



УДК 577.354.2

© 1992 С.И. Бибиков, Р.Н. Гришанин, А.Д. Каулен,
В. Марван*, Д. Остерхельт*, В.П. Скулачев

РОЛЬ БАКТЕРИОРОДОПСИНА В ФОТОРЕЦЕПЦИИ У *HALOBACTERIUM HALOBIVM*

Институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского, Московский
государственный университет им. М.В. Ломоносова;

*Институт биохимии Макса Планка, Мюнхен

Ген бактериородопсина был введен в "слепой" мутант *Halobacterium halobium*, у которого отсутствовали все четыре известных ретинальсодержащих белка (бактериородопсин, галородопсин и сенсорные родопсины I и II) и который, как следствие, не проявлял ни аттрактантной реакции на длинноволновый, ни репеллентной реакции на коротковолновый свет. Клетки полученного в результате трансформации штамма вновь приобрели способность к фоторецепции. При этом репеллентную реакцию индуцировало уменьшение интенсивности не только оранжевого и красного, но и синего света. Для появления репеллентной реакции на снижение освещенности бактериородопсинсодержащий трансформант требовал гораздо больших изменений интенсивности света, чем штамм, содержащий сенсорные родопсины. Чувствительность трансформанта к свету увеличивалась добавлением 1 мМ цианида и, напротив, уменьшалась добавлением аргинина, иначе говоря, регулировалась агентами, увеличивающими или уменьшающими вклад светонезависимой генерации ΔD_{H+} соответственно. При очень высоких фоновых интенсивностях света даже сильные световые стимулы теряли способность к индукции поведенческой реакции, но добавление агентов, повышающих H^+ -проводимость (протонофоров), вновь сенсбилизировало клетки к световым стимулам. Кроме того, было обнаружено, что мутация, результатом которой является замена Asp-96 на Asp в бактериородопсине и, как результат, нарушение его способности к светозависимой ΔD_{H+} -генерации, значительно снижала способность клеток к фоторецепции, опосредованной бактериородопсином. Азид, который, как известно, восстанавливает протонтранспортирующую активность данного мутантного бактериородопсина, увеличивал фоточувствительность клеток, несущих мутантный белок. Более того, азид устранял как падение уровня $\Delta\Psi$, так и репеллентную реакцию — факторы, индуцируемые синим светом у штамма, обладающего бактериородопсином с заменой Asp-96 на Asp, в условиях оранжевого фонового освещения. Предполагается, что фоторецепция, опосредуемая бактериородопсином, обусловлена светозависимой генерацией ΔD_{H+} , которая регистрируется специальным сенсором ΔD_{H+} — "протометром".

Как только бактериородопсин был открыт в 1971 г., его сходство со зрительным родопсином по структуре хромофора (ретиналь), первичной реакции, индуцируемой светом (изомеризация ретиналя), и фоточиклу (образование интермедиатов, абсорбирующих в коротковолновой

области) привело авторов к предположению, что новый ретинальсодержащий белок каким-то образом участвует в фоторецепции [1]. Данное предположение претендовало на возможное объяснение механизма поведенческих реакций галобактерий на световые стимулы.

Однако дальнейшие исследования галобактериальных ретиналевых белков, казалось бы, свидетельствовали против фоторецепторной функции бактериородопсина. Было обнаружено, что, во-первых, бактериородопсин функционирует как светозависимая протонная помпа [2–5] и, во-вторых, галобактерии обладают тремя другими ретиналевыми белками, два из которых – сенсорный родопсин I и сенсорный родопсин II (другое название – фобородопсин) специализированы именно на фоторецепции, а не на запасании энергии света, будучи представленными в клетке в гораздо меньших количествах, чем бактериородопсин [6–13]. Было показано, что аттрактантный эффект оранжевого и красного света может опосредоваться сенсорным родопсином I, тогда как репеллентное действие света коротких длин волн объясняется участием сенсорного родопсина II, а также коротковолнового интермедиата фотоцикла сенсорного родопсина I. Все это усиливало впечатление, что для бактериородопсина, равно как и для галородопсина (Cl⁻-помпы), нет места в фоторецепторной системе галобактерий. Казалось, что противоположные эффекты длинноволнового и коротковолнового света на поведение галобактерий [14] можно объяснить, принимая во внимание лишь два ретинальсодержащих белка из четырех – сенсорные родопсины I и II. Считалось, что такое заключение подтверждается также и фактом очень высокой чувствительности сенсорных родопсинов, которые, подобно зрительному родопсину, работают как счетчик фотонов (одного фотона достаточно для того, чтобы вызвать поведенческий ответ). Однако надо принимать во внимание, что такая максимально возможная чувствительность, будучи по сути идеальной при слабом свете, должна быть не слишком удобной в условиях сильной освещенности из-за быстрого насыщения системы по свету.

В 1981 г. мы описали специфическую особенность реакции *Halobacterium halobium* на уменьшение интенсивности яркого света. Было показано, что цианид и дициклогексилкарбодиимид (DCC) сильно увеличивают чувствительность бактерий к снижению интенсивности яркого света при 500–600 нм. В то же время чувствительность к синему свету не затрагивалась этими веществами [15]. Позже было показано, что использованное в этих экспериментах в качестве стимула уменьшение интенсивности света приводит к снижению трансмембранной разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$) [16]. Величина этого эффекта сильно увеличивалась цианидом и DCC. Кроме того, было показано, что замена Na⁺ на K⁺ в среде инкубации вызывала сенсбилизацию реакции на длинноволновый свет, равно как и увеличивала амплитуду падения уровня $\Delta\psi$ в ответ на уменьшение интенсивности света. Добавление субстратов окисления приводило к уменьшению обоих эффектов.

С целью объяснения всех этих эффектов было выдвинуто предположение, что бактерии обладают специальным устройством для измерения разности электрохимических потенциалов ионов водорода ($\Delta\mu_{H^+}$) [15–18]. Согласно гипотезе, этот рецептор $\Delta\mu_{H^+}$, названный протометром, продуцирует либо аттрактантный, либо репеллентный сигнал, соответственно тому, увеличивается уровень $\Delta\mu_{H^+}$ или, напротив, уменьшается. С увеличением яркости света бактериородопсин генерирует $\Delta\mu_{H^+}$ большего значения, что, собственно, и рецептируется клеткой как аттрактантный стимул. Уменьшение интенсивности света приводит к снижению $\Delta\mu_{H^+}$ и, таким образом, вызывает репеллентный эффект. По-

следнее должно быть особенно выражено при условии, что дыхание или H^+ -АТФ-аза ингибированы соответственно цианидом или DCC. Кроме того, действие DCC направлено также на Na^+/H^+ -антипортер, который включен в систему забуферивания $\Delta\mu_{H^+}$. Такое забуферивание отсутствует при замене внеклеточного Na^+ на K^+ [19, 20].

Изложенная выше гипотеза недавно получила некоторые косвенные подтверждения. Было обнаружено, что у *H. halobium*: а) протонфоры снижают $\Delta\mu_{H^+}$ и вызывают репеллентную реакцию [16], б) цианид и DCC не влияют на фотореакции мутанта, обладающего сенсорными родопсинами, но дефектного по бактериородопсину [21], в) в подобном мутанте $\Delta\psi$ не принимает участия в передаче сигнала фототаксиса [22].

Нельзя, однако, было исключить, что $\Delta\mu_{H^+}$ каким-то образом модулирует процессинг сигнала, продуцируемого сенсорным родопсином I [22]. Если это действительно так, мутант, который обладал бы бактериородопсином как единственным ретиналевым белком, должен быть "слепым", точно так же, как тот, который вообще не обладает ретинальсодержащими белками. С другой стороны, если "протомер" существует, должны быть верны следующие предсказания: а) должно наблюдаться в основном аттрактантное действие света; синий свет в некоторой степени может быть аттрактантным подобно оранжевому или красному по причине широкого спектра действия бактериородопсина как протонной помпы; б) цианид должен сенсibiliзировать фоточувствительность такого штамма; в) свет низкой интенсивности, пригодный для фоторецепции, опосредуемой сенсорными родопсинами, в данном случае должен быть малоэффективным. Освещение должно быть достаточно сильным для того, чтобы поддержать высокую степень протонтранспортирующей активности бактериородопсина. Последнее необходимо, чтобы уровень $\Delta\mu_{H^+}$ в клетке находился в достаточно сильной зависимости от этой активности.

Ниже мы описываем эксперименты, показывающие, что эти свойства действительно присущи трансформанту *H. halobium* Pho81-B4, полученному путем введения гена бактериородопсина в мутант Pho81, у которого отсутствовали все четыре ретиналевых белка.

Система трансформации для *Halobacteria* впервые была описана Клайном и соавт. [23] для *H. volcanii* и затем модифицирована Ни с соавт. [24] для *H. halobium* штамма L-33, в котором ген *bop* был инактивирован IS-транспозоном ISH-2 [25].

Штаммы L-33 и OD-2, оба мутанты *bop*⁻ линии S9, были использованы для получения мутантов группы F1x, дефектных по галлопсину [26].

Штамм F1x15 (производный OD-2) был использован затем для получения мутантов Pho, дефектных по фототаксису [9]. Клетки мутантного штамма Pho81 были подвижны и полностью хемотактильны, но не отвечали на световые стимулы. Мутация была явно плейотропной, и клетки были неспособны к синтезу обоих сенсорных родопсинов, а также метилакцептирующего белка 94 кДа, который, вероятно, включен в процесс трансдукции сигнала, посылаемого сенсорным родопсином на флагеллярный мотор. Таким образом, штамм Pho81, у которого отсутствуют все известные ретинальсодержащие белки, представлялся удобным объектом для трансформации.

Плазмидный вектор p319 (рис. 1) был сконструирован Ни с соавт. [24]. Для этого вектор pH455, экспрессирующийся в *H. volcanii*, содержащий точку инициации репликации и ген устойчивости к мевинолину, был лигирован с плазмидой WT77, содержащей гены *bop*, *brp* и *bat* из *Halobacterium GRB*, точку инициации репликации *Escherichia coli* и ген устойчивости к ампициллину. Мевинолин (δ -лактон 1,2,6,7,8,8a-гек-

сагидро- β , δ -дигидрокси-2,6-диметил-8-(2-метил-1-оксобутоксн)-1-нафтален-пептановой кислоты) является ингибитором β -гидрокси- β -метил-глутарил-CoA-редуктазы, которая необходима для синтеза некоторых галобактериальных липидов [27]. Ген *bor* кодирует бактериородопсин, *brp* и *bat* являются дополнительными генами, в которых нуждается синтез бактериородопсина. Следует отметить, что гены *bor* из *Halobacterium* sp. GRB и *H. halobium* различаются в двух нуклеотидах. Такое различие не затрагивает организацию молекулы бактериородопсина в галобактериальной мембране [28].

Эффективность трансформации была низка, возможно, по причине наличия в клетках реципиентного штамма *H. halobium* эффективной системы модификации-рестрикции. При трансформации штамма Pho81 через 45 сут на поддерживающих чашках было обнаружено только 8 пурпурных колоний среди колоний со спонтанной устойчивостью к мевинолину. Каждому из изолятов был присвоен индекс BN, где N означает номер изолята. После микроскопического контроля и отбора на оптимальный рост среди линий для дальнейших исследований был выбран штамм Pho81-B4.

Клетки мутанта Pho81-B4 росли нормально при 37°C, образуя культуры с интенсивной пурпурной окраской в присутствии $2 \cdot 10^{-5}$ М мевинолина. Однако после трех пассажей в среде, не содержащей мевинолина, клетки имели тенденцию терять пурпурный цвет и характерные поведенческие реакции. Исходя из этого мы заключили, что плазида р319 способна к автономной репликации в клетках *H. halobium*, равно как и к синтезу бактериородопсина, что согласуется с данными Ни и соавт. [24].

Измерения спектров поглощения клеточных лизатов выявили в дифференциальном спектре Pho81-B4 против Pho81 широкий пик с максимумом около 560 нм, который соответствует бактериородопсину. Из штамма Pho81-B4 были выделены пурпурные мембраны, и, как было продемонстрировано при анализе интермедиатов фотоцикла, фотохимическая активность пигмента соответствовала бактериородопсину.

Поведение трансформированных клеток. Высокоподвижные клетки штамма Pho81-B4 получали после нескольких пассажей на чашках Петри с полужидкой агаризованной (0,3%) средой для выращивания, содержащей мевинолин. Приблизительно 90% клеток спонтанно проявляли в своем поведении так называемые реверсии, т.е. остановку движения с последующим изменением его направления в противоположную сторону. Этот эффект проявлялся в основном в течение первых 2 мин от начала наблюдения в условиях отсутствия световых стимулов (спонтанные реверсии, см. рис. 2). Количество клеток, реверсировавших в течение первых 5 с в отсутствие стимулов, не превышало 10%.

Световые стимулы, такие, как снижение интенсивности оранжевого света, вызывали почти немедленный поведенческий ответ. Фактически подавляющее большинство клеток Pho81-B4 реверсировали в течение первых 5 с после подачи светового стимула (рис. 3г-е). Этого не наблюдалось в случае родительского штамма Pho81, клетки которого не отвечали на уменьшение интенсивности света любой из использованных в эксперименте длин волн (рис. 3а-в). Последний факт соответствует ранее опубликованным наблюдениям [29], согласно которым штамм Pho81, обладающий нормальной способностью к хемотаксису, дефектен по фототаксису.

Измерения тактических реакций клеток Pho81-B4 на свет с различными длинами волн (рис. 3г-е) выявили способность трансформанта отвечать реверсией на уменьшение интенсивности синего и ближнего ультрафиолетового света ($300 < \lambda < 400$ нм). Таким образом, бакте-

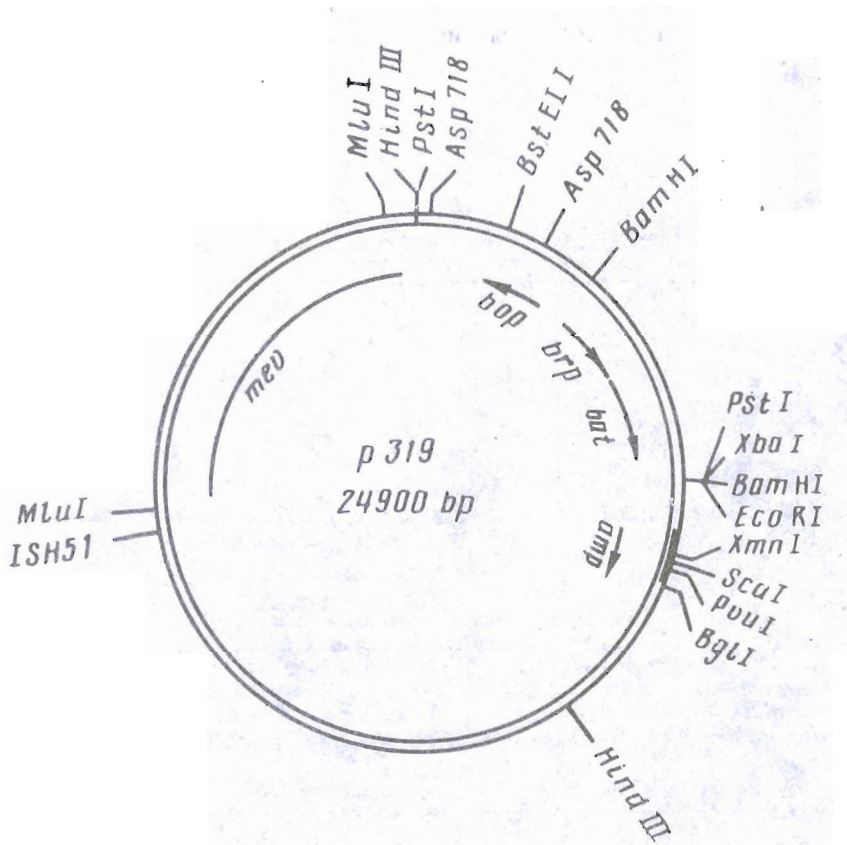


Рис. 1. Плазмидный вектор p319 [21]

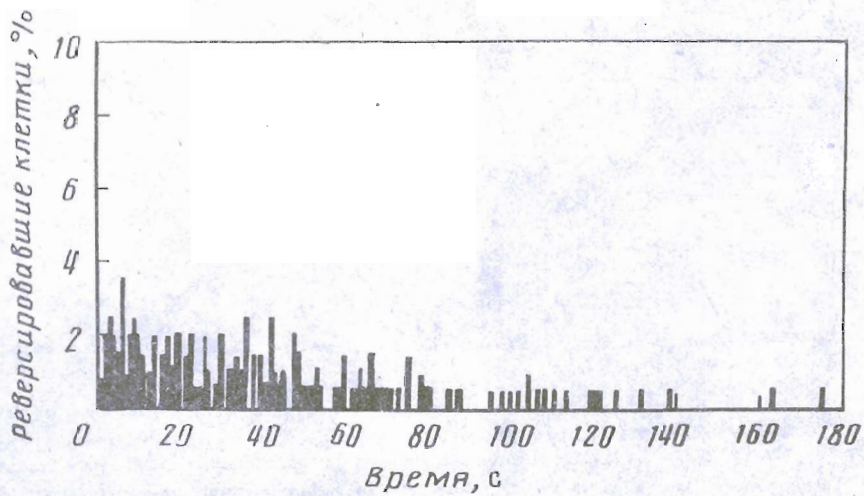


Рис. 2. Спонтанные реверсии штамма Pho81-B4. Гистограмма построена на основе оценки 210 клеток

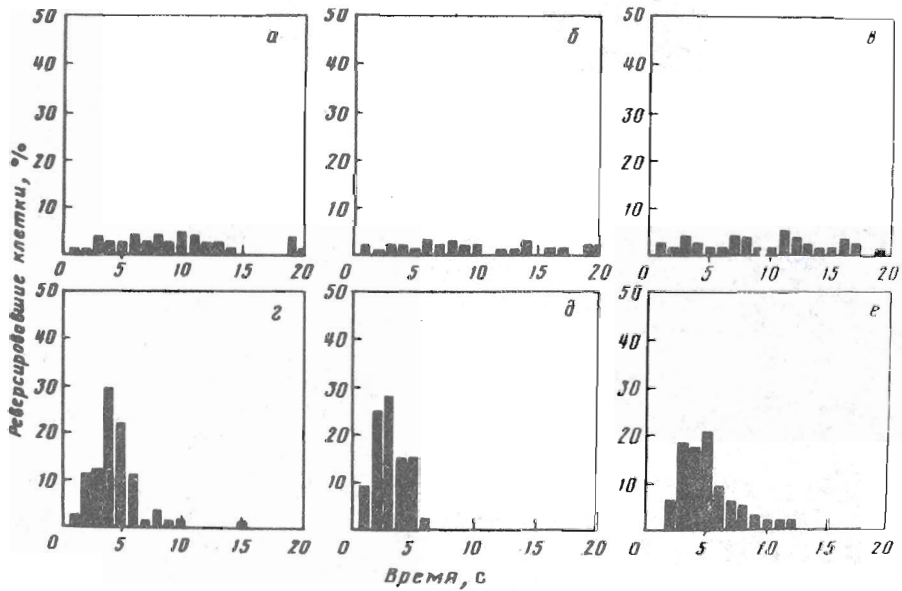


Рис. 3. Действие световых стимулов различных длин волн на частоту реверсий в течение 20 с после подачи стимула на штаммы Rho81 (а-в) и Rho81-B4 (г-е). Световой стимул состоял в 40%-ном падении интенсивности света при введении нейтрального светофильтра в световой пучок в нулевой момент времени. Источник света — ртутная лампа X80 od CS мощностью 200 Вт. а, г — красный свет ($\lambda > 600$ нм), б, д — оранжевый свет ($\lambda > 540$ нм), в, е — синий свет ($300 < \lambda < 400$ нм). Исходная интенсивность света была установлена равной 300 Вт/м^2

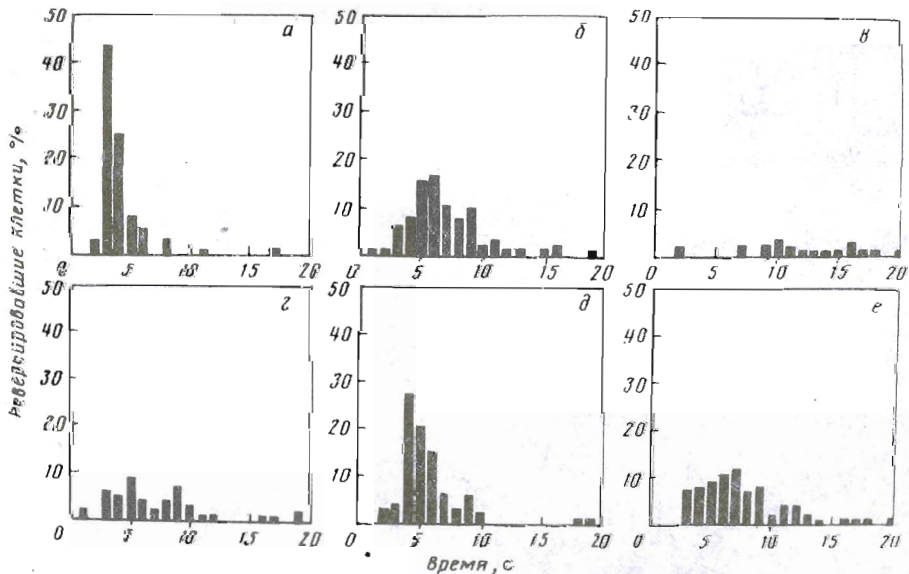


Рис. 4. Поведенческие ответы штаммов Rho81-B4 (а-в) и Fk15 (г-е) на уменьшение яркости оранжевого света разной интенсивности. Стимулы представляли собой уменьшение интенсивности света (в квант- $\text{мм}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$), подаваемого через интерференционный фильтр ($\lambda = 572 \pm 10$ нм): а, г — от $3,8 \cdot 10^{14}$ до $4,7 \cdot 10^{13}$; б, д — от $4,7 \cdot 10^{13}$ до $6,1 \cdot 10^{12}$; в, е — от $6,1 \cdot 10^{12}$ до $7,6 \cdot 10^{11}$

риородопсин, как оказалось, возвращает клеткам способность к фоторецепции, но в своеобразном виде: падение интенсивности синего света, точно так же как оранжевого и красного, вызывало репеллентный ответ у клеток Pho81-B4, что типично для реакции на аттрактантные факторы среды. Следует подчеркнуть, что репеллентный эффект уменьшения яркости синего света совершенно уникален для штамма *H. halobium* Pho81-B4. Даже клетки *E. coli*, не проявляя фототактических реакций на длинноволновый свет видимой области спектра, стремятся избегать синего и ультрафиолетового облучения [30]. Такое поведение вполне объяснимо с точки зрения повреждающего действия коротковолнового света на клетки.

Когда мы нормализовали интенсивности фонового и стимулирующего света, выяснилось, что реакция на оранжевый свет была выше, чем на красный и синий. Среднее время ответа на стимулы, даваемые в оранжевой, красной и синей областях спектра, было равно соответственно 3,1, 4,4 и 5,2 с (рис. 3). Соотношения между данными могут быть объяснены на основе допущения, что бактериородопсин ответствен за фотореакции трансформированных клеток.

На рис. 4 показаны реакции двух штаммов *H. halobium* на стимуляцию оранжевым светом разной интенсивности. Видно, что штамм, обладающий бактериородопсином, т.е. Pho81-B4 (рис. 4а-в), более чувствителен к стимулам, даваемым в области высокой интенсивности света, тогда как с уходом в область низкой интенсивности способность к фоторецепции падает. Например, 8-кратное падение яркости света с $3,8 \cdot 10^{14}$ до $4,7 \cdot 10^{13}$ квант \cdot мм 2 \cdot с $^{-1}$ вызывает более сильную репеллентную реакцию, чем 8-кратное снижение интенсивности света с $4,7 \cdot 10^{13}$ до $6,1 \cdot 10^{12}$ квант \cdot мм 2 \cdot с $^{-1}$. Дальнейшее 8-кратное снижение интенсивности света до $7,6 \cdot 10^{11}$ квант \cdot мм 2 \cdot с $^{-1}$ не оказывало какого-либо значительного действия на частоту реверсий. В то же время клетки штамма Flx15, содержащие сенсорные родопсины (рис. 4г-е), проявляли максимальную фотореакцию на изменение яркости света в области меньшей интенсивности светового потока, чем клетки Pho81-B4.

Как было показано предыдущими исследованиями нашей группы, [15, 16, 21], цианид увеличивает чувствительность *H. halobium* к изменениям интенсивности света. Такой эффект наблюдался на штаммах, обладающих наряду с сенсорными родопсинами еще и бактериородопсином, но не на штаммах, обладающих только сенсорными родопсинами. Было сделано предположение, что цианид, ингибируя Δd_{11+} -генерирующую активность дыхательной цепи, увеличивал вклад бактериородопсиновой протонной помпы в генерацию Δd_{11+} , уровень которой регистрировался Δd_{11+} -рецептором.

Как было обнаружено, то же самое действие цианид оказывает на мутант Pho81-B4: цианид в концентрации 1 мМ повышает величину реакции на фотостимул (рис. 5а-в). Более высокие концентрации цианида (5 мМ) сильно ингибировали фоторецепцию. Для штамма Flx3 все использованные в данном эксперименте концентрации цианида проявляли, скорее, слабое ингибирующее, чем стимулирующее, действие (рис. 5г-е). Ингибиторное действие цианида на фотореакции Flx3 может объясняться относительно низким уровнем Δd_{11+} в клетках этого штамма в присутствии цианида. Этот уровень Δd_{11+} может быть еще достаточным для поддержания подвижности, но слишком низким для того, чтобы клетки могли осуществлять тактические реверсии, как это известно для других бактерий [31]. Штамм Flx3 (bR-sR $^+$) был использован в этом эксперименте вместо Flx15 по причине его сравнительно высокой реакции на фотостимулы в области интенсивности света, оптимальной для реакций клеток

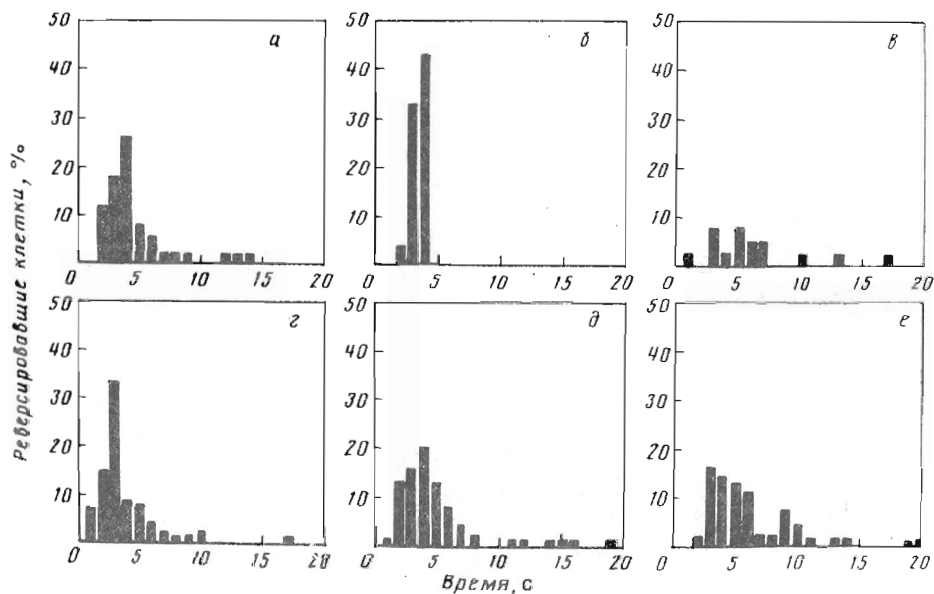


Рис. 5. Действие цианида калия на фотореакцию штаммов Pho81-B4 (а-в) и Flx3 (z-e): а, в — без добавления цианида; б, д — 1 мМ KCN; з, е — 5 мМ KCN. Фотостимул — 40%-ное уменьшение интенсивности освещения, подаваемого через интерференционный светофильтр 572 ± 10 нм

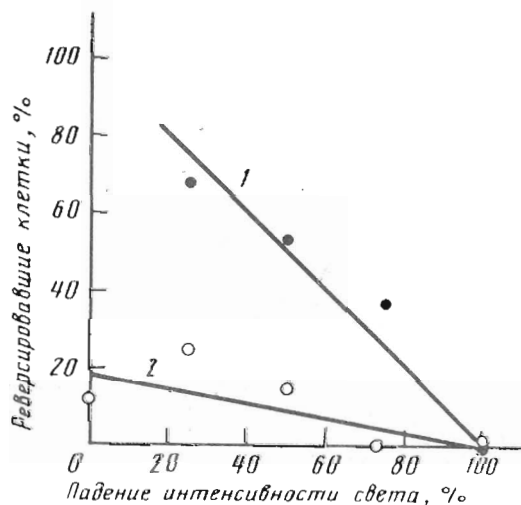


Рис. 6. Зависимость числа клеток Pho81-B4, реверсирующих в ответ на фотостимул, от величины падения интенсивности света. Эксперимент был выполнен в отсутствие (1) и в присутствии (2) 29 мМ аргинина. Интенсивность света снижалась с 40 Вт/м^2 (100%) до указанных на оси абсцисс значений с использованием нейтральных фильтров. После каждого стимула клетки адаптировались к исходному освещению 60 с. Для каждой точки оценивалось 90–100 клеток при помощи системы автоматического слежения

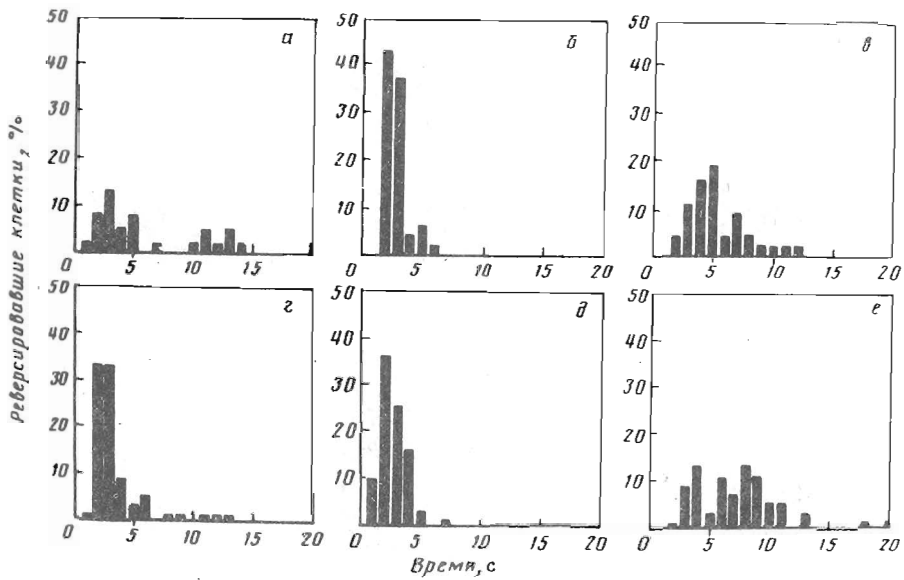


Рис. 7. Фоточувствительность клеток Pho81-B4 при высокой интенсивности фонового освещения ($\lambda > 500$ нм) в отсутствие ХКЦФ (а-в) и в присутствии $2 \cdot 10^{-6}$ М (г-е). Интенсивность света уменьшали путем введения в световой пучок нейтрального светофильтра с 1300 до 160 Вт/м² (а,г), со 160 до 20 Вт/м² (б,д) и с 20 до 2,5 Вт/м² (в,е)

Pho81-B4.

Допуская, что 1 мМ цианид увеличивает фоточувствительность Pho81-B4, ингибируя светонезависимый дыхательный механизм генерации $\Delta\mu_{H^+}$, мы могли предсказать, что стимулирование работы светонезависимой $\Delta\mu_{H^+}$ -генерирующей системы будет уменьшать чувствительность фоторецепции. Как показано на рис. 6, это действительно имеет место. Светонезависимая генерация $\Delta\mu_{H^+}$ была стимулирована добавлением аргинина, который ферментируется галобактериями с образованием АТР, так что последующий гидролиз АТР H^+ -АТР-азой может поддерживать уровень $\Delta\mu_{H^+}$. Согласно рис. 6, добавление аргинина сильно подавляло фоточувствительность клеток штамма Pho81-B4.

В условиях очень высокой интенсивности фонового освещения происходит уменьшение чувствительности фоторецепции (рис. 7а-в). Этот эффект мог быть объяснен насыщением системы бактериородопсин — протомер при максимально высоких значениях $\Delta\mu_{H^+}$. Если это предположение верно, добавление разобщителя (карбонилцианид-3-хлорфенилгидразон, ХКЦФ) должно снимать десенсибилизирующее действие высокоинтенсивного фонового освещения, снижая $\Delta\mu_{H^+}$ ниже насыщающего уровня. Эксперимент подтвердил данное предположение (рис. 7г-е).

Еще одно указание на то, что $\Delta\mu_{H^+}$ включен в процесс трансдукции сигнала в фотореакциях, опосредованных бактериородопсином, было получено в экспериментах с мутантом Pho81-D96N-8, аналогом штамма Pho81-B4, с точечной мутацией в гене *bor* (Asp-96 заменен на Asn; D96N-замена). Мы обнаружили, что этот мутант имеет очень низкую чувствительность к снижению интенсивности оранжевого света — стандартному для Pho81-B4 стимулу, что фактически соответствует данным о

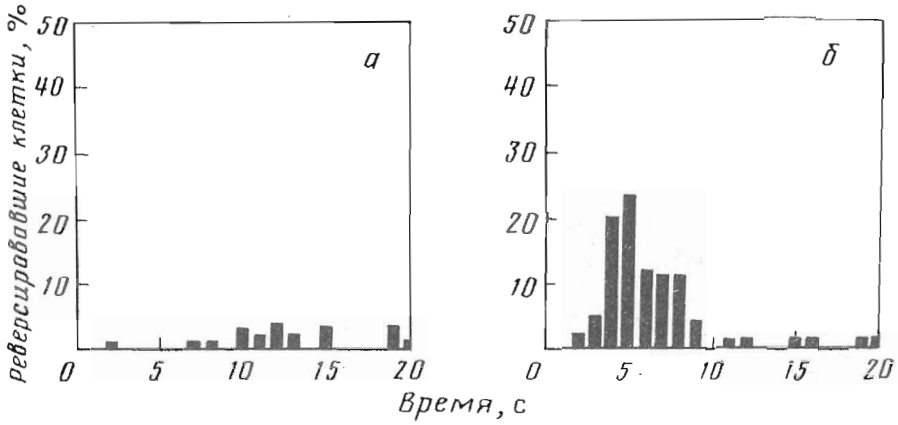


Рис. 8. Чувствительность клеток Pho81-D96N-8 к уменьшению интенсивности оранжевого света в отсутствие азида (а) и в присутствии 5 мМ азида (б). Фотостимул — уменьшение интенсивности 572 ± 10 нм света от $3,8 \cdot 10^{14}$ до $7,6 \cdot 10^{13}$ квант·мм⁻²·с⁻¹

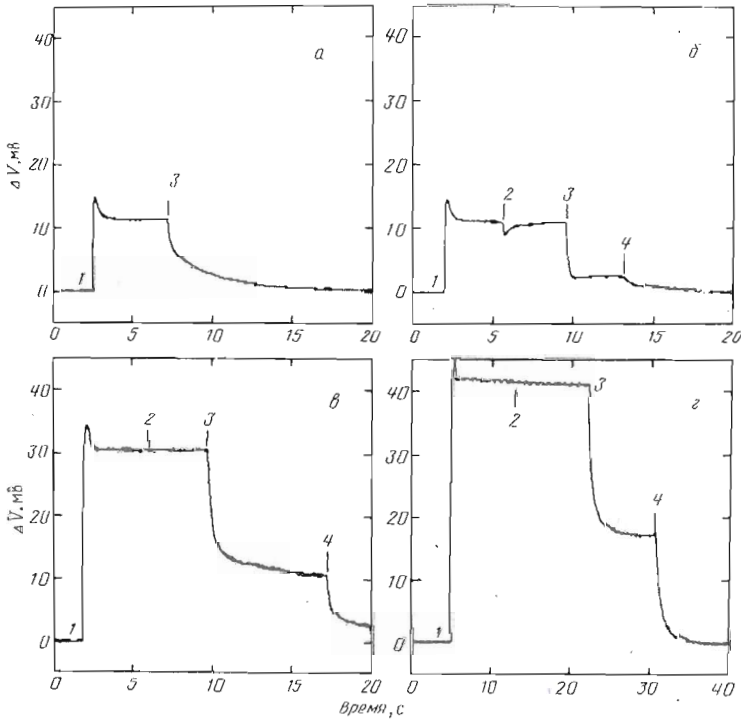


Рис. 9. Генерация электрического потенциала мутантным бактериородопсином D96N (а-б) и бактериородопсином дикого типа (в). 1 — включение оранжевого света; 2 — включение синего света; 3 — выключение синего света; 4 — выключение оранжевого света

том, что замена D96N приводит к сильному ингибированию активности протонной помпы бактериородопсина [32–35]. Мы предположили, что азид, который, как известно, способен восстанавливать активность мутантного D96N-бактериородопсина [36], должен стимулировать способность штамма Pho81-D96N-8 к репеллентным реакциям в ответ на падение интенсивности оранжевого света. Действительно, 5 мМ азид сильно увеличивал чувствительность штамма Pho81-D96N-8 к такому стимулу (рис. 8). В той же серии экспериментов было показано, что экспонирование клеток штамма Pho81-D96-8 на фоне синего освещения вызывает некоторое увеличение их чувствительности к уменьшению интенсивности оранжевого света (данные не приведены). Это наблюдение побудило нас исследовать корреляцию действия оранжевого и синего света на генерацию $\Delta\Psi$ с фотореакциями *H. halobium*.

Известно, что при освещении интермедиата M₄₁₂ фотохимического цикла бактериородопсина происходит конверсия этого интермедиата в исходную форму, bR₅₆₈ [37]. Этот процесс сопровождается генерацией трансмембранной разности потенциалов ($\Delta\Psi$) с полярностью, противоположной полярности $\Delta\Psi$, генерируемой в процессе превращения bR₅₆₈ → M₄₁₂ [38]. В мутантном D96N-бактериородопсине фоточикл ингибирован на стадии распада интермедиата M₄₁₂ [32, 35], так что оранжевый свет приводит к накоплению M₄₁₂. Благодаря этим свойствам включение дополнительного синего света на фоне оранжевого освещения должно вызывать индукцию трансмембранной разности потенциалов с полярностью, противоположной обычно существующей на клеточной мембране, и, следовательно, должно вызывать репеллентную реакцию, опосредуемую "протометром". Оба эффекта должны сниматься азидом. Как показали эксперименты, эти взаимозависимые свойства действительно присущи D96N-мутанту.

На рис. 9 показаны фотоэлектрические реакции, измеренные на бактериородопсинсодержащих фрагментах мембран (пурпурных бляшек), адсорбированных на поверхности коллодиевой пленки, импрегнированной раствором фосфолипидов в декане. Освещение оранжевым светом пурпурных мембран, содержащих мутантный D96N-бактериородопсин, приводит к генерации некоторой $\Delta\Psi$ (рис. 9а), сильно возрастающей при добавлении азиды (рис. 9б). Дополнительное освещение синим светом на фоне оранжевого вызывало незначительное, но вполне измеримое быстрое падение $\Delta\Psi$ (рис. 9б). Такое падение отсутствовало, если в пробы был добавлен азид (рис. 9в). При выключении оранжевого света уровень $\Delta\Psi$ снижался. Это снижение в присутствии синего света было более быстрым, но не полным (ср. рис. 9а, б). В пурпурных мембранах дикого типа оранжевый свет генерировал высокую $\Delta\Psi$, которая не падала при включении синего света даже в отсутствие азиды (рис. 9г). В последнем случае требовались гораздо более высокие интенсивности синего света для того, чтобы вызвать падение $\Delta\Psi$ на фоне оранжевого света (данные не приведены).

Поведенческие ответы штаммов Pho81-B4 и Pho81-D96N-8 на включение синего света на фоне оранжевого освещения свидетельствуют (рис. 10), что синий свет, который является аттрактантом для штамма Pho81-B4 в отсутствие фонового длинноволнового освещения (см. выше, рис. 3е), становится репеллентным в его присутствии. Включение синего света вызывало у клеток, экспонированных на фоне оранжевого света, увеличение процента реверсий в течение нескольких секунд после воздействия. Эта реакция была гораздо выше у мутанта Pho81-D96N-8.

Данные по действию азиды на соотношение фотореакций клеток Pho81-D96N-8 на синий и оранжевый свет говорят о том, что в присут-

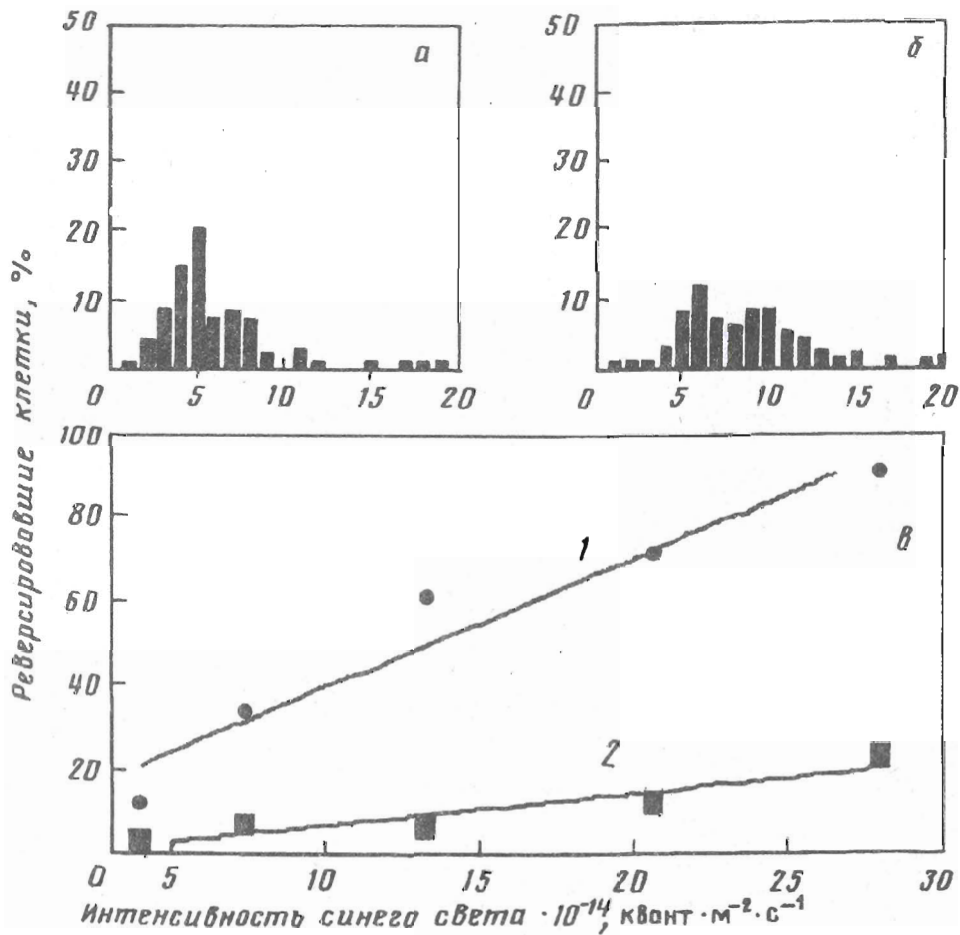


Рис. 10. Реакции клеток Pho81-B4 (б, в-2) и Pho81-D96N-8 (а, в-1) в ответ на включение синего света на фоне оранжевого освещения. Фоновый свет 572 ± 10 нм, $3,8 \cdot 10^{14}$ $\text{квант} \cdot \text{мм}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Синий свет 450 ± 20 нм, $3,67 \cdot 10^{15}$ $\text{квант} \cdot \text{мм}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (а, б). Зависимость репеллентной реакции от интенсивности синего света (в) оценивалась как вероятность остановки клетки с последующим изменением направления движения на противоположное в течение 7 с с момента включения синего света. Для каждой точки оценивалось 75 клеток

ствии азида включение синего света на фоне оранжевого теряет способность вызывать увеличение количества реверсирующих клеток (ср. рис. 11 а, б). Более того, в этих условиях синий свет становился аттрактантом для мутанта Pho81-D96N-8, так как в присутствии азида клетки отвечают реверсией движения не на включение, а на выключение синего света на фоне оранжевого освещения (ср. рис. 11 а и г).

Метиллактоцентрирующие белки таксиса. Известно, что в систему таксиса бактерий включены метиллактоцентрирующие белки-трансдукторы, отвечающие за первые этапы возникновения возбуждения в системе и за

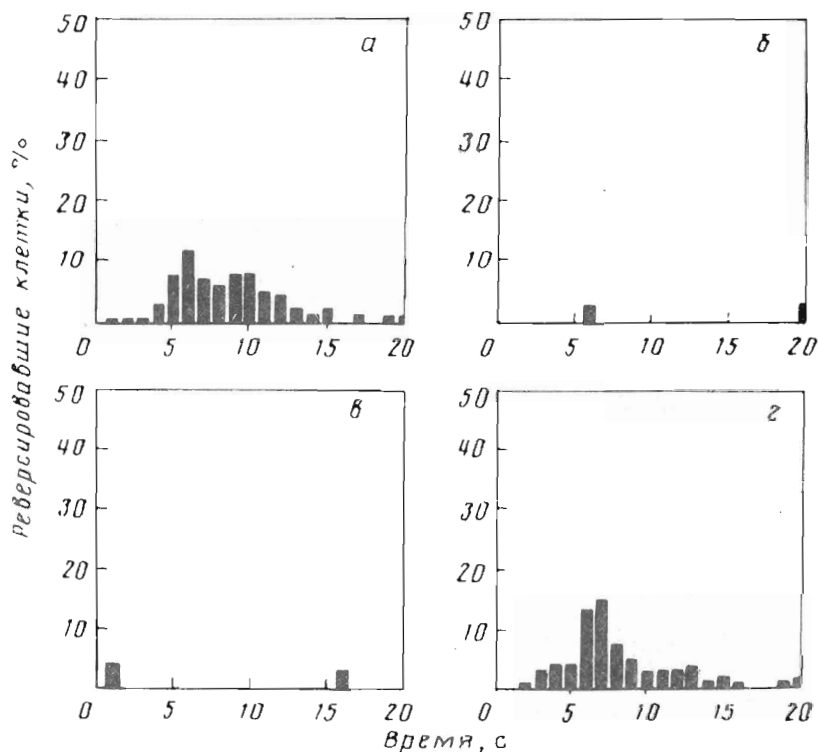


Рис. 11. Действие азида на реакции клеток Pho81-D96N-8 на синий свет в условиях оранжевого фонового освещения в отсутствие азида (а, в) и в присутствии 5 мМ азида (б, д); а, б — реакции на включение синего цвета (450 ± 20 нм, $3,67 \cdot 10^{15}$ квант·мм⁻²·с⁻¹); в, г — реакции на выключение синего света. Фоновый свет 572 ± 10 нм, $6,9 \cdot 10^{12}$ квант·мм⁻²·с⁻¹

Репеллентная реакция трех штаммов *H. halobium*, различающихся по ретинальсодержащим белкам

Стимул	Flx15 bR ⁻ hR ⁺ sRI ⁺ sRII ⁺	Pho81 bR ⁻ hR ⁻ sRI ⁻ sRII ⁻	Pho81-B4 bR ⁺ hR ⁻ sRI ⁻ sRII ⁻
Увеличение интенсивности синего света	Есть	Нет	Нет
Увеличение интенсивности оранжевого света	Нет	"	"
Уменьшение интенсивности синего света	"	"	Есть
Уменьшение интенсивности оранжевого света	Есть	"	"

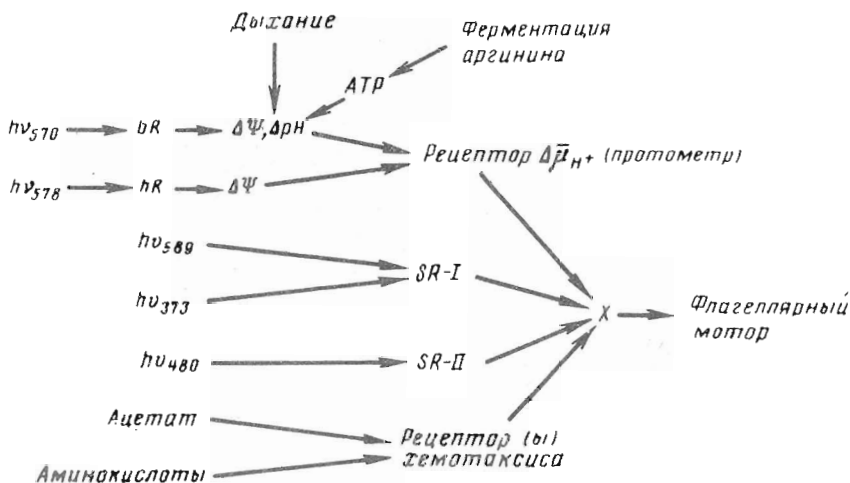


Рис. 12. Система таксиса галобактерий. bR — бактериородопсин; hR — галородопсин; sRI, sRII — сенсорные родопсины I и II; X — "переключатель" флагеллярного мотора

адаптацию к стимулам [39]. Метилакцептирующие белки присутствуют в галобактериях, как и во многих зубактериях; описаны изменения в уровне их метилирования в ответ на фототактические и хемотактические стимулы [40—42]. Мы изучили действие этионина, ингибитора метилирования белков, на поведение штаммов Pho81-B4 и Flx15 в ответ на фотостимулы. Как ранее было показано нашей группой, этионин блокирует фототактическую реакцию дикого типа *H. halobium*, будучи добавленным в концентрации 1 мМ [43]. Мы воспроизвели этот эффект как на штамме, обладающем только сенсорными родопсинами, так и на штамме, содержащем только бактериородопсины (данные не приведены).

В следующей серии экспериментов проводилась идентификация метилакцептирующих белков в различных штаммах *H. halobium*. Клетки инкубировались в присутствии [³H-метил]метионина и ингибитора белкового синтеза пуромидина. Были изучены следующие штаммы: ET1001 (bR⁺sR⁺), R₁M₁ (bR⁺sR⁺), Flx3 (bR⁻sR⁺) и Pho81 (bR⁻sR⁻). Метилакцептирующие белки идентифицировались автордиографически на высокоразрешающих полиакриламидных гелях. Как и в предыдущих исследованиях, в штамме Pho81 отсутствовал один из белков (94 кДа), который, как считается, участвует в процессинге сигнала таксиса, продуцируемого сенсорным родопсином [44]. Было обнаружено, что в штамме ET1001 не выявляется полоса, соответствующая метилируемому белку 80 кДа. В соответствии с результатами наших исследований этот штамм способен к фототаксису, опосредуемому бактериородопсином [21]. Наше предварительное изучение мутации в штамме ET1001 предполагает, что метилакцептирующий белок 80 кДа участвует в передаче сигнала таксиса при рецепции глюкозы и ацетата [45]. Таким образом, если метилирование необходимо для фоторецепции штамма Pho81-B4, то в передаче сигнала от бактериородопсина и протометра на эффектор (флагеллярный мотор) включен иной белок, а не метилакцептирующие белки 80 и 94 кДа. Это

дает основания предполагать, что сенсорные родопсины, протометр, а также рецепторы хемотаксиса используют различные метилакцептирующие белки в процессе передачи и обработки сигнала таксиса.

Результаты изучения фототаксиса различных штаммов *H. halobium* суммированы в таблице и рис. 12. Один из главных результатов данного исследования состоит в том, что ген бактериородопсина был введен в геном "слепого" штамма *H. halobium*, не содержащего ретиналевых белков, и такая трансформация привела к возникновению репеллентной реакции в ответ на уменьшение интенсивности света. Это наблюдение полностью подтверждает гипотезу [15, 21, 17, 46], согласно которой а) фотоны, поглощаемые бактериородопсином, могут иметь в конечном итоге аттрактантное действие; б) такая фотосенсорная система не нуждается в участии сенсорных родопсинов.

Специфические особенности трансформанта полностью соответствуют концепции, заключающейся в том, что фототаксис, опосредуемый бактериородопсином в качестве фоторецептора, обусловлен протонтранслоцирующей активностью бактериородопсина, выражающейся в изменении уровня Δp_{H^+} , который отслеживается специфическим рецептором Δp_{H^+} (протометром). Эта концепция объясняет такие свойства трансформанта, как

1) аттрактантное действие не только длинноволнового, но и коротковолнового света;

2) увеличение фоточувствительности цианидом благодаря подавлению светонезависимого (дыхательного) механизма генерации Δp_{H^+} ;

3) снижение фоточувствительности в присутствии аргинина, стимулирующего светонезависимый (ферментация плюс H^+ -АТФ-аза) путь генерации Δp_{H^+} ;

4) необходимость для фоторецепции довольно высоких интенсивностей света, достаточных для поддержания генерации Δp_{H^+} за счет работы бактериородопсина;

5) сенсibiliзирующее действие разобщителя в условиях подавления фототаксиса очень высокими интенсивностями фонового освещения;

6) низкая фоточувствительность трансформанта, несущего мутантный бактериородопсин, имеющий пониженную активность как H^+ -помпы (D96N-мутант);

7) активация фоторецепторной функции в D96N-мутанте при добавлении азида, который, как известно, восстанавливает H^+ -транспортирующую активность мутантного бактериородопсина;

8) репеллентное действие синего света, подаваемого на фоне оранжевого освещения, особенно выраженное в случае мутанта D96N;

9) снятие эффекта (8) азидом.

Интересная возможность состоит в том, что сенсорные родопсины могут быть ответственны за фоторецепцию, включая различение цветов, при низких интенсивностях света, тогда как бактериородопсин участвует в фоторецепции в условиях высоких интенсивностей, когда система рецепции аттрактантного света, использующая сенсорный родопсин в качестве фоторецептора, уже насыщена. Следует отметить, что обе эти ситуации вполне характерны для естественных условий.

По-видимому, путь обработки и передачи сенсорной информации от бактериородопсина к флагеллярному мотору, опосредованный рецепцией Δp_{H^+} , включает в себя какой-то метилакцептирующий белок, отличный от белков 80 и 94 кДа, участвующих в системах хемотаксиса и фототаксиса, осуществляемого при участии сенсорных родопсинов.

Штамм Pho81-B4 представляется удобной моделью для изучения механизма рецепции Δp_{H^+} благодаря простоте способа наблюдения за

фотореакциями, а также относительно хорошей изученности бактериородопсина как генератора Δn^+ .

Экспериментальная часть

В работе использовались карбонилцианид-3-хлорфенилгидразон (ХКЦФ), пурамицин и *DL*-этионин (Sigma, США), 3-(*N*-морфолино)пропансульфоная кислота (MOPS, рК 7,2) и азид натрия (Fluka, Швейцария), [^3H -метил]метионин (Amersham, США) и Ariezon-Fett M (Merck, ФРГ). Мевинолин получали экстракцией этанолом из фармацевтического препарата "Mevinacor" (ФРГ). Отечественные реактивы имели марку х.ч. и ос.ч.

Трансформация. Трансформация *H. halobium* штамма Pho81 была выполнена согласно методике, ранее описанной Клайном [23]. Активную клеточную культуру (2 мл, 90 единиц Клетта) осаждали центрифугированием при 4000g в течение 15 мин при комнатной температуре, затем клетки были ресуспендированы в среде SPH (2 mM NaCl, 2 mM KCl, 50 mM трис-HCl, 15% сахарозы, pH 8,7). 20 мкл 0,5 M раствора EDTA в SPH были аккуратно наложены на осадок от центрифугирования и затем осадок быстро ресуспендировался. Сферопласты формировались в течение 10–20 мин. Затем добавляли 10 мкл плазмидной ДНК р319, а спустя 20 мин в систему аккуратно вводили 240 мкл раствора ПЭГ (60% (v/v) полиэтиленгликоля 600 и 40% (v/v) 2 M NaCl, 25 mM KCl, 15% сахарозы) и интенсивно перемешивали. Спустя 20 мин смесь разводили 1 мл буфера для регенерации (3,5 M NaCl, 150 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mM KCl, 7 mM CaCl_2 , 50 mM трис-HCl, pH 7,2, 15% сахарозы), тщательно перемешивали, после чего ее центрифугировали 20 мин при 3000g. Супернатант декантировали, а сферопласты ресуспендировали в 1 мл среды для выращивания, содержащей 18% сахарозы, и затем инкубировали в термостате в темноте при 37°C в течение ночи. 100 мкл суспензии смешивали в пробирке с агаризованной средой при 56°C, после чего смесь наслаивали на чашки с поддерживающим агаром, содержащим 20 мкМ мевинолин. Чашки загерметизировали и инкубировали при 40°C в течение месяца. К оставшимся от процедуры 0,9 мл суспензии добавляли мевинолин до концентрации 20 мкМ, и через 4 сут сферопласты полностью регенерировали и были способны расти в отсутствие сахарозы.

Измерения спектров поглощения. Для измерений спектров поглощения клетки *H. halobium* осаждали при 14000g в течение 10 мин, промывали дважды раствором 3,5 M NaCl и лизировали бидистиллированной водой. Спектры измеряли на спектрофотометре Hitachi U-3400. Для оценки наличия бактериородопсина дифференцированием спектров исследуемого по этому признаку штамма против заведомо бактериородопсиндефицитного штамма спектры нормализовались по абсорбции массового пула каротеноидов с максимумом в области 545 нм.

Приготовление клеток для оценки тактических реакций. Среда культивирования *H. halobium* содержала 4270 mM NaCl, 27 mM KCl, 8,4 mM цитрат натрия, 81 mM MgSO_4 и 7 г/л пептона "Oxoid", pH 7,0. Клетки галобактериальных штаммов Pho81, Flx3, Flx15 [9], Pho81-B4 и Pho81-D96N-8 были селекционированы с целью получения подвижных клонов на чашках Петри, содержащих среду роста с 0,3% агаром. Полужидкая среда для штаммов Pho81-B4 и Pho81-D96N-8 содержала 20 мкМ мевинолин. Клетки были взяты с четко выраженного края облака клеток, разбегающихся в процессе роста из локального места инокуляции на полужидком агаре, и внесены в 150 мл среды роста в колбах Эрленмейе-

ра объемом 500 мл. Бактерии выращивали при 37°C на качалке при 100 об/мин до ранней стационарной фазы роста до оптического поглощения, приблизительно равного $2 \cdot 10^8$ клеток/мл. Затем их отмывали от среды культивирования NaCl-буфером (4270 mM NaCl, 27 mM KCl, 81 mM $MgSO_4$, 25 mM MOPS, pH 7,0) центрифугированием при 3,5g в течение 10 мин, после чего ресуспендировали в среде NaCl до подходящей для наблюдений концентрации.

Регистрация поведенческих реакций. Для наблюдений подвижности и поведения каплю клеточной суспензии помещали на предметное стекло, накрывали покровным стеклом, его края изолировали Arizeon-Fett M во избежание испарения среды, приводящего к выпадению кристаллов соли из насыщенного раствора и для уменьшения диффузии кислорода в суспензию клеток. В большинстве случаев в экспериментах для получения данных о поведенческих реакциях клетки оценивались визуально. Поведение клеток наблюдали при комнатной температуре в фотомикроскоп Univag (Reichert). Для измерений реакций клеток при интенсивностях освещения ниже нормальной разрешающей способности человеческого зрения, а также на фоне коротковолнового видимого света использовали видеокамеру ночного видения RCA с аутоконтрастирующим устройством, сопряженную с видеомонитором Panasonic. Для получения статистически достоверных данных отслеживали 75 клеток и более.

Величину репеллентного ответа измеряли как вероятность реверсии вектора оси направления движения клетки после изменения интенсивности света. Вероятности реакции клетки корректировали относительно вероятностей спонтанных реверсий. Один из методов представления данных использовал построение гистограмм, где вероятность реакции клеток отображалась на оси ординат, тогда как на оси абсцисс приводились временные интервалы между моментом подачи светового стимула и моментом реверсии движения случайно выбранной клетки. Наблюдение за каждой бактерией велось в течение 20 с, в качестве единицы временной шкалы принимался интервал в 1 с. Так как некоторые клетки не проявляли реверсии в течение периода наблюдения, сумма вероятностей ответов клеток за это время, показанных на гистограмме, почти всегда ниже 100%.

В ряде экспериментов по изучению эффектов различных условий на фототаксис реакции клеток на свет представлялись в виде кривых зависимостей интенсивностей ответов от величины стимула. За интенсивность реакции принимали количество реверсий клеток в течение первых 4 или, где указано, 7 с после подачи стимула. Данные об эффекте аргинина на фототаксис получали с помощью системы компьютерного анализа движения [47].

Для измерения действия световых стимулов с различной длиной волны на частоту реверсий штаммов Pho81 и Pho81-B4 в качестве стимулов использовали уменьшение интенсивности общего светового потока на 40%. Источником света служила ртутная лампа XBO od CS мощностью 200 Вт. В эксперименте использовались абсорбционные фильтры из оптического стекла с трансмиссией более 600 нм для красного, более чем 540 нм для оранжевого и в области от 300 до 400 нм для синего фильтра. Интенсивности света были нормализованы с помощью нейтральных фильтров до 300 Вт/м².

При необходимости использования монохроматического длинноволнового света в экспериментах применялся оранжевый интерференционный фильтр ($\lambda = 572 \pm 10$ нм), если не указано иначе.

Для исследования действия цианида на эффективность реакции штаммов Pho81-B4 и Flx3 в ответ на световые стимулы клетки промыва-

лись солевым буфером, KCN добавлялся из стокового раствора с концентрацией 100 мМ.

Эффект $2 \cdot 10^{-6}$ М ХКЦФ на фоточувствительность клеток Pho81-B4 в зависимости от области интенсивности освещения ($\lambda > 500$ нм), в которой давался фотостимул, измеряли путем введения в световой пучок, идущий через конденсор, нейтрального фильтра. Концентрация ХКЦФ, использованная в эксперименте, не влияла на подвижность и фотореакции Pho81-B4 при умеренных интенсивностях светового потока.

Этионин, ингибитор метилирования белков, для приготовления стокового раствора с концентрацией 1 М растворяли в эквимольном NaOH. Добавление этого раствора к суспензии клеток до концентрации 1 мМ сдвигало pH в щелочную область приблизительно на 0,5–0,7 единиц pH. Эквивалентное количество щелочи добавляли к контрольной суспензии клеток. Затем суспензии инкубировали 1,5 ч при 37°C. Сдвиг pH не имел заметных эффектов на подвижность и поведение клеток.

Для регистрации реакций бактерий на световые стимулы коротковолновых длин волн на фоне длинноволнового освещения использовали систему подачи света через объектив микроскопа Univag. Свет, подаваемый через конденсор, пропускался через оранжевый интерференционный фильтр ($\lambda = 572 \pm 10$ нм) и являлся фоновым, в то время как стимулирующий свет, подаваемый через объектив, предварительно пропускался через синий интерференционный фильтр с $\lambda = 450 \pm 20$ нм. Источником света для фонового освещения служила ртутная лампа HBO od CS, тогда как для стимулирующего освещения — лампа накаливания с максимальной мощностью 200 Вт.

Измерение генерации $\Delta\Psi$ бактериородопсином. Пурпурные мембраны, выделенные из штамма дикого типа или мутанта D96N, были подвергнуты ультразвуковой обработке, после чего фрагменты пурпурных мембран были адсорбированы на коллоидной пленке, импрегнированной раствором яичного лецитина в декане (70 мг/мл) и октадециламина (0,5 мг/мл), как было описано в ряде работ [48, 49]. Смесь инкубации содержала 0,1 М NaCl и 5 мМ HEPES, pH 7,8 (температура 23°C). Генерация $\Delta\Psi$ измерялась двумя электродами, введенными в инкубационную смесь по обе стороны от измерительной мембраны с сорбированными на одной из сторон фрагментами пурпурных мембран [49]. В целях освещения ячейки оранжевым или синим светом применялись оптические фильтры с $\lambda > 500$ и 400 \pm 30 нм соответственно. В качестве источник света использовалась лампа КГМ мощностью 70 Вт.

Электрофорез и автордиография. Мечение метилакцептирующих белков было выполнено по ранее описанной методике [41]. В качестве ингибитора синтеза белка использовался пурамицин. Электрофорез галобактериальных белков в неградиентных полиакриламидных гелях и автордиография проводились по методике, описанной Аламом и соавт. [40].

Мы благодарим Анну Матушак за помощь в проведении трансформации галобактериальных клеток. Приносим большую благодарность проф. Дж.Л. Спудиху за любезное предоставление мутанта *H. halobium* Pho81.

Работа финансировалась исследовательским грантом Московского государственного университета.

Также выражаем признательность за финансовую поддержку Max-Planck-Gesellschaft работы С. Бибикова в Институте биохимии Макса Планка в лаборатории Д. Остерхельта, где были выполнены эксперименты по трансформации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Oesterhelt D., Stoeckenius W.*// Nature New. Biol. 1971. V. 233. P. 149—152.
2. *Drachev L.A., Kaulen A.D., Ostroumov S.A., Skulachev V.P.*// FEBS Lett. 1974. V. 39. P. 43—45.
3. *Kayushin L.P., Skulachev V.P.*// FEBS Lett. 1974. V. 39. P. 39—42.
4. *Oesterhelt D., Stoeckenius W.*// Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. P. 2853—2857.
5. *Racker E., Stoeckenius W.*// J. Biol. Chem. 1974. V. 249. P. 662—663.
6. *Bogomolni R.A., Spudich J.L.*// Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. P. 6250—6254.
7. *Marwan W., Oesterhelt D.*// J. Mol. Biol. 1987. V. 195. P. 333—342.
8. *Spudich J.L., Bogomolni R.A.*// Nature (London). 1984. V. 312. P. 509—513.
9. *Sundberg S.A., Bogomolni R.A., Spudich J.L.*// J. Bacteriol. 1985. V. 164. P. 282—287.
10. *Takahashi T., Tomioka H., Kamo N., Kobatake Y.*// FEMS Microbiol. Lett. 1985. V. 28. P. 161—164.
11. *Takahashi T., Watanabe M., Kamo N., Kobatake Y.*// Biophys. J. 1985. V. 48. P. 235—240.
12. *Tsuda M., Nelson B., Chang C.H., Govindjee R., Ebrey T.G.*// Biophys. J. 1985. V. 47. P. 721—724.
13. *Wolff E.K., Bogomolni R.A., Scherrer P., Hess B., Stoeckenius W.*// Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 7272—7276.
14. *Hildebrand E., Schimz A.*// Photochem. and Photobiol. 1983. V. 38. № 5. P. 593—597.
15. *Baryshev V.A., Glagolev A.N., Skulachev V.P.*// Nature (London). 1981. V. 292. P. 338—340.
16. *Baryshev V.A., Glagolev A.N., Skulachev V.P.*// J. Gen. Microbiol. 1983. V. 129. P. 367—374.
17. *Glagolev A.N.*// J. Theor. Biol. 1980. V. 82. P. 171—185.
18. *Glagolev A.N.*// Trends Biochem.Sci. 1984. V. 9. P. 397—400.
19. *Brown I.I., Galperin M.Y., Glagolev A.N., Skulachev V.P.*// Eur. J. Biochem. 1983. V. 134. P. 345—350.
20. *Skulachev V.P.*// FEBS Lett. 1978. V. 87. P. 171—179.
21. *Bibikov S.I., Skulachev V.P.*// FEBS Lett. 1989. V. 243. P. 303—306.
22. *Oesterhelt D., Marwan W.*// J. Bacteriol. 1987. V. 169. P. 3515—3520.
23. *Cline S.M., Lam W.L., Charlebois R.L., Sehalkwyk L.C., Doolittle F.W.*// Can. J. Microbiol. 1989. V. 35. P. 148—154.
24. *Ni B., Chang M., Duschl A., Lanyi J.K., Needleman R.*// Gene. 1990. V. 90. P. 169—172.
25. *DasSarma S., Rajbhandary U.L., Khorana H.G.*// Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. P. 2201—2203.
26. *Spudich E.N., Spudich J.L.*// Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. P. 4308—4312.
27. *Cabrera J.A., Bolds J., Shields P.E., Havel C.M., Watson J.A.*// J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 3578—3583.
28. *Soppa J., Otomo J., Straub J., Tittor J., Meessen S., Oesterhelt D.*// J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 13049—13056.

29. Sundberg S.A., Alam M., Lebert M., Spudich J.L., Oesterhelt D., Hazelbauer G.L.// J. Bacteriol. 1990. V. 172. P. 2328—2335.
30. Taylor B.L., Miller J.B., Warrick H.M., Koshland D.E., Jr.// J. Bacteriol. 1979. V. 140. P. 567—573.
31. Klian S., Macnab R.M.// J. Mol. Biol. 1980. V. 138. P. 563—597.
32. Butt H.J., Fendler K., Bamberg E., Tittor J., Oesterhelt D.// EMBO J. 1989. V. 8. P. 1657—1663.
33. Драчев Л.А., Каулен А.Д., Корана Х.Г., Могои Т., Отто Х., Скулачев В.П., Хейн М.П., Хольц М.// Биохимия. 1989. Т. 54. № 9. С. 1467—1477.
34. Gerwert K., Hess B., Soppa J., Oesterhelt D.// Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 4943—4947.
35. Holz M., Drachev L.A., Mogi T., Otto H., Kaulen A.D., Heyn M.P., Skulachev V.P., Khorana H.G.// Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 2167—2171.
36. Tittor J., Soell C., Oesterhelt D., Butt H.-J., Bamberg E.// EMBO J. 1989. V. 8. P. 3477—3482.
37. Oesterhelt D., Hess B.// Eur. J. Biochem. 1973. V. 37. P. 316—326.
38. Karvaly B., Dancshazy Z.// FEBS Lett. 1977. V. 76. P. 36—40.
39. Silverman M., Simon M.// Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 3317—3321.
40. Alam M., Lebert M., Oesterhelt D., Hazelbauer G.L.// EMBO J. 1989. V. 8. № 2. P. 631—639.
41. Bibikov S.I., Baryshev V.A., Glagolev A.N.// FEBS Lett. 1982. V. 146. P. 255—258.
42. Schinz A.// FEBS Lett. 1981. V. 125. P. 205—207.
43. Baryshev V.A., Glagolev A.N., Skulachev V.P.// FEMS Microbiol. Lett. 1982. V. 13. P. 47—50.
44. Spudich E.N., Hasselbacher C.A., Spudich J.L.// J. Bacteriol. 1988. V. 170. P. 4280—4285.
45. Бибииков С.И. Рецепция и передача сигнала в фототаксисе *H. halobium*. Дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ, 1987.
46. Skulachev V.P.// Membrane Bioenergetics. B.: Springer-Verlag, 1988.
47. Marwan W., Oesterhelt D.// J. Mol. Biol. 1990. V. 215. P. 277—285.
48. Drachev L.A., Kaulen A.D., Skulachev V.P.// FEBS Lett. 1984. V. 178. P. 331—335.
49. Drachev L.A., Kaulen A.D., Khitrina L.V., Skulachev V.P.// Eur. J. Biochem. 1981. V. 117. P. 461—470.

S.I.BIBIKOV, R.N.GRISHANIN, A.D.KAULEN,
W.MARWAN*, D.OESTERHELT*, V.P.SKULACHEV

THE ROLE OF BACTERIORHODOPSIN
IN PHOTORECEPTION IN HALOBACTERIUM HALOBIIUM

A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
Moscow State University, Moscow;
*Max-Planck-Institut für Biochemie, München

Bacterio-opsin gene is introduced to a "blind" *Halobacterium halobium* mutant which lacks all the four retinal proteins (bacteriorhodopsin, halorhodopsin and sensory rhodopsins I and II) and, as a consequence, shows no attractant response to a long wavelength light and no repellent response to the short wavelength light. The resulting transformant cells acquire the capability to sense the light stimuli. However, decrease in intensity of not only orange and red lights but also of blue light is shown to induce the repellent effect. To induce the light response, much larger changes in the light intensity are necessary in the bacteriorhodopsin-containing transformant than in a mutant, containing sensory rhodopsins. The light sensitivity of the mutant is increased by adding 1 mM cyanide or decreased by arginine, i.e. by agents reducing or increasing the light-independent generation of $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$, respectively. At very high light intensities, even a large decrease in the illumination fails to induce the repellent effect but the addition of the $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ -lowering agent (protonophorous uncoupler) sensitizes the cell to the light stimuli. Mutation resulting in substitution of the Asp-96 by Asn in bacteriorhodopsin and as a consequence, in inhibition of its H^+ pump activity, is found to reduce the bacteriorhodopsin-mediated photoreception. Azide, which is known to activate the mutant H^+ pump, increases the photosensitivity of the mutant cells. Moreover, azide abolishes the $\Delta\psi$ -decreasing and repellent effects on the blue light on the strain possessing a mutant bacteriorhodopsin with replacement of Asn for Asp in position 96 of the polypeptide chain, under orange background illumination. It is assumed that the bacteriorhodopsin-mediated photoreception is due to the light-supported generation of $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$, which is monitored by a special $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ sensor, "protometer".