

ВПЛИВ ВОЛОГОСТІ НА ФОТОІНДУКОВАНІ ПРОЦЕСИ У ПЛІВКАХ БАКТЕРІОРОДОПСИНУ

І. І. Трикур, О. І. Корпош, Н. П. Фролова, В. М. Різак

Ужгородський національний університет, 54, вул. Волошина, м. Ужгород, 88000, Україна

Вода відіграє велику роль у функціонуванні молекули трансмембранного білка – бактеріородопсину. Дослідженню впливу відносної вологості оточуючого середовища на оптичні характеристики плівок бактеріородопсину з різними матрицями і присвячена дана робота. В якості матриць використовувалися водорозчинна желатина та водонерозчинні золь-гельні стекла. Спектральні та кінетичні характеристики плівок досліджувались у діапазоні вологості 47 – 100%. Встановлено, що для різних типів матриць залежності спектральних та кінетичних характеристик плівок від вологості відрізняються.

Вступ

Бактеріородопсин (БР) – світлочутливий трансмембранний білок, виявлений у мембранах галофільних бактерій *Halobacterium salinarium* [1]. Поглинання кванту світла приводить до конформаційних змін у молекулі БР, які носять зворотний характер. Молекула проходить через ряд проміжних станів – інтермедіатів, після чого повертається у вихідний стан [2]. Даний процес називають фотоциклом. У результаті проходження фотоциклу енергія поглинутого кванту світла використовується для трансмембранного переносу протону з цитоплазми бактерії [3]. Інтермедіати БР мають різні часи життя та характеризуються зсувом максимуму поглинання відносно основного стану БР₅₇₀. Інтермедіат M₄₁₂ має найбільший час життя і максимальний зсув максимуму поглинання [4].

Відомо [5–8], що зміна вологості приводить до зміни оптичних параметрів плівок бактеріородопсину. Зокрема, зменшення вологості приводить до: зменшення квантового виходу, зміщення термальної цис-транс ізомеризаційної рівноваги, зміни констант швидкостей прямих та зворотних реакцій фотоциклу, виникнення прямих шунтуючих реакцій [9] і т.д. У переважній більшості досліджень, які проводились в даному напрямку, використовувалися плівки на основі водорозчинних матриць (желатин, полівініло-

вий спирт). Очевидно, що водорозчинні матриці є чутливими до зміни вологості і вносять додаткову похибку в експериментальні результати.

У зв'язку з цим, дана робота присвячена дослідженню впливу зміни вологості на динаміку фотоіндукованих змін у плівках БР, виготовлених з використанням водорозчинних та водонерозчинних матриць.

Методика експерименту

Плівкові структури з капсульованим бактеріородопсином у прозору водонерозчинну золь-гельну скляну матрицю отримано за допомогою технології одержання золь-гельних матеріалів згідно роботи [10]. Авторами [10] описано методику виготовлення золь-гельних зразків на основі тетраметоксилану (TMOS). Нами використовувався тетраетоксисілан (TEOS), оскільки TMOS дуже токсичний. Для одержання плівкової структури брали 0,7 мл TEOS, 0,3 мл H₂O та 0,01 мл HCl з молярною масою 0,04 М. Все поміщали в полістиролову пробірку. Дана суміш опромінювалася ультразвуком протягом 20 хвилин у льодяній ванні. Після цього до суміші додали 1 мл H₂O. З одержаної суміші відібрали 0,25 мл в іншу посудину і до цього об'єму додали 0,12 мл буфера з рН=9 та 0,1 мл водної суспензії бактеріородопсину (з концентрацією $c = 14$ мг/мл). Після перемішування, суміш нанесли ме-

тодом поливу на попередньо очищену скляну підкладинку і помістили для висихання в холодильник з температурою 4°C. Підкладинка знаходилась у закритій посудині. Процес висихання тривав 6 діб.

Виготовлення плівок БР на основі желатинової матриці проводилось згідно ТУ У 02070832.008 [11].

Дослідження оптичних параметрів плівок проводились за допомогою установки, розробленої на основі спектрофотометра СФ-46. Використання регулярного оптичного світловоду для введення збуджуючого випромінювання дозволило проводити дослідження фоточутливих матеріалів з точністю, гарантованою технічними характеристиками спектрофотометру [12].

Блок засвітки зразка складається з лампи КГМ 4 зі стабілізованим джерелом живлення, електромагнітної шторки, системи лінз та касети світлофільтрів, які формують та вводять збуджуюче випромінювання з заданими амплітудними та спектральними характеристиками у світловод. Для обробки та калібровки вихідного сигналу використовувався 8-розрядний аналого-цифровий перетворювач Ecotest-120, сигнал з якого через порт RS-232 подається на ЕОМ, що дозволяє проводити реєстрацію фотоіндукованих змін досліджуваних об'єктів у режимі реального часу.

Для встановлення бажаної вологості (47, 58, 66, 87 та 100%) використовувалися насичені розчини відповідних солей. Пробірка з розчином солі встановлювалась у герметичній кварцовій кюветі, в якій знаходилась досліджувана плівка. Для встановлення рівноваги парів насиченого розчину солі та стабілізації вологості плівка витримувалася не менше 24 годин перед вимірюванням. Всі дослідження проводились при кімнатній температурі.

Оскільки інтермедіат M_{412} має найбільший час життя та характеризується максимальним спектральним зсувом відносно основного стану молекули, зміни у протіканні фотоциклу найлегше відслідковувати, досліджуючи процеси формування та розпаду M_{412} при різних умовах.

Для оцінки впливу вологості на параметри фотоциклу обчислювались напівперіод життя інтермедіату M_{412} та фотоіндукована зміна коефіцієнту пропускання ΔT на характеристичних довжинах хвиль 412 та 570 нм. Фотоіндукована зміна коефіцієнту пропускання ΔT – зміна коефіцієнту пропускання плівки (збільшення на 570 нм і зменшення на 412 нм) у присутності зовнішнього збуджуючого випромінювання. Напівперіод життя інтермедіату M_{412} – це час необхідний для зміни пропускання на 50% при знятті зовнішнього освітлення[4].

Результати експерименту

Спектральні дослідження. Нами було проведено дослідження впливу вологості на спектри поглинання плівок БР з різними матрицями при різних значеннях відносної вологості.

Для експериментів використовувалися желатинові плівки, матриця яких є водорозчинною, та золь-гельні плівки, які не є розчинними у воді. На рис. 1. показано зміни спектрів поглинання в залежності від рівня вологості для желатинової (а) та золь-гельної (б) плівки.

Як видно з наведених графіків, поведінка плівок при зміні вологості відрізняється для різних матриць, хоча для обох видів матриць реєструється зростання поглинання при збільшенні вологості. Для плівки з желатиновою матрицею суттєве збільшення висоти максимуму поглинання спостерігається лише для вологості 100%. У діапазоні 47% – 66% спостерігаються несуттєві зміни висоти максимуму поглинання. Загальна зміна висоти максимуму поглинання при зміні вологості від 47% до 100% становить 8%. Спектрального зсуву при дегідратації не спостерігалось. Отримані результати узгоджуються з літературними даними[6], де автори спостерігали збільшення поглинання у желатинових плівках при збільшенні вологості. Разом з тим автори роботи [6] виявили значний зсув максимуму поглинання у синю область для плівок БР при зменшенні вологості. Однак, зміна положення мак-

симуму поглинання у роботі [6] спостерігалася при зменшенні вологості до величини меншої ніж 43%. Оскільки у нашому

експерименті значення вологості лежали у діапазоні 47%-100%, то зсув максимуму поглинання зафіксувати не вдалося.

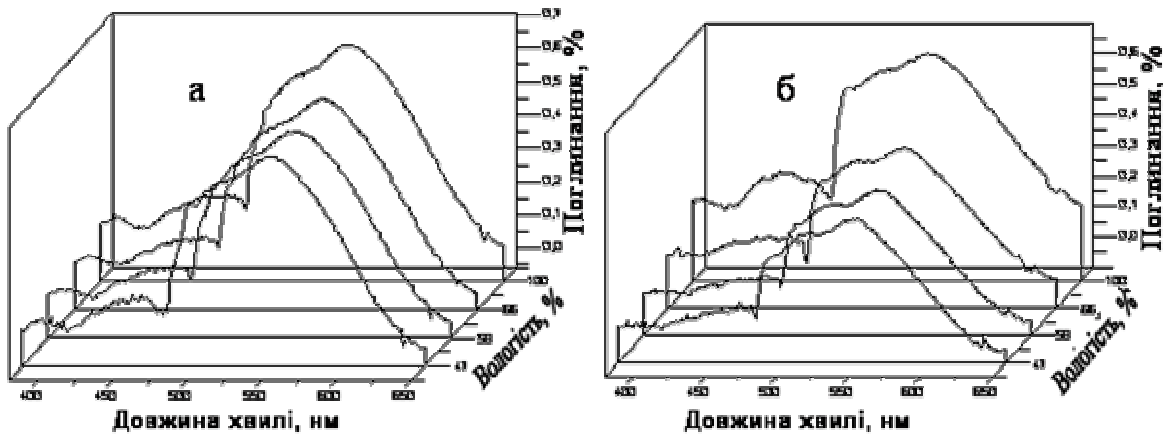


Рис. 1. Спектри поглинання плівок на основі бактеріородопсину при різних значеннях відносної вологості. а) – плівка БР з желатиноюватою матрицею; б) – плівка БР виготовлена на основі золь-гель технології.

Для плівок, виготовлених по золь-гельній технології, спостерігалася суттєве зростання висоти максимуму поглинання при зростанні вологості. При вологості 47% висота максимуму поглинання становить 37%, а при зростанні вологості до 100% - збільшується на 27% і стає рівна 64%.

Фотоіндуковані зміни у плівках БР.

Для дослідження кінетики фотоіндукованих процесів у плівках БР при різній вологості проводилися дослідження зміни пропускання плівок БР при релаксації молекули БР із збудженого в основний стан. Отримані результати наведено на рис. 2 та рис. 3.

На основі отриманих результатів ми проводили розрахунок зміни коефіцієнту оптичного пропускання ΔT та напівперіоду життя $\tau_{1/2}$ інтермедіату M_{412} під дією зовнішнього освітлення. Отримані результати наведено на рис. 4 та рис. 5.

На рис. 4. наведено залежності напівперіоду життя інтермедіату M_{412} від вологості для плівок з різними матрицями.

Для обох типів плівок спостерігається збільшення $\tau_{1/2}$ при зменшенні вологості. Величина зміни $\tau_{1/2}$ для желатинової плівки становить близько 23 с при зміні вологості від 47 до 100%. Для золь-гельної плівки при даних умовах спосте-

рігається зміна $\tau_{1/2}$ на 28 с. Збільшення $\tau_{1/2}$ свідчить про зміни у фотоциклі молекул БР, спричинені зміною вологості.

Залежність фотоіндукованої зміни коефіцієнту оптичного пропускання ΔT від рівня вологості наведена на рис. 5. Як видно з результатів на довжині хвилі 570 нм ΔT для золь-гельної плівки зростає майже лінійно при зменшенні вологості, в той час як для желатинової плівки не спостерігається чіткої залежності ΔT від вологості. На довжині хвилі 412 нм спостерігається зростання ΔT для обох видів плівок.

Як видно з наших результатів та досліджень авторів [5-8, 13, 14], вода відіграє велику роль у функціонуванні молекули БР. З попередніх робіт [3, 9, 14] відомо, що молекули води знаходяться у безпосередній близькості до хромофорної групи – ретиналю і приймають участь у функціонуванні протонного каналу. Гідратаційні оболонки служать для вирівнювання внутрішньомолекулярних електростатичних полів, тим сами стабілізуючи молекулу. З точки зору алгоритму функціонування протонного каналу, вплив зміни вологості на напівперіод життя інтермедіату M_{412} , який ми спостерігаємо на експерименті, можна пояснити наступним чином.

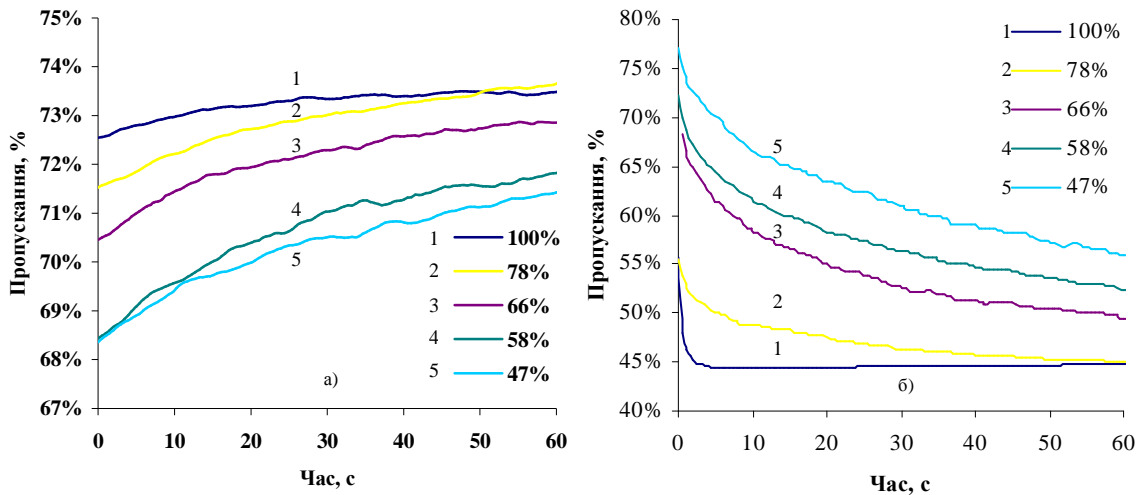


Рис. 2. Зміна пропускання плівки на основі БР з використанням золь-гельної матриці після зняття зовнішнього випромінювання при різних значеннях вологості; а) при $\lambda = 412$ нм, б) $\lambda = 570$ нм.

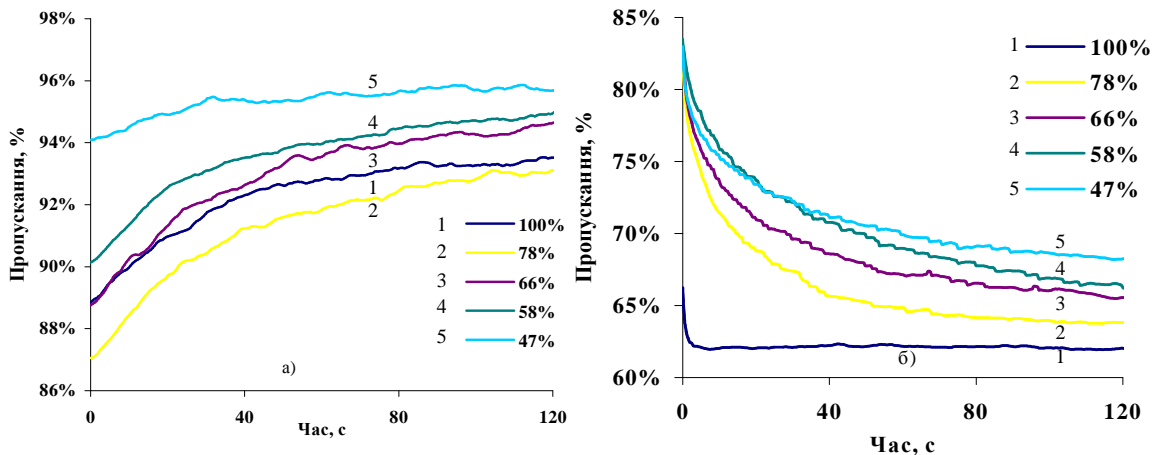


Рис. 3. Криві зміни пропускання плівки на основі БР з використанням желатинової матриці після зняття зовнішнього випромінювання при різних значеннях вологості; а) при $\lambda = 412$ нм, б) $\lambda = 570$ нм.

Відомо [2, 3, 15], що на етапі розпаду інтермедіату M_{412} і утворення інтермедіату O_{640} відбувається репротонування Шифової основи (ШО) ретиналю. Донором протону в даному випадку виступає амінокислотний залишок Asp96. На цьому етапі фотоциклу pKa Asp96 рівний 11, в той час як pKa ШО залишається рівним 8 [3,15]. При таких значеннях pKa передача протону від Asp96 до ШО є енергетично не вигідною. Однак, депротонування ШО (на етапі переходу від інтермедіату M_1 до M_2) призводить до нейтралізації електростатичного комплексу ШО-протион, що зумовлює структурні перебудови у протонному каналі, зокрема, до повертання

ретиналю та відхилення цитоплазматичного кінця спіралі F [3,7]. Такі перебудови приводять до збільшення гідратації цитоплазматичної сторони спіралі F, в тому числі й Asp96 та зменшення його pKa до 7. Відповідно, кількість молекул води у плівці, яка буде визначатися вологістю, впливає на pKa Asp96. Якщо ж, при пониженні вологості, кількість води недостатня, репротонування ШО стає утрудненим. А отже перехід від інтермедіату N_{560} до O_{640} буде блокуватись. Попередні дослідження показали, що переходи $M_2 \leftrightarrow N_{560} \leftrightarrow O_{640}$ є реверсивними [3, 9, 14, 16]. Блокування прямого переходу $N_{560} \rightarrow O_{640}$ буде приводити до зміщення

рівноваги прямих і зворотніх переходів у бік збільшення констант швидкостей зво-

ротніх реакцій. Саме цей факт, на думку

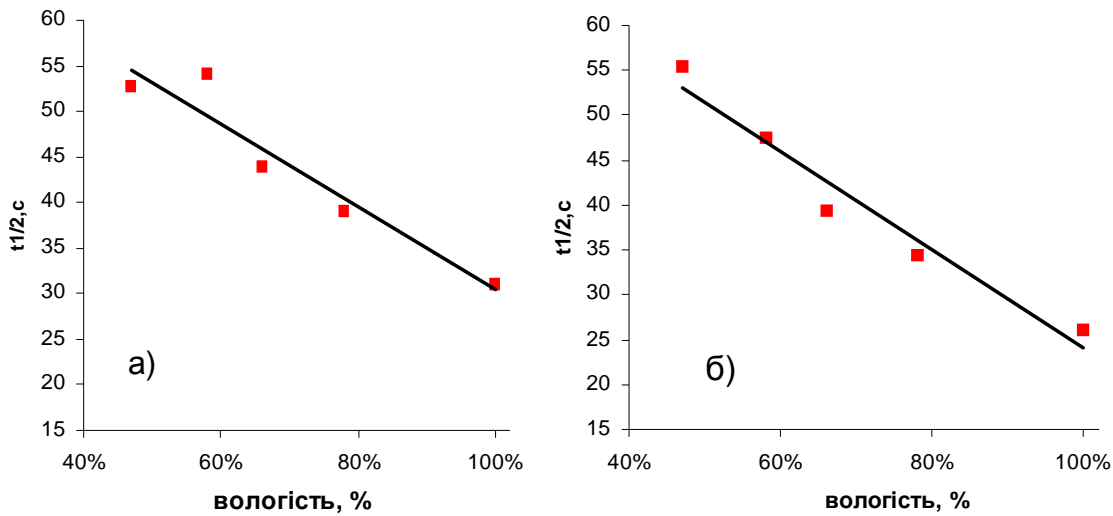


Рис. 4. Залежність напівперіоду життя інтермедіату M_{412} - $\tau_{1/2}$ від вологості; а) – желатинова плівка БР; б) – плівка БР виготовлена по золь-гельній технології.

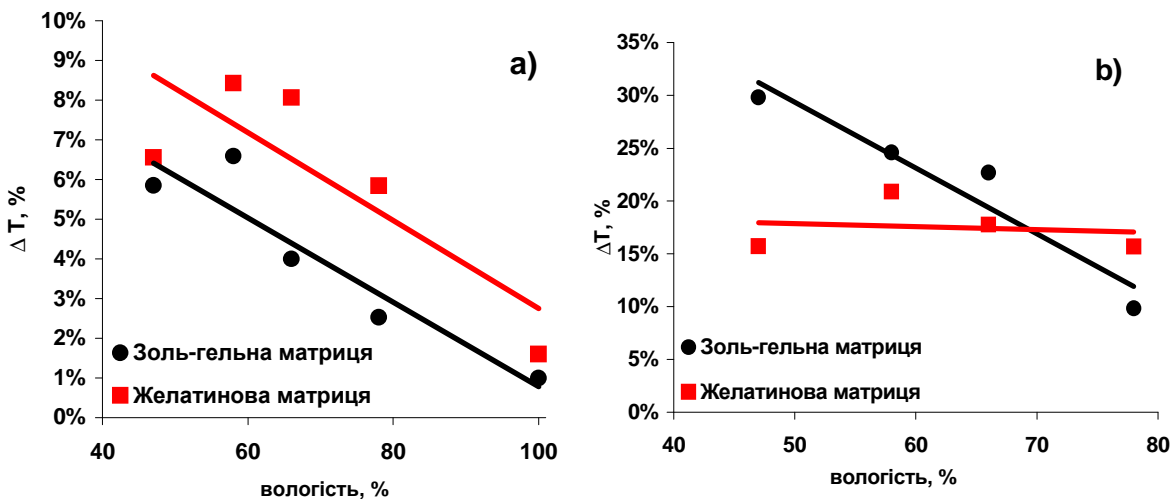


Рис.5. Залежність величини фотоіндукованої зміни коефіцієнта пропускання плівок БР при різних значеннях вологості на характеристичних довжинах хвиль: а) – 412 нм; б) – 570 нм.

дослідників [9, 11, 14-17], приводить до сповільнення розпаду інтермедіату M_{412} .

Цим самим можна пояснити і збільшення ΔT на довжині хвилі 570 нм при зменшенні вологості. Оскільки розпад інтермедіату M_{412} сповільнюється все більша кількість молекул буде “зависати” у стані M_{412} , що і буде викликати збільшення пропускання на довжині хвилі 570 нм.

Висновки

У даній роботі нами проведено дослідження впливу вологості на параметри

фотоциклу плівок бактеріородопсину на основі різних матриць.

Встановлено, що при збільшенні вологості спостерігається зростання висоти максимуму поглинання для обох видів плівок. Для желатинової плівки маємо збільшення на 8%, а для золь-гельної – на 27%.

Розрахунки для $\tau_{1/2}$ виявили збільшення напівперіоду життя інтермедіату M_{412} при зменшенні вологості від 100% до 47%. Для желатинової плівки $\tau_{1/2}$ збільшився на 23 с, а для золь-гельної плівки – на 28 с. Встановлено, що величина фото-

індукованої зміни пропускання ΔT теж залежить від рівня вологості.

Запропоновано модель механізму впливу вологості на фотоцикл бактеріородопсину.

Література

1. N. Hampp Bacteriorhodopsin as a Photochromic Retinal Protein for Optical Memories // *Chem. Rev.* 2000, 100, 1755-1776
2. Всеволодов Н.Н. Биопигменты - фоторецепторы. Фотоматериал на бактеріородопсине.- М.: Наука, 1988.-222 с.
3. Lanyi J. K. Mechanism of ion transport across membranes // *The Journal of Biological Chemistry* - Vol. 272., 1997.
4. T. Kouyama, Y. Kimura, K. Kinoshita, A. Ikegami Immobility of the chromophore in bacteriorhodopsin // *FEBS LETTERS* Volume 124, № 1, 1981, 100-104
5. S. Crittenden, S. Howell, R. Reifenger, J. illebrecht, R.R. Birge Humidity-dependent open-circuit photovoltage from a bacteriorhodopsin-indium tin oxide bioelectronic heterostructure // *Nanotechnology* – Vol 14 (2003), p. 562-565.
6. T.V. Dyukova, E.P. Lukashev Dehydration effects on D96N bacteriorhodopsin films // *Thin Solid Films* Vol. 283 (1996), p. 1- 4.
7. Robert R. Renthall, Nicholas Gracia and Roben Regalado Water and Carboxyl Group Environments in the Dehydration Blueshift of Bacteriorhodopsin // *Photochemistry and Photobiology* 74(5) 714-718, 2000.
8. Фролова Н.П., Корпош О.І., Баторі-Тарці З.І., Цьома І.Й., Ярош В.В., СічкаМ.Ю., Плівкові структури на базі бактеріородопсину, чутливі до змін вологості., Науковий вісник Ужгородського університету, серія фізика, 2004, вип. 15, с. 30-33.
9. G. Varo, J.K. Lanyi Distortions in the photocycle of bacteriorhodopsin at moderate dehydration // *Biophysical Journal*, Vol 59., 1991 p. 313-322.
10. Howard H. Weetall Retention of Bacteriorhodopsin Activity in dried sol-gel glass // *Biosensor & Bioelectronics* Vol. 11, No. 3, pp. 327-333, 1996.
11. Плівкові структури фотохромного матеріалу бактеріородопсину (ФХМБР). ТУ У 02070832.008 – 97. від 25.12.1997.
12. Спектрофотометр СФ-26. Технічний опис та інструкція по експлуатації С.20,1983р.
13. А.В. Druzhko, S.K. Pirutin, A.R. de Lera, R. Alvarez, S. Alvarez and M. Dominguez 14-Fluorine bacteriorhodopsin gelatin films: performance at different relative humidities // *Journal of Biological Physics and Chemistry* 4 (2004).
14. P. Hildebrandt and M. Stockburger Role of Water in Bacteriorhodopsin's Chromophore: Resonance Raman Study // *Biochemistry* Vol. 23 (1984), p. 5539-5548.
15. Баторі-Тарці З. І. Модифікація оптичних властивостей плівкових структур на базі бактеріородопсину; Дис. анд. фіз.-мат. наук: 01.04.10. / . – Ужгород, 2001.-131с.
16. P.C. Pandey, B.C. Upadhyay, C.M.D. Pandey Dependence of M, N and O states decay kinetics of D96N bacteriorhodopsin on amine and amino compounds and its application in chemical sensing // *Sensors and Actuators B* 46 (1998) 80–86.
17. Бандровська І.К., Баторі –Тарці З.І., Корпош О.І., Фролова Н.П. Модифікація кінетики фотоциклу бактеріородопсину. // *Український фізичний журнал.*- 2001, т. 46, № 2, с.161-164.

INFLUENCE OF HUMIDITY ON PHOTOINDUCED PROCESSES IN BACTERIORHODOPSIN FILMS

I. I. Trikur, O. I. Korposh, N. P. Frolova, V. M. Rizak

Uzhgorod National University, 88000 Uzhgorod, Voloshina St. 54

The water plays a major role in photocycle BR. Therefore given paper is devoted to research of humidity influence on optical properties BR films. Spectral and kinetic characteristics were monitored over a range of relative humidity 47-92% for films with different types of matrixes. As matrixes were used water soluble gelatine and not water soluble sol-gel glasses. The obtained results confirmed our earlier suggestion that the type of a matrix influences of feature of light-induced processes at change of humidity.