

## БИОФИЗИКА И МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

**ИК-спектроскопия структурных изменений  $\alpha$ -химотрипсина, связанных с изменением функции в органических растворителях**Н. Н. Брандт<sup>1</sup>, А. А. Манькова<sup>1,a</sup>, А. Ю. Чикишев<sup>2</sup><sup>1</sup>Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет, кафедра общей физики и волновых процессов. Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.<sup>2</sup>Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Международный лазерный центр. Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 62.E-mail: <sup>a</sup> [mankova@physics.msu.ru](mailto:mankova@physics.msu.ru)

Статья поступила: 22.12.2010, подписана в печать 30.01.2011

Для определения изменений вторичной структуры  $\alpha$ -химотрипсина, связанных с изменением функции в органических растворителях, при помощи ИК-Фурье-спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения проведены измерения лиофилизованного фермента  $\alpha$ -химотрипсина, его растворов в воде и тяжелой воде, таблеток, смоченных в ацетонитриле и циклогексане и суспензий в этих растворителях. Экспериментальные результаты показывают, что при переходе от водного раствора к лиофилизованному образцу наблюдаются наиболее значительные структурные изменения (уменьшение содержания  $\alpha$ -спиральных фрагментов и увеличение содержания  $\beta$ -структурных фрагментов). Такие же, но менее выраженные структурные изменения сопровождают и переход от лиофилизованного образца к суспензии в органических растворителях.

*Ключевые слова:* ИК-Фурье-спектроскопия НПВО, колебательная спектроскопия, структура и функция ферментов, белки, химотрипсин.

УДК: 543.421/424. PACS: 82.80.Gk.

**Введение**

Одним из важнейших вопросов физики белков является проблема взаимосвязи функции молекулы фермента с его структурой: при функционировании фермента его структура, как правило, изменяется. Значительное влияние на структуру молекулы фермента и, следовательно, на ее функционирование оказывает микроокружение. Для большинства ферментов естественным микроокружением является водная среда. Функции таких ферментов могут претерпевать существенные изменения в неводных растворителях. Так, например, известно, что гидролитический фермент  $\alpha$ -химотрипсин меняет (инвертирует) функцию в органических растворителях, осуществляя пептидный синтез или переэтерификацию [1–3].

Существует значительное количество экспериментальных методов, позволяющих исследовать структуру белковых молекул. Высочайшей информативностью отличаются методы оптической колебательной спектроскопии, такие как спектроскопия комбинационного рассеяния (КР), КАРС-спектроскопия и ИК-спектроскопия. В частности, анализ колебательных линий амид I ( $1600\text{--}1700\text{ см}^{-1}$ ), амид II ( $1500\text{--}1600\text{ см}^{-1}$ ) и амид III ( $1200\text{--}1300\text{ см}^{-1}$ ) дает возможность определять процентное содержание элементов вторичной структуры.

Работа посвящена определению изменений вторичной структуры  $\alpha$ -химотрипсина, связанных с изменением его функции, при помощи ИК-Фурье-спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО).

**Материалы и методы**

Измерения проводились на ИК-спектрометре Nicolet-6700 (Thermo Electron Corporation) с приставкой

Smart Orbit, использующей принцип НПВО для измерения спектров поглощения непрозрачных образцов [4]. Измерения проводились в диапазоне  $400\text{--}4000\text{ см}^{-1}$  со спектральным разрешением  $2\text{ см}^{-1}$ . Каждый спектр являлся результатом усреднения по 100 сканированиям.

В экспериментах были исследованы следующие образцы: лиофилизованный  $\alpha$ -химотрипсин, его растворы в бидистиллированной обычной воде и тяжелой воде в концентрации  $5.7\text{ мМ}$ , смоченные в ацетонитриле и циклогексане таблетки (лиофилизованный фермент, спрессованный под давлением) и суспензии белка в этих растворителях. Выбранные растворители использовались ранее в экспериментах по изучению изменения функции  $\alpha$ -химотрипсина в органических растворителях [1]. Использование тяжелой воды ( $\text{D}_2\text{O}$ ) является стандартным приемом для анализа колебания амид I, поскольку частоты этого резонанса совпадают с частотами интенсивной линии деформационных колебаний обычной воды. Раствор в тяжелой воде готовился за 4–6 часов до эксперимента, так как в соответствии с данными работы [5] при растворении белков в тяжелой воде 85–90% обмена водорода на дейтерий происходит в течение первых трех часов.

В работе были использованы  $\alpha$ -химотрипсин фирмы «Самсон-Мед», бидистиллированная вода, тяжелая вода ( $\text{D}_2\text{O}$ ), ацетонитрил (ЧДА) и циклогексан (ХЧ) производства «Реахим».

Таблетки толщиной около  $350\text{ мкм}$  и диаметром  $5\text{ мм}$  были изготовлены путем прессования лиофилизованного белка. Суспензии  $\alpha$ -химотрипсина в органических растворителях были получены смешиванием  $5\text{ мг}$  белка с  $20\text{ мкл}$  растворителя.

Обработка результатов проводилась с помощью программы GeneHunter, основанной на генетическом алгоритме и позволяющей аппроксимировать спектр с использованием наборов аналитических функций [6]. Для аппроксимации спектральных линий и фоновых сигналов мы применяли наборы гауссовых кривых и квадратичные полиномы соответственно.

### Результаты и обсуждение

Эксперименты показали, что спектры таблеток, смоченных в ацетонитриле и циклогексане, совпадают со спектрами соответствующих суспензий. В дальнейшем в работе представлены только данные, полученные для суспензий.

Наличие существенно отличающихся фоновых сигналов и разные абсолютные амплитуды спектральных компонент сильно затрудняют прямое сравнение линий амид I, II и III. В связи с этим была проведена аппроксимация спектров. Рис. 1 дает представление о качестве такой аппроксимации. Мы не приводим аппроксимирующие гауссовы компоненты в связи с неоднозначностью аппроксимации (каждый набор гауссовых кривых не является единственным). Для аппроксимации линий амид I, II и III мы использовали 4, 2 и 2 гауссовы компоненты соответственно.

На рис. 2 представлены кривые для четырех образцов, каждая из которых получена вычитанием из исходного спектра суммы квадратичного полинома, аппроксимирующего фон, и всех гауссовых компонент, за исключением лежащих в диапазоне 1600–1700 см<sup>-1</sup>, соответствующем линии амид I. Таким образом, каждую из представленных кривых можно рассматривать как линию амид I «в чистом виде». Исходя из предположения о том, что форма линии амид I полностью определяется вторичной структурой, мы представили кривые, нормированные на площади под ними.

На рис. 3 представлены аналогичные результаты для диапазонов 1200–1270 и 1480–1580 см<sup>-1</sup>, соответствующих линиям амид III и II.

Видно, что самые значительные структурные изменения происходят с молекулой белка при переходе от водного раствора к лиофилизованному образцу. Струк-

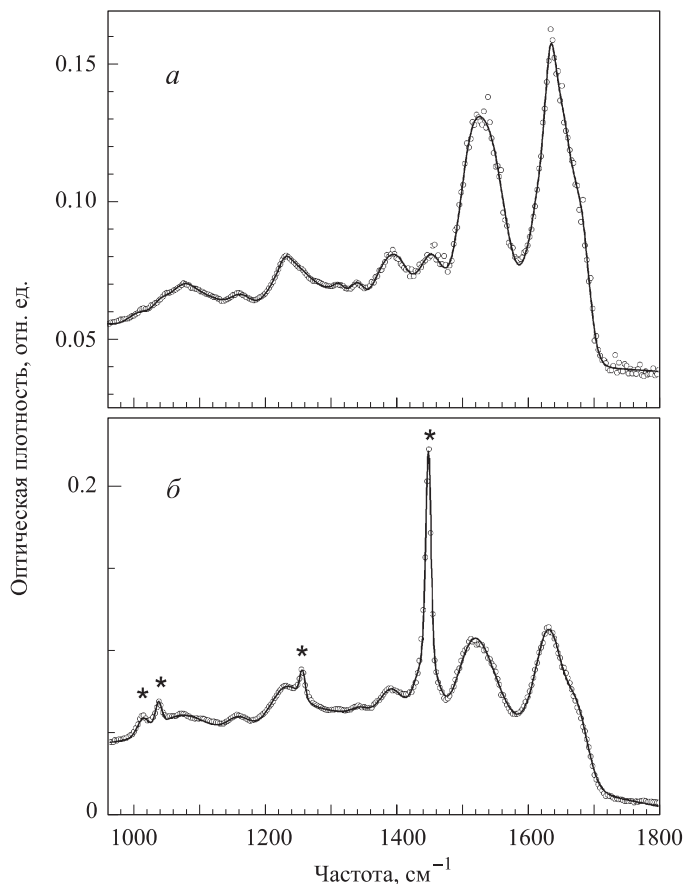


Рис. 1. ИК спектры: *a* — лиофилизованного  $\alpha$ -химотрипсина и *б* — суспензии  $\alpha$ -химотрипсина в циклогексане (точки) и соответствующие аппроксимирующие кривые (сплошные линии) (см. текст). Звездочками отмечены линии циклогексана

тура белковой молекулы, находящейся в окружении молекул органического растворителя, близка к структуре белковой молекулы в порошке.

На основании анализа многочисленных данных о зависимостях формы линии амид I от относительного содержания элементов вторичной структуры [7–14] мож-

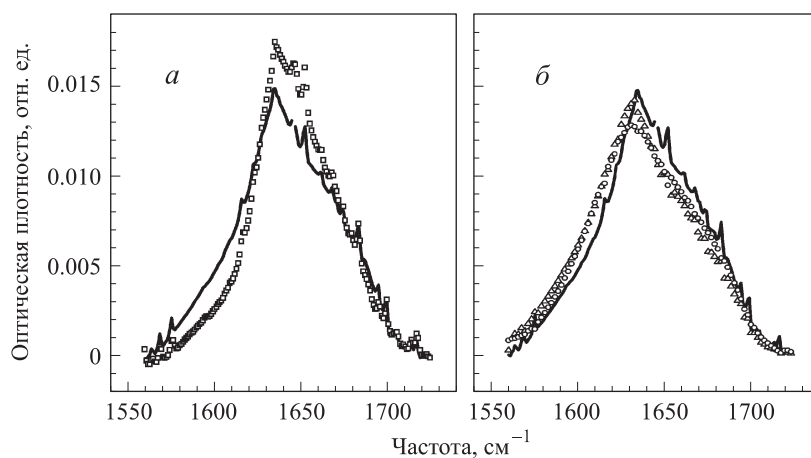


Рис. 2. Разности ИК спектров  $\alpha$ -химотрипсина (диапазон амид I) и соответствующих аппроксимирующих кривых (см. текст): *a* — раствор в D<sub>2</sub>O (квадраты) и лиофилизованный фермент (сплошная линия) и *б* — лиофилизованный фермент (сплошная линия), суспензия в ацетонитриле (треугольники) и суспензия в циклогексане (круги)

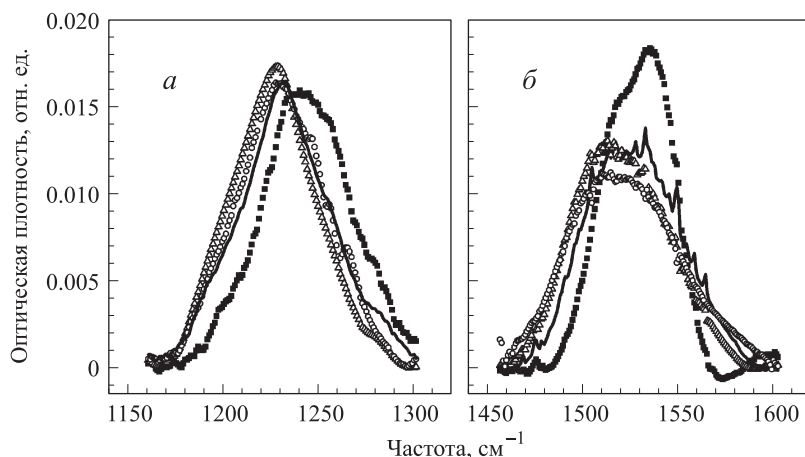


Рис. 3. Разности спектров  $\alpha$ -химотрипсина (диапазоны амид III (а) и амид II (б)) и соответствующих аппроксимирующих кривых (см. текст): водный раствор (квадраты), сухой порошок (сплошная линия), суспензия в ацетонитриле (треугольники) и суспензия в циклогексане (круги)

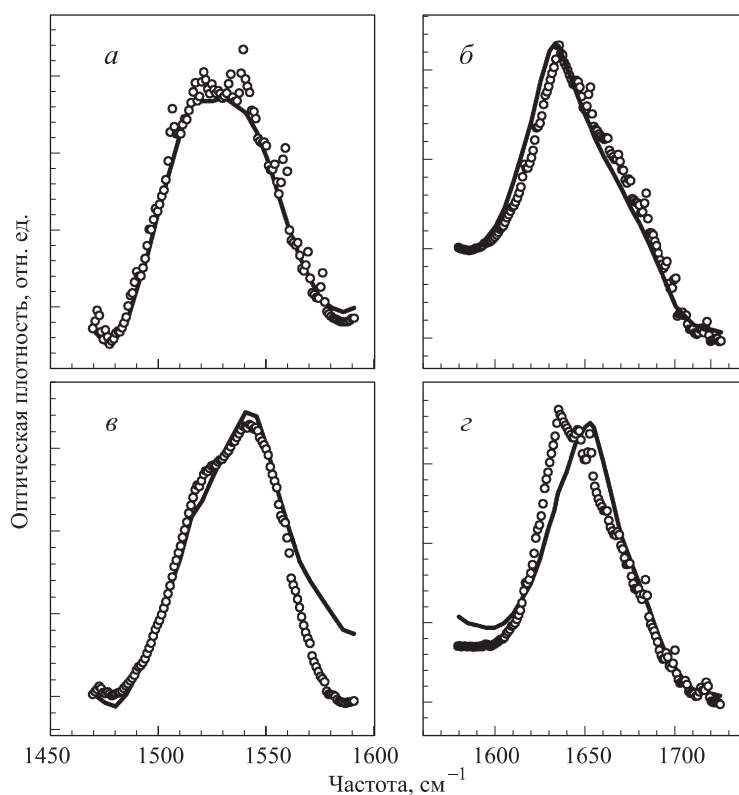


Рис. 4. Масштабированные ИК спектры (круги) лиофилизованного порошка  $\alpha$ -химотрипсина (а, б) и его растворов в  $\text{H}_2\text{O}$  (в) и  $\text{D}_2\text{O}$  (г). Соответствующие оцифрованные из работы [16] ИК-спектры (сплошные линии) сухих образцов  $\alpha$ -химотрипсина (а, б) и цитохрома С (в, г)

но заключить, что  $\alpha$ -спиралям,  $\beta$ -структурированным и неупорядоченным фрагментам соответствуют спектральные составляющие с максимумами на частотах 1654, 1633 и 1680  $\text{cm}^{-1}$  соответственно. Исходя из этого можно предположить, что переход от водного раствора к лиофилизованному образцу сопровождается увеличением содержания  $\beta$ -структурированных элементов и соответственно уменьшением содержания  $\alpha$ -спиралей. Заметим также, что тенденция к уменьшению содержания  $\alpha$ -спиралей и увеличению содержания  $\beta$ -структурированных участков сохраняется и при переходе от лиофилизованного образца к образцам в ор-

ганических растворителях. Наблюдаемые спектральные изменения при переходе от лиофилизованного образца к водному раствору качественно соответствуют ранее полученным данным КАРС-спектроскопии: переход к раствору сопровождался увеличением отношения содержания  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -структурированных участков [15].

Для дополнительного качественного сравнения спектров в области амид I мы произвели оцифровку представленных в работе [16] ИК-спектров четырех белков с существенно отличающимися вторичными структурами ( $\alpha$ -химотрипсина, рибонуклеазы, цито-

хрома С и миоглобина). На рис. 4 сравниваются масштабированные измеренные и оцифрованные спектры. Видно, что спектры порошка  $\alpha$ -химотрипсина практически совпадают (рис. 4, а б). Из всех оцифрованных спектров наиболее близким к измеренному спектру раствора  $\alpha$ -химотрипсина является спектр цитохрома (рис. 4, в г), в котором содержание  $\alpha$ -спиралей существенно больше, чем в лиофилизованном  $\alpha$ -химотрипсине. Сопоставление имеющихся данных по вторичным структурам для этих образцов [16] показывает, что содержание неупорядоченных фрагментов в них практически одинаковое, а содержание  $\alpha$ -спиральных ( $\beta$ -структурированных) фрагментов существенно больше в цитохроме ( $\alpha$ -химотрипсине). Эти данные хорошо коррелируют с представленной выше припиской характерных частот в области линии амид I.

Количественный анализ, основанный на изменениях линий амид II и III, затруднен из-за недостаточности и неоднозначности существующих литературных данных. Вместе с тем отметим, что измеренные и оцифрованные спектры также достаточно хорошо совпадают и в области полосы амид II (рис. 4, а).

Полученные экспериментальные результаты показывают, что изменение функционирования  $\alpha$ -химотрипсина в органических растворителях связано с изменением вторичной структуры молекулы. Отметим также качественное соответствие полученных данных с результатами экспериментов по КР-спектроскопии [17].

### Заключение

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что наиболее значительные структурные изменения (уменьшение содержания  $\alpha$ -спиралей и увеличение содержания  $\beta$ -структурированных участков) наблюдаются при переходе от водного раствора к лиофилизованному образцу. Такие же, но менее выраженные структурные изменения сопровождают и переход от лиофилизованного образца к суспензии в органических растворителях.

### IR spectroscopy of structural changes of $\alpha$ -chymotrypsin related to the changes of functioning in organic solvents

N. N. Brandt<sup>1</sup>, A. A. Mankova<sup>1,a</sup>, A. Yu. Chikishev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of General Physics and Wave Processes, Faculty of Physics, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia.

<sup>2</sup>International Laser Center, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia.

E-mail: <sup>a</sup>mankova@physics.msu.ru.

To determine the variations in the secondary structure of  $\alpha$ -chymotrypsin related to the changes of functioning, we measure the ATR-FTIR spectra of the lyophilized enzyme, its solutions in normal and heavy water, tablets wetted in acetonitrile and cyclohexane, and suspensions in these solvents. The experimental results show that the most significant structural changes (a decrease in the content of  $\alpha$ -helical fragments and an increase in the content of  $\beta$ -sheets) are related to the transition from the aqueous solution to the lyophilized sample. Similar but less developed structural changes are observed for the transition from the lyophilized sample to the suspensions in organic solvents.

**Keywords:** ATR FTIR spectroscopy, vibrational spectroscopy, structure and function of enzymes, proteins, chymotrypsin.

PACS: 82.80.Gk.

Received 12 December 2010.

English version: *Moscow University Physics Bulletin* 3(2011).

### Сведения об авторах

1. Брандт Николай Николаевич — канд. физ.-мат. наук, доцент; e-mail: brandt@physics.msu.ru.
2. Манькова Анна Александровна — студентка; e-mail: mankova@physics.msu.ru.
3. Чикишев Андрей Юрьевич — докт. физ.-мат. наук, доцент; e-mail: ach58@yandex.ru.

Таким образом, с точки зрения вторичной структуры молекулы лиофилизованная форма  $\alpha$ -химотрипсина является промежуточным состоянием фермента между его состояниями в водном растворе и суспензии в органическом растворителе. Следовательно, можно предположить, что с точки зрения функциональной активности лиофилизованный белок занимает промежуточное состояние между гидролитически активным ферментом и ферментом, выполняющим функцию синтеза.

### Список литературы

1. Klibanov A.M. // Trends Biochem. Sci. 1989. **14**. P. 141.
2. Dabulis K., Klibanov A.M. // Biotechnology and Bioengineering. 1993. **41**. P. 566.
3. Dordick J.S. // Biotechnology Progress. 1992. **8**. № 4. P. 259.
4. <http://www.thermoscientific.com/wps/portal/ts/>
5. Blout E.R., DeLoae C., Asadourian A. // J. Am. Chem. Soc. 1961. **83**. P. 1895.
6. <http://neuroproject.ru/>
7. [http://www.imb-jena.de/ImgLibDoc/ftir/IMAGE\\_FTIR.html](http://www.imb-jena.de/ImgLibDoc/ftir/IMAGE_FTIR.html)
8. Dong A., Prestrelski S.J., Allison S.D., Carpenter J.F. // J. Pharm. Sci. 1995. **84**. P. 415.
9. Prestrelski S.J., Arakawa T., Carpenter J.F. // Arch. Biochem. Biophys. 1993. **303**. P. 465.
10. Kong J., Shaoning Yu. // Acta Biochim. Biophys. Sinica. 2007. **39**, N 8. P. 549.
11. Wolkers Wim F., Parvez I. et al // J. Biochem. 1995. **34**. P. 7825.
12. Bonwell E.S., Wetzel D.L. // J. Agric. Food Chem. 2009. **57**. P. 10067.
13. Griebenow K., Klibanov A.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. **92**, № 24. P. 10969.
14. Prestrelski S.J., Tedeschi N., Arakawa T., Carpenter J.F. // Biophys. J. 1993. **65**. P. 661.
15. Chikishev A.Yu., Lucassen G.V., Koroteev N.I., Otto C. et al. // Biophys. J. 1992. **93**. P. 976.
16. Smith B.M., Franzen S. // J. Anal. Chem. 2002. **74**, N 16. P. 4076.
17. Брандт Н.Н., Сакодынская И.К., Чикишев А.Ю. // Журн. физ. химии. 2001. **75**. С. 1033.