

## Задача №13

### **Применение методов стационарной и импульсной лазерной дифференциальной спектроскопии для изучения спектрально-кинетических свойств фоточувствительных белков (на примере бактериородопсина).**

*Цель задачи:* освоение методов стационарной абсорбционной и кинетической дифференциальной спектрофотометрии и приобретение практических навыков. Получение разностных спектров поглощения, измерение кинетики лазер-индуцированных изменений поглощения в широком диапазоне температур и ее экспоненциальная аппроксимация. Построение зависимости константы скорости процесса от температуры в координатах Аррениуса. Вычисление энергии активации  $E_a$ . Освоение пакета программ ORIGIN для обработки полученных данных.

*Приборная база:* спектрофотометр Hitachi-557 (190-900 нм), а также сконструированная на кафедре установка флеш-фотолиза с лазерным возбуждением (Nd-YAG, 532 нм, 8 нс, 10 мДж) и временным разрешением порядка 0,1 мкс.

*Объект:* мембранные препараты с бактериородопсином дикого типа галофильных бактерий *Halobacterium salinarium*.

## Описание метода импульсной дифференциальной спектроскопии (флеш-фотолиз)

Принцип действия сконструированной в лаборатории установки заключается в следующем. Свет от измерительной лампы диспергируется монохроматором, проходит через образец и второй монохроматор, а затем попадает на фотокатод фотоэлектронного умножителя, что вызывает появление постоянного напряжения  $U_n$  на его сопротивлении нагрузки  $R_n$ . Под действием возбуждающей короткой вспышки света происходит регистрация изменения величины  $U_n$  на выбранной длине волны наблюдения. Если действие возбуждающего света приводит к увеличению поглощения образца, то интенсивность прошедшего зондирующего света уменьшается, если к уменьшению поглощения – то увеличивается. В методе дифференциальной импульсной спектроскопии на сопротивление нагрузки от внешнего источника подается опорное постоянное напряжение  $U_0$  обратной по отношению  $U_n$  полярности, а интенсивность зондирующего света и напряжение на динодах ФЭУ подбираются такими, чтобы эти величины были равными. В этом случае выходная разность напряжения будет равна нулю, а ее изменение  $\Delta U$  будет пропорционально изменению поглощения образца  $\Delta D$ . Сканирование по длине волны зондирующего света позволяет по точкам построить дифференциальный спектр изменений поглощения под действием возбуждающего света, а кинетика изменения  $\Delta U$  во времени после вспышки дает информацию о закономерностях образования и распада промежуточных состояний вещества.

Всю установку можно разделить на оптическую систему, систему фотовозбуждения и систему регистрации.

### 1. Оптическая система

Свет от измерительной лампы OSRAM-100 (галогенная, 12 В, 100 Вт) диспергируется монохроматором на дифракционной решетке (600 штрихов/мм, дисперсия 3 нм/мм, светосила 1:2,5). После монохроматора световой поток определенной длины волны фокусируется линзой на термостатируемую кювету с исследуемым образцом и, пройдя через второй монохроматор с той же длиной волны, попадает на фотокатод ФЭУ. Фотовозбуждение объекта производится однократными короткими вспышками света Nd-YAG лазера «LS-2131M» (длина волны 532 нм, длительность вспышки 8 нс, энергия вспышки 10 мДж, LOTIS ТП, Minsk, Belarus), расположенного под углом  $90^\circ$  к прошедшему свету.

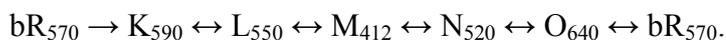
### 2. Система регистрации

В качестве приемника измерительного света в установке используется фотоэлектронный умножитель 9658B Electron Tubes Ltd. (UK), имеющий максимальную спектральную чувствительность в области 350-450 нм. На сопротивление нагрузки  $R_n$  в 10 ком от источника стабилизированного напряжения подается опорное напряжение 2 В.

Скомпенсированный сигнал поступает или непосредственно на вход аналого-цифрового преобразователя (АЦП) DL 912 (2 канала по 4096 точек, 8 бит, частота преобразования 20 МГц, «Datalab», England). Через интерфейс RS-232 сигнал затем подается в персональный компьютер. Для улучшения соотношения сигнал/шум обычно проводится накопление и усреднение нескольких одиночных кинетических кривых. Кинетическая кривая анализируется в мультиэкспоненциальном приближении по алгоритму Маркуарта непосредственно программой управления установкой флеш-фотолиза или же данные переводятся в ASCII формат, а затем проводится их анализ с помощью программы ORIGIN. Например, для аппроксимации кинетической кривой в виде суммы двух экспонент для процесса образования продукта и суммы двух экспонент для процесса его распада вводится формула  $A(t) = -A_1 \cdot \exp(-t/\tau_1) - A_2 \cdot \exp(-t/\tau_2) + B_1 \cdot \exp(-t/\tau_3) + B_2 \cdot \exp(-t/\tau_4) + C$ , где  $A_1, A_2, B_1, B_2$  – амплитуды соответствующих компонентов образования и распада,  $\tau_1, \tau_2, \tau_3, \tau_4$  – их характеристические времена, а  $C$  – уровень сигнала, к которому возвращается поглощение образца после вспышки (в дифференциальной моде должно быть близко к 0).

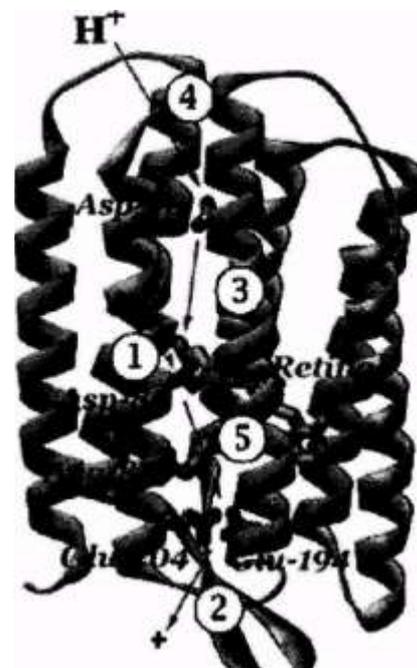
**Объект исследования:** Бактериородопсин (БР)- светочувствительный белок, содержащий ретиналь в качестве хромофора и локализованный в цитоплазматической мембране бактерий *Halobacterium salinarium*. Белок представляет собой полипептидную цепь из 248 аминокислот, формирующих 7 трансмембранных  $\alpha$ -спиралей. Хромофор соединяется с  $\epsilon$ -аминогруппой Lys216 апопротеина через протонированную амидную связь (Шиффово основание).

**Фотоцикл бактериородопсина.** Поглощение света бактериородопсином запускает фотоцикла со следующими интермедиатами:



Инициацией процесса является изомеризация ретиналя из *all-trans* в *13-cis* / *15-anti* состояние на стадии  $bR_{570} \rightarrow K_{590}$ .

Возникающие при этом конформационные изменения белковой части молекулы отражаются на  $pK_a$  ключевых групп, участвующих в переносе протона. Первичные процессы перехода в возбужденное состояние и изомеризации хромофора происходят за времена порядка 5 пс. На стадии  $L_{550} \rightarrow M_{412}$  происходит перенос протона на первичный акцептор Asp85. Ионная пара Шиффово

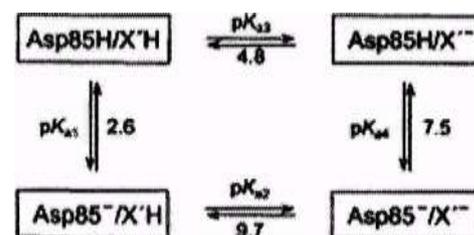


основание/Asp85 стабилизируется молекулой воды “402”, расположенной между ними, и молекулой воды “401”, взаимодействующей с карбоксилем Asp85.

Конформационные изменения белковой структуры приводят к разрыву водородных связей, стабилизирующих эту ионную пару с изначально низкой  $pK_a$  акцептора протонов Asp85 (около 2) и высокой  $pK_a$  Шиффова основания (около 13). Результатом является снижение значения  $pK_a$  основания Шиффа примерно на 5 единиц до 7 и повышение  $pK_a$  Asp85 до 7.5.

Одновременно с этими событиями происходит выделение протона на внешней стороне мембраны.

Группа, выделяющая протон во внешнюю среду представляет собой целый комплекс, содержащий Glu194, Glu204, связанную воду и Arg82. Выделение протона



происходит почти одновременно с образованием  $M_{412}$  интермедиата с характерным временем около 80 мкс. Величина  $pK_a$  протон выделяющего комплекса (ПВК) БР дикого типа в начальном состоянии равна 9 и во время протонирования Asp85 понижается до 5,8. Совпадение изменения значений  $pK_a$  для Asp85 и ПВК в начальном состоянии и в  $M_{412}$  интермедиате позволило предположить наличие связи между протонированием первого и депротонированием второго. Протонирование Asp85 облегчает депротонирование протон выделяющей группы. С другой стороны депротонирование этой группы повышает  $pK_a$  Asp85 и способствует депротонированию Шиффова основания. Считают, что повышение  $pK_a$  Asp85 связано с движением положительно заряженного Arg82 в сторону ПВК и изменением баланса водородных связей Arg82 с соседними аминокислотными остатками и молекулами воды.

Изучение кинетики образования и распада ключевого интермедиата фотоцикла БР дикого типа и его мутантов позволило предположить существование по крайней мере двух состояний  $M_1 \leftrightarrow M_2$ . Равновесие между ними сильно сдвинуто в сторону образования  $M_2$  (отношение констант прямой и обратной реакции порядка 200 при pH=7), так что фактически эта часть фотоцикла содержит необратимую реакцию, определяющую направленность процесса:  $M_1 \rightarrow M_2$ . На стадии  $L \leftrightarrow M_1$  происходит протонирование Asp85 с последующим выделением протона наружу на этапе  $M_1 \rightarrow M_2$ . По некоторым данным состояние  $M_1$  бактериородопсина соответствует форме с «закрытым» цитоплазматическим (донорным) полу-каналом. Затем, за счет смещения  $\alpha$ -столбов донорный участок канала открывается от внешней водной среды до основания Шиффа. Это состояние соответствует «открытой»  $M_2$  форме.

Следующим событием фотоцикла является репротонирование Шиффова основания за счет внутреннего переноса протона с Asp96. Это происходит во время  $M_2 \rightarrow N$  перехода

за 2-3 мс. В основном состоянии  $pK_a$  Asp96 очень велико, около 11. Во время  $M_2 \rightarrow N$  перехода устанавливается связь между основанием Шиффа и Asp96 и уменьшается сродство Asp96 к протону ( $pK_a$  падает до 7,2). В результате происходит репротонирование Шиффова основания.

Как было показано, на этапе образования  $M_2$  интермедиата в цитоплазматическом сегменте канала появляются мобильные молекулы воды, которые участвуют в переносе протона между Asp96 и основанием Шиффа. Образование N интермедиата сопровождается конформационными изменениями в белке.

Рентгеноструктурное изучение бактериородопсина показало смещение цитоплазматической части спирали к наружной части мембраны. Вероятно, это и является главной причиной для открытия цитоплазматического канала, а увеличение гидратации внутри него изменяет сродство Asp96 к протону.

Следующим этапом фотоцикла является репротонирование Asp96 с цитоплазматической поверхности за 5-10 мс. Поглощение протона из среды сопровождается реизомеризацией хромофора из *13-cis* конфигурации в N интермедиате в *all-trans* конфигурацию в O интермедиате.

Последней стадией является депротонирование Asp85 и возвращение белка в начальное состояние при переходе  $O \rightarrow bR$ . Протон переносится с Asp85 на ПВК за ~3 мс. Считается, что депротонирование Asp85 сопровождается обратным смещением Arg82 и происходит восстановление ионной пары Шиффова основание/Asp85. Конкретный путь переноса протона от Asp85 до ПВК не полностью известен, но предположительно это цепочка водородных связей, связывающих с помощью молекул воды Asp85, Asp212, Tyr57, Arg82, Glu194-Glu204. Мутации по всем этим аминокислотам сильно снижают скорость перехода.  $O \rightarrow bR$  и приводят к накоплению O интермедиата.

### ***Задание1***

В темноадаптированном состоянии БР находится в *13-cis* (форма не способна к трансмембранному переносу протона) и *all-trans* состоянии в соотношении 0,6:0,4. Под действием постоянного света ( $\lambda > 540$  нм) БР переходит полностью в *all-trans* конформацию, которая собственно и является светозависимым протонным насосом. Поскольку это состояние имеет более длинноволновое поглощение и больший коэффициент молярной экстинкции, переход из «темноадаптированного» в «светоадаптированное» состояние БР сопровождается увеличением поглощения и смещением спектра в область длинных волн.

**Выполнить:**

(а) на спектрофотометре Hitachi-557 записать спектр поглощения «темноадаптированного» БР.

(б) Осветить образец желтым светом в течение 2-3 минут и записать спектр поглощения «светоадаптированной» формы. (в) Получить разностный спектр, характеризующий этот переход

**Задание 2**

Важная информация о физических механизмах трансформации световой энергии в природных фоточувствительных белках может быть получена из наблюдения за температурным изменением кинетических параметров отдельных реакций, индуцированных короткой вспышкой света. Обычно скорость химической реакции при повышении температуры увеличивается. Аррениусом была предложена эмпирическая формула, описывающая зависимость константы скорости реакции от температуры:

$$k = A * e^{-E_a/RT},$$

где  $A$  – так называемый предэкспоненциальный или вероятностный фактор,  $E_a$  – энергия активации,  $R$  – молярная газовая постоянная (8,3145 Дж/моль град),  $T$  – абсолютная температура.

Уравнение Аррениуса можно записать в виде:  $\ln k = -E_a/RT + \ln A$

В этом виде оно очень удобно для графического выражения данных. Если вдоль оси ординат откладывать  $\ln k$ , а вдоль оси абсцисс  $1/T$ , то наклон кривой будет равен  $-E_a/R$ . Аппроксимируя зависимость линейной функцией типа  $y = B * x + A$ , получаем коэффициент  $B$ . Тогда энергия активации  $E_a$  будет равна  $(-B) * R$  (в Дж/мол в случае по оси абсцисс  $1/T$ , или в кДж/мол в случае откладывания по оси абсцисс  $1000/T$ , что обычно делается).

Оригинальный подход к теории скоростей реакций предложил в 1935 г. Эйринг.

Разработанная им теория носит название теории переходного состояния, так как в ней в качестве основного процесса рассматривается распад активированного комплекса на вершине энергетического барьера. В ней учитывается термодинамическое соотношение между константой скорости и изменением свободной энергии. Эйринг постулировал, что измеряемая константа скорости процесса  $k$  связана с константой равновесия с участием активированного комплекса  $K^\ddagger$  соотношением:

$$k = K^\ddagger * (k_b T/h), \quad (1)$$

где  $k_b$  – константа Больцмана ( $1,38054 * 10^{-23}$  Дж/моль град),  $T$  – абсолютная температура,  $h$  – постоянная Планка ( $6,6256 * 10^{-34}$  Дж с)

Стандартное изменение свободной энергии  $\Delta G$  для химической реакции с константой  $K$  выражают уравнением  $\Delta G = -RT \ln K$ . Изменение свободной энергии для процесса активации  $\Delta G^\ddagger$ , будет иметь вид:

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln K^\ddagger \quad (2)$$

Связь между изменениями свободной энергии, энтальпии и энтропии для процесса активации при постоянной температуре выражается уравнением:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (3)$$

Эти величины носят название соответственно свободной энергии активации, энтальпии активации и энтропии активации. Энтальпия активации  $\Delta H^\ddagger$  связана с  $E_a$  следующим соотношением:  $E_a = \Delta H^\ddagger + RT$ .

Объединение уравнений (1), (2) и (3) дает выражение:

$$\ln k - \ln (kT/h) = \Delta S^\ddagger/R - \Delta H^\ddagger/RT$$

Откладывая по оси ординат  $\ln k - \ln (kT/h)$ , по оси абсцисс  $1000/T$ , и аппроксимируя полученную зависимость линейной функцией  $y = B \cdot x + A$  получаем коэффициенты  $B$  и  $A$ , которые используются для вычислений:  $\Delta H^\ddagger = (-B) \cdot R$  (кДж/моль) и  $\Delta S^\ddagger = A \cdot R$  (Дж/моль)

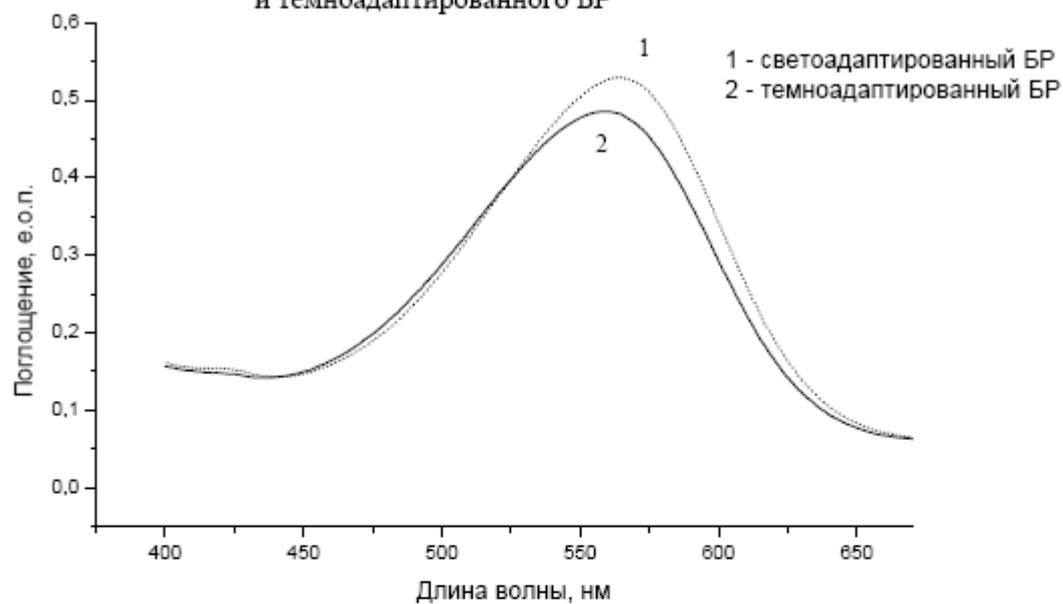
### **Выполнить:**

- (а) В интервале температур от +5 до +50° с шагом ~5 градусов на длине волны 410 нм (в максимуме поглощения М-продукта фотоцикла БР) провести измерение индуцированных одиночной вспышкой света изменений поглощения.
- (б) Провести аппроксимацию кинетических кривых распада изменений поглощения в рамках двухэкспоненциальной модели.
- (в) Для двух констант скорости распада М-продукта построить зависимость Аррениуса (зависимость  $\ln k$  от  $1000/T$ ). Получить значение  $E_a$ .

### **Рекомендованная литература:**

1. Современные методы биофизических исследований. Практикум по биофизике. (под ред. А.Б. Рубина), Москва, «Высшая школа», 1988
2. В. Уильямс, Х. Уильямс, Физическая химия для биологов, Москва, «Мир», 1976
3. Я. Лани, Биохимия, 2001, т. 66, с. 1477-1482
4. S. P. Balashov, Biochimica et Biophysica Acta, 2000, v. 1460, p. 75-94

### Спектры поглощения светоадаптированного и темноадаптированного БР



### Разностный спектр поглощения "светоадаптированный минус темноадаптированный БР"

