



УДК 535.343:535.568:536.629:576.8:577.150.36

АНАЛИЗ КОНФОРМАЦИЙ И ТЕРМОИНДУЦИРОВАННЫЕ  
ПРЕВРАЩЕНИЯ БАКТЕРИОРОДОПСИНА  
В ПУРПУРНЫХ МЕМБРАНАХ  
ИЗ *HALOBACTERIUM HALOBIVM*

Шныров В. Л., Филиппова Е. А., Чекулаева Л. Н.,  
Сухомудренко А. Г.

Институт биологической физики Академии наук СССР, г. Пущино

При исследовании конформационной лабильности бактериородопсина в пурпурных мембранах из *Halobacterium halobium* установлено, что их нагревание приводит к разрушению ~30% исходного количества  $\alpha$ -спиралей. Устойчивость большей части  $\alpha$ -спиральных фрагментов к тепловому воздействию объясняется образованием комплексов, периферийные участки которых играют роль теплового демпфера. Строение этих комплексов обсуждается на основе данных КД- и ИК-спектроскопии, причем для моделирования светорассеяния мембранных препаратов использовали полистирольный латекс и липосомы. Показано, что теплоспоглощение суспензии пурпурных мембран вблизи 100° С связано с необратимым разрушением структуры мембраны.

Изучение механизмов переноса ионов через мембраны — одна из важнейших задач современной физико-химической биологии. Решающую роль в активном транспорте ионов играют конформационные переходы различных компонентов систем трансмембранного переноса, чем и объясняется растущий интерес к изучению структурных особенностей этих компонентов. Конформационный анализ мембранных белков, однако, наталкивается на ряд экспериментальных трудностей, связанных с отсутствием четких методических разработок по исследованию молекулярных спектров в условиях интенсивного светорассеяния, что нередко приводит к ошибочной трактовке экспериментальных результатов.

В настоящей работе изучено влияние светорассеяния на КД белков и полученные данные использованы для исследования конформации бактериородопсина в пурпурных мембранах из *Halobacterium halobium*. Этот хромопротеид, содержащий в качестве простетической группы протонированный альдимин ретиналя с  $\epsilon$ -аминогруппой Lys<sup>41</sup> [1], является светозависимым протонным насосом, который создает на мембране градиент рН, используемый для синтеза АТФ [2]. Полученные в последнее время данные о первичной структуре бактериородопсина [1] и надмолекулярной организации пурпурных мембран [3, 4] позволили нам с новых позиций рассмотреть конформационные перестройки в молекуле бактериородопсина.

Конформацию мембранных белков обычно изучают традиционными спектральными методами, такими, как спектрополяриметрия и абсорбционная спектроскопия, достаточно хорошо разработанными для изучения

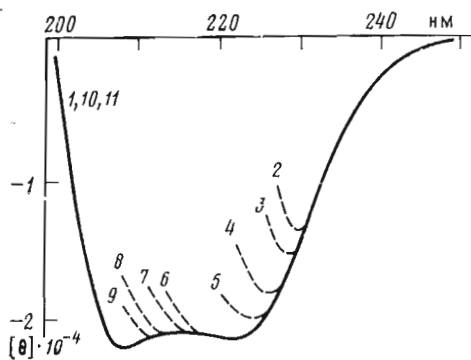


Рис. 1

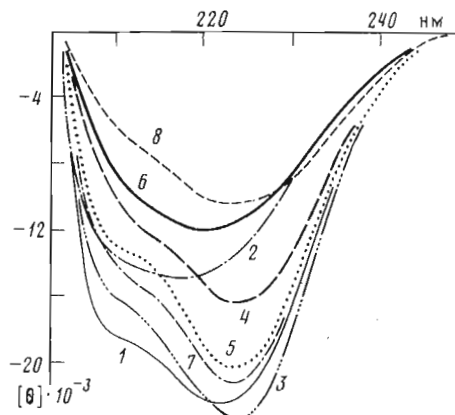


Рис. 2

Рис. 1. КД-спектр раствора сывороточного альбумина человека (0,5 г/л) в присутствии полистирольных латексов с частицами диаметром 0,176 (А) и 0,091 мкм (Б). Концентрация латекса указана в числе частиц в мл. 1 — контроль; 2 — А,  $7,8 \cdot 10^{10}$ ; 3 — Б,  $6,85 \cdot 10^{11}$ ; 4 — А,  $5,15 \cdot 10^{10}$ ; 5 — Б,  $3,4 \cdot 10^{11}$ ; 6 — Б,  $1,7 \cdot 10^{11}$ ; 7 — А,  $3,9 \cdot 10^{10}$ ; 8 — А,  $2,6 \cdot 10^{10}$ ; 9 — Б,  $0,85 \cdot 10^{11}$ ; 10 — Б,  $6,85 \cdot 10^{10}$ ; 11 — А,  $1,56 \cdot 10^{10}$

Рис. 2. КД-спектры суспензий нативных (А) и денатурированных теплом (Б) пурпурных мембран в 0,05 М фосфатном (рН 7) и боратном (рН 9,55) буфере. Указан рН (рD) среды: 9,55 (H<sub>2</sub>O) — А (1), Б (2); 7,0 (H<sub>2</sub>O) — А (3), Б (4); 9,55 (D<sub>2</sub>O) — А (5), Б (6); 7,0 (D<sub>2</sub>O) — А (7), Б (8)

конформаций биополимеров в растворах. Первые попытки применить для исследования белков в мембранах метод КД [5–7] были встречены рядом возражений [8–15]; основные из них сводились к следующему: 1) при исследовании больших агрегатов часть молекул внутри агрегата не будет взаимодействовать с электромагнитной волной, 2) рассеяние света может существенным образом исказить КД исследуемых белков. В связи с этим, прежде чем анализировать конформацию бактериородопсина, мы изучили влияние светорассеяния на КД белка в модельной системе — суспензии полистирольного латекса в растворе сывороточного альбумина человека. В использованных латексах частицы имели диаметр 0,176 и 0,091 мкм, т. е. были близки по размерам к некоторым субклеточным органеллам [16, 17]. Достоинство этой модельной системы заключается в том, что частицы латекса не взаимодействуют с белком и сильно рассеивают свет. В такой системе полностью исключены побочные эффекты, описанные в работе [18], и возможные искажения кругового дихроизма могут быть отнесены только за счет светорассеяния. Концентрацию латекса выбирали такой, чтобы свет, прошедший через раствор, имел достаточную для измерения дихроизма интенсивность в диапазоне 200–250 нм. Этот спектральный диапазон наиболее часто используют при изучении конформаций белков методом КД-спектроскопии [19].

На рис. 1 приведены КД-спектры водного раствора сывороточного альбумина человека в отсутствие и в присутствии полистирольных латексов с частицами различного размера. Содержание  $\alpha$ -спиралей в альбумине (~50%) вычисляли, исходя из удельной эллиптичности при 209 нм [19]. При концентрации латекса с диаметром частиц 0,176 мкм, отвечающей  $1,56 \cdot 10^{11}$  частиц/см<sup>3</sup>, рассеяние света в кювете с длиной оптического пути 1 мм достигало предельно допустимого значения, при котором интенсивность попадающего на приемник рассеянного света была сравнима с интенсивностью светового сигнала, несущего информацию о дихроизме. В этих условиях КД-спектр белка не регистрируется. При уменьшении концентрации латекса вдвое наблюдаются искажения КД-спектра белка в диапазоне 230–250 нм, причем эти искажения особенно велики при длинах волн меньше 230 нм. Если же на входе приемника (т. е. под нуле-

вым углом) уровень сигнала превышает уровень рассеянного света, светорассеяние не оказывает существенного влияния на КД-спектр. В этих условиях оно лишь уменьшает интенсивность полезного сигнала, что эквивалентно увеличению поглощения раствора. Кривые 4–6 на рис. 1 подтверждают сделанный вывод. Максимальная концентрация латекса с диаметром частиц 0,176 мкм, при которой рассеянный свет не влияет на КД-спектр белка в диапазоне 200–250 нм, составляет  $2,6 \cdot 10^{10}$  частиц/см<sup>3</sup>. Аналогичный результат был получен при использовании латекса с диаметром частиц 0,091 мкм. В этом случае максимально допустимая концентрация частиц при измерениях в диапазоне 230–250 нм составляет  $6,85 \cdot 10^{11}$  частиц/см<sup>3</sup>. Наблюдаемое при этой концентрации влияние светорассеяния такое же, как и при использовании латекса с диаметром частиц 0,176 мкм в концентрации  $7,8 \cdot 10^{10}$  частиц/см<sup>3</sup>. Отсюда следует, что в этих условиях увеличение диаметра частиц вдвое приводит к увеличению светорассеяния на порядок. Если концентрацию латекса с диаметром частиц 0,091 мкм уменьшить до  $6,85 \cdot 10^{10}$  частиц/см<sup>3</sup>, то рассеяние света не искажает КД-спектр белка в области 200–250 нм. Таким образом, это максимально допустимая концентрация частиц с размером около 1000 Å, при которой рассеянный свет не искажает КД-спектр белков с высоким содержанием  $\alpha$ -спирали.

Для оценки вклада латексных частиц в светорассеяние модельной системы были измерены индикатрисы рассеяния латекса и водного раствора белка. Оказалось, что при измерениях под углом 90° рассеяние света белком в концентрации 0,5 г/л в 70 раз меньше рассеяния латексом с диаметром частиц 0,176 мкм при концентрации  $1,56 \cdot 10^{10}$  частиц/см<sup>3</sup>. Таким образом, основной вклад в светорассеяние вносит полистирольный латекс, а рассеянием света белком можно пренебречь. Выводы, полученные в эксперименте с полистирольным латексом, проверены на другой модельной системе: суспензии липосом диаметром 250–300 Å или липидных пузырьков размером 2000–3000 Å в водном растворе цитохрома Р-450 (0,4 г/л) в условиях, при которых за время регистрации КД-спектра цитохром не встраивается в липидный бислой [20]. При концентрации липосом 0,2–2 г/л рассеяние света не влияло на КД-спектр цитохрома Р-450. Липидные пузырьки не искажают КД-спектр цитохрома Р-450 вплоть до концентрации фосфолипида 0,7 г/л. Таким образом, присутствие в среде частиц латекса, липосом или пузырьков не сказывается на КД-спектре белков, если интенсивность света, прошедшего через раствор, превышает интенсивность рассеянного света.

Полученный вывод находится в противоречии с рекомендациями [8–15] по учету искажений, которые вносятся светорассеянием. Это расхождение объяснимо, если учесть, что в упомянутых работах изучали круговой дихроизм поли- $\alpha$ , *L*-глутаминовой кислоты в растворенном и агрегированном состояниях. Молекулы этого полимера, находящиеся внутри большого агрегата, не взаимодействуют со светом, поскольку внешние молекулы агрегата поглощают падающее на них излучение.

Подобный эффект, приводящий к кажущемуся снижению концентрации хиральных хромофоров, вряд ли возможен для белков, встроенных в липосомы или пузырьки, поскольку оптически активные хромофоры в описанных нами экспериментах распределены в монослое. Эффект кажущегося снижения концентрации хромофоров может быть вызван одновременным присутствием оптически активных и неактивных хромофоров, однако в наших опытах этот фактор не был определяющим. Вопрос о возможном экранировании хромофоров при исследовании конформации белков во фрагментах мембран, размеры которых превышают 2000 Å, должен решаться отдельно. Таким образом, свет, рассеянный под нулевым углом, не может вносить существенных искажений в наблюдаемую эллиптичность, в крайнем случае он может ее немного увеличить. Опираясь на этот вывод, мы провели анализ конформаций в бактериородопсине.

На рис. 2 приведен КД-спектр бактериородопсина в пурпурных мембранах. Этот спектр в области поглощения пептидной группы аналогичен спектрам полипептидов с высоким содержанием  $\alpha$ -спиралей [19]. Согласно данным [21], в бактериородопсине около 75% пептидных групп образуют правую  $\alpha$ -спираль. Аналогичная оценка была получена нами, исходя из значения эллиптичности при 220 нм. Спиральные участки пептидной цепи бактериородопсина сгруппированы в 7 фрагментов, в каждом из которых по 25–30 аминокислотных остатков, образующих 7–8 спиральных витков (в двух концевых витках каждого фрагмента возможны искажения  $\alpha$ -спиралей).

КД-спектр бактериородопсина имеет характерную особенность, не встречающуюся в спектрах других белков, содержащих 50–70%  $\alpha$ -спиралей: эллиптичность при 209 нм заметно меньше, чем вблизи 220 нм. Одной из причин искажения КД-спектра бактериородопсина может оказаться присутствие в суспензии значительного количества осколков мембран, размеры которых превышают 2000 Å.

Электронно-микроскопическое изучение пурпурных мембран, обработанных ультразвуком, показало, что 20–30% осколков мембран имеют размер  $\sim 1$  мкм и около 30% — 0,1–0,2 мкм. В основном это плоские частицы толщиной около 50 Å. Несмотря на значительную долю больших частиц, экранирование пептидных хромофоров в них мало вероятно, поскольку по своей толщине пурпурная мембрана отвечает размеру лишь одной молекулы бактериородопсина. Кроме того, занижение эллиптичности наблюдается не во всем спектральном диапазоне, как это имело бы место при экранировании частиц хромофоров, а лишь в узкой области вблизи 209 нм. Как известно [22], здесь локализован максимум поглощения липидов; это может приводить к кажущемуся изменению эллиптичности благодаря уменьшению отношения сигнала к рассеянному свету. Другой причиной занижения эллиптичности на длине волны 209 нм может оказаться вклад в КД-спектр  $\beta$ -изгибов пептидной цепи бактериородопсина.

Согласно данным, приведенным в работе [23], КД-спектр  $\beta$ -изгибов типа 4 ( $-60, -30, -60, 0^\circ$ ) [24] имеет положительную полосу с максимумом вблизи 205 нм и отрицательную полосу с минимумом при 220 нм. Сложение положительной полосы  $\beta$ -изгибов с отрицательной полосой  $\alpha$ -спиралей может привести к уменьшению значения эллиптичности вблизи 209 нм. Полосы  $\beta$ -изгибов и  $\alpha$ -спиралей при 220 нм отрицательны; поэтому при их сложении абсолютное значение эллиптичности в этой области возрастает. Отдать предпочтение одному из двух объяснений только на основании анализа КД-спектров не представляется возможным. Хорошим критерием присутствия в белке  $\beta$ -структуры является резонансное расщепление полосы Амид I в ИК-спектре на две хорошо разрешенные полосы с максимумами поглощения при 1620 и 1690  $\text{см}^{-1}$  или наличие одной полосы с максимумом 1640  $\text{см}^{-1}$  [25–28].

На рис. 3 (кривая 1) приведен ИК-спектр суспензии пурпурных мембран в  $\text{D}_2\text{O}$  в области полосы поглощения Амид I, на которой видно слабо выраженное плечо при 1625  $\text{см}^{-1}$ . Эти данные как будто подтверждают правильность предположения об образовании пептидной цепью бактериородопсина  $\beta$ -изгибов, однако для дальнейшей проверки этой гипотезы мы исследовали КД- и ИК-спектры бактериородопсина после его тепловой денатурации. На рис. 2, 2 приведен КД-спектр мембран, в которых бактериородопсин был подвергнут тепловой денатурации в 0,05 М боратном буфере (рН 9,55). Сравнивая спектры нативного и денатурированного белка, можно видеть, что различие в значениях эллиптичности при 209 и 220 нм при тепловой денатурации сглаживается. После нагревания суспензии пурпурных мембран в течение 30 мин при 95° С содержание  $\alpha$ -спиралей уменьшается до 55%; т. е. разрушается всего около  $1/3$  спиральных участков в молекуле бактериородопсина. Стабилизация остальных спиральных участков, возможно, осуществляется липидами, которые создают микроокруже-

ние части спиральных фрагментов бактериородопсина, образуя своеобразный тепловой демпфер. Это означает, что передаваемая липидам кинетическая энергия теплового движения молекул растворителя лишь частично передается белку, а частично расходуется на увеличение кинетической энергии самих липидов.

Отмеченное выше увеличение эллиптичности при 209 нм и ее уменьшение при 220 нм могло произойти, на наш взгляд, из-за разрушения структуры  $\beta$ -изгибов. Если бы исходное различие в эллиптичности при 209 и 220 нм было связано с присутствием липидов, оно вряд ли уменьшилось бы при нагревании, поскольку общее количество липидов в суспензии при

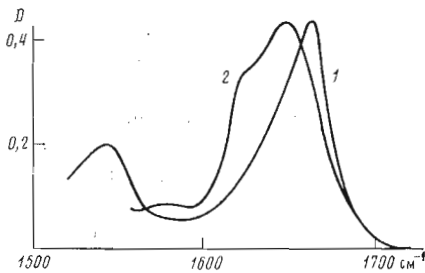


Рис. 3

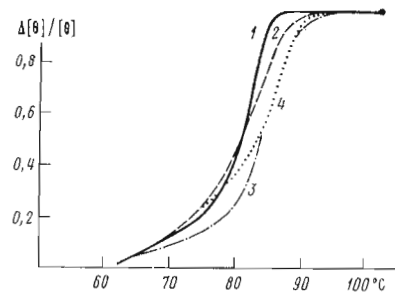


Рис. 4

Рис. 3. ИК-спектры суспензии нативных (1) и денатурированных теплом (2) пурпурных мембран в  $D_2O$  (0,05 М боратный буфер, рD 9,55)

Рис. 4. Изменения эллиптичности при 220 нм при нагревании суспензии пурпурных мембран в 0,05 М фосфатном (рН, рD 7,0) или в боратном (рН, рD 9,55) буфере. 1 — рН 9,55,  $H_2O$ ; 2 — рD 9,55,  $D_2O$ ; 3 — рН 7,0,  $H_2O$ ; 4 — рD 9,55,  $D_2O$

этом не изменяется. Размеры мембранных фрагментов, как показали электронно-микроскопические измерения [29], уменьшились. Чтобы исключить влияние изменения размеров фрагментов, можно сравнить КД-спектры нативного и денатурированного бактериородопсина при рН 7,0 (рис. 2, 3 и 4). Тепловая обработка суспензии мембран при этом значении рН приводит к уменьшению размеров мембранных фрагментов примерно в такой же степени, как и нагревание при рН 9,55, однако кривые 3 и 4 на рис. 2 имеют одинаковую форму. Это может означать, что при тепловой денатурации при рН 7,0 не происходит разрушения  $\beta$ -изгибов и затрагивается меньшая доля  $\alpha$ -спиральных участков.

На рис. 3 приведены ИК-спектры суспензии пурпурных мембран в тяжелой воде. КД-спектры нативных и денатурированных мембран, суспендированных в тяжелой воде (см. кривые 5–8 на рис. 2), несущественно отличаются от спектров суспензий мембран в обычной воде. Замена обычной воды на тяжелую сравнительно мало сказывается и на кривых плавления  $\alpha$ -спиралей в бактериородопсине.

На рис. 4 видно, что эта замена не влияет на значение соответствующих температур перехода при рН 7,0 и 9,55, хотя в тяжелой воде область перехода несколько шире. В нейтральной среде на кривой плавления в  $D_2O$  хорошо различаются две стадии, причем примерно половина спиральных участков, разрушающихся ниже  $84^\circ C$ , менее стабильна в  $D_2O$ , чем в  $H_2O$ . Выше этой температуры характер плавления бактериородопсина в  $H_2O$  и  $D_2O$  одинаков. Кривая плавления в щелочной среде отличается тем, что выше температуры перехода несколько увеличивается стабильность  $\alpha$ -спиралей. Отметим, что  $\alpha$ -спирали в бактериородопсине более стабильны в нейтральной среде — температура перехода при рН 7,0 равна  $84^\circ C$ , а при рН 9,55 —  $81^\circ C$ .

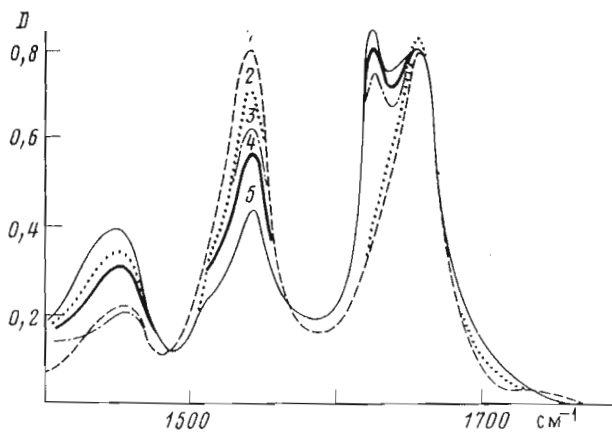


Рис. 5. ИК-спектры пленки из пурпурных мембран в области полос Амид I и Амид II. 1 — контроль; 2 — после 19 ч выдерживания в парах  $D_2O$ ; 3 — после тепловой денатурации в парах  $H_2O$ ; 4, 5 — после выдерживания денатурированного образца в парах  $D_2O$  соответственно 2 и 48 ч

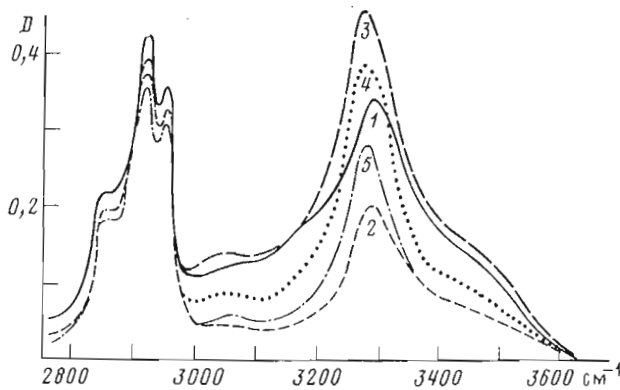


Рис. 6. ИК-спектр пленки из пурпурных мембран в области полосы Амид А. Нумерация кривых соответствует приведенной в подписи к рис. 5

В ИК-спектре денатурированного бактериородопсина появляется интенсивная полоса поглощения с максимумом при  $1620\text{ см}^{-1}$  (рис. 3, 2). Известно, что в случае антипараллельной  $\beta$ -структуры резонансное расщепление полосы Амид I приводит к появлению дополнительной полосы поглощения с максимумом при  $1690\text{ см}^{-1}$  [27], а при параллельной  $\beta$ -структуре нерасщепленная полоса Амид I имеет максимум при  $1640\text{ см}^{-1}$  [28]. Наблюдаемая у денатурированного бактериородопсина полоса при  $1620\text{ см}^{-1}$  не соответствует ни одному из этих вариантов. Более того, появление этой полосы при денатурации не сопровождается уменьшением поглощения в области  $1650\text{--}1660\text{ см}^{-1}$ , отвечающего пептидным группам в  $\alpha$ -спиральных и неупорядоченных участках цепи. Этот факт свидетельствует о том, что, если  $\beta$ -структура и образуется в термоденатурированном бактериородопсине, то она является, вероятно, межмолекулярной и/или образуется между отдельными фрагментами макромолекул с одинаковой ориентацией пептидных групп вдоль полипептидной цепи. Если образование такого рода структур действительно происходит при тепловой денатурации бактериородопсина, следует допустить, что эти  $\beta$ -сшивки имеют конформацию

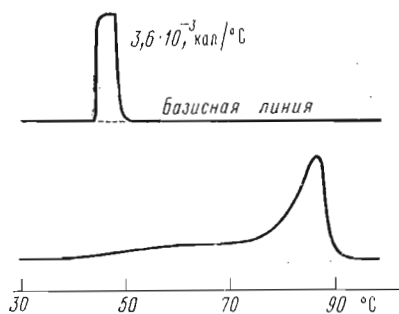


Рис. 7. Термограмма суспензии пурпурных мембран (концентрация бактериородопсина 5,66 г/л) в 0,05 М фосфатном буфере, pH 9,55

натурации могут быть обусловлены также резонансным взаимодействием С—О-колебаний пептидной группы с С—О-колебаниями липидов, возникающими благодаря новой структурной организации протеолипидного комплекса.

Такому предположению не противоречат ИК-спектры пленки пурпурных мембран, нанесенной на подложку из флуорита (рис. 5). При денатурации бактериородопсина в спектрах этих пленок появляется интенсивная полоса поглощения с максимумом при  $1625\text{ см}^{-1}$ , причем полоса Амид I сохраняет свое положение и интенсивность. Выдерживание пленки в парах тяжелой (равно как и обычной) воды приводит к увеличению поглощения при  $1625\text{ см}^{-1}$ . Наблюдаемое при этом постепенное уменьшение интенсивности полосы Амид II свидетельствует об увеличении числа пептидных групп, находящихся в контакте с молекулами воды (рис. 6).

Корреляция между уменьшением интенсивности полосы Амид II и увеличением интенсивности полосы при  $1625\text{ см}^{-1}$ , вероятно, объясняется таким встраиванием молекул воды в протеолипидный комплекс, что оно приводит к изменению ориентации групп С—О в молекуле липида и, как следствие, к изменению резонансного взаимодействия между С—О-колебаниями молекул липида с соответствующими колебаниями в пептидной группе. Описанные явления происходят только с денатурированным бактериородопсином, в нативном белке они выражены слабо. Некоторая зависимость спектра от влажности, которая наблюдается и в области колебания С—Н-групп ( $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ ), также связана, по-видимому, с изменением локального окружения СН-групп при встраивании молекул воды в протеолипидный комплекс (рис. 6).

Тепловая денатурация бактериородопсина была изучена также методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (ср. [30]). На рис. 7 приведены термограммы суспензии пурпурных мембран в воде при pH 9,55, из которых видно, что теплоемкость суспензии увеличивается, начиная с  $40^\circ\text{C}$ . Теплопоглощение в области  $80^\circ\text{C}$  обусловлено, вероятнее всего, плавлением некоторых  $\alpha$ -спиральных фрагментов бактериородопсина, что согласуется с данными, полученными методом КД-спектроскопии (ср. рис. 4). Дальнейшее нагревание не сопровождается изменениями в КД-спектре, откуда можно заключить, что конформация пептидной цепи бактериородопсина остается неизменной. Несмотря на это, на термограмме наблюдается интенсивное теплопоглощение (этот процесс необратим), которое, по всей вероятности, обусловлено разрушением структуры протеолипидного комплекса. По-видимому, на этом этапе плавления в пурпурных мембранах происходят те самые перестройки, которые приводят к иной по сравнению с нативной структурой ориентации липидов по отношению к липидным группам молекулы бактериородопсина. Детально это явление мы намерены обсудить в последующих публикациях с использованием расчетных методов.

типа 4 ( $-70, -10, 80, 20^\circ$ ) [23]. В этом случае можно согласовать данные КД- и ИК-спектроскопии.

Действительно, в КД-спектре денатурированного бактериородопсина (см. рис. 2) форма полос, характерная для  $\alpha$ -спирали, не искажается по сравнению с нативным белком, тогда как при образовании  $\beta$ -структуры, для спектра которой характерен минимум при  $217\text{ нм}$ , такое искажение было бы заметным. Возможность же образования  $\beta$ -структуры указанного выше типа не исключена, поскольку в диапазоне  $200\text{--}250\text{ нм}$  ее вклад в дихроизм невелик [23]. Изменения в ИК-спектрах при тепловой денатурации

Авторы выражают глубокую признательность Ю. С. Тараховскому за помощь в проведении электронно-микроскопических исследований и Г. И. Бачмановой за предоставление препарата цитохрома Р-450.

### Экспериментальная часть

Пурпурные мембраны из *Halobacterium halobium* получали по известной методике [31]. Фракцию пурпурных мембран диализовали против бидистиллята в течение 1 сут, затем центрифугировали при 100 000g в течение 30 мин до получения плотного осадка. Осадок суспендировали в фосфатном (рН 7,0) или боратном (рН 9,55) буфере.

Круговой дихроизм регистрировали на автоматическом спектрополяриметре J-20 (Jasco, Япония) в 0,1-мм кварцевой кювете, помещенной в термостатируемую ячейку. Концентрацию бактериородопсина в суспензии пурпурных мембран определяли спектрофотометрически [32]. Спектры регистрировали с помощью спектрофотометров «Specord UV-VIS» и «Specord 75IR» (Carl Zeiss, ГДР). В диапазоне 300–600 нм использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути 0,5 см, а в инфракрасной области спектра — флуоритовые термостатируемые кюветы с длиной оптического пути 80 мкм. Температуру в кюветах поддерживали с помощью ультратермостата с погрешностью не более 0,5° С. Калориметрические измерения проводили на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре ДАСМ-1М (СКБ ВП АН СССР). Все температурные зависимости определяли при скорости нагрева 1° С/мин. Светорассеяние регистрировали с помощью фотогониодиффузомера «Sofica» (Франция). В работе использовали сывороточный альбумин человека (Reanal, Венгрия) и полистирольный латекс (Serva, ФРГ). Размеры фрагментов мембран определяли с помощью электронного микроскопа JEM-7A методом негативного контрастирования 1% раствором фосфорномолибденовой кислоты.

Суспензию пурпурных мембран непосредственно перед измерениями обрабатывали ультразвуком в течение 5–6 мин (диспергатор УЗДН-1; 0,3 А, 22 кГц), выдерживали ~20 мин в темноте при 60° С и затем охлаждали до 20° С со скоростью 1° С/мин. Равенство изотопного состава воды в основной кювете и в кювете сравнения контролировали по интенсивности поглощения полосы Амид А (около 3300 см<sup>-1</sup>). Пленки для измерения ИК-спектров получали высушиванием суспензии пурпурных мембран на флуоритовых подложках в атмосфере азота. Водородно-дейтериевый обмен производили, помещая высушенные пленки в герметичные кюветы, насыщенные парами D<sub>2</sub>O. Степень обмена оценивали по изменению интенсивности полос Амид II и Амид А в ИК-спектре.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Lobanov N. A. The structural basis of the functioning of bacteriorhodopsin: an overview.— FEBS Lett., 1979, v. 100, № 1, p. 219–224.
2. Racker E., Stoerkenius W. Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation.— J. Biol. Chem., 1974, v. 249, № 2, p. 662–663.
3. Henderson R. The structure of the purple membrane from *Halobacterium halobium*: analysis of the X-ray diffraction pattern.— J. Mol. Biol., 1975, v. 93, № 1, p. 123–138.
4. Blaurock A. E. Bacteriorhodopsin: a transmembrane pump containing  $\alpha$ -helix.— J. Mol. Biol., 1975, v. 93, № 1, p. 139–158.
5. Wallach D. F. H., Zahler P. H. Protein conformations in cellular membranes.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, v. 56, № 5, p. 1552–1559.
6. Lenard G., Singer S. G. Protein conformation in cell membrane preparations as studied by optical rotatory dispersion and circular dichroism.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, v. 56, № 6, p. 1828–1835.
7. Gordon A. S., Wallach D. F. H., Strauss G. H. The optical activity of plasma membranes and its modification by lyssolecithin, phospholipase A and phospholipase C.— Biochim. et biophys. acta, 1969, v. 183, № 3, p. 405–416.



8. Urry D. W., Ji T. H. Distortions in circular dichroism patterns of particulate (or membranous) systems.—Arch. Biochem. and Biophys., 1968, v. 128, № 3, p. 802–807.
9. Urry D. W., Krivacic J. Differential scattering of left and right circularly polarized light by optically active particulate systems.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, v. 65, № 4, p. 845–852.
10. Urry D. W. Optical rotation and biomolecular conformation.—In: Spectroscopic approach to biomolecular conformation. Chicago: Amer. Med. Assoc., 1970, p. 34–122.
11. Gordon D. J., Holzwarth G. M. Optical activity of membrane suspensions: calculation of artifacts by Mie scattering theory.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, v. 68, № 10, p. 2365–2369.
12. Gordon D. J. Mie scattering by optically active particles.—Biochemistry, 1972, v. 11, № 3, p. 413–420.
13. Schneider A. S. Circular dichroism and optical rotatory dispersion of scattering suspensions.—Chem. Phys. Lett., 1971, v. 8, № 6, p. 604–608.
14. Duysens L. N. M. The flattening of the absorption spectrum of suspensions, as compared to that of solutions.—Biochim. et biophys. acta, 1956, v. 19, № 1, p. 1–12.
15. Вологина И. А. Применение спектрополяриметрии для изучения структуры мембранных белков.—В кн.: Итоги науки и техники. Сер. «Биофизика». М.: ВИНТИ, 1975, т. 4, с. 133–225.
16. Coupland R. E. The chromaffin system.—In: Handbook of Expt. Pharmacology. Berlin: Springer Verlag, 1972, v. 33, p. 16–45.
17. Deamer D. W. The relation of membrane ultrastructure to membrane function.—In: Mammalian cell membranes. Butterworths, 1977, v. 4, p. 1–31.
18. Sjöholm I., Ekman B. Scattering of light— a serious potential risk in circular dichroism measurements in the far ultraviolet region.—Anal. Biochem., 1975, v. 65, № 2, p. 596–599.
19. Львов К. М., Сухомудренко А. Г. Спектральные методы конформационного анализа полипептидов и белков.—Биофизика, 1974, т. 11, № 3, с. 576–581.
20. Уваров В. Ю., Бачманова Г. И., Арчаков А. И., Сухомудренко А. Г., Мясоедова К. Н. Конформация и тепловая стабильность растворимого и встроенного в мембрану липосом цитохрома Р-450.—Биохимия, 1980, т. 48, № 8, с. 1463–1469.
21. Henderson R., Unwin P. N. T. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy.—Nature, 1975, v. 257, p. 28–33.
22. Shenstone F. S. Ultraviolet and visible spectroscopy of lipids.—In: Biochemistry and methodology of lipids. J. Wiley and Sons Inc., 1971, p. 219–230.
23. Woody R. W. Studies of theoretical circular dichroism of polypeptides: contributions of  $\beta$ -turns.—In: Peptides, polypeptides and proteins. J. Wiley and Sons Inc., 1974, p. 338–350.
24. Abbreviations and symbols for the description of the conformation of polypeptide chains. IUPAC-IUB commission on biochemical nomenclature.—Biochemistry, 1970, v. 9, № 18, p. 3471–3479.
25. Miyazawa T., Blout E. R. The infrared spectra of polypeptides in various conformations: amide I and II bands.—J. Amer. Chem. Soc., 1961, v. 83, № 3, p. 712–719.
26. Chirgadze Yu. N., Shestopalov B. V., Venyaminov S. Yu. Intensities and other spectral parameters of infrared amide bands of polypeptides in the  $\beta$ - and random forms.—Biopolymers, 1973, v. 12, № 6, p. 1337–1351.
27. Chirgadze Yu. N., Nevskaya N. A. Infrared spectra and resonance interaction of amide I vibration of the antiparallel—chain pleated sheet.—Biopolymers, 1976, v. 15, № 3, p. 607–625.
28. Chirgadze Yu. N., Nevskaya N. A. Infrared spectra and resonance interaction of amide I vibration of the parallel—chain pleated sheet.—Biopolymers, 1976, v. 15, № 3, p. 627–636.
29. Шныров В. Л., Тараховский Ю. С., Боровягин В. Л. Изучение структурных изменений в пурпурных мембранах из *Halobacterium halobium* при температурной и щелочной денатурации.—Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 7, с. 1054–1059.
30. Лазарев Ю. А., Шныров В. Л. Исследование тепловой денатурации бактериородопсина из *Halobacterium halobium*.—Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 1, с. 105–112.
31. Oesterhelt D., Stoekenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*.—Nature New Biol., 1971, v. 233, p. 149–152.
32. Oesterhelt D., Meentzen M., Schuhmann L. Reversible dissociation of the purple complex in bacteriorhodopsin and identification of 13-cis and all-trans retinal as its chromophores.—Eur. J. Biochem., 1973, v. 40, № 1, p. 453–463.

Поступила в редакцию  
9.XII.1980

CONFORMATIONAL ANALYSIS AND THERMO-INDUCED TRANSFORMATIONS  
OF BACTERIORHODOPSIN IN PURPLE MEMBRANES FROM  
*HALOBACTERIUM HALOBIUM*

SHNYROV V. L., PHILIPPOVA E. A., CHEKULAeva L. N.,  
SUKHOMUDRENKO A. G.

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

In a study on the conformational lability of bacteriorhodopsin in purple membranes isolated from *Halobacterium halobium*, heating was shown to break about 30% of the initial  $\alpha$ -helical structure. The stability of the remaining  $\alpha$ -helical fragments against heat degradation apparently is due to formation of complexes wherein the peripheral sites function as a heat damper. The structure of these complexes is discussed in the light of CD and IR spectroscopy data; polystyrene latex and liposomes were used in some experiments to model of the light scattering by membrane suspensions. Heat absorption around 100° C by the purple membrane suspensions was shown to be related to the irreversible degradation of the membrane structure.

---