

ЛАЗЕРНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ И ДИНАМИКА БИОМАКРОМОЛЕКУЛ

Чикишев А. Ю.

Методы лазерной спектроскопии применены для исследования внутри-молекулярных структурных изменений, связанных с функциональной активностью белковых молекул.

Введение. В последнее время в мировой науке закрепился и стал общепринятым подход, основанный на рассмотрении биомолекул и, в первую очередь, белков как молекулярных машин. Такое рассмотрение логически тесно связано с концепцией «белок–машина», сформулированной советскими учеными в 60-х годах прошлого века (Чернавский и др., 1967). И если в первых работах были представлены общие закономерности, оправдывающие «механистический» подход к функционированию белков, то в современных исследованиях рассмотрение доведено до прямого расчета кпд молекулярных машин. Любой машине, в том числе и молекулярной, свойственна взаимосвязь между структурой и функцией. Является обыденным то обстоятельство, что макроскопические машины и механизмы изменяют свою пространственную структуру при выполнении той или иной функции. В связи с этим возникает вопрос: существует ли такая же взаимосвязь и в мире молекулярных машин? Методы линейной и нелинейной колебательной спектроскопии применены нами для исследования функционально-значимых структурных изменений молекулярных машин (белковых молекул) и изучения модельных систем.

Колебательная спектроскопия функционально-значимых структурных изменений белковых молекул. Одним из важнейших аспектов проблемы «структура – функция» является выявление конформационных изменений белков (ферментов), связанных с работой «молекулярной машины».

Методы лазерной спектроскопии (поляризационной спектроскопии когерентного антистоксова рассеяния света (КАРС) и спектроско-

пии спонтанного КР) были применены нами для определения конформационных изменений молекулы фермента при взаимодействии с лигандом. Связывание субстрата является одним из важнейших этапов функционирования молекулы белка-фермента. В связи с этим, задача выявления соответствующих конформационных изменений имеет исключительную значимость для понимания процессов, происходящих на молекулярном уровне.

Схема спектрометра и особенности экспериментов по КАРС спектроскопии проведены в (Chikishev et al., 1992). Данные по технике КР спектроскопии приведены в (Brandt and Chikishev, 2002).

В качестве образцов использовали растворы химотрипсина и его комплекса с антралиловой кислотой в обычной и тяжелой воде. Применение в качестве растворителя тяжелой воды позволяло избежать перекрытия полосы амид I и полосы обычной воды на 1640 см^{-1} . Выбор антралиловой кислоты в качестве лиганда обусловлен тем обстоятельством, что КР спектр этого соединения не содержит линий в тех областях, где находятся конформационно-чувствительные комбинационные резонансы белковой молекулы. Концентрация растворов (по белку) составляла 4–6 мМ. Совпадение (с точностью до ошибки эксперимента) КАРС и КР спектров образцов, полученных в начале и конце измерений, подтверждало отсутствие изменений структуры молекулы, связанных с воздействием лазерного излучения.

Рассмотрим изменения, происходящие в спектральных диапазонах, в которых лежат колебательные полосы, чувствительные к изменению структуры белковой молекулы.

Поляризационная спектроскопия когерентного антистоксова рассеяния света дает возможность получать прямую спектроскопическую информацию о структуре широкой конформационно-чувствительной полосы амид I в колебательных спектрах белковых молекул. Выбор соответствующих поляризационных условий проведения эксперимента позволяет выявить три полосы в пределах широкого контура амид I. Эти полосы отнесены нами к элементам вторичной структуры белка (α -спираль, β -структура, неупорядоченная конформация). Результаты экспериментов по КАРС спектроскопии находятся в хорошем соответствии с данными альтернативных методов (рентгеноструктурный анализ, круговой дихроизм, ИК и КР спектроскопия) (Chikishev et al., 1992).

На рис. 1 представлены КАРС спектры раствора химотрипсина в тяжелой воде. В экспериментах фиксировалось положение поляризационного анализатора в сигнальном канале и вектора поляризации излучения одного из лазеров накачки. Варьировалось только положение вектора поляризации излучения второго лазера. Существенное изменение формы спектра связано только с изменением поляризационных условий.

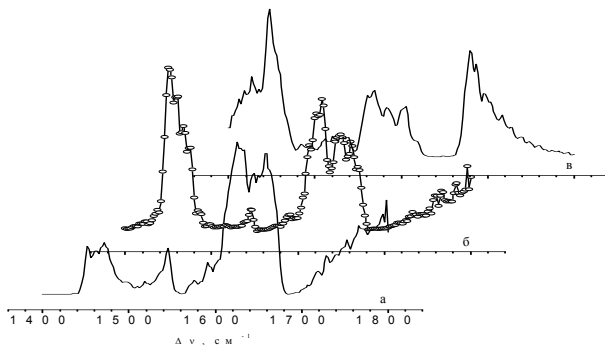


Рис. 1. КАРС спектры раствора химотрипсина в тяжелой воде, измеренные при различных поляризационных условиях.

На рис. 2 представлены для сравнения спектры свободного и лигандированного белка, полученные при двух положениях поляризационного анализатора. Ясно видны различия, которые существенно превосходят ошибку эксперимента.

На основании приведенных данных можно сделать вывод о том, что взаимодействие фермента с лигандом (являющееся важнейшим этапом функционирования молекулярной машины) приводит к существенным изменениям вторичной структуры белка. В предположении об однозначном соответствии между наблюдаемыми колебательными резонансами и элементами вторичной структуры можно заключить, что содержание α -спиралей, β -структур и участков с неупорядоченной конформацией в свободном белке составляет 3, 52 и 45%, соответственно, а в лигандированном белке — 20, 37 и 43%, соответственно. В рамках такой интерпретации наблюдаемые изменения следует приписать перехо-

ду существенной части аминокислотных остатков из α -спиральной в β -структурную конформацию. Любопытно отметить качественное совпадение изменений вторичной структуры фермента при переходе от связанной формы к свободной с изменениями, которые претерпевают молекулы прионов при развитии болезни Крейтцфельда–Якоба. Интересно, что в обоих случаях происходит перераспределение между элементами порядка — процентное содержание участков с неупорядоченной конформацией изменений практически не претерпевает.

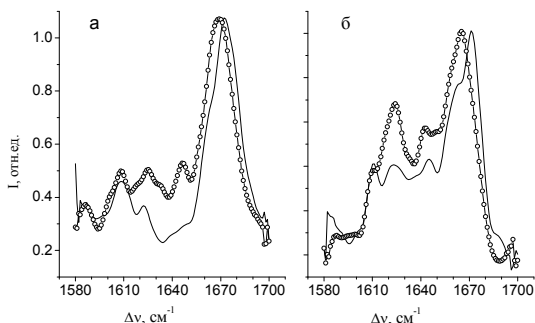


Рис. 2. КАРС спектры растворов (сплошная линия) свободного и (о) лигандированного химотрипсина в тяжелой воде, измеренные при различных поляризационных условиях.

Были измерены КАРС спектры свободного и лигандированного химотрипсина в спектральном диапазоне, где доминируют три линии: 877 см^{-1} (триптофан), 856 и 830 см^{-1} (тирозиновый дублет). Отношение интенсивностей линий тирозинового дублета составляет $R_{\text{Тyr}} = 1,8$ и $R_{\text{Тyr}} = 3,8$ для свободного и лигандированного белка, соответственно. Сопоставление этих значений позволяет заключить, что в лигандированном химотрипсине тирозины являются более сильными акцепторами протона, чем в свободном белке. Таким образом, состояние водородных связей, образуемых тирозиновыми остатками лигандированного белка, существенно отличается от такового в свободном белке.

На рис. 3 представлены КР спектры растворов свободного и лигандированного химотрипсина в обычной и тяжелой воде. В диапазоне

500–550 cm^{-1} все спектры могут быть аппроксимированы при помощи трех линий с частотами 510, 519 и 537 cm^{-1} . Видно, что спектральные изменения, связанные со сменой растворителя весьма незначительны. В то же время, связывание с лигандом приводит к качественным изменениям в спектре: увеличивается относительная интенсивность высокочастотной компоненты при одновременном уменьшении интенсивности низкочастотной компоненты.

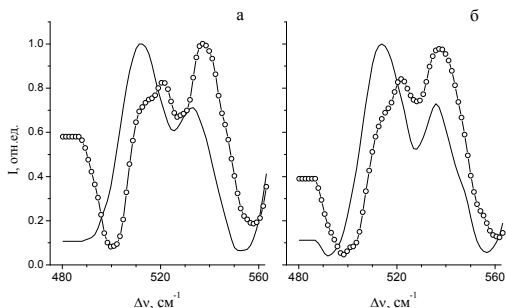


Рис. 3. КР спектры растворов (сплошная линия) свободного и (о) лигандированного химотрипсина в (а) обычной и (б) тяжелой воде.

Колебательные резонансы на частотах приблизительно 510, 525 и 540 cm^{-1} принято приписывать гош-гош-гош, гош-гош-транс и транс-гош-транс конформациям дисульфидных мостиков, соответственно. Аппроксимация КР спектров дает значения частот, близкие к указанным. В связи с этим, логично предположить, что взаимодействие с лигандом (как в обычной, так и в тяжелой воде) приводит к уменьшению содержания гош-гош-гош конформации и соответствующему увеличению содержания транс-гош-транс конформации.

На основании изложенного экспериментального материала можно сделать принципиально важный вывод об изменениях структуры молекулы фермента при его взаимодействии с лигандом.

Совокупность полученных данных может рассматриваться как подтверждение концепции «белок-машина». Действительно, нами рассмотрено взаимодействие молекулы химотрипсина (молекулярная масса

≈ 25000 а.е.м.) и молекулы антралиловой кислоты (молекулярная масса 137 а.е.м.). Белок превосходит лиганд по массе и, следовательно, по объему почти в 200 раз. Связывание лиганда происходит в активном центре — сравнительно небольшой части белковой молекулы. Естественно предположить, что взаимодействие приведет к модификации структуры активного центра, то есть «рабочего органа» фермента. Однако, концепция белок-машина предполагает, что функционирование осуществляет весь «механизм» как целое. Если это так, то есть, если работает не выделенная часть, а вся молекула, следует ожидать, что структурные изменения затронут и самые удаленные участки. Именно такие результаты и получены в экспериментах по сравнению КАРС и КР спектров свободного и лигандированного белка. Ни одна из рассмотренных колебательных полос не определяется исключительно колебаниями групп активного центра. Наоборот, колебания амид I и амид III, а также в какой-то мере колебания дисульфидных мостиков можно рассматривать как характеризующие «остов» молекулы, ее структуру как единое целое.

Особенности широкополосного фона в КР спектрах биомолекул. В КР спектрах практически всех биомолекул присутствует значительный фоновый сигнал, причем интенсивность фоновой компоненты, как правило, существенно превосходит интенсивности КР линий. Важно отметить, что при длительном воздействии лазерного излучения интенсивность фоновой компоненты уменьшается (происходит выжигание фона или фотообесцвечивание). Колебательные спектры биополимеров практически не изменяются при облучении образцов видимым лазерным излучением, что свидетельствует об отсутствии изменений состава и вторичной структуры биополимеров.

Будем исходить из предположения о флуоресцентной природе широкополосного фона, так как в работе (Arutyunyan et al., 2004) методом флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением было показано, что время затухания фонового сигнала в КР спектре водного раствора α -химотрипсина составляет порядка 4 нс, что доказывает наличие вклада флуоресценции в сигнал светорассеяния. Возбуждение производилось на длине волны 532 нм. Большинство белков практически не поглощает и не флуоресцирует в видимой области спектра. Тем не менее, молекула белка имеет сложную пространственную структуру, которая может содержать аминокислотные циклы или внутримолеку-

лярные шивки, сдвигающие спектр поглощения и, соответственно, спектр флуоресценции в видимую спектральную область. В рамках такого предположения возникают два основных вопроса. Во-первых, связан ли широкополосный фон с флуоресценцией самих молекул белка или различных примесей. Во-вторых, насколько чувствительны параметры широкополосного фона и его динамические характеристики к конформационным изменениям молекул белка.

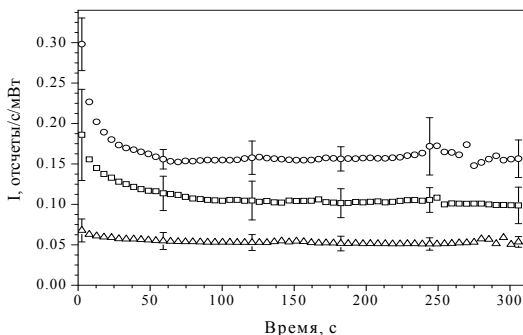


Рис. 4. Кинетики фотообесцвечивания (\square) барназы, (\circ) комплекса барназа-барстар и (Δ) растворителя. Мощность возбуждения 500 мВт, время накопления сигнала в одной точке 5 секунд, концентрации барназы и комплекса — 25 мкМ.

Для проверки гипотезы о том, что флуоресцентный фоновый сигнал в растворах белков определяется именно молекулами белка, были измерены кинетики фотообесцвечивания белка барназы, комплекса барназа-барстар и буфера, в котором они были растворены (Agutyunyan et al., 2005). Результаты приведены на рис. 4. Следует отметить, что соотношение сигналов от растворов комплекса и барназы в начальный момент времени примерно равно соотношению молярных масс этих биополимеров (1,8). (Аналогичный результат был получен для белка ризица и одной из его субъединиц: при соотношении молекулярных масс 2:1 сигналы отличались примерно в два раза.) Поскольку молярные концентрации барназы и комплекса одинаковы, то в объемах, из которых производится светосбор, находится одинаковое количество молекул с различными молекулярными массами. Так как процедуры выделения белков практически идентичны, то степень чистоты обоих растворов оди-

накова. Следовательно, различия в интенсивностях широкополосного фона доказывают, что флуоресценция в данном случае определяется именно молекулами белка, а не примесями или растворителем.

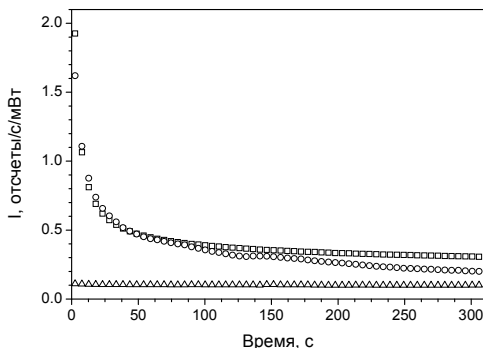


Рис. 5. Кинетики фотообесцвечивания водных растворов ПЛЛ при (□) pH 6,5 и (○) pH 13,0 и (Δ) щелочи NaOH. Мощность возбуждения 500 мВт, время накопления сигнала в одной точке 5 секунд, концентрация 30 мг/мл. Размер символов соответствует экспериментальной ошибке.

Известно, что поли-L-лизин (ПЛЛ) может быть обратимо переведен из α -структурной конформации в β -структурную, из α -структурной в неупорядоченную и из β -структурной в неупорядоченную, путем изменения pH и температуры раствора. Были получены КР спектры ПЛЛ в β -структурной и неупорядоченной конформациях. Полученные данные использовали для определения влияния вторичной структуры биополимера на характеристики фотообесцвечивания его растворов.

На рис. 5 представлены кинетики фотообесцвечивания растворов ПЛЛ и концентрированной щелочи NaOH, которую использовали для получения необходимого pH. Видно, что кинетики фотообесцвечивания растворов ПЛЛ с различным pH сильно отличаются в начальной точке и на временах, больших 200 секунд.

Отметим еще одну особенность фонового сигнала: почти экспоненциальное уменьшение интенсивности со временем облучения может дополняться осцилляциями интенсивности. Таким образом, несмотря на

общее снижение возможны сравнительно короткие интервалы, где интенсивность возрастает. Возможной причиной осцилляций является изменение геометрических параметров лазерного пучка, вследствие изменения параметров тепловой линзы, наведенной в среде. Это явление известно в литературе как «оптические сердцебиения» («optical heartbeats»).

На основе полученных данных можно сделать следующие выводы. При отсутствии флуоресцирующих примесей и флуоресценции растворителя интенсивность широкополосного фона в КР спектрах водных растворов белков и полипептидов и характерное время фотообесцвечивания зависят от конформационного состояния молекул. Наличие эффекта фотообесцвечивания растворов биополимеров свидетельствует о деструктивном воздействии видимого лазерного излучения на биомолекулы, которое необходимо учитывать при исследованиях с использованием лазерного излучения видимого диапазона. При этом видимое лазерное излучение не оказывает влияния на аминокислотный состав и не вызывает изменений во вторичной структуре биополимеров. Так как широкополосный фон в КР спектрах белков является сигналом от белковых молекул, а его характеристики зависят от конформационного состояния белков, то изучение этих характеристик может быть альтернативным методом получения информации о конформационном состоянии белков.

Низкочастотные (терагерцовые) колебания. Одной из особенностей белковых молекул является субглобулярное строение. Выделение значительных частей молекулы, способных двигаться как единое целое подтверждается и расчетами, выполненными при помощи методов молекулярной динамики. Тем самым обосновывается предположение о существовании немногих выделенных степеней свободы.

Интерес к проблеме субглобулярных движений был в значительной степени стимулирован результатами экспериментов по КР спектроскопии в области низких частот. Характерные значения частот линий составляют $20\text{--}30\text{ см}^{-1}$, что соответствует пикосекундному диапазону для периода колебаний и терагерцовому диапазону для частот. Интересно отметить, что простейшие расчеты дают близкие к экспериментальным значения частот колебаний.

Будем считать, что большие части белковой молекулы (субглобулы соединены между собой «шарниром» (роль которого выполняют ковалентные пептидные связи) и могут совершать движения друг относи-

тельно друга. Учтем также, что субглобулы связаны между собой системой водородных связей. Для оценки частоты колебаний необходимо знать жесткость «пружин», в качестве которой выступает водородная связь. Энергия водородной связи хорошо описывается потенциалом Морзе: $U(x) = D(1 - \exp[-\alpha(x-l)])^2 - D$. Эквивалентная силовая постоянная водородной связи $k = 2D\alpha^2$. Учитывая, что $D = 2-5$ ккал/моль $= (1,5-3,5) \cdot 10^{-20}$ Дж и $\alpha = 5-30$ нм⁻¹, получаем $k \approx 1-60$ н/м. Характерное значение массы — 10000 а.е.м. $= 1,66 \cdot 10^{-23}$ кг. Период колебаний на одной «пружине» составляет $T = 2\pi(m/k)^{1/2} \approx 3-25$ пс. В качестве другой простой модели можно рассмотреть упругую сферу, период собственных упругих колебаний которой определяется по формуле $T = 2r(\rho/E)^{1/2}$, где ρ и E — плотность и модуль Юнга материала сферы, соответственно, а r — ее радиус. Подставляя характерные значения $\rho = 10^3$ кг/м³, $E = 10^{10}$ н/м² и $r = 50$ А, получим $T \approx 3$ пс.

Отметим, что большинство успешных экспериментов было проведено с кристаллическими образцами. Ни в денатурированных белках, ни в водных растворах низкочастотные линии зарегистрированы не были. Первое обстоятельство может рассматриваться в качестве подтверждения существования функционально значимых выделенных степеней свободы. Второе же обстоятельство заставляет более детально рассмотреть вопрос о добротности возможных движений больших частей молекулы. Важность такого рассмотрения связана с определением характера движений по выделенным степеням свободы. В случае низких добротностей эти движения могут быть только релаксационными, в то время как при добротностях хотя бы незначительно превышающих единицу, следует, по-видимому, принимать во внимание и возможность колебательных движений. Согласно общепринятой точке зрения низкочастотные колебания белковых молекул в воде оказываются передемпфированными. В подтверждение такого утверждения приводят, как правило, результаты простых оценок силы трения по формуле Стокса. В этом разделе приведены экспериментальные результаты для модельных систем, которые в значительной степени опровергают представления о передемпфированности колебаний.

Использовались три модельных вещества, обладающие собственными низкочастотными колебательными резонансами (тетрахлорэтан (ТХЭ) (95 см^{-1}), тетрабромэтан (ТБЭ) (64 см^{-1}) и ацетамид (100 см^{-1})). Применялись растворители, способные образовывать водородные связи с исследуемыми молекулами (вода и ДМСО), и растворитель, не образующий водородных связей (четырехлористый углерод). В экспериментах варьировались концентрации исследуемых веществ.

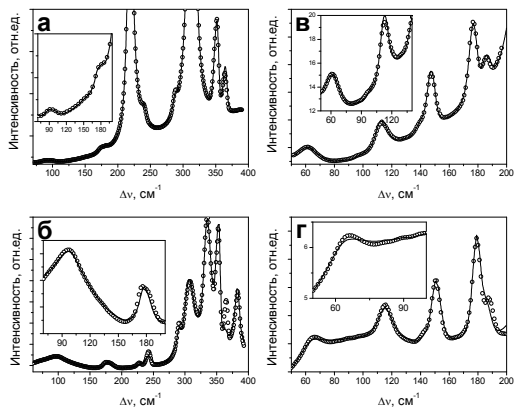


Рис. 6. Спектры смесей ТХЭ с (а) ЧХУ и (б) ДМСО и ТБЭ с (в) ЧХУ и (г) ДМСО в мольном соотношении 1:8 (сплошные линии) и аппроксимации этих спектров линейными комбинациями спектров чистых веществ (о).

На рис. 6 представлены измеренные КР спектры растворов модельных веществ и аппроксимирующие кривые, представляющие собой линейные комбинации спектров чистых веществ, построенные с учетом смещений линий. Лишь для спектра ТБЭ в ДМСО заметно отклонение аппроксимирующей кривой от измеренного спектра. Только в этом случае спектральные изменения, связанные со сдвигом линий, дополняются уширением.

На рис. 7 представлены сдвиги линий ТБЭ и ТХЭ в зависимости от концентраций для двух растворителей. Видно, что увеличение концентрации четыреххлористого углерода (ДМСО) сопровождается низкочастотными (высокочастотными) сдвигами линий. Качественное различие

сдвиг может быть связано со способностью растворителя к образованию водородных связей. Дополнительные данные получены для раствора ТБЭ в ДМСО, где аппроксимация производилась с изменением ширины линии. Лишь этот результат соответствует представлениям об изменении добротности низкочастотного осциллятора при взаимодействии с растворителем. По представленным данным изменение добротности должно быть сравнительно невелико (около 20%).

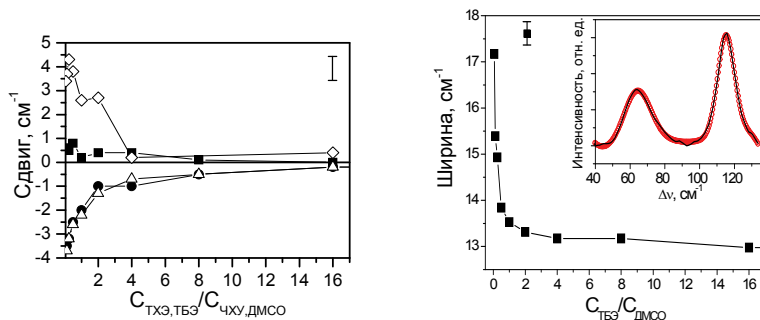


Рис. 7. Зависимости сдвигов НЧ линии ТХЭ (95 см^{-1}) в смесях с (Δ) ЧХУ и (\diamond) ДМСО и ТБЭ (64 см^{-1}) в смесях с (\bullet) ЧХУ и (\blacksquare) ДМСО от мольного соотношения компонентов смеси и зависимость ширины гауссовой кривой, использованной при аппроксимации спектров смеси ТБЭ и ДМСО, от мольного соотношения компонентов.

Несколько иной результат получен для растворов ацетамида в воде (Brandt et al., 2008). Низкочастотная полоса этого модельного вещества состоит из нескольких спектральных компонент (аппроксимирующую кривую достаточного высокого качества можно получить в виде линейной комбинации по меньшей мере трех гауссовых кривых). Для растворов ацетамида изменение относительных концентраций приводит к перераспределению относительных интенсивностей спектральных компонент, хотя возможно и одновременное незначительное изменение положений и ширин линий. Наблюдаемая спектральная неоднородность может быть связана с существованием цепочек водородно-связанных молекул ацетамида. Взаимодействие с растворителем (водой) несомненно влияет на длину цепочек и, следовательно, на относительные интенсивности низкочастотных компонент в спектре. Наблюдаемое для

растворов ацетамида уширение низкочастотной полосы, по-видимому, не следует связывать с изменением эффективной добротности.

Таким образом, влияние растворителей на низкочастотные колебательные резонансы модельных веществ, выражается в сдвиге, уширении и изменении формы линии. Наблюдаемые изменения не могут быть объяснены только изменением эффективного трения (добротности) в присутствии молекул растворителя. Наблюдаемые уширения НЧ линий в КР спектрах модельных веществ могут быть объяснены изменением относительных интенсивностей спектральных компонент.

Заключение. По данным колебательной спектроскопии и локальное (взаимодействие с субстратом), и поверхностное воздействие на молекулу белка приводит к конформационным изменениям молекулы в целом. Фоновый сигнал в КР спектрах белков и полипептидов имеет, по-видимому, флуоресцентную природу и существенно зависит от свойств макромолекулы. Образование водородных связей с молекулами растворителя влияет на параметры НЧ колебательных линий растворенных веществ; взаимодействие с молекулами растворителя приводит к частотным сдвигам и изменениям относительных амплитуд НЧ линий и не сводится к уменьшению эффективной добротности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Чернавский Д.С., Хургин Ю.И., Шноль С.Э. Об упругих деформациях белка-фермента // *Молекулярная биология*. — 1967. — т. 1. — с. 419–424.
- Arutyunyan N.R., Brandt N.N., Chikishev A.Yu., Lebedenko S.I., Romanovsky Yu.M. Nature of the broadband background in Raman spectra of aqueous solutions of α -chymotrypsin // *Laser Physics*. — 2004. — Vol. 14. — P. 1054.
- Arutyunyan N.R., Brandt N.N., Chikishev F.Yu., Lebedenko S.I., Parashchuk O.D., Razzhivin A.P. Broadband background in Raman spectra of proteins: deterministic signal or noise? // *Fluctuation and Noise Letters*. — 2005. — Vol. 5. — P. L233–L241.
- Brandt N.N., Chikishev A.Yu. Laser Raman spectrometer for the studies of biomolecules with monitoring temperature of the samples // *Laser Physics*. — 2002. — Vol. 12. — P. 647–652.

Brandt N.N., Chikishev A.Yu., Dolgovskii V.I., Kargovskii A.V., Lebedenko S.I.
Low-frequency vibrational motions in proteins: physical mechanisms and effect on functioning // *The European Physical Journal B*. — 2008. — Vol. 65. — P. 419–424.

Chikishev A.Yu., Lucassen G.W., Koroteev N.I., Otto C., Greve J. Polarization sensitive coherent anti-Stokes Raman scattering spectroscopy of the amide-I band of proteins in solution // *Biophysical Journal*. — 1992. — Vol. 93. — P. 976.

LASER SPECTROSCOPY AND DYNAMICS OF BIOMACROMOLECULES

Chikishev A. Yu.

The methods of laser spectroscopy are employed in the study of intramolecular structural changes related to the functional activity of protein molecules.