

## МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ СТРУКТУРНИХ ЗМІН У ПЛІВКАХ МЕМБРАННИХ БІЛКІВ

*Методом голографічної інтерферометри з використанням фототермотастичних реєструвальних середовищ досліджувалися плівки, мембранних білків, які містять фотосинтетичні реакційні центри *Rhodobacter sphaeroides*. Плівки були отримані шляхом природного сушіння водних розчинів білків при температурі 4 °С. Товщина плівок становила 0,3+0,5 мм. Встановлено, що за освітлення плівок реакційних центрів відбувається зменшення контрасту інтерференційних смуг без зміни їх положення. Швидкість зменшення контрасту зростає зі збільшенням інтенсивності освітлення плівок. Висловлено припущення, що цей ефект може бути обумовлений утворенням у плівці кластерів, розмір яких співрозмірний з довжиною хвилі світла, зміною взаємодії між білково-пігментними комплексами реакційних центрів у результаті фотоіндукованих структурних перебудову їхньому білковому комплексі.*

### Вступ

Молекулярний комплекс реакційного центру (РЦ) являє собою трисубодичну М, L, H глобулу з кофакторами (чотири бактеріохлорофіли, два бактеріофеофетини, два хінони та один високоспіновий атом заліза  $Fe^{2+}$ ). Відомо [1, 2], що за поглинання кванта світла в РЦ відбувається фотоокиснення первинного донора електрона - димеру бактеріохлорофіла (P). Збудже-

ний електрон через ряд проміжних переносників потрапляє на первинний (Qa) хінонний акцептор, а потім на кінцевий (Qb). Структуру молекулярного комплексу РЦ і схему фотопереносу електрона ілюструє рис. 1, а, б відповідно.

На кожному з кофакторів ланцюга переносу електрона його стабілізація зумовлена структурно-динамічною організацією молекулярного комплексу РЦ. Так, процес локалізації електрона на хінонних акцепторах визначається станом все-

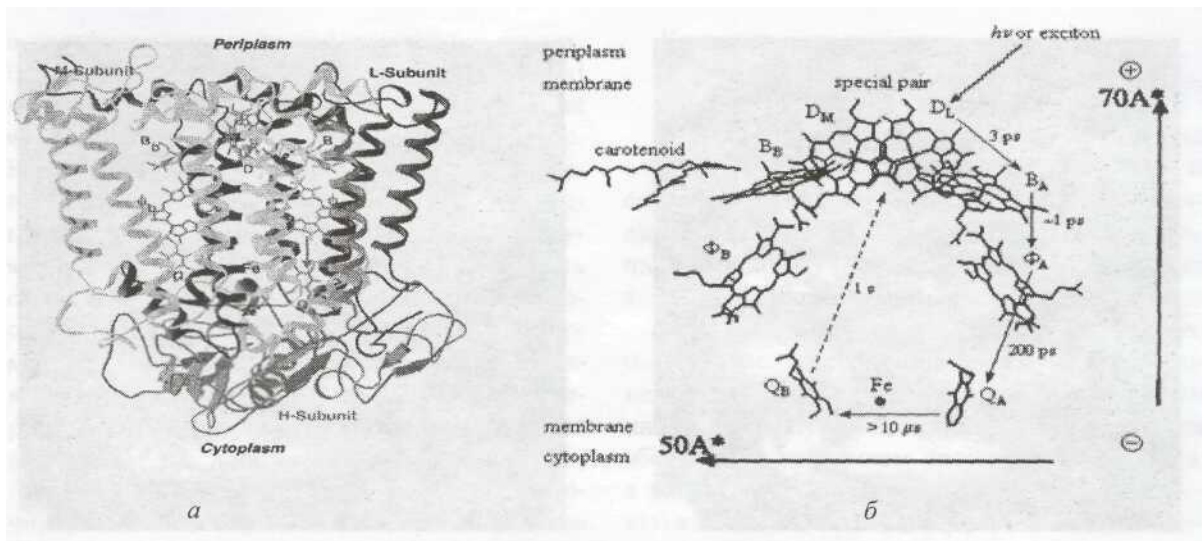


Рис. 1. Структура молекулярного комплексу

редині білкових водневих зв'язків (які утворюються в тім числі й за участю молекул води розчину), протонуванням йоногенними групами найближчих амінокислотних залишків і, можливо, супроводжується перебудовами структури молекулярного комплексу РЦ. Із рис. 1 бачимо, що найбільший час у фотоактивованому стані електрон знаходиться на редокс-кофакторі Q<sub>b</sub>. У цьому разі димер бактеріохлорофіла залишається позитивно зарядженим, потенціальний рівень кінцевого акцептора (Q<sub>b</sub>) знижується, а рівень первинного акцептора (Q<sub>a</sub>) залишається сталим. Це спричинює вповільнення процесу інактивації електрона, оскільки його повернення з (Q<sub>b</sub>) на (P) відбувається через (Q<sub>a</sub>). Чим більше часу електрон знаходиться на (Q<sub>b</sub>), тим сильніше просідає його рівень і тим більше ускладнюється процес інактивації електрона, тим довше молекулярний комплекс РЦ знаходиться під дією внутрішньомолекулярного електростатичного поля.

### Матеріали та методика

Раніше [3] нами було показано, що за освітлення водного розчину молекулярного комплексу РЦ відбувається зменшення молекулярного об'єму комплексу РЦ на 20Å<sup>3</sup>, яке фіксували за зменшенням відстані між інтерференційними смугами, що збігалося з даними праць [4-6]. У цій роботі продовжили вивчення фотоіндукованих змін у молекулярному комплексі плівки РЦ методом голографічної інтерферометрії з використанням фототермопластичних реєструючих середовищ. Оптичну схему використаної установки ілюструє рис. 2.

Як об'єктами скористалися плівками завтовшки 0,3/0,5 мм, які складаються з білково-

пігментних комплексів РЦ, виділених з мембран клітин *Rhodobacter sphaeroides*. Плівки РЦ було отримано з водних розчинів 0,01 М Na-фосфатного буфера з рН 7,2, який містив 0,05 % детергенту. Концентрація молекул РЦ в розчині становила  $\sim 10^{-7}$  М. Розчин налили в циліндричну кювету об'ємом 4 см<sup>3</sup> і сушили при температурі 4 °С до повного висихання. Поверхня плівки не була дзеркальною. Підкладку з плівкою РЦ поміщали на голографічний стіл, витримували в темряві протягом 2 год і реєстрували голограму плівки РЦ. Після реєстрації голограми (час реєстрації голограми

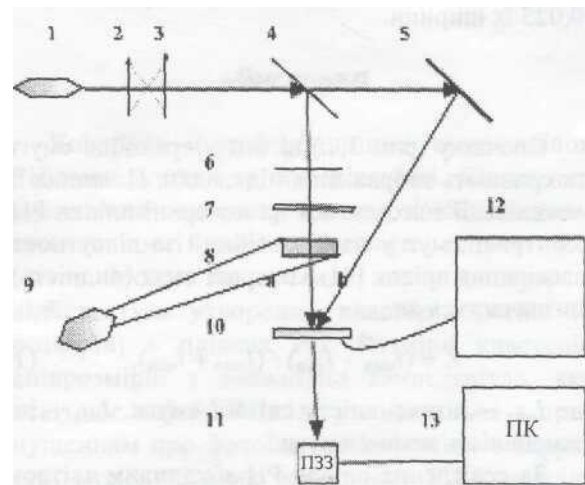
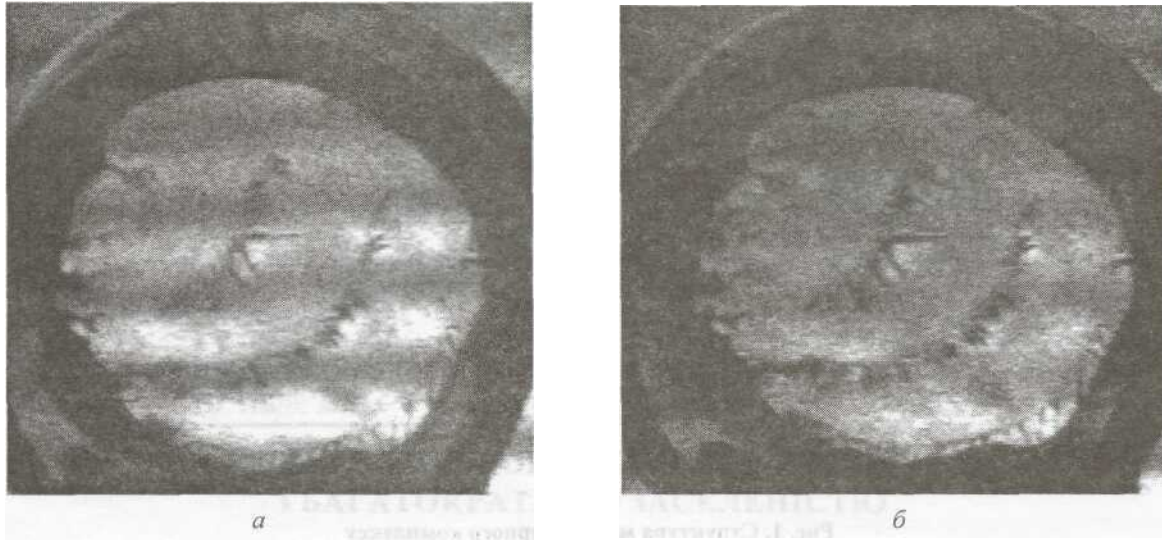


Рис. 2. Оптична схема:

1 - лазер ЛПІ-79-1; 2,3 - коліматор; 4 - напівпрозоре дзеркало; 5 - відбивне дзеркало; 6 - плоскопаралельна пластина; 7 - дифузний розсіювач; 8 - кювета; а - з буфером, б - з розчином РЦ; P - джерело світла, яке освітлює кювету; 10 - пластинка з фототермопластичним реєструвальним середовищем; // - ПЗЗ-камера; 12 - блок керування процесом реєстрації голограм; 13 - ПК



**Рис. 3. Типовий знімок інтерференційної картини:**  
***a* - темновий стан плівки РЦ; *б* - стан плівки РЦ після засвічення**

становив 1 с, інтенсивність об'єктного променя -  $0,5 \text{ мкВт/см}^2$ , опорного променя  $50 \text{ мкВт/см}^2$ ) вводили фазовий зсув у об'єктному промені, повертаючи пластину *б*. У площині підкладки з плівкою РЦ виникали інтерференційні смуги, які реєструвалися ПЗЗ-камерою з ПК. ПЗЗ-камеру було зфокусовано на поверхню плівки РЦ, її положення не змінювалося в процесі експериментів. Типовий знімок інтерференційної картини ілюструє рис. 3. Точність вимірювання положення інтерференційних смуг дорівнювала  $0,025$  їх ширини.

### Результати

Спочатку (рис. 3, *a*) ці інтерференційні смуги покривають зображення підкладки. Площина їх локалізації знаходилася на поверхні плівки РЦ. Контраст смуг у часі постійний за відсутності засвічення плівок РЦ. Контраст смуг (видність), визначається як

$$K = (I_{\max} - I_{\min}) / (I_{\max} + I_{\min}), \quad (1)$$

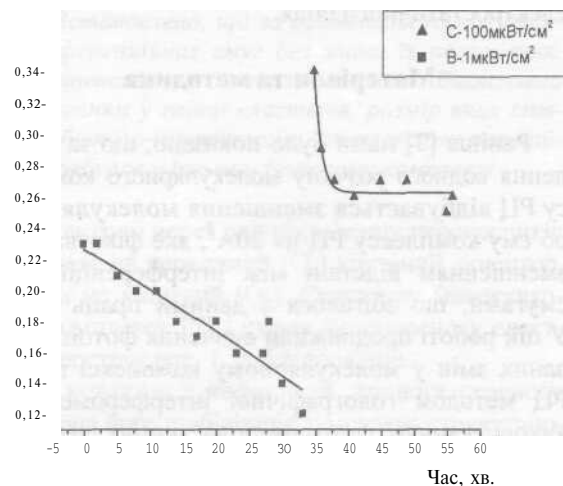
де  $I_{\max}$  - інтенсивність світлої смуги,  $I_{\min}$  - інтенсивність темної смуги.

За освітлення плівок РЦ збудивим світлом контраст інтерференційних смуг зменшувався без зміни відстані між смугами. Швидкість зміни контрасту залежала від інтенсивності освітлення РЦ. Зі збільшенням інтенсивності освітлення плівок РЦ швидкість зменшення контрасту інтерференційних смуг зростала. У цьому разі поляризація світла, яке пройшло крізь плівку РЦ, не змінюється. Також установлено, що після зменшення контрасту повторний запис голо-

грами плівки РЦ повертає контраст інтерференційних смуг до початкової величини. Повторне освітлення плівок РЦ знову зумовлює зменшення контрасту інтерференційних смуг. Результати типових експериментів ілюструє рис. 4. Спочатку плівка РЦ була засвічена світлом з інтенсивністю  $1 \text{ мкВт/см}^2$ , потім голограма плівки була перезаписана і плівка РЦ була знову засвічена світлом з інтенсивністю  $100 \text{ мкВт/см}^2$ .

### Обговорення результатів

Згідно з працею [7], розглянемо інтерференцію світла в деякій точці простору, в яку надходять світлові промені від точкового джерела та промені, розсіяні шорсткою поверхнею об'єкта



**Рис. 4. Плівки РЦ, засвічені світлом з різною інтенсивністю (у мкВт/см<sup>2</sup>)**

в недеформованому та деформованому станах. Вважаємо, що існують дві в середньому гладкі поверхні. Одна - недеформована поверхня  $A$ , на якій положення точок  $P$  задає радіус-вектор  $p$ . Реальна поверхня  $A^*$  з точками  $P^*$  має мікропрофіль, який хаотично відхиляється від середньої поверхні  $A$ . Таким чином, розглядаємо сукупність недеформованих поверхонь, які мають одне і те ж середнє положення, але різну мікроструктуру, і поряд із цим сукупність деформованих поверхонь, мікроструктура яких однакова з мікроструктурою недеформованих поверхонь. Описуючи проходження світла через плівку РЦ за допомогою випадкової комплексної функції  $S(p)$ , при цьому не враховуючи, що інтенсивність світла, яке пройшло, може бути різною для різних напрямків, і нехтуючи неоднорідністю профілю поверхні плівки, вважаємо, що дійсна та уявна частини функції  $G(p)$  є незалежними й мають нульові середні значення  $E$ , тобто

$$E[G(p)] = 0 \quad (2)$$

для будь-якої точки простору. Для малих зміщень об'єкта можна вважати, що світлові промені, які відповідають одній і тій самій матеріальній точці на недеформованій і деформованій поверхнях об'єкта, відрізняються тільки фазовим множником. Тоді величини, що характеризують стан деформованої поверхні, виявляються вираженими як функції величин, що характеризують стан недеформованої поверхні, яка є поверхнею порівняння. Повна комплексна амплітуда  $U(p)$  в точці  $K$  обумовлена суперпозицією амплітуд світлових полів, розсіяних недеформованою  $U(p)$  і деформованою  $U^*(p)$  поверхнями:

$$U_r(p) = U(p) + U^*(p). \quad (3)$$

Інтенсивність сумарного поля з урахуванням (2) дорівнює

$$J(p) = 1/2(E\{UU^*\} + E\{U^*U^*\} + E\{U^*U\} E\{U^*U^*\}), \quad (4)$$

$$J(p) = I + I^* + \Gamma + \Gamma^*. \quad (5)$$

Можна показати, що  $I = I^*$  та  $\Gamma = \Gamma^*$ :

$$\Gamma = 1/2E\{U^*U\} = |\Gamma| \exp[-2\pi i/\lambda D_K], \quad (6)$$

де  $D$  - фаза світлових променів деформованого стану об'єкта.

$$I_{\max} = 2(I + |\Gamma|), \quad I_{\min} = 2(I - |\Gamma|).$$

Контраст смуг дорівнює

$$K = |\Gamma|/I. \quad (7)$$

Таким чином, контраст смуг залежить від характеристик двох станів об'єкта, апертури системи спостереження та від положення  $p$  точки  $K$ , в якій спостерігаються смуги. Вважають, що смуги локалізовані в тих точках  $K$ , в яких контраст є максимальним.

Об'єктом слугували плівки РЦ завтовшки 0,3/0,5 мм. Інтерференційні смуги були локалізовані на поверхні об'єкта. У цьому разі напрямок вектора зміщення поверхні об'єкта збігається з напрямком спостереження об'єкта, а зміщення поверхні об'єкта є невеликим. Оскільки відстань між інтерференційними смугами не змінювалася, то середнє значення оптичної густини плівок РЦ за їх освітлення також не змінювалося, і зміну контрасту смуг, згідно з виразом (6), можна пояснити зміною мікропрофілю ( $D$ ) поверхні плівок РЦ. Крім того, слід відзначити, що такі особливості поведінки контрасту інтерференційної картини є типовими для спекл-інтерферометрії, коли контраст голографічних інтерферограм зростає за інтерференції двох світлових картин з нестационарними областями когерентності (коли змінюються з часом розміри областей когерентності об'єкта). Це також можна вважати непрямим підтвердженням припущення, що під час освітлення плівок РЦ в них відбувається кластеризація або помітна зміна розмірів кластерів, співрозмірних із довжиною хвилі світла.

## Висновки

Контраст інтерференційних смуг плівок РЦ зменшується за їх освітлення. Швидкість зменшення контрасту зростає зі збільшенням інтенсивності опромінюючого плівку РЦ світла. Можна припустити, що у цьому разі відбувається утворення кластерів (зміна їх розмірів) в плівках РЦ. Розміри кластерів співрозмірні з довжиною хвилі світла, яке освітлює плівки РЦ. Це узгоджується з припущенням про фотоіндуковані зміни в структурі молекулярного комплексу РЦ і можливою зміною міжмолекулярної взаємодії в досліджуваних зразках, наприклад, за рахунок зміни кута між зв'язками бактеріохлорофіл, бактеріофетин - первинним, вторинним хінонними акцепторами. Висока ймовірність такого процесу визначається значним часом перебування нерівноважного електрона на вторинному хінонному акцепторі.

- Рубин А. Б. Биофизика: В 2 т.- М.: Изд-во мое. ун-та, 2000.-Т. 2.-468 с.
- Шувалов В. А., Климов В. А. II Биофизика- 1987.- Т. 32- Вып. 5.-С. 814-829.
- Барабаш Ю. М., Заболотный М. А., Соколов Н. Я., Харкянен В. Н. II Исследование медленных фотоиндуцированных изменений в реакционных центрах Rb. Sphaeroides R-26 методом голографической интерферометрии // Там же.- 2002.- №6.- С. 152-160.
- 4 Malkin S., Churio M. S., Shochat S., Braslavsky S. E. II J. Photochem. Photobiol. B: Biology 23.-P. 79-85.- 1994.
5. Hou J. M., Boichenko V. A., Wang Y. C. et al. // Biochemistry.- 2001.-40.-P. 7109-7116.
6. Hou J. M., Boichenko V. A., Diner B. A., Mauzerall D. II Ibid- 2001.-40.- P. 7117-7125.
7. Schuman W., Dubax M. Holographic Interferometry Springer-Verlag.- Berlin; Heidelberg; New York, 1979- 189 p.

*Yu. Barabash, S. Hnedyuk, M. Zabolotny, M. Sokolov*

## **METHODS OF DIAGNOSTICS OF THE STRUCTURAL CHANGES IN MEMBRANE PROTEINS' FILMS**

*In this work the films of photosynthetic reaction centers Rb Sphaeroides drawn by the air-seasoning of the aqueous solutions of RCs at 4 °C were studied using the method of holographic interferometry. The films were 0.3-Ю.5 mm thick. It has been established that during the RC films' illumination the reduction of interference bands' contrast occurs without their location change. The rate of contrast reduction becomes higher with the increase of the films' illumination intensity. It has been supposed that this effect may be caused by the formation of clusters whose size is commensurable to the light's wavelength. This effect may be due to the change in protein-pigment RC complexes' interaction as a result of photoinduced structural rebuildings in the RC complex.*