

Bacteriorhodopsin에 관한 마취제 유도 산-염기 평형 및 Electric Dichroism

李 紀 煥

공주대학교 자연과학대학 화학과
(1997. 10. 30 접수)

Anesthetic-Induced Acid-Base Equilibrium and Its Electric Dichroism on the Bacteriorhodopsin

Ki-Hwan Lee

Department of Chemistry, College of Natural Science, Kongju National University,
Kongju 314-701, Korea
(Received October 30, 1997)

요 약. 마취제를 purple membrane내 bacteriorhodopsin(bR)에 가했을 때 570 nm 흡수 띠는 480 nm로 이동한다. 마취제에 의해 유도된 분광학적 변화는 가역적이다. 이러한 평형의 겉보기 pKa(6.3)는 bR에 분산된 마취제의 성질에 의존한다. bR의 전기 배향 측정은 비교적 작은 전기장에서도 쉽게 달성될 수 있었으며 이때의 배향각도는 60° 이었다. 그러나 마취제로 처리한 bR은 이러한 변화를 관측할 수가 없었다. 이들 결과들은 마취제에 의해 발색단과 발색단 주변의 단백질 구조의 민감한 변화가 단백질 매트릭스의 전하를 띤 잔기들의 공간적 배향에 영향을 준 것으로 보인다.

ABSTRACT. When anesthetics were added to a bacteriorhodopsin (bR) in the purple membranes, the 570 nm absorption band shifts to 480 nm. This anesthetic-induced spectroscopic change is reversible. The apparent pKa (6.3) of this equilibrium depends on the nature of the anesthetics in which bR is dispersed. The electric orientation measurements showed that the native bR is easily achieved by relatively small electric field which is oriented at 60°, while anesthetic-treated bR is not the case. These results demonstrate that the subtle changes in the chromophore and the protein structure surrounding the chromophore by anesthetics influence the spatial orientation of the charged residues in the protein matrix surrounding chromophore.

서 론

Halobacterium halobium 세포의 purple membrane 내에 존재하는 bacteriorhodopsin(bR) 분자는 광에너지를 수용 저장하고, 일련의 광화학 순환반응을 하면서 ATP 합성을 유도한다. 이러한 현상에 대한 연구결과는 세포내의 bR을 구성하고 있는 발색단 레티날의 양성자화 상태와 레티날-단백질 사이의 상호작용으로 인하여 에너지를 저장하기도 하고 전달하는 중심위치로 간주되고 있으며, 이로부터 가지색 색깔이나 분광학적 특징이 나타난다고 보고되어 있다.¹ 즉, all-trans 레티날이 bacteriorhodopsin과의 결합으로 발색단의 최대 흡수파장이 380 nm에서 570 nm까

지 이동한다. 한편 570 nm의 흡수 최대 파장을 갖는 화학종이 바로 bR인데 시각색소인 로돕신과 분자구조가 유사하다. Nakanishi 등²은 부분적으로는 Schiff 염기의 양성자화 상태(440 nm까지 이동)와 이차적 상호작용 및 발색단 주변의 단백질 매트릭스(Protein Matrix)내에 전하를 띤 잔기들의 정전기적 상태 등이 이러한 분광학적 변화를 나타내는 중요한 요인이라고 설명하고 있다.

bR의 3차구조는 7개의 트랜스 멤브레인 소수성 분절(transmembrane hydrophobic helical segment)이 친수성 환(hydrophilic loop)으로 연결되어 있으며, 이 안에는 248개의 아미노산으로 구성되어 있고 양성자

화된 Schiff 염기는 Lys-216에 연결되어 있다.³ bR 자체에 관한 중간체 흡수 및 진동 분광학의 연구⁴⁻⁷와 광순환 동안 대응하는 전하 변이 전류(charge displacement current)의 분석^{8,9}으로부터 다음과 같은 광화학 과정의 설명할 수 있었다. bR이 광을 수용하면 발색단인 레티날이 all-trans 배치를 갖는다. All-trans 배치에 의한 광흡수는 일련의 광화학 순환으로 다음과 같은 단계로 일어난다. 즉, K, L, M, N 및 O에서 다시 원래 상태인 bR로 돌아가는데, 이때 M과정에서 탈양성자와 상태를 유지한다. 그런 다음 다시 세포외부로부터 양성자를 수용한다. 그러므로 이 구조의 순환성을 광에너지 전환에서부터 멤브레인 수송, 단백질 동역학 및 분자간 상호작용을 포함하는 인공기능에 이르기까지 다양한 분야에서 적용될 수 있는 이상적인 실험 모델로서 bR을 연구하게 된 연유가 여기에 있다.

분광학적인 관점에서 bR이나 시각색소인 로돕신도 마찬가지로 외부조건에 따라서 대단히 민감하게 흡수과정의 이동이 일어난다. 시각색소 로돕신에 여러 가지 양쪽성 물질을 가하면 천연색소인 로돕신과 용매화된 지질과의 상호 교환으로 흡수파장이 498 nm에서 502 nm로 이동한다.¹⁰ bR에서는 용매화 효과가 대단히 커서 새롭게 세제(detergent)를 가했을 때 세제-단백질(detergent-protein) 상호작용에 의해서 원래의 지질-단백질 상호작용을 대체한 결과 최대 흡수파장이 단파장쪽으로 22 nm나 이동이 일어난다.¹¹ 이것은 아마도 멤브레인의 용매화에 수반하여 단백질 구조의 점차적인 변화에 기인 된다고 결론을 내리고 있다. bR은 또한 여러 가지 실험 조건에 따라서 대단히 큰 분광학적인 이동이 단계적으로 나타난다. 예를 들면 마취제를 purple membrane에 가하면 원래의 최대 흡수띠인 570 nm(bR₅₇₀; purple color)에서 480 nm(bR₄₈₀; red color) 혹은 380 nm(bR₃₈₀; white color)로 이동하기도 한다.¹² 이같은 현상을 Mes-saoudi 등¹³은 마취제와 bR 사이의 직접 상호작용은 배제할 수 없으나 발색단 위치에서 일차적인 상호작용은 아닌 것으로 설명하였다. 여기서 주목할 것은 결국 purple membrane의 발색단과 마취제 사이의 상호작용에 대한 메카니즘은 명백하게 밝혀지지 않았으며 더욱 흥미 있는 것은 마취제로 섭동된 purple membrane은 광화학 순환반응은 일어나지만 양성자 펌프능력은 상실된다고 보고¹⁴된 바 있으나 그 이유

도 아직 분명치 않다.

양성자 펌프 능력은 여러 가지 조건에 크게 의존한다는 것은 분명하며 특히 pH의 변화에 따라서도 좌우된다는 것이 알려져 있다.¹⁵ 즉, 480 nm와 540 nm 색소 사이에 산-염기 평형의 적정은 pK_a가 13.3으로 보고되었기 때문에 레티날과 bR 사이의 Schiff 염기의 질소가 작용기 역할을 한다고 보기는 어렵다. 이같은 생각은 공명 라만 분광법(resonance Raman spectroscopy)으로부터 purple(570 nm) 및 red(480 nm) form 모두에서 양성자와 된 Schiff 염기가 확인되기 때문이다.¹⁶ 그러므로 마취제 존재에서 bR₅₇₀과 bR₄₈₀ 사이의 pH 의존 평형을 조사하여 hypsochromic 흡수종을 특성화 할 필요성이 제기된다. 또한 이같은 특성의 확인을 위하여 bR₅₇₀과 bR₄₈₀의 배향을 조사한다면 hypsochromic shift에 관한 가능한 메카니즘을 제안할 수 있을 것으로 생각한다.

Purple membrane의 배향을 조사하기 위하여 Keszthelyi,¹⁷ Barahas¹⁸ 및 Kimura¹⁹ 등은 purple membrane내의 bR 분자의 큰 영구 쌍극자 모멘트의 방향이 멤브레인 평면과 수직으로 존재한다고 electric dichroism 실험 방법을 통해 규명하였다. 이와 같은 배향을 측정할 때는 electric dichroism 방법이 효과적이라고 알려져 있다.²⁰ 이 방법에 의하여 Keszthelyi¹⁷가 purple membrane 평면에 대하여 발색단의 배향 각도를 구하였는데, 이 때의 각도는 59°였다. 만일 purple membrane이 마취제에 의해 섭동되면 멤브레인 평면에 대하여 영구 쌍극자 모멘트의 정도 및 배향 등이 달라질 것으로 예상된다. 이미 설명한 바와 같이 purple membrane에 마취제를 섭동시키면 적색 멤브레인(red membrane)이 생성되는데 이를 bR₄₈₀으로 명명한다. 그러므로 purple membrane의 bR₅₇₀과 bR₄₈₀의 전기적 성질에 관한 비교 연구는 대단히 중요한 역할을 할 수 있다. 왜냐하면 bR₄₈₀은 광화학 순환반응을 하면서도 양성자 펌프능력이 상실된다¹⁴는 사실에 기초하여 분자적 메카니즘을 규명한다면 bR₄₈₀의 상세한 분자구조를 예측할 수 있을 것으로 기대되기 때문이다.

본 연구에서는 purple membrane과 섭동된 purple membrane의 pH 변화에 따른 분광학적 변화와 물리적 성질을 비교 분석하고, 또한 외부 전기장을 걸어 주어서 일어나는 현상을 고찰하여, 마취제와 같은 외부 물질을 가하였을 때의 bR과의 상호작용 메카니즘을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

Purple membrane 조제 방법

Purple membrane 조제 과정은 Kates 등²¹의 방법으로 *Halobacterium halobium* S9으로부터 이루어졌다.

단백질은 bovine serum albumin을 표준으로 하여 Lowry 등²²의 방법으로 결정하였다. 조제된 purple membrane의 565 nm에서의 흡수계수(ϵ_{565})는 4.8×10^4 이고, 이 외에도 280 nm의 흡수띠가 존재한다. 이 실험에서의 $A_{565}/A_{280}=2.05$ 이다. 이는 Osterhelts와 Stoerkenius의 결과³와 잘 일치하였다. 또한 조제된 purple membrane은 SDS-gel 전기 영동법에서 단일띠를 보여주었다.

시료 용액은 purple membrane 저장액의 염을 씻어내기 위해서 증류수를 가하고 60분 동안 17,000 g에서 연속하여 3회 반복 원심 분리를 하였다. 마지막으로 2차 증류수 혹은 pH 4.0~11.0 범위의 완충용액으로 원하는 농도의 시료를 만들어 사용했다. Linear dichroism 실험을 위하여 bR_{570} 의 최종 농도는 10~20 μ M을 사용하였으며, bR_{480} 과 bR_{570} 의 평형을 위하여 enflurane(trademark Ethrane; 2-Chloro-1,1,2-trifluoroethyl difluoromethyl ether; Anaquest, Pointe-Claire, QC, Canada) 수 μ L를 purple membrane이 있는 5 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)에 가하였다. 이때 % 부피비는 대략 1%(V/V)이었다.

흡수 스펙트럼의 측정

흡수 스펙트럼 측정시 Pye Unicom SP 8-100에 diffused sample holder를 부착하여 탁한 시료의 scattering artifact를 최소화하였다.

Electric Dichroism 측정 방법

측정장치는 Fig. 1과 같다. 시료 셀에 백금전극을 설치하고 시료 용액에 낮은 전기장(< 30 V)의 전압을 걸어주고 편광된 광을 사용하여 흡수도의 변화를 전기장에 수직인 방향 및 수평방향으로 측정한다. 이때 백금전극을 사용함으로써 전극 효과를 충분히 줄일 수 있다. 백금전극을 사용하면 시간 전개과정에서 E는 거의 사각파에 가깝게 나타나는 향상된 배향장을 제공해 주므로 백금전극을 항상 사용하였다. 텅스텐 램프로부터의 빛은 단색광기에 의해서 선택되고 시료 셀을 지나기 전에 편광기로 편광 시킨다. 시료를 통과한 광은 광전증배관에 의하여 기록된다. 한편, 전기장에 의하여 유도된 electric dichroism의 배향각도에 관한 식은 다음에 의하여 구하여진다.²³

$$\frac{\Delta A_{\perp}}{A} = \frac{-1}{A} \text{Log} \left(1 + \frac{\Delta I_{\perp}}{I} \right) = \phi(\beta) \left(\frac{3}{2} \sin^2 \theta - 1 \right)$$

$$\frac{\Delta A_{\parallel}}{A} = \frac{-1}{A} \text{Log} \left(1 + \frac{\Delta I_{\parallel}}{I} \right) = \phi(\beta) (3 \cos^2 \theta - 1) \quad (1)$$

여기서 ΔI_{\perp} 와 ΔI_{\parallel} 는 전기장 방향에 대하여 각각 수직과 평행한 편광의 광세기 변화이며, ΔA_{\perp} 와 ΔA_{\parallel} 는 대응 흡수도 변화, I_0 는 입사광 세기, 그리고 $A = \log(I/I_0)$ 는 전기장이 없을 때의 흡수도이다. $\phi(\beta)$ 는 영구 쌍극자의 배향함수이다. 즉, $\phi(\beta) = 1 - 3(\coth \beta - 1/\beta)$ 이다. 여기서 $\beta = \mu BE/kT$ 이고, μ 는 분자의 영구 쌍극자 모멘트, B는 상수로서 쌍극자의 내부 장에서 걸어주는 장 E에 따라 달라진다. k는 볼츠만 상수, T는 온도이다. θ 는 걸여준 전기장과 발색단 전이모멘트의 방향 사이의 각도 즉, bR 분자의 배향각도이

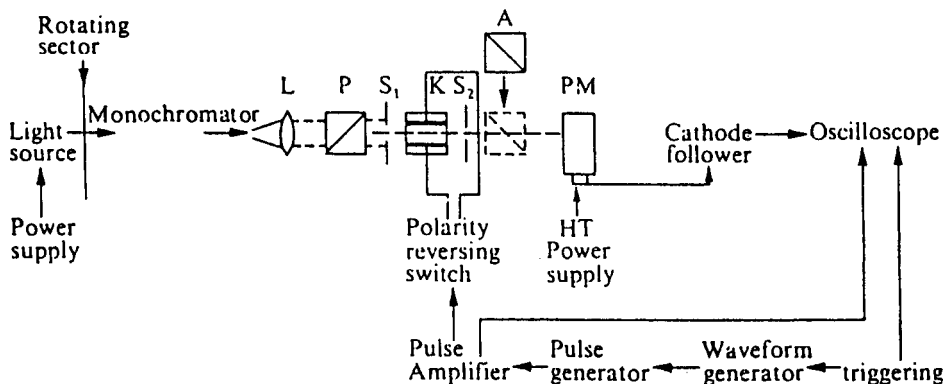


Fig. 1. Schematic diagram of the apparatus for the electric dichroism measurement.

다. 식(1)로부터 다음 식이 유도된다.

$$\frac{\Delta A_{\perp}}{A} = -\frac{1}{2} \frac{\Delta A_{\parallel}}{A} \quad (2)$$

즉, 이 식은 θ 에 무관하게 만족해야 한다. 또한 한 쪽 방향으로의 전기 영동적 이동 현상을 피하기 위해서는 전기장을 대칭적으로 걸어주는 것이 중요하다. 본 실험에 있어서 시간 t 동안 양의 전압 펄스, $2t$ 시간 동안 0 및 또다른 시간 t 동안 음의 펄스를 주므로서 극복할 수 있었으며 여기서 $t=3$ sec이고, 전기장 $E=2\sim 30$ V/cm를 사용하였을 때 20~30번의 완전한 사이클에서도 한쪽 방향으로 흐르는 전기 영동적 이동 현상은 관찰할 수 없었다.

결과 및 고찰

bR₅₇₀과 bR₄₈₀의 평형

Purple membrane에 마취제인 enflurane(ether type)을 가했을 때 유도된 레티날 발색단의 스펙트럼 변화는 Fig. 2와 같다. enflurane 존재에서 멤브레인의 purple color는 점차 사라지고 완전히 red color로 전환하며 스펙트럼 이동은 480 nm로 단파장 이동한다. 또한 보통의 진공 조건에서 enflurane은 쉽게 제거되고 bR의 원래 570 nm purple form으로 완전히 회복된다. 그러므로 이 과정은 가역 과정임을 알 수 있다.

Red membrane인 bR₄₈₀은 구조적인 관점에서 bR₅₇₀과 거의 차이가 없음에도 불구하고 bR₄₈₀에 있

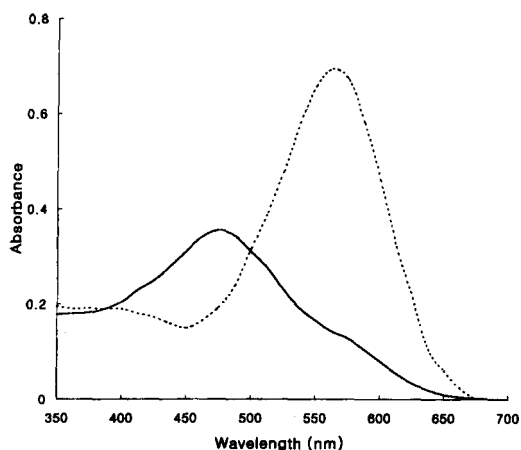


Fig. 2. Absorption spectra of 14 μ M bacteriorhodopsin suspended in 5 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) before(---) and after(—) addition of 1.0% (v/v) enflurane.

어서는 약한 양성자 펌핑 활성도를 나타내고 있음이 보고되었다.²⁴ Pande 등²⁵은 bR₄₈₀과 bR₅₇₀이 모두 광 이성화를 할 수 있는 양성자 레티날 Schiff 염기와 동일한 2차 구조를 갖고 있으나, 480 nm에 있어서는 트랜스 멤브레인 나선형 분질의 배향에 대하여 다소 느슨한 3차 구조를 갖는다고 제안하였다. 또한 Rothshield 등²⁶은 나선형 배향의 약간의 변화는 bR에서 어떤 그룹 즉, 아미노산 서열 중 Asp⁹⁶가 겹보기 pKa를 조절할지도 모른다고 제안하였다.

마취제 존재에서 bR₄₈₀과 bR₅₇₀의 평형상태를 조사하기 위하여 pH 변화에 따른 각 흡수 스펙트럼을 측정하였다. Fig. 3은 1%(V/V) enflurane 마취제 존재에서 pH 변화에 따른 bR₄₈₀의 생성물을 나타내었다. 이때 실험범위 pH(4.0 < pH < 11.0)에서 bR₅₇₀과 평형을 이루고 있는 bR₄₈₀의 상대적인 양을 결정하였다. 사용된 식은 $\Delta A_{480}^{\max} = \Delta A_{570}^{\max}(\Delta A_{480}/\Delta A_{570})$ 이다. 여기서 ΔA_{570}^{\max} 은 마취제를 가하지 않았을 때 570 nm에서 bR₅₇₀의 초기 흡수도이며, ΔA_{480} 과 ΔA_{570} 은 마취제 존재에서 각기 480 nm와 570 nm에서의 흡수도 변화이다.

pH 8.0 이상에서는 90% 이상이 bR₄₈₀으로 전환되었으며 480 nm/570 nm 발색단 평형은 겹보기 pKa가 6.3 이었다. pH 7보다 낮은 영역에서는 포화 마취제 농도에서도 bR₅₇₀이 완전히 bR₄₈₀으로 전환되지 않음

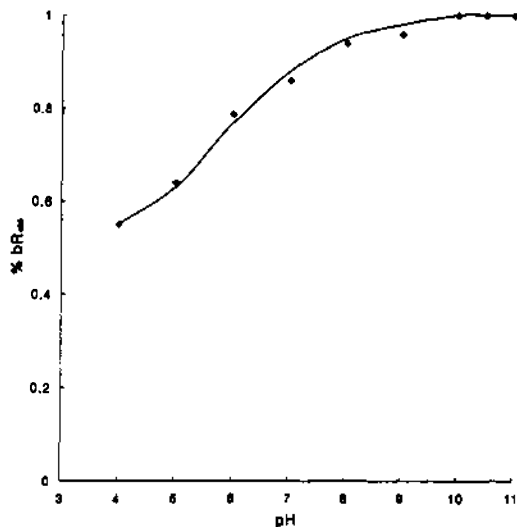


Fig. 3. Percentage bR transformed to bR₄₈₀ at equilibrium in the 4 to 11 pH range in the presence of 1% (v/v) enflurane.

을 발견하였다. 이는 bR_{480} 과 bR_{570} 의 평형은 pH에 의존함을 나타낸다.

bR 의 산-염기 평형 실험에서 Druckman 등¹⁵의 보고에 의하면 pH 11.5 이상에서 암적용된 흡수종이 bR_{560} 에서 bR_{460} 으로 변환되기 시작하며, 이는 탈양성자화된 Schiff 염기 발색단으로 특징 지워진다고 하였다. pH 13.0 이상에서는 탈색(bleaching)이 일어나고 처음에는 가역적이거나 다음 단계에서는 비가역적으로 365 nm(bR_{365})의 흡수종이 나타난다. 이 과정은 bR_{460} 과 경쟁적이다. 평형에 대응하는 겉보기 pKa는 13.3으로 보고되었다. bR_{560} (pH 6.5)에서 bR_{460} (pH 12.67 ± 0.03)으로의 전이에 관련된 과정은 가역적이며 염기성계에서 pH 6.2로의 빠른 산성화를 시켰을 때 원래의 bR_{560} 스펙트럼으로 회복된다고 보고하였다. 그러나 bR_{365} 종은 pH 12.67 ± 0.03 에서 산성화를 시켰을 때 원래의 bR_{560} 스펙트럼으로 회복되지 않는다고 보고하였다. 따라서 이 조건에 bR_{365} 는 비가역 반응을 나타낸다.

본 실험에서 마취제 존재 하에서 산-염기 겉보기 pKa는 6.3이었으며 Druckman¹⁵의 마취제 없이 산-염기 겉보기 pKa는 13.3과 비교할 때 대단히 낮은 pKa를 나타내고 있다. 이는 아마도 마취제에 의해서 단백질의 형태 변화를 유도하여 활성 자리를 섭동시키며 보다 낮은 pH에서도 Schiff 염기나 Asp⁹⁶의 노출을 원활히 함으로서 다음과 같은 $bR_{570} \rightleftharpoons bR_{480} + H^+$ 평형이 유지되는 것으로 제안된다.

Bucher 등¹⁴은 양성자 펌핑 활성도에 대한 action spectrum은 570 nm에 집중되며 480 nm 색소에 의한 양성자 펌핑 활성도는 거의 나타나지 않음을 보고하였다. 이때 존재하는 색소의 90% 이상이 bR_{480} 이었다. 이와 같이 광화학 순환반응은 일어나지만 양성자 펌핑 활성도는 병행되지 않는 현상에 대해서는 아직도 정확한 결론을 얻지 못하고 있다. 만일 bR_{480} 이 완화된 3차 구조를 갖는다면 외부 전기장에 대하여 배향이 다를 것으로 생각되며 이것이 최대 흡수 파장에 영향을 줄 수 있을 것으로 예상된다.

전기장에 의한 purple membrane의 배향

전기적 배향의 메커니즘은 purple membrane의 영구 쌍극자 혹은 유발 쌍극자에 기인되기 때문에 동일한 측정법은 purple membrane의 전기적인 성질에 가치 있는 정보를 제공하여 주며, 특히 electric dichroism의 측정은 purple membrane의 광학 비등방성에

관한 정보를 제공해 준다.²⁷

멤브레인내 bR 의 배열은 P_3 plane group으로 분류된다. 그 결과 영구 쌍극자는 멤브레인 표면에 수직인 배향을 가져야 한다. 멤브레인 표면을 따라서 크게 유도된 쌍극자가 예상되지만 외부 전기장에 기인되는 멤브레인 표면 가까이 상대 이온의 이동이 일어날 것이다. 따라서 전기장을 걸어 주었을 때 영구 및 유발 쌍극자에 기인하는 멤브레인의 배향은 수직할 것으로 예상된다.

Fig. 4는 마취제를 가하지 않은 purple membrane의 경우이며, 편광을 사용하여 흡수도 변화를 전기장에 수직인 방향에 따라서 electric dichroism 측정을 나타낸 것이다. 이때 멤브레인 내에 묻혀 있는 bR 분자의 배향을 결정하기 위한 측정은 파장 570 nm에서 수행하였다. 이 경우 입자 크기에 따른 광 산란의 문제가 따를 수 있는데 이를 제거하기 위해서 측정 시 수조에서 초음파 진동에 의해 완화 시킬 수 있었다. 마취제를 가하지 않은 purple membrane은 전기장에 의하여 배향되고 있으며, 이는 영구 혹은 유도 전기 쌍극자 능률을 갖고 있음을 나타낸다.

Fig. 5는 식(1)을 이용하여 전기장 강도에 따르는

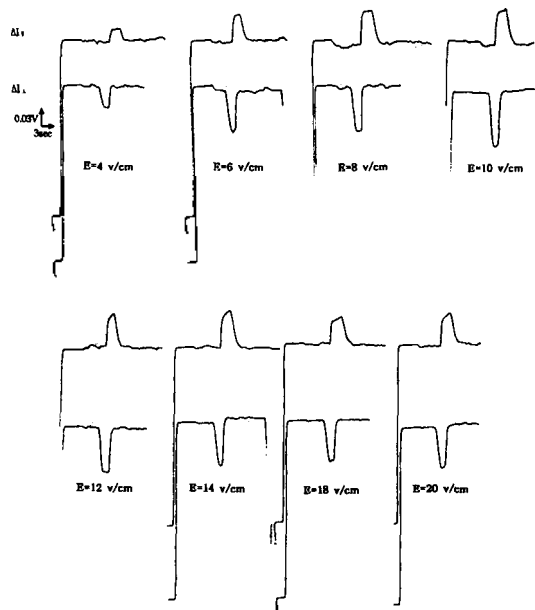


Fig. 4. Time course of absorption changes of purple membrane solution for different field strengths. ΔI_{\perp} ; the measuring light was polarized parallel to the direction of electric field. ΔI_{\parallel} ; for perpendicular polarization. $\lambda=570$ nm.

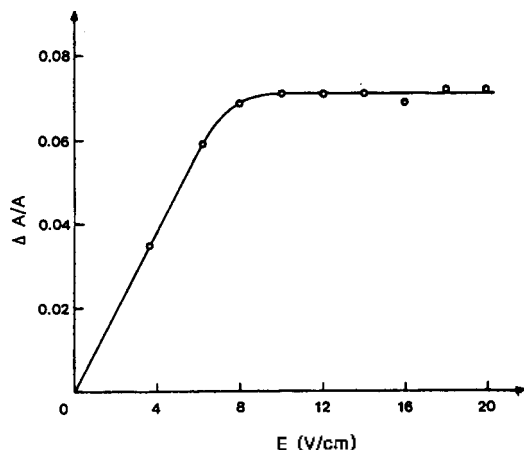


Fig. 5. Dependence of the reduced dichroism on the electric field strength. Calculation of the data in Fig. 4. according to Eq. (1).

reduced dichroism의 의존성을 계산하여 나타내었다. 또한 실험에서 얻어진 값을 식(2)에 대입했을 때 비교적 잘 일치하였다. $\Delta A_{\perp}/A$ 혹은 $\Delta A_{\parallel}/A$ 의 포화된 값으로부터 bR 분자의 배향 각도(θ)는 식(1)에 의하여 결정할 수 있었다. 본 실험에서 얻어진 bR 분자의 배향 각도는 60° 이었으며 Keszthelyi¹⁷가 보고한 59° 에 매우 근접하였다. 이로부터 purple membrane에 묻혀 있는 bR 분자가 광 유도에 의한 양성자 펌핑 작용에 중요한 배향임을 확인할 수 있었다.

한편 bR₄₈₀에 있어서는 electric dichroism을 관찰할 수 없었다. 이는 bR₅₇₀과 bR₄₈₀ 사이에 분산 의존도의 정성적인 차이가 있음을 보여준다. 즉 bR₄₈₀의 경우 마취제에 의하여 분산 의존도가 증가하여 그 결과 영구 쌍극자 모멘트의 감소를 수반하게 된다. 이와 같은 영구 쌍극자 모멘트의 감소가 bR의 양성자 펌프의 기능에 대단히 중요한 역할을 하는 것이라 생각되며 이때 완화된 3 차구조에 의한 발색단과 발색단 주변의 단백질 구조의 민감한 변화에 의해서 단백질 매트릭스의 전하를 띤 잔기들의 공간적 배향에 영향을 준 것으로 보인다.

본 연구는 공주대학교 교내 연구비에 의해 이루어졌으며 또한 연구과정에 있어서 실험실 및 시료를 제공해 준 캐나다 퀘벡대학교의 F. Boucher 교수와 Electric Dichroism 측정에 도움을 준 N. Beaudoin 박사께 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. Stoeckenius, W.; Bogomolni, R. *Annu. Rev. Biochem.* **1982**, *51*, 587.
2. Nakanishi, K.; Balogh-Nair, V.; Arnabold, M.; Tsujimoto, K.; Honig, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7945.
3. Oesterhelt, O.; Stoeckenius, W. *Nature (New Biol.)*, **1971**, *233*, 149.
4. Mathies, R. A.; Lin, S. W.; Ames, J. B.; Pollard, W. T. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **1991**, *20*, 491.
5. Lozier, R. H.; Neiderberger, W.; Bogomolni, R. A.; Hwang, S. B.; Stoeckenius, W. *Biochim. Biophys. Acta.* **1976**, *440*, 545.
6. Hwang, S. B.; Stoeckenius, W. *J. Membr. Biol.* **1977**, *33*, 325.
7. Balashov, S. P.; Ebrey, T. G. *Spectrum*. **1994**, *7*, 1.
8. Trissl, H. W. *Photochem. Photobiol.* **1990**, *51*, 793.
9. Der, A.; Hargittai, P.; Simmon, J. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **1985**, *10*, 259.
10. Motoyama, H.; Hamanaka, T.; Kito, Y.; Morita, H.; Guerette, L.; Abran, D.; Boucher, F., *Biochim. Biophys. Acta.* **1986**, *861*, 9.
11. Lam, E.; Packer, L. *Arch. Biochem. Biophys.* **1983**, *221*, 557.
12. Lee, K. H.; McIntosh, A. R.; Boucher, F. *Biochem. Cell Biol.* **1991**, *69*, 178.
13. Messaoudi, S.; Lee, K. H.; Beaulieu, D.; Baribeau, J.; Boucher, F. *Biochim. Biophys. Acta.* **1992**, *1140*, 45.
14. Boucher, F.; Taneva, S. G.; Elouatik, S.; Dery, M.; Messaoudi, S.; Harvey Girard, E.; Beaudoin, N. *Biophys. J.* **1996**, *70*, 948.
15. Druckmann, S.; Ottolenghi, M.; Pande, A.; Pande, J.; Callender, R. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1982**, *105*, 4953.
16. Pande, C.; Callender, R.; Baribeau, J.; Boucher, F.; Pande, A. *Biochim. Biophys. Acta.* **1987**, *973*, 257.
17. Keszthelyi, L. *Biochim. Biophys. Acta.* **1980**, *598*, 429.
18. Barahas, K.; Der, A.; Dancshazy, Z.; Keszthelyi, L.; Marden, M. *Biophys. J.*, **1983**, *43*, 5.
19. Kimura, Y.; Ikegami, A.; Ohno, K.; Saigo, S.; Takeuchi, Y. *Photochem. Photobiol.* **1981**, *33*, 435.
20. Shah, M. J. *J. Phys. Chem.* **1963**, *67*, 2215.
21. Kates, M.; Kushwaha, S. C.; Sprott, G. D. *Methods Enzymol.* **1982**; *98*.
22. Lowry, D. H.; Rosenbrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265.
23. Fredericq, E.; Houssier, C. *Electric Dichroism and Electric Birefringence*; Clarendon press: Oxford, **1973**.

24. Harvey-Girard, E. *Master's thesis*; Universite'du Quebec a TroisRivieres (in French), 1990.
25. Pande, C.; Callender, R.; Chang, C. H.; Ebrey, T. *Photochem. Photobiol.* **1985**, *42*, 549.
26. Rothschild, K. J.; Marti, T.; Sonar, S.; He, Y. W.; Rath, P.; Fischer, W.; Khorana, G. H., *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 27046.
27. Taneva, S. G.; Todorov, G.; Petkanchin, I. B.; Stoylov, S. P. *Eur. Biophys. J.* **1987**, *14*, 415.