



УДК 541.64 : 541.183.022 : 547.96

ПОЛИМЕРНЫЕ МОНОСЛОИ
С ИММОБИЛИЗОВАННЫМ БАКТЕРИОРОДОПСИНОМ

Зайцев С. Ю., Дзехцер С. В., Зубов В. П.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

В настоящее время мономолекулярные слои используются в качестве модельных систем при изучении конформационных превращений различных мембраноактивных соединений [1]. Цель настоящей работы состояла в формировании и исследовании монослоев светочувствительного мембранного белка — бактериородопсина, играющего ключевую роль в процессах фоторецепции [2] и являющегося перспективным биоматериалом для технического использования [3].

Известно, что бактериородопсин способен образовывать монослои на границе раздела фаз [4, 5]. Нами установлено, что характеристики монослоев бактериородопсина существенно зависят от концентрации солей в водной фазе и степени агрегации молекул белка в исходной суспензии. Как видно из рис. 1, значения площади (A_0), приходящейся на молекулу белка в слое, а также критической площади (A_K) и критического давления (p_K), при которых наступает коллапс монослоя, возрастают с увеличением времени предварительного диспергирования суспензии белка ультразвуком. Экспериментально полученные значения площади ($A_0 = 15 \text{ нм}^2$), приходящейся на молекулу белка с липидом в монослое (рис. 1), согласуются с литературными данными по структуре белка в мембране: согласно модели Хендерсона, геометрические размеры молекулы белка составляют $2,5 \times 3,5 \times 4,5 \text{ нм}$ [6], элементарная ячейка включает 3 молекулы белка и 12—14 молекул липидов [7].

Для дополнительного исследования полученные монослои были перенесены на кварцевые подложки при $\pi = 20\text{--}30 \text{ мН/м}$. В полученных таким образом ориентированных мультислоях белок сохранял свои спектральные характеристики (данные не приведены), что подтверждало нативность его структуры.

Методом малоуглового рентгеновского рассеяния [8] был установлен период повторяемости мультислойной структуры бактериородопсина, который составляет $4,74 \pm 0,04 \text{ нм}$ (результат получен сотрудниками Института кристаллографии АН СССР Ю. М. Львовым и В. В. Ерохиным на автоматическом малоугловом дифрактометре с линейным позиционно-чувствительным детектором, разработанным в Институте кристаллографии АН СССР [8]).

На основании вышеупомянутых данных можно полагать, что бактериородопсин в монослое, по-видимому, имеет ту же конформацию, как и в нативных мембранах, и что полученный монослой может рассматриваться как адекватная модель пурпурных мембран.

Ранее в ряде работ [7, 9, 10] высказывалось предположение, что воздействие света с длиной волны 570 нм, приводящее в нативных мембранах к фотохромным превращениям бактериородопсина, сопровождается его конформационными перестройками. Использование монослоев позволяет непосредственно регистрировать конформационные превращения мембраноактивных соединений по изменениям площади монослоя [11].

Мы изучили воздействие света с длиной волны 570 нм на монослой самого бактериородопсина и его производного, модифицированного акрилоилхлоридом по аминок группам лизина [12]. Как видно из рис. 2, без

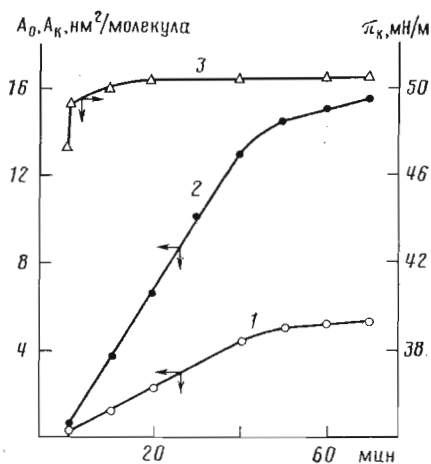


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость площади на молекулу бактериородопсина в монослое A_0 (2), критической площади A_K (1) и критического давления коллапса монослоя π_K (3) от времени предварительного озвучивания водной дисперсии белка

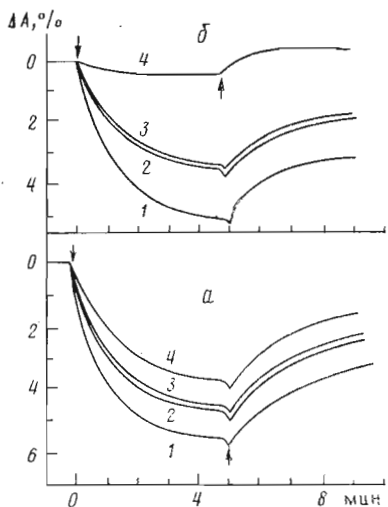


Рис. 2

Рис. 2. Кривые изменения площади монослоев (при $\pi = 20$ мН/м) от времени освещения (λ 570 нм) бактериородопсина (а) и модифицированного акрилоилхлоридом бактериородопсина (б) без липида (2, 3) и с липидоподобным мономером (1, 4); 1, 2 — исходные монослои, 3, 4 — монослои, предварительно облученные УФ-светом с λ 254 нм; стрелка вниз — начало освещения, вверх — конец освещения с λ 570 нм; водная фаза 0,5 М КСl. ΔA — изменение площади монослоя

освещения площадь монослоя белка при поверхностном давлении 20 мН/м не изменяется во времени. После начала облучения (стрелка \downarrow на рис. 2), площадь монослоя быстро уменьшается и достигает постоянного значения через 4—5 мин непрерывного облучения. Через 5 мин облучение прекратили (стрелка \uparrow на рис. 2), при этом площадь монослоя белка начинала медленно возвращаться к исходному значению. Во избежание разогрева водной фазы и монослоя при облучении проводили термостатирование кюветы и использовали водяной фильтр и светофильтр ЖС-18, поглощающий излучение с длиной волны менее 500 нм. Необходимо отметить, что при использовании светофильтра СС-4, поглощающего при 500—700 нм, т. е. в области светочувствительности бактериородопсина, изменения в площади монослоя при освещении не наблюдаются. Поэтому изменения площади монослоя, показанные на рис. 2, по-видимому, связаны с конформационными изменениями белка при его переходе из исходного состояния в возбужденное и обратно.

Для формирования полимерных монослоев с иммобилизованным бактериородопсином в качестве липидоподобного мономера был использован способный к полимеризации N-акрилоилфосфатидилэтанолламин, ранее синтезированный нами из яичного фосфатидилэтанолламина [13]. Смешанные монослои бактериородопсина и модифицированного акрилоилхлоридом бактериородопсина с липидоподобным мономером (рис. 2, 1) претерпевают даже несколько большие обратимые изменения площади при фотоактивации, чем монослои самих белков. Этот эффект, вероятно, можно объяснить менее плотной упаковкой белка и его большей подвижностью в липидном слое. Как видно из рис. 2, 3, УФ-облучение (λ 254 нм) не сказывается на конформационной подвижности бактериородопсина и его модифицированного аналога в монослое.

Далее мы нашли, что полимеризация смешанных монослоев бактериородопсина с N-акрилоилфосфатидилэтанолламином при УФ-облучении (λ 254 нм) не приводит к существенным изменениям ΔA (рис. 2а, 4). По-видимому, иммобилизация белка в матрице из линейного липидоподобного полимера лишь незначительно ограничивает его конформационную по-

движность. В то же время совместная полимеризация N-акрилоилфосфатидилэтанолamina с белком, содержащим полимеризующие группы, в монослое приводит к уменьшению ΔA более чем в 10 раз (рис. 2б, 4). Таким образом, ковалентная иммобилизация бактериородопсина с образованием спитого белок-липидного полимерного слоя приводит к значительному ограничению его конформационной подвижности. Предварительные опыты показали, что сополимеризацией N-акрилоилфосфатидилэтанолamina с модифицированным бактериородопсином в монослое при фотоактивации, т. е. в возбужденном состоянии фоточикла, удастся на порядок уменьшить величину ΔA и тем самым увеличить время жизни промежуточного состояния фотохромного цикла белка.

Полученные в настоящей работе полимерные монослои, содержащие иммобилизованный бактериородопсин, дают возможность зафиксировать промежуточное состояние фотохромного цикла белка, что может иметь значение не только для исследований молекулярных механизмов процессов фоторецепции, но и при создании на основе бактериородопсина биосенсорных устройств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fendler J. H. *Membrane Mimetic Chemistry*. N. Y.: Wiley-Interscience, 1982. 522 p.
2. Ovchinnikov Yu. A. // *Biopolymers*. 1985. V. 24. № 1. P. 157—166.
3. Hong F. T. // *Biosystems*. 1986. V. 19. № 3. P. 223—236.
4. Hwang S.-B., Korenbrot J. J., Stoerkenius W. // *J. Membrane Biol.* 1977. V. 36. № 2. P. 115—135.
5. Войццкий В. М., Драчев Л. А., Каулен А. Д., Скулачев В. П. // *Биоорг. химия*. 1979. Т. 5. № 8. С. 1184—1195.
6. Henderson R., Unwin P. N. T. // *Nature*. 1975. V. 257. № 5523. P. 28—31.
7. Stoerkenius W., Lozier R. H., Bogomolni R. A. // *Biochim. et biophys. acta*. 1979. V. 505. № 3140. P. 245—278.
8. Львов Ю. М., Фейгин Л. А. // *Кристаллография*. 1987. Т. 32. Вып. 3. С. 800—845.
9. Ahl P. L., Cone R. A. // *Biophys. J.* 1984. V. 45. № 6. P. 1039—1049.
10. Packer L., Hrabeta E., Abdulaev N. G., Robinson A. E., Kiselev A. V., Taneva S. G., Tolh-Boconadi R., Keszthelyi L. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1987. V. 145. № 3. P. 1164—1170.
11. Зайцев С. Ю., Луценко В. В., Зубов В. П. // *Биоорг. химия*. 1983. Т. 9. № 4. С. 567—569.
12. Зайцев С. Ю. Создание, исследование и применение полимерных ориентированных мембран на основе поверхностно-активных мономеров: Дис. ... канд. хим. наук. М.: ИБХ АН СССР, 1986.
13. Зайцев С. Ю., Звонкова Е. Н., Зубов В. П. // *Биоорг. химия*. 1986. Т. 12. № 12. С. 1675—1677.

Поступило в редакцию
22.XII.1987

POLYMER MONOLAYERS WITH IMMOBILIZED BACTERIORHODOPSIN

ZAITSEV S. Yu., DZEKHTSER S. V., ZUBOV V. P.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Monolayers of the membrane photosensitive protein, bacteriorhodopsin, have been prepared and investigated. The protein is able to reversably change areas of monolayers in the course of photoactivation. Chemical immobilization of bacteriorhodopsin in the polymer lipid layer allows limit the protein's conformational mobility in the excited state of photocycle, which is important for study of molecular mechanisms of photoreception and design of biosensor devices.