

4. Киселев В.Ф., Козлов С.Н., Зотеев А.В. Основы физики поверхности твердого тела. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1999.
5. Jafry Y., Sumner T.J. // *Class. Quantum Grav.* 1997. **44**. P. 1567.
6. Электреты / Под ред. Г. Сесслера. М.: Мир, 1983.
7. Астров Д.Н., Ермаков Н.Б., Коростин С.В. // *Письма в ЖЭТФ*. 1998. **67**, № 1. С. 15.

8. Yves Martin, David W. Abraham, H. Kumar Wickramasingh // *Appl. Phys. Lett.* 1988. **52**, No. 13. P. 1103.
9. Harris L. B., Fiasson J. // *J. Phys. E: Sci. Instrum.* 1984. **17**. P. 788.

Поступила в редакцию  
30.03.01

## ОПТИКА И СПЕКТРОСКОПИЯ

УДК 543. 424

### КР-СПЕКТРОСКОПИЯ ВОДНОГО РАСТВОРА АГГЛЮТИНИНА РИЦИНА В ПРИСУТСТВИИ ХЛОРИДА ГУАНИДИНА

Н. Н. Брандт, О. В. Воронина, Ю. А. Савочкина<sup>\*)</sup>, А. И. Сотников,  
А. Г. Тоневицкий<sup>\*\*)</sup>, А.Ю. Чикишев

(кафедра общей физики и волновых процессов)

E-mail: ach@lasmed.ilc.msu.su

**Частичная денатурация рибосоминактивирующего белка агглютинина рицина под действием хлорида гуанидина (модель взаимодействия с клеточной мембраной) приводит к перестройке его вторичной структуры, проявляющейся в изменениях полос амид III и, предположительно, амид VII. Конформационно-чувствительные полосы, соответствующие колебаниям триптофана и дисульфидных мостиков, изменений не претерпевают.**

#### Введение

КР-спектроскопия — один из сравнительно немногих экспериментальных методов, позволяющих проводить исследования структуры и конформационной динамики биомолекул в нативной (обычно водной) среде. В КР-спектрах белков можно выделить ряд спектральных полос, анализ которых позволяет определять конформацию различных аминокислотных остатков, дисульфидных мостиков, а также вторичную структуру молекул [1]. Так, анализируя полосу амид III, которая отвечает колебаниям пептидных связей, можно определить содержание  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -структуры и неупорядоченной структуры в молекуле белка. Анализ линий, отвечающих валентным колебаниям S-S, позволяет определять конформацию дисульфидных мостиков. Ранее было показано, что КР-спектроскопия позволяет получить информацию об изменениях структуры ферментов при лигандировании и неспецифических взаимодействиях [2, 3].

Любая молекула белка-фермента выполняет определенную функцию. В частности, функция рибосоминактивирующих белков, используемых для создания иммунотоксинов, заключается в инактивации белоксинтезирующей системы клетки-мишени [4]. Для выполнения своей функции ферменту необходимо проникнуть в цитоплазму клетки через

мембрану. Это возможно только в том случае, если молекула белка имеет определенную конформацию. Так, молекулы рибосоминактивирующих белков второго типа состоят из активной (А) и связывающей (В) субъединиц. В-цепь содержит область, отвечающую за связывание с клеточными рецепторами и проникновение токсина в цитоплазму, а субъединица А обладает ферментативными свойствами [5]. Молекула агглютинина рицина состоит из четырех субъединиц. Две А- и две В-субъединицы соединены тремя дисульфидными связями, так что схематически молекула агглютинина рицина может быть представлена в виде В-А-А-В [6].

Внутриклеточная среда сильно отличается от водной. Известно, что белок в результате проникновения его через мембрану внутрь клетки частично денатурируется [7, 8]. В настоящей работе в качестве денатурирующего агента был выбран хлорид гуанидина (ХГ).

Целью настоящей работы является сравнение конформационных особенностей агглютинина рицина в нативной среде и в среде, моделирующей клеточную мембрану. Полученная таким образом информация может быть использована для выяснения механизмов переноса токсинов через мембрану клетки и создания новых иммунотоксинов, специфически воздействующих на определенные виды клеток.

<sup>\*)</sup> Государственный научный центр «ГНИИгенетика».

<sup>\*\*)</sup> НИИ трансплантологии и искусственных органов.

## 1. Экспериментальная установка и образцы

В качестве источника возбуждения КР-спектров был использован аргоновый лазер фирмы Spectra-Physics с длиной волны 488 нм. Для подавления слабого паразитного излучения лазерной плазмы лазерный луч направлялся через интерференционный фильтр с полосой пропускания 2 нм и затем фокусировался на исследуемый образец. Мощность лазерного излучения составляла 300 мВт. Рассеянный свет после голографического фильтра, обеспечивающего подавление возбужденного излучения на четыре порядка, фокусировался на щели полихроматора. Сигнал регистрировался при помощи многоканального детектора LN/CCD-512TK/S фирмы Princeton Instruments. С детектора сигнал поступал на контроллер ST-130 фирмы Princeton Instruments, а затем на ЭВМ, где обрабатывался с помощью программного обеспечения WinSpec. Спектральное разрешение составляло  $5 \text{ см}^{-1}$ . Измерения КР-спектров проводились в диапазоне  $440 \div 1450 \text{ см}^{-1}$ .

Агглютинин рицина был получен из семян клещевины (*Ricinus communis*) и очищен, как описано в работе [2]. Затем была проведена гель-фильтрация образца на колонке PD10 в фосфатном буфере при pH 7.5 с добавлением 0.02%  $\text{NaN}_3$ . После этого концентрация белка повышалась приблизительно до 16 мг/мл. Концентрации ХГ и агглютинина рицина составляли 1 М и 0.18 мМ соответственно. При выбранной концентрации ХГ происходит лишь частичная денатурация белка: эксперименты по тушению собственной триптофановой флуоресценции показали, что квантовый выход флуоресценции рицина и его субъединиц падает не более чем на 5% при увеличении концентрации ХГ на 1 М [9]. Такая ситуация может соответствовать частичной денатурации белка и в клеточной мембране.

Время измерения одного спектра составляло 5 ч. Спектры, полученные в течение первого и последнего часа, совпадали друг с другом, что доказывает отсутствие разрушающего воздействия лазерного излучения на образцы. Все спектры были нормированы на мощность лазерного излучения, время накопления соответствующего спектра и концентрацию агглютинина рицина.

## 2. Результаты

Были измерены КР-спектры ХГ, водных растворов агглютинина рицина и агглютинина рицина в присутствии ХГ.

КР-спектр водного раствора агглютинина рицина в диапазоне  $400 \div 1400 \text{ см}^{-1}$  (рис. 1) содержит ряд конформационно-чувствительных полос (помечены звездочками). Это линии дисульфидных мостиков, полосы амид III и амид VII, а также линии триптофана.

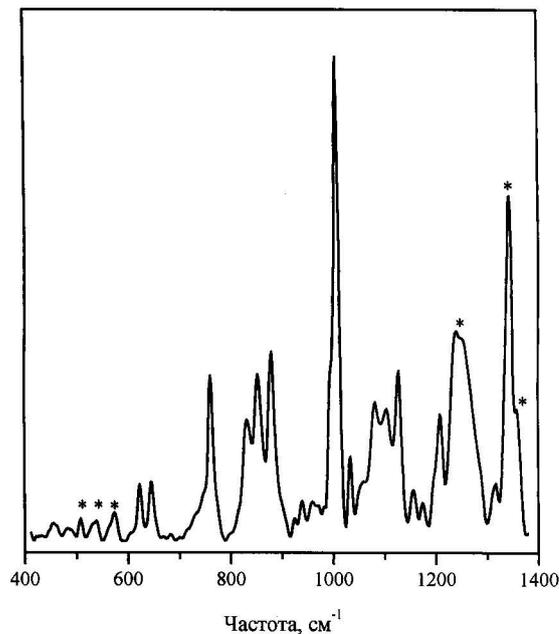


Рис. 1. КР-спектр водного раствора агглютинина рицина

КР-спектр агглютинина рицина и его аппроксимация четырьмя гауссовыми составляющими представлены на рис. 2. Частоты и ширины составляющих оказались равными  $507, 536, 573, 621 \text{ см}^{-1}$  и  $9, 9, 11, 8 \text{ см}^{-1}$  соответственно.

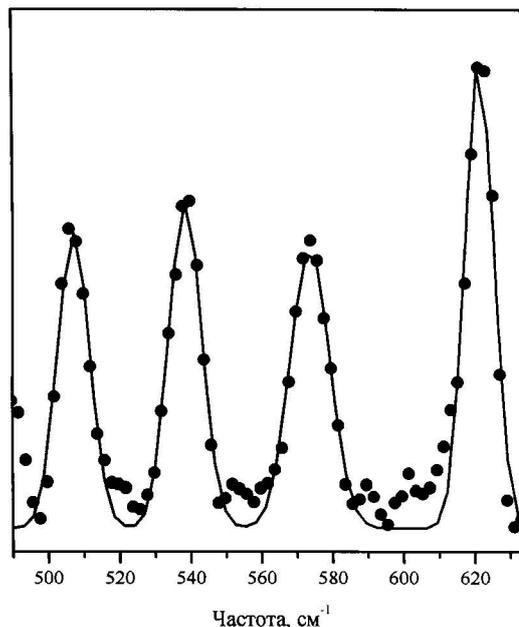


Рис. 2. КР-спектр водного раствора агглютинина рицина (точки) и его аппроксимация четырьмя гауссовыми составляющими (сплошная линия)

В спектре агглютинина рицина в присутствии ХГ почти незаметны колебательные линии фермента на фоне интенсивной полосы ХГ с максимумом на частоте  $532 \text{ см}^{-1}$  и шириной около  $50 \text{ см}^{-1}$ . Этот спектр аппроксимировался суммой спектральных составляющих, полученных при аппроксимации чистого ХГ и чистого белка. Частоты и полуширины компонент фиксировались, варьировались только

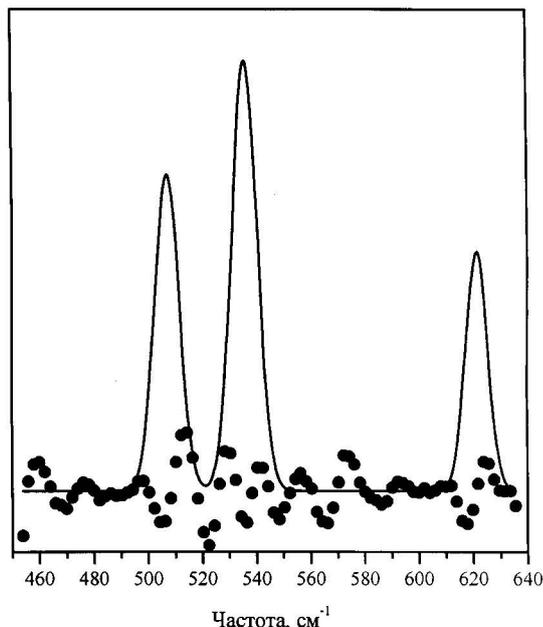


Рис. 3. Аппроксимация спектра агглютинина рицина в присутствии хлорида гуанидина набором гауссовых кривых (кривая). Разность КР-спектра агглютинина рицина в присутствии хлорида гуанидина и его аппроксимации (точки)

амплитуды. Аппроксимирующие полосы, соответствующие «белковому» вкладу в суммарный спектр, показаны на рис. 3 сплошной линией. Точками представлена разность КР-спектра водного раствора агглютинина рицина в присутствии ХГ и его аппроксимации суммой спектральных составляющих.

В диапазоне  $1220 \div 1300 \text{ см}^{-1}$  в спектре чистого агглютинина рицина интенсивность низкочастотных компонент выше, чем интенсивность высокочастотных. После взаимодействия с ХГ интенсивность низкочастотных компонент уменьшилась, а высокочастотных — возросла (рис. 4).

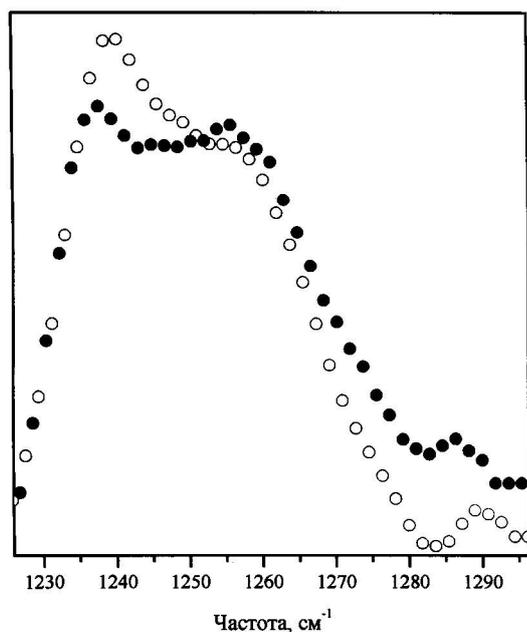


Рис. 4. КР-спектры чистого агглютинина рицина (светлые точки) и агглютинина рицина в присутствии хлорида гуанидина (темные точки)

В спектрах агглютинина рицина в присутствии и в отсутствие ХГ в спектральном диапазоне  $1280 \div 1450 \text{ см}^{-1}$  присутствует интенсивная линия на частоте  $1340 \text{ см}^{-1}$  с плечом на частоте  $1360 \text{ см}^{-1}$  (рис. 5). Амплитуда и форма этой линии в обоих случаях практически одна и та же.

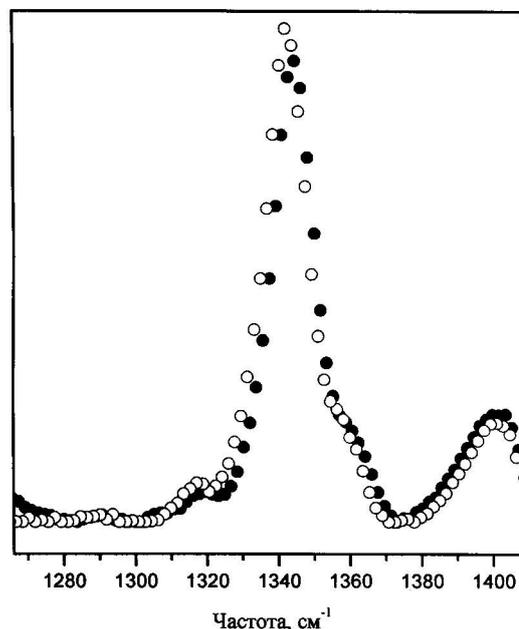


Рис. 5. КР-спектр водного раствора агглютинина рицина в присутствии (светлые точки) и в отсутствие (темные точки) хлорида гуанидина

### 3. Обсуждение

Известно, что в КР-спектрах белков линии на частотах  $510, 525$  и  $540 \text{ см}^{-1}$  отвечают колебаниям дисульфидных мостиков [1, 10], имеющих *гош-гош-гош*, *гош-гош-транс* и *транс-гош-транс* конформации соответственно. Ранее было показано, что в молекулах агглютинина рицина, находящихся в водном растворе, присутствуют все три вида конформации дисульфидных мостиков, им соответствуют полосы на частотах  $507, 532$  и  $540 \text{ см}^{-1}$  [3, 11]. Поскольку частоты последних двух линий близки, для упрощения аппроксимации вместо них была использована одна линия на частоте  $536 \text{ см}^{-1}$ . Аппроксимация спектра агглютинина рицина в присутствии ХГ показывает, что количество и форма спектральных компонент в диапазоне полос дисульфидных мостиков такие же, как в спектре чистого агглютинина рицина. Этот факт свидетельствует о том, что после взаимодействия с ХГ конформация дисульфидных мостиков практически не изменилась.

Линия на частоте  $621 \text{ см}^{-1}$  в спектре агглютинина рицина соответствует колебаниям фенилаланина [12]. Как известно, линия фенилаланина на частоте  $1005 \text{ см}^{-1}$  нечувствительна к изменениям структуры белка. Поскольку интенсивность линии на частоте  $621 \text{ см}^{-1}$  в спектре агглютинина рицина

в присутствии ХГ не изменилась по сравнению со спектром чистого агглютинина рицина, можно предположить, что эта линия также нечувствительна к конформационным изменениям фермента.

Полоса амид III ( $1225 \div 1350 \text{ см}^{-1}$ ) отражает вторичную структуру белка [1]. Наличие КР-сигнала в частотных интервалах  $1230 \div 1240$ ,  $1257 \div 1288$  и  $1293 \div 1328 \text{ см}^{-1}$  соответствует различным конформациям белка [13]: в первом интервале —  $\alpha$ -спирали, во втором — неупорядоченной структуре, в третьем —  $\beta$ -структуре. В спектре чистого агглютинина рицина преобладают колебания, соответствующие  $\alpha$ -структуре. Уменьшение интенсивностей низкочастотных составляющих полосы амид III в спектре агглютинина рицина в присутствии ХГ свидетельствует об уменьшении содержания  $\alpha$ -спирали в молекулах белка. В то же время содержание неупорядоченной и  $\beta$ -структуры возрастает. Таким образом, при взаимодействии агглютинина рицина с ХГ часть  $\alpha$ -структуры преобразуется в неупорядоченную и  $\beta$ -структуру.

В спектре чистого агглютинина рицина присутствует линия на частоте  $574 \text{ см}^{-1}$ , однако после взаимодействия с ХГ эта полоса исчезает, что свидетельствует о ее конформационной чувствительности. Линия на частоте  $573 \text{ см}^{-1}$  в литературе связывается с колебаниями аминокислотных остатков триптофана [14]. В то же время линия на частоте  $563 \text{ см}^{-1}$  известна в спектре белка тиоредоксина как полоса амид VII [15]. Таким образом, в спектре чистого агглютинина рицина полоса на частоте  $574 \text{ см}^{-1}$  может быть отнесена к колебаниям аминокислотных остатков триптофана либо может трактоваться как полоса амид VII. Конформационно-чувствительной полосой, соответствующей колебаниям аминокислотных остатков триптофана, служит линия на частоте  $1360 \text{ см}^{-1}$ . Из рис. 5 видно, что интенсивность, ширина и положение линий на частотах  $1340$  и  $1360 \text{ см}^{-1}$  в спектре агглютинина рицина не изменилось после взаимодействия с ХГ. Следовательно, можно предположить, что если бы полоса на частоте  $574 \text{ см}^{-1}$  отвечала колебаниям триптофана, она осталась бы неизменной после взаимодействия белка с ХГ. Поэтому линия на частоте  $574 \text{ см}^{-1}$  скорее всего соответствует колебанию амид VII. Известно, что все линии амид соответствуют колебаниям полипептидной цепи [1]. По изменениям интенсивностей этих линий можно судить о конформационных изменениях полипептидной цепи. В нашем случае полоса амид VII оказывается чрезвычайно чувствительной к изменению вторичной структуры белка, поскольку ее изменения при добавлении ХГ к агглютинину рицина значительно более сильно выражены, чем изменения полосы амид III.

Наблюдаемые нами изменения в КР-спектрах, по-видимому, соответствуют начальным конформа-

ционным изменениям структуры белковой молекулы при ее денатурации. Результаты экспериментов показывают, что вторичная структура агглютинина рицина оказывается весьма чувствительной к действию денатурирующего агента.

### Заключение

Для определения конформационных изменений агглютинина рицина, происходящих из-за его частичной денатурации при взаимодействии с клеточной мембраной, были измерены КР-спектры водного раствора агглютинина рицина в присутствии и в отсутствие денатурирующего агента (хлорида гуанидина).

Взаимодействие агглютинина рицина с хлоридом гуанидина приводит к незначительной денатурации белка, вызывающей уменьшение содержания  $\alpha$ -структуры и увеличение содержания неупорядоченной и  $\beta$ -структуры. Об изменении вторичной структуры токсина свидетельствуют также изменения линии на частоте  $574 \text{ см}^{-1}$ , соответствующей, по-видимому, колебанию амид VI. Конформация дисульфидных мостиков белка при этом почти не изменяется.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (грант 00-15-97843) и ВМБФ (грант 0081/99 13N7516).

Авторы выражают благодарность А.П. Разживину и И.К. Михайлюку за помощь в обработке экспериментальных данных.

### Литература

1. *Carey P.R.* Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies. N. Y.: Acad. Press, 1982.
2. *Брандт Н.Н., Молодоженя В.В., Сакодынская И.К., Чикишев А.Ю.* // Журн. физ. химии. 2000. **74**, № 11. С. 2051.
3. *Brandt N.N., Chikishev A.Yu., Sotnikov A.I.* et al. // Biospectroscopy (in press).
4. *Тоневицкий А.Г., Агапов И.И., Фисенко А.П.* // Биотехнология. 1995. № 11. С. 5.
5. *Тоневицкий А.Г., Теляков Д.Е., Мойсенович М.М.* и др. // Биотехнология. 1995. № 11. С. 31.
6. *Lord J.M., Sphyris N., Roberts L.M., Wales R.* // J. Biol. Chem. 1995. **270**. P. 20292.
7. *Бушueva Т.Л., Тоневицкий А.Г., Майсурян Н.А.* и др. // Молекулярная биология. 1988. **22**, № 2. С. 493.
8. *Ptitsyn O.B.* et al. // Chemtracts. 1993. **4**. P. 133.
9. *Bushueva T.L., Tonevitsky A.G.* // FEBS Lett. 1987. **215**, No. 1. P. 155.
10. *Rutenberg E., Katzin B.J., Ernst S.* et al. // Protein Struct. Funct. 1991. **10**. P. 240.
11. *Брандт Н.Н., Чикишев А.Ю., Сотников А.И.* и др. // ДАН. 2001. **376**, № 5. С. 687.
12. Lazer Scattering Spectroscopy of Biological Objects / Ed. by J. Stepanek, P. Anzenbacher, B. Sedlacek. Amsterdam, Elsevir, 1997.

13. Mlsna D., Monzingo A.F., Katzin B.J. et al. // Protein Sci. 1993. **2**. P. 429.  
 14. Chen M.C., Lord R.C., Mendelsohn R. // Biochim. et Biophys. Acta. 1973. **328**. P. 252.

15. Huimin Li, Hanson C., Fuchs J.A. et al. // Biochemistry. 1993. No. 32. P. 5800.

Поступила в редакцию  
21.03.01

## ФИЗИКА ТВЕРДОГО ТЕЛА

УДК 621.315.592

### ФОКУСИРОВКА ВОЛНЫ ОБРАЗОВАНИЯ ТОЧЕЧНЫХ ДЕФЕКТОВ ВДОЛЬ КРИСТАЛЛОГРАФИЧЕСКИХ НАПРАВЛЕНИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ НА КРИСТАЛЛЫ ЛАЗЕРНОГО ГАУССОВСКОГО ПУЧКА

В. И. Емельянов, А. В. Рогачева

(кафедра общей физики и волновых процессов)

E-mail: emel@em.msk.ru

**Теоретически исследована пространственная самоорганизация волны генерации дефектов (ВГД) в лазерно-возбужденных кристаллических полупроводниках и диэлектриках. Показано, что благодаря упругой анизотропии кристалла и гауссовскому распределению интенсивности возбуждающего лазерного излучения ВГД фокусируется вдоль кристаллографических направлений кристалла.**

#### Введение

В работах [1, 2] рассмотрена волна генерации точечных дефектов (ВГД), возбуждаемая в полупроводниках и диэлектриках при интенсивной генерации в них электронно-дырочных пар лазерным излучением. При этом исследование ограничивалось стационарным одномерным распространением ВГД при пространственно-однородном распределении лазерного излучения.

В настоящей работе рассмотрено формирование пространственных характеристик ВГД в кубическом анизотропном кристалле при действии лазерного излучения с гауссовским распределением интенсивности. Показано, что этот процесс состоит из двух этапов. На первом этапе происходит угловая самоорганизация ВГД: благодаря упругой анизотропии угловой спектр дефектно-деформационных мод сжимается вдоль трех взаимно ортогональных направлений типа [100]. В результате формируются три независимые плоские ВГД, распространяющиеся вдоль таких направлений.

Угловая самоорганизация имеет место как при однородном, так и при неоднородном распределении интенсивности лазерного излучения. При неоднородном (гауссовом) распределении интенсивности происходит также пространственная самоорганизация — фокусировка ВГД вдоль направлений типа [100].

Рассмотрен случай цилиндрической симметрии неоднородного распределения интенсивности, реализуемый для лазерного пучка с гауссовским рас-

пределением интенсивности в поперечном сечении и осью, направленной вдоль [100]. В этом случае фокусировка ВГД приводит к образованию повышенной концентрации дефектов в приосевой области с протуберанцами, вытянутыми вдоль направлений типа [100].

В связи с этими предсказаниями теории пространственной самоорганизации ВГД отметим, что подобная морфология повреждения кристаллов часто наблюдается при облучении кристаллов лазерными импульсами с достаточно большой интенсивностью [3, 4].

#### 1. Концентрации свободных электронов и свободных дырок, локализованных дырок и локализованных электронно-дырочных пар

Для двухзонного полупроводника с шириной запрещенной зоны  $E_g$  концентрация свободных дырок  $n_h$ , создаваемых в валентной зоне при межзонном поглощении лазерного излучения с энергией кванта  $\hbar\omega$ , описывается уравнением [1]

$$\frac{\partial n_h}{\partial t} + \gamma_k n_h + \frac{n_h}{\tau_r} = D_e \Delta n_h - \mu_h \theta_h \operatorname{div} (n_h \nabla \xi) + W, \quad (1)$$

где  $\gamma_k = \beta_h n_d$  — скорость локализации дырок вблизи имеющихся точечных дефектов ( $\beta_h = \sigma_h v_h$ ,  $\sigma_h$  — сечение захвата,  $v_h$  — скорость дырки);  $\tau_r^{-1} = \tau_{r0}^{-1} + \gamma_A n_h^2$  — константа скорости рекомбинации дырок ( $\tau_{r0}$  — время линейной рекомбинации,  $\gamma_A$  — константа оже-рекомбинации);  $D_e$  и  $\mu_h$  —