г. Растворы электролитов. М.: Изд-во иностр. лит., 1963.
19. Вопросы физической химии растворов электролитов/Ред. Миклулин Г. И. Л.: Химия, 1968.

Поступила в редакцию  
31.III.1983

#### ANION INFLUENCE ON BACTERIORHODOPSIN SPECTRAL TRANSITION AT LOW pH

DRACHEV A. L., DRACHEV L. A., KAULEN A. D., KHITRINA L. V.,  
CHEKULAIEVA L. N.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry,  
M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow; Institute of Biological Physics,  
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino*

The spectral transition of bacteriorhodopsin in the suspension of purple membranes from the blue form (BR605) to the acidic purple form (BR565) has been investigated in HCl and HCl+KCl solutions. This transition takes place exclusively under the action of anions, and the dependence of the transition degree on  $\text{pCl}^-$  is linear in the Hill coordinates, having the slope close to 3. The cooperativity of the transition in the bacteriorhodopsin trimers is discussed. Flash spectroscopy was used to distinguish between the neutral purple and the acidic purple forms.