

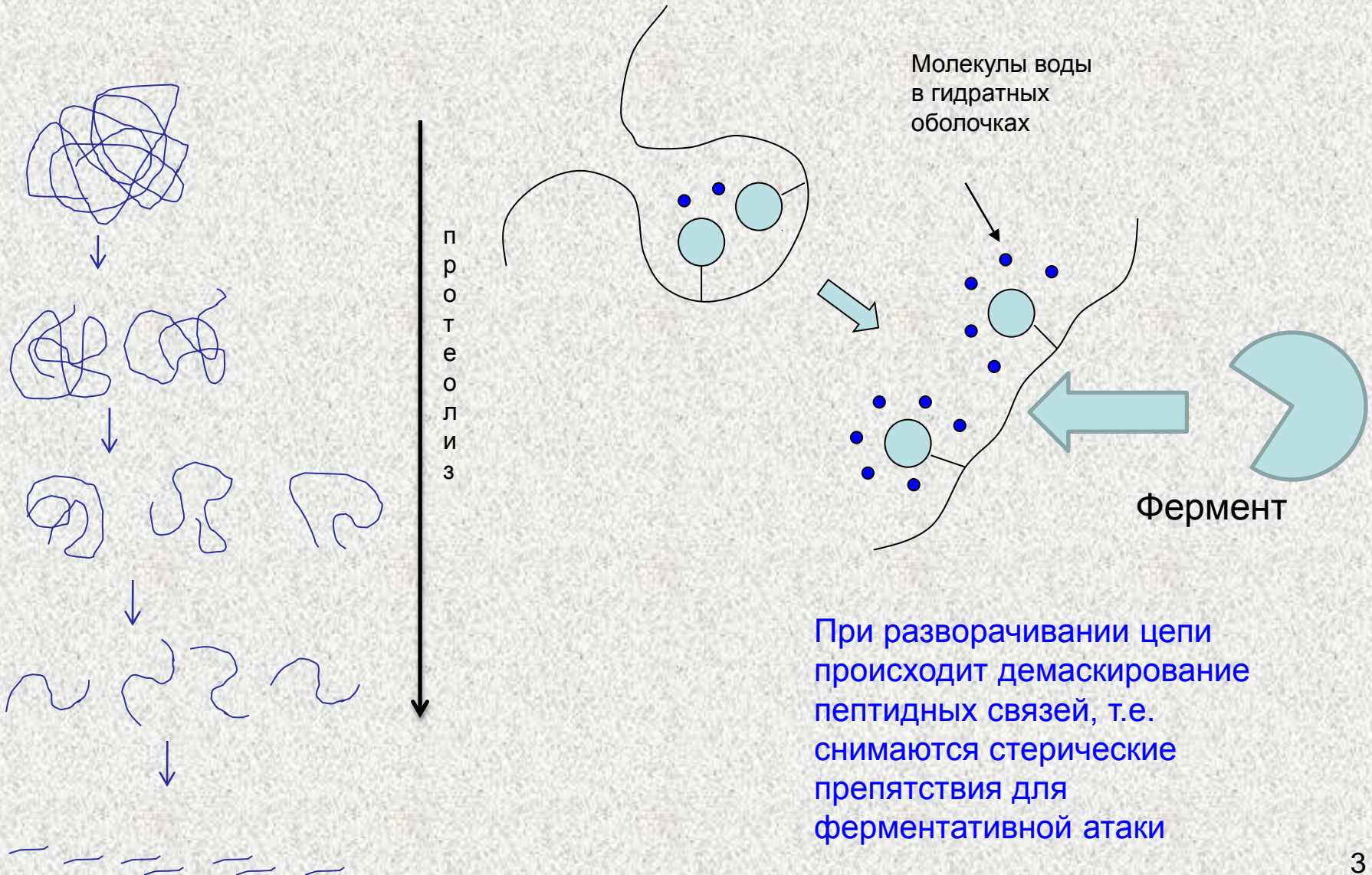
Руководитель: внс дхн М.М. Воробьев

Лаборатория **Химической кинетики и спектральных методов изучения гидратации биополимеров**

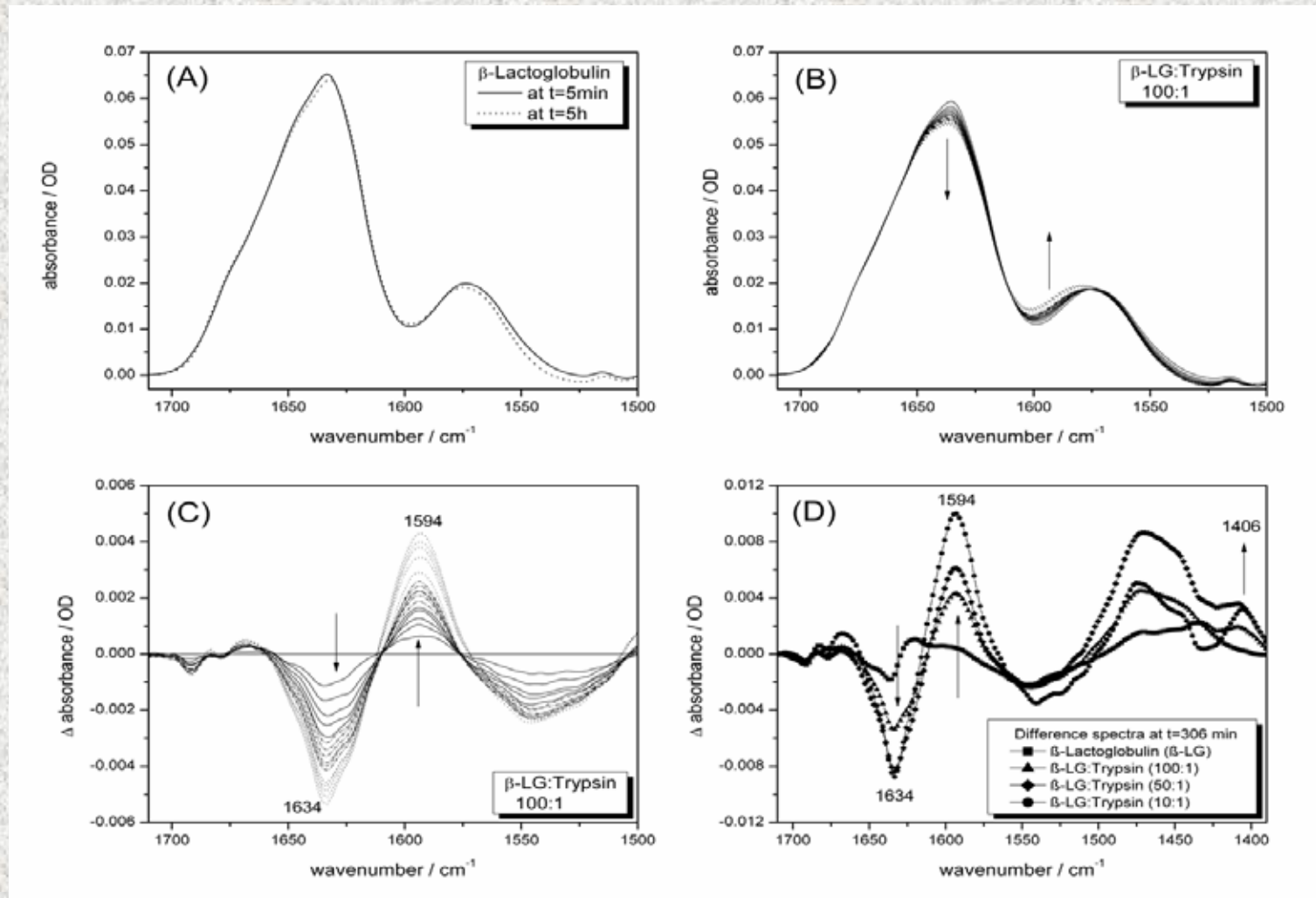
Направления исследований:

1. Изучение кинетики гидролиза пептидов.
2. Изучение кинетики гидролиза эфирных субстратов полимерными катализаторами.
3. Количественное изучение гидратации полимеров методом миллиметровой спектроскопии.

Физическая составляющая протеолиза – демаскирование и разворачивание полипептидной цепи



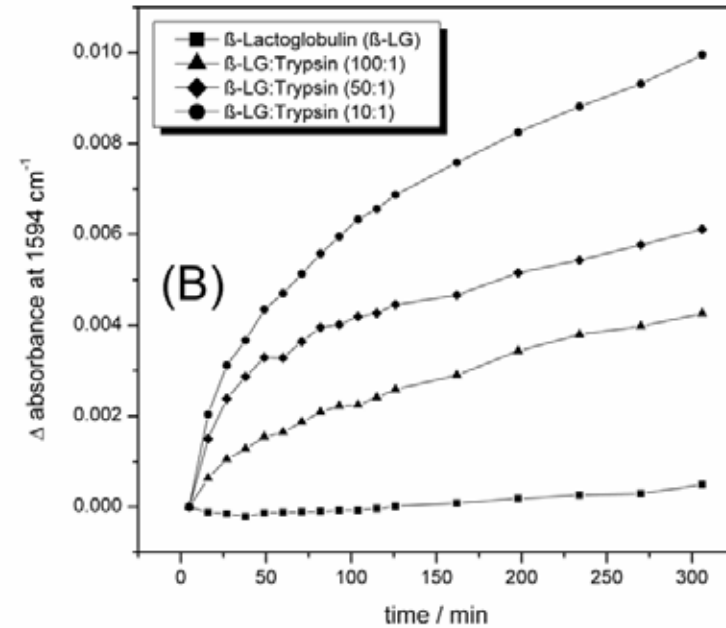
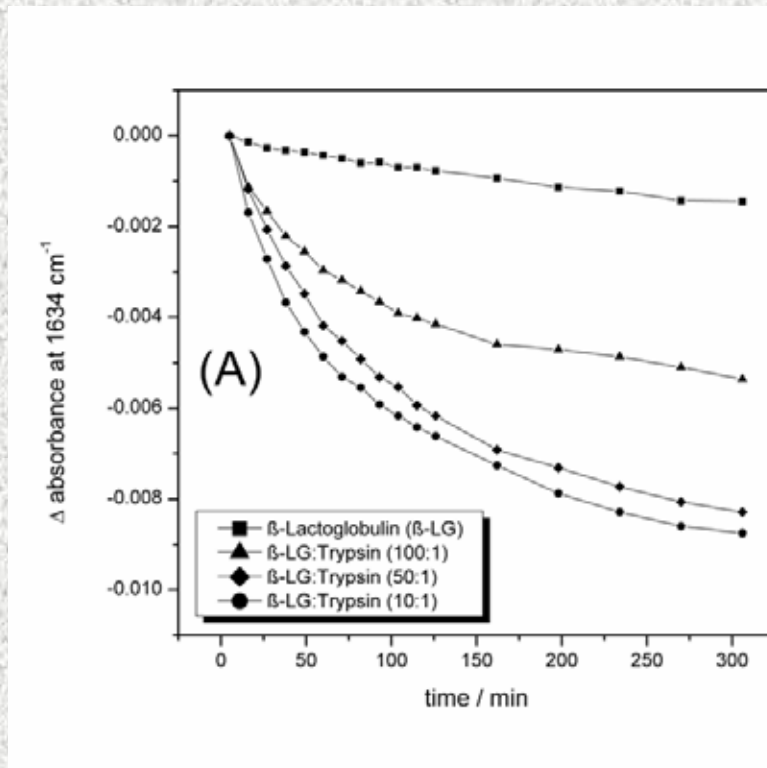
Изменение ИК-спектров при протеолизе β -лактоглобулина трипсином



Кинетика протеолиза β -лактоглобулина трипсином

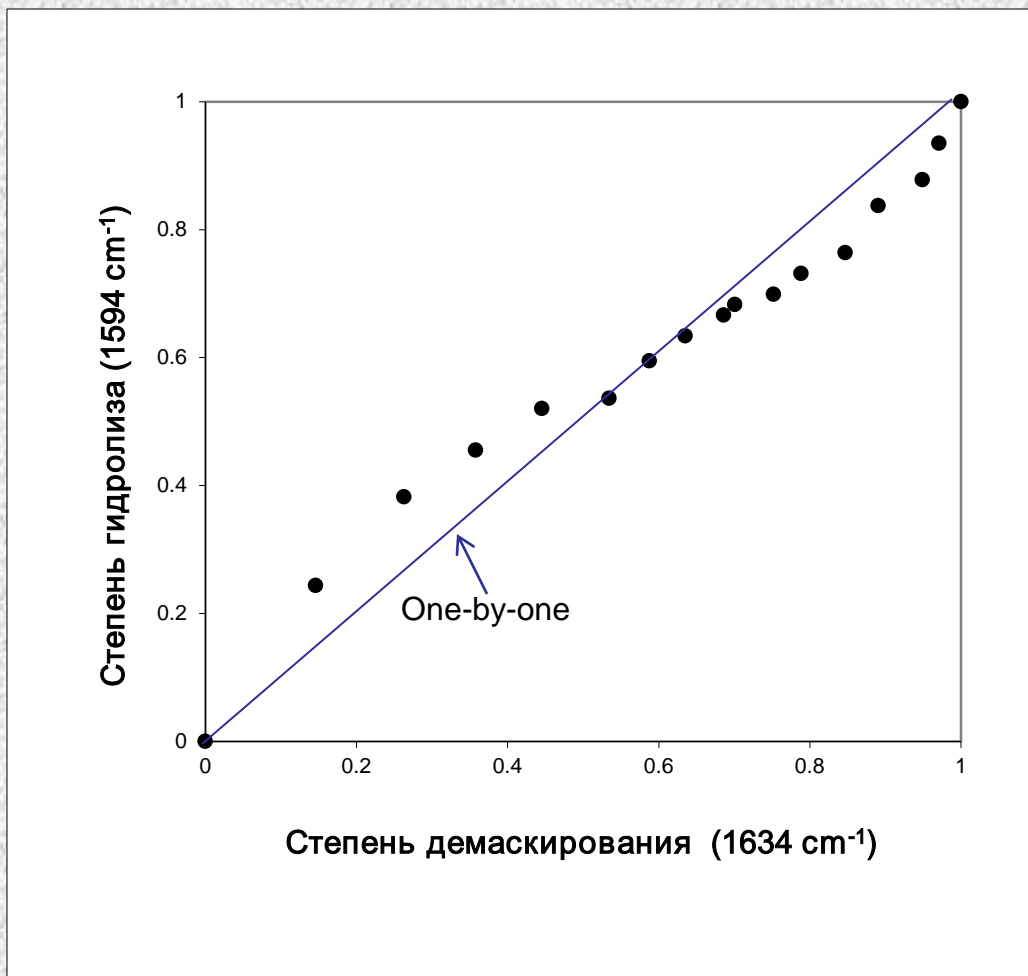
Уменьшение концентрации β -листов

Увеличение концентрации концевых групп (COO^-)



Соотношение гидролиза и демаскирования при протеолизе β -лактоглобулина трипсином по данным ИК-спектроскопии

Увеличение количества концевых групп \uparrow



b=LG:Trypsin (50:1)
pD=8.0 t=36°C

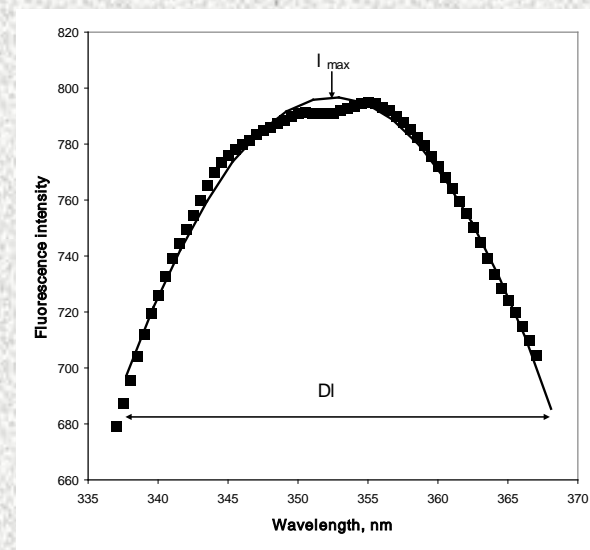
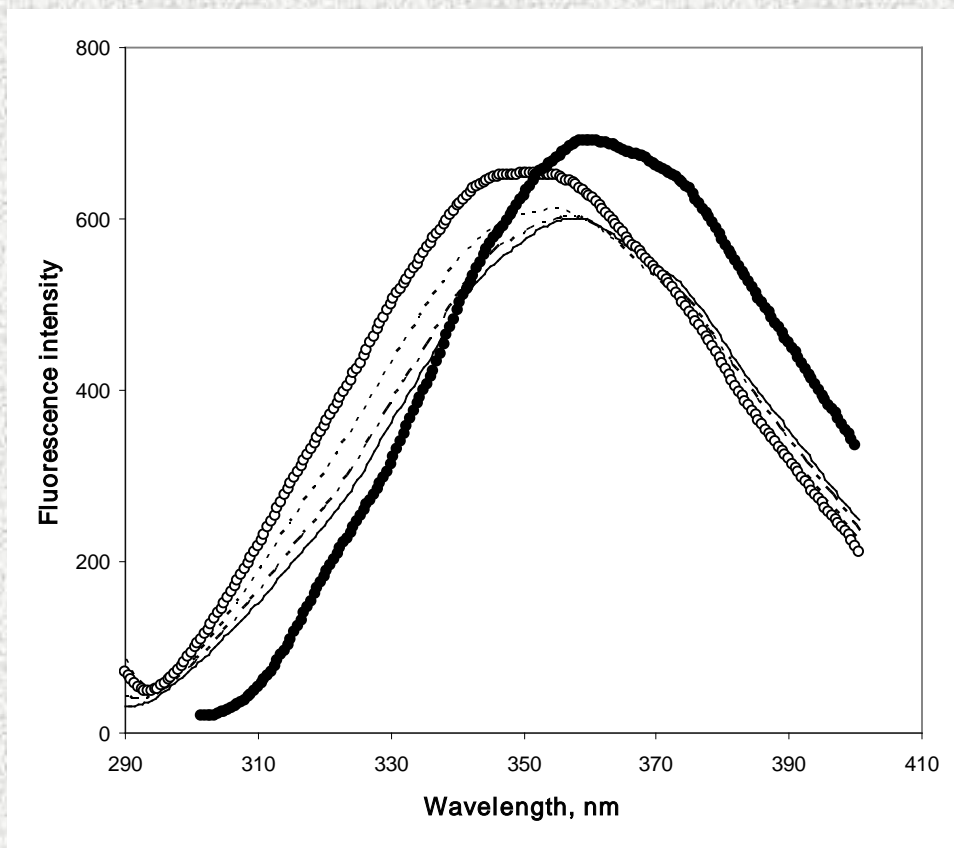
Тип протеолиза one-by-one



$$m \approx 1 \quad k_d \gg k_h$$

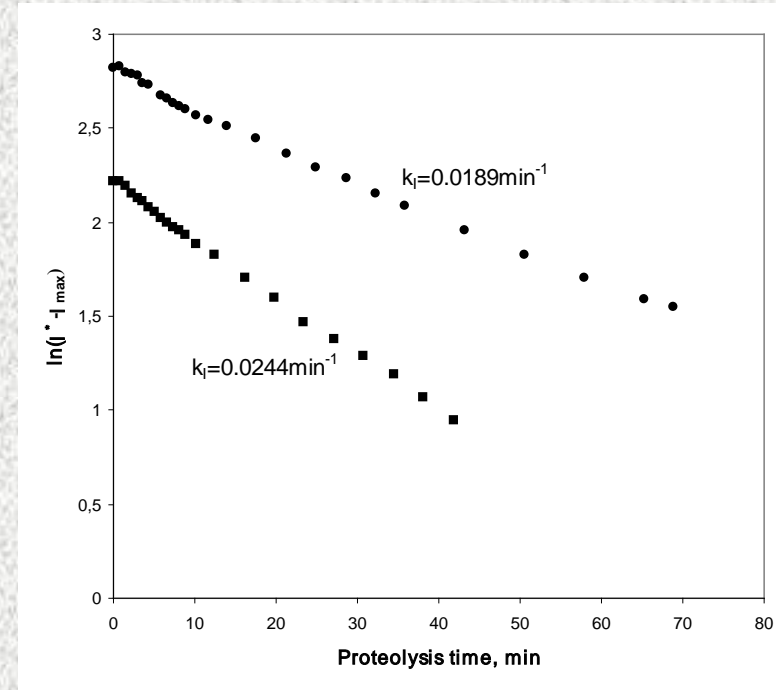
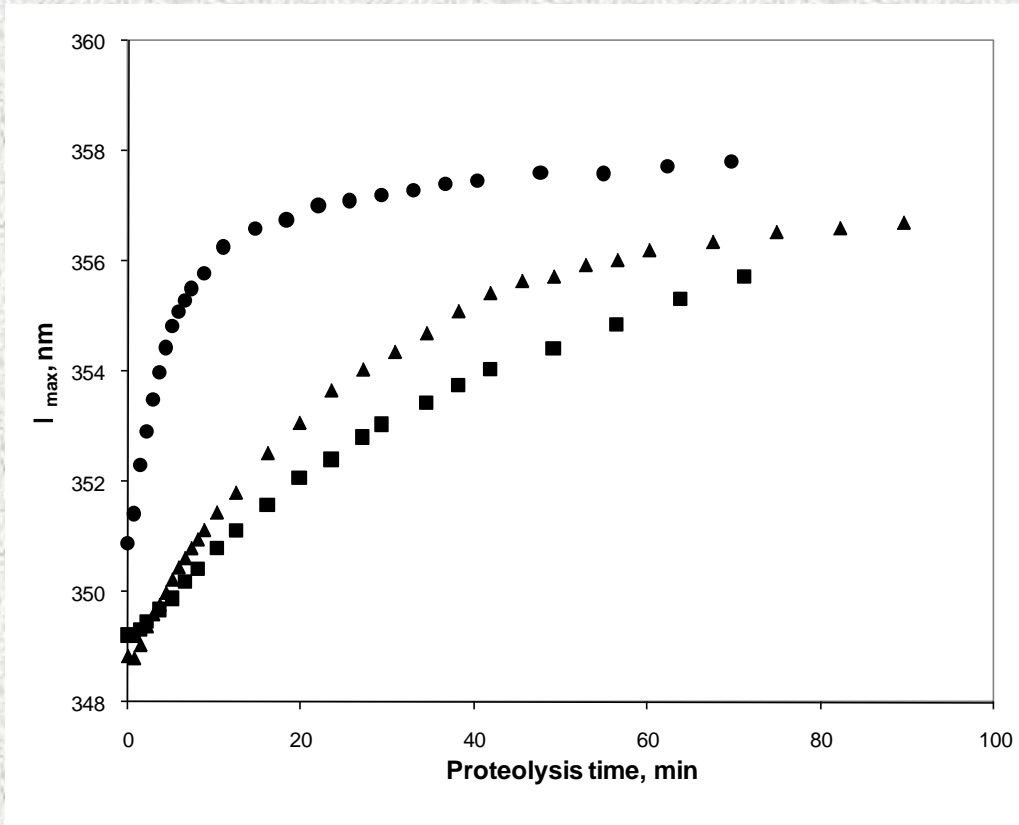
Разрушение β -структур \rightarrow

Сдвиг максимума флуоресценции остатка TRP в ходе протеолиза β -казеина трипсином



Нативный β -казеин, гидролизованный β -казеин за 3 мин протеолиза (- - -), 15 мин (— · —), и 60 мин (————). Аминокислота L-Trp (●). Возбуждение 285 нм.

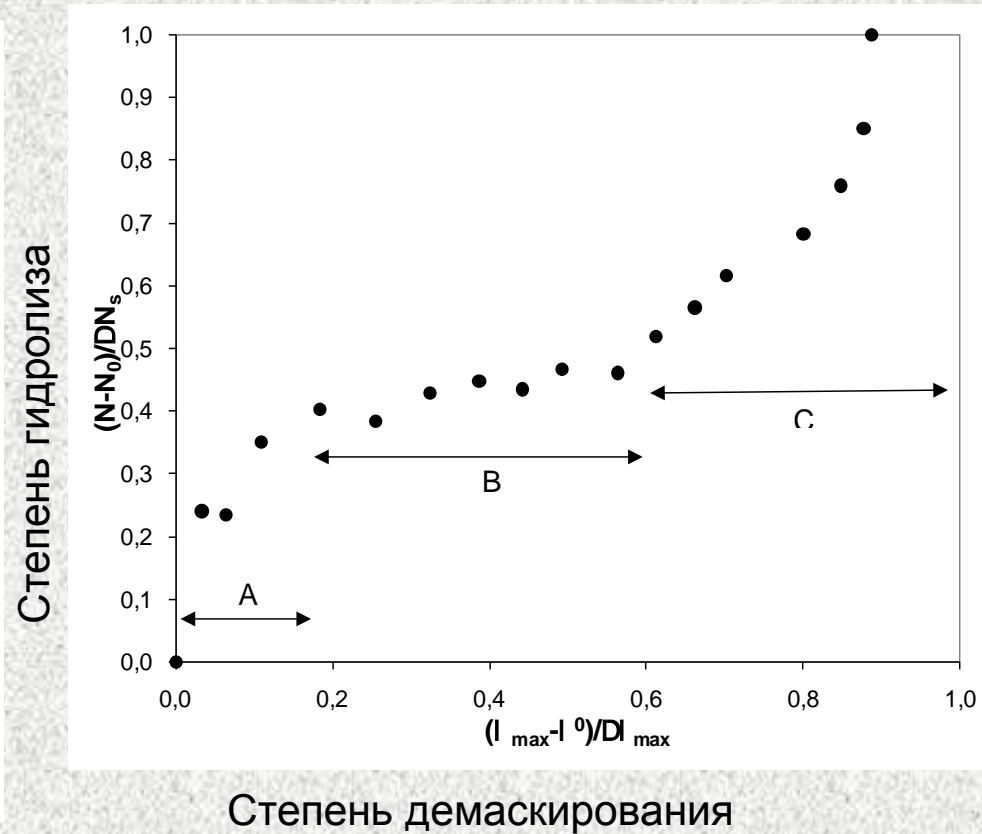
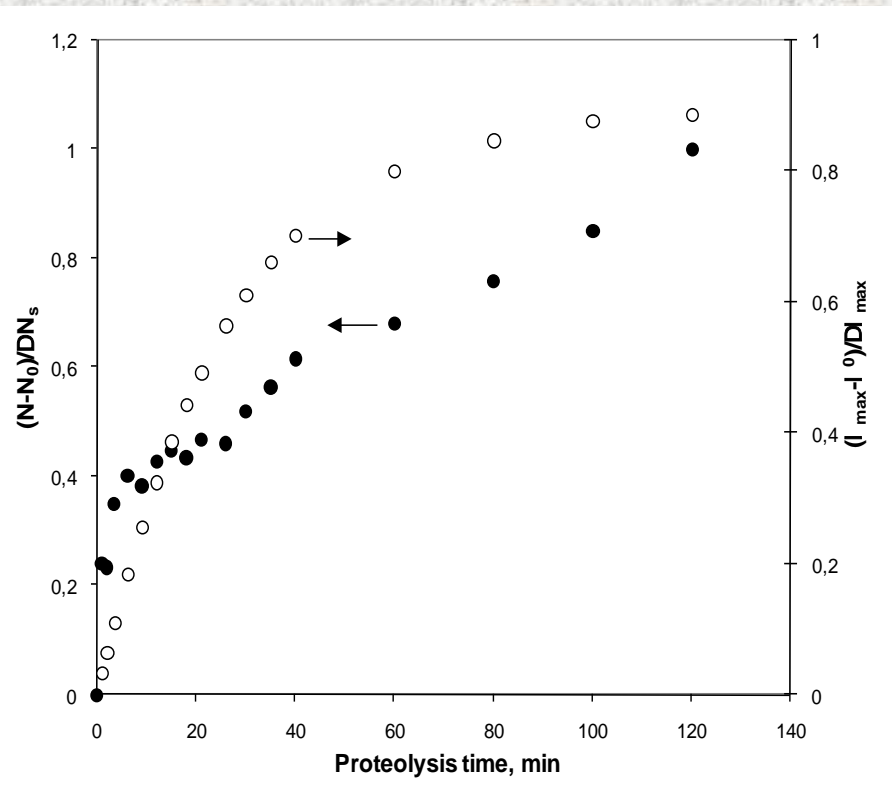
Кинетика демаскирования пептидных связей



Протеолиз β -казеина (0.25 г/л) трипсином при концентрации фермента 0.00025 г/л (\blacksquare), 0.0005 г/л (\blacktriangle), and 0.0025 г/л (\bullet), температура 37°C, pH 7.9.

Демаскирование при протеолизе β -LG (\bullet) при концентрации трипсина 0.005 г/л и β -CN (\blacksquare) при концентрации трипсина 0.0005 г/л

Сопоставление кинетики демаскирования и гидролиза связей

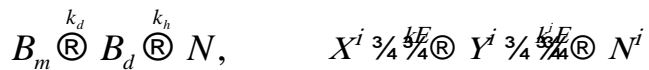


Кинетическая кривая для гидролиза (●) и демаскирования (○) при протеолизе β -CN (0.25 г/л) при концентрации трипсина 0.0005 г/л.

Вычисление параметров протеолиза в рамках двухстадийной схемы

На первой стадии изначально недоступные для ферментативной атаки маскированные пептидные связи B_m превращаются в демаскированные связи B_d .

На второй стадии эти связи гидролизуются в соответствии со специфичностью, определяемой аминокислотной последовательностью:



где k_d - константа скорости демаскирования, k_h (k^j) - константа скорости гидролиза демаскированных связей, N - концевые группы (COO^- , NH_3^+).

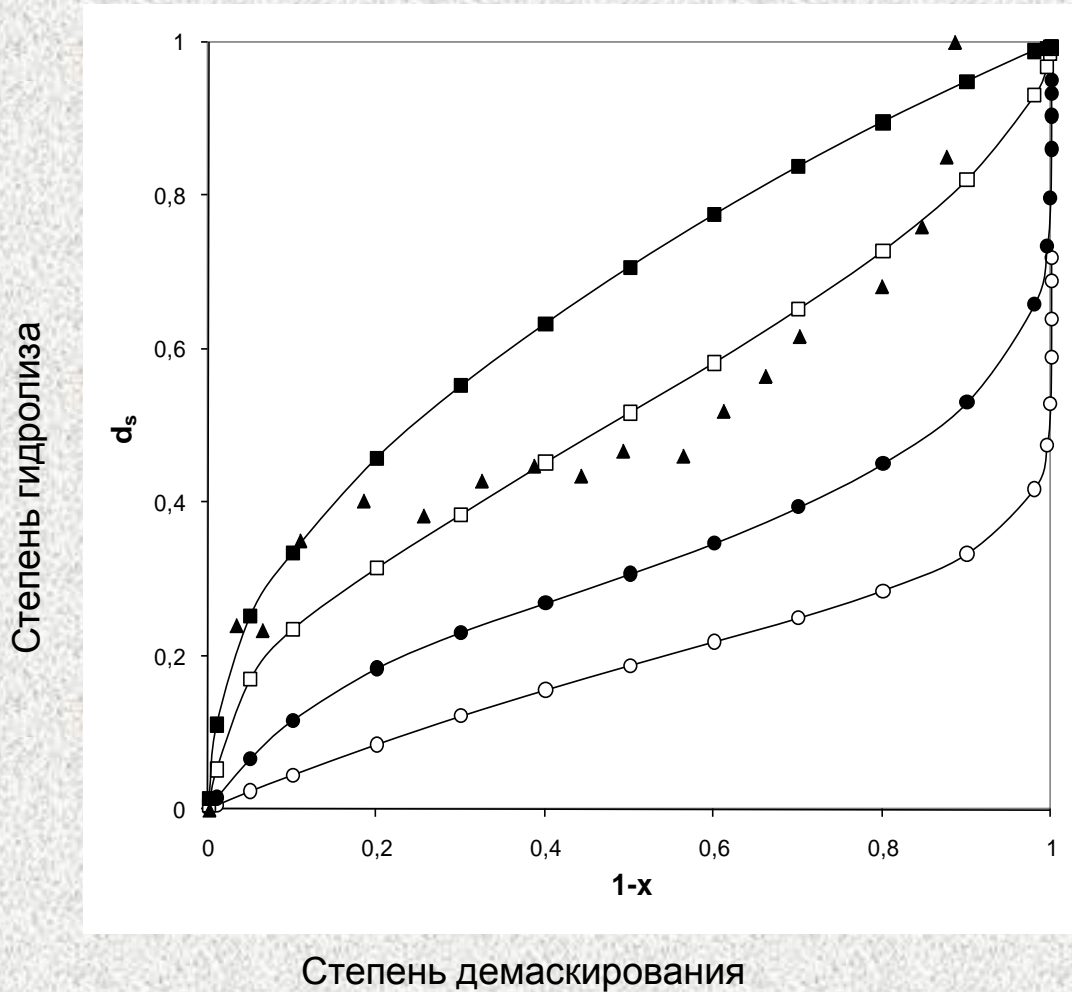
$$mx \frac{1 + x^{a^j} b^j}{a^j} \frac{X_0^j}{X_0^j} = 1 - d - mx$$

$$a^j = \frac{k^j}{k_d} - 1 \quad b^j = a^j \frac{Y_0^j}{X_0^j} - 1$$

k_d – константа скорости демаскирования

m – начальная степень маскирования пептидных связей

Определение m и k_d



$$m=0.20\pm 0.19$$
$$k_d=0.031\pm 0.013$$

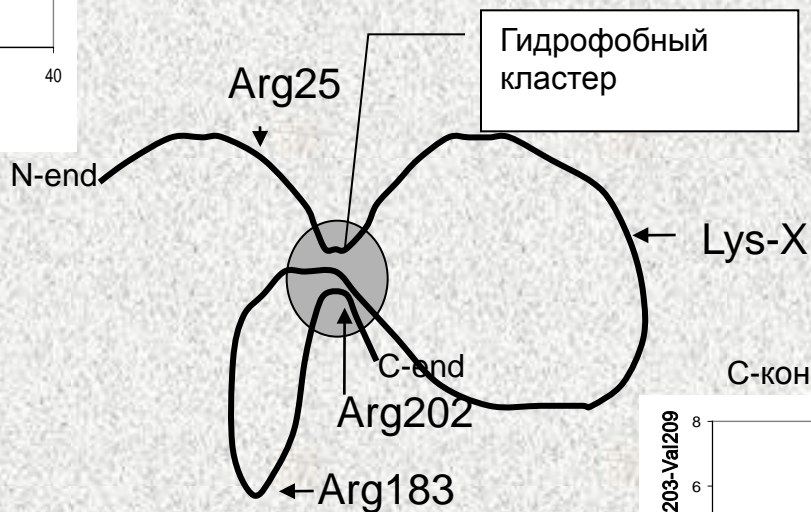
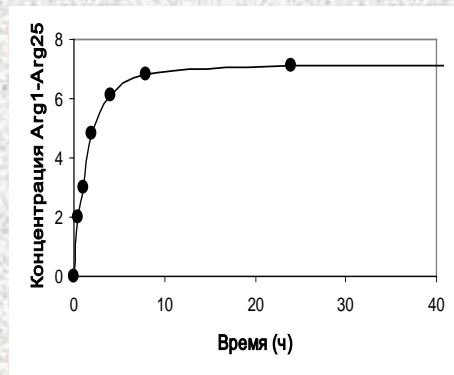
$$k_{\text{Lys-X}}=0.04$$

$$k_d/k_{\text{Lys-X}}=0.78$$

Вычисленные кривые: $m=0.2$; $k_d=0.4$ (\circ), 0.12 (\bullet), 0.031 (\square), 0.012 (\blacksquare).
Эксперимент (\blacktriangle)

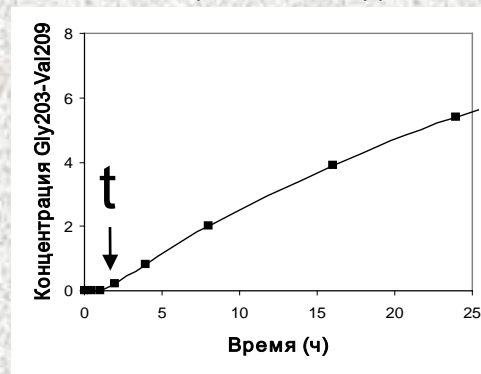
Соотношение констант скоростей по данным HPLC для протеолиза β -казеина трипсином

N-концевой пептид



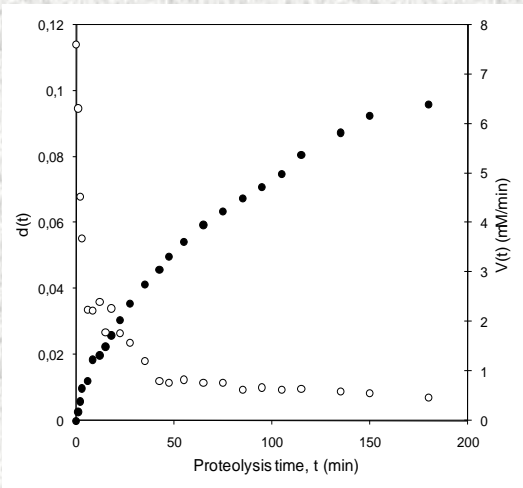
$$k_d/k_{\text{Lys-X}} = 1.14 \pm 0.18$$

C-концевой пептид

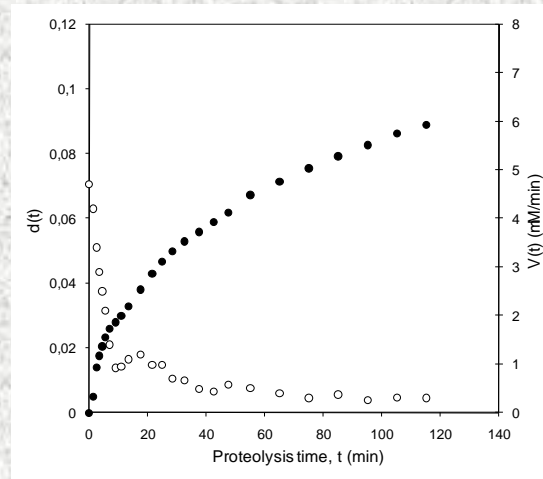


Кинетика протеолиза суммарного казеина химотрипсином

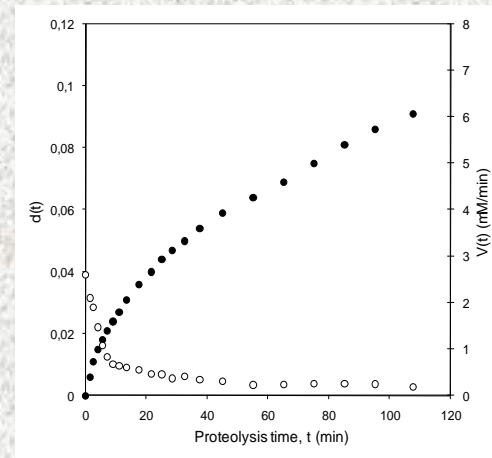
S=0.4г/л



S=0.2г/л



S=0.1 г/л

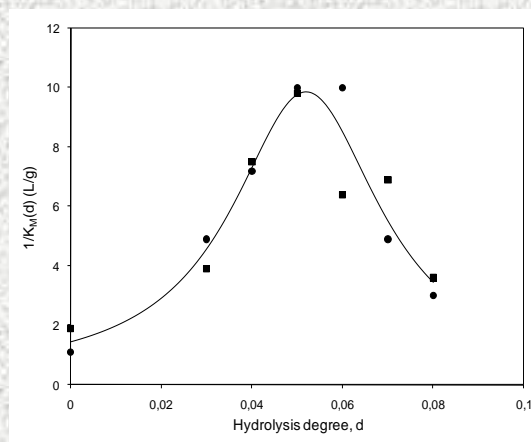


Степень гидролиза (●)

Скорость гидролиза (○)

Время протеолиза

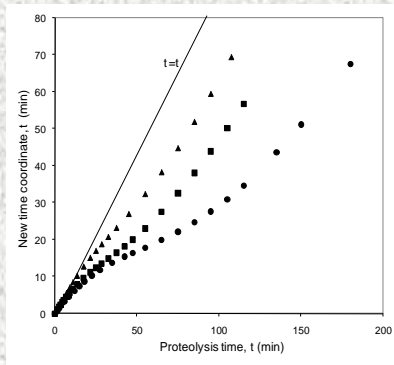
Обратная величина
константы Михаэлиса



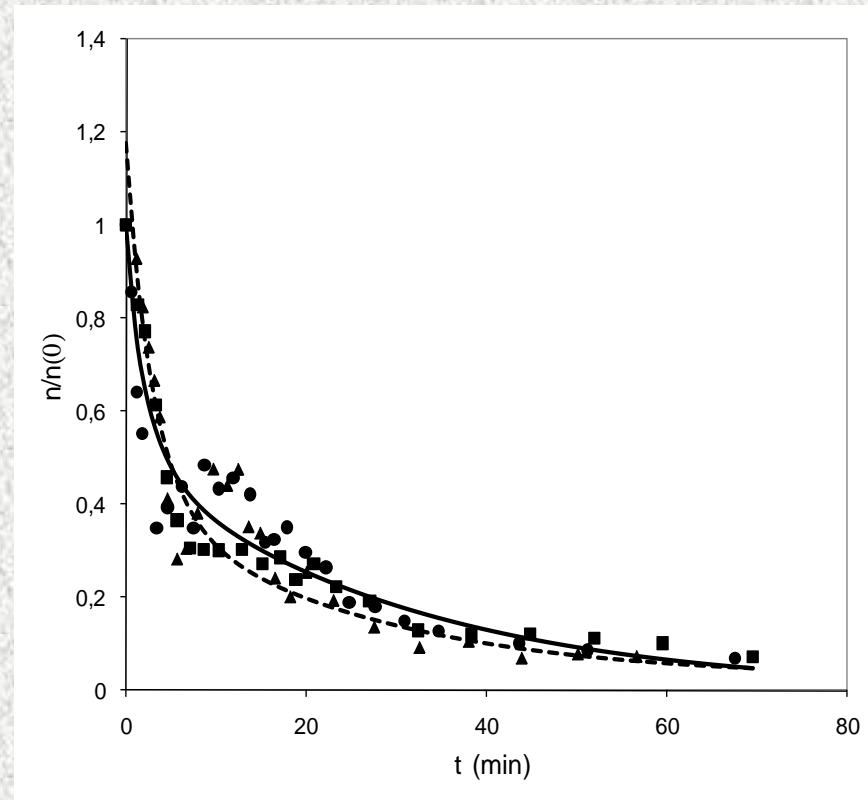
Степень гидролиза

Определение параметров k_h , k_d и m .

k_h – константа скорости гидролиза, k_d – константа скорости демаскирования, m – начальная степень маскирования



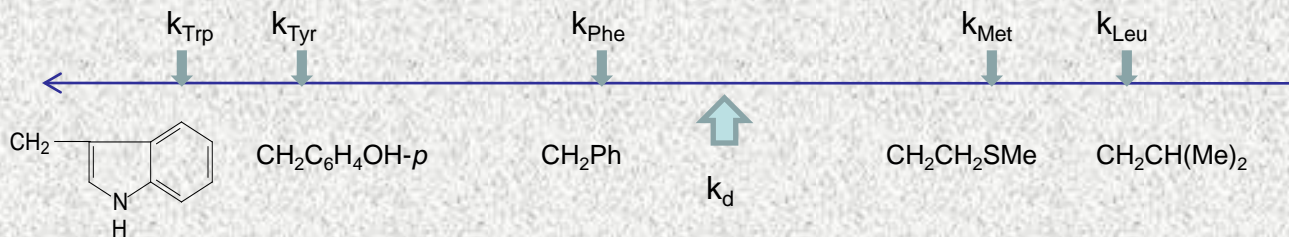
Концентрации субстрата:
0.4 (●), 0.2 (■), и 0.1 (▲)
г/л.



$$\frac{n}{n(0)} = \frac{1}{(1-m) \sum_i k^i c_0^i} \left(\sum_i m k_d e^{-k_d t} + \frac{k^i c_0^i}{k_h k^i - k_d} + m \sum_i k^i c_0^i \frac{1 - e^{-k_h k^i t}}{m} - \frac{k_d}{k_h k^i - k_d} e^{-k_h k^i t} \right)$$

Параметры протеолиза химотрипсином

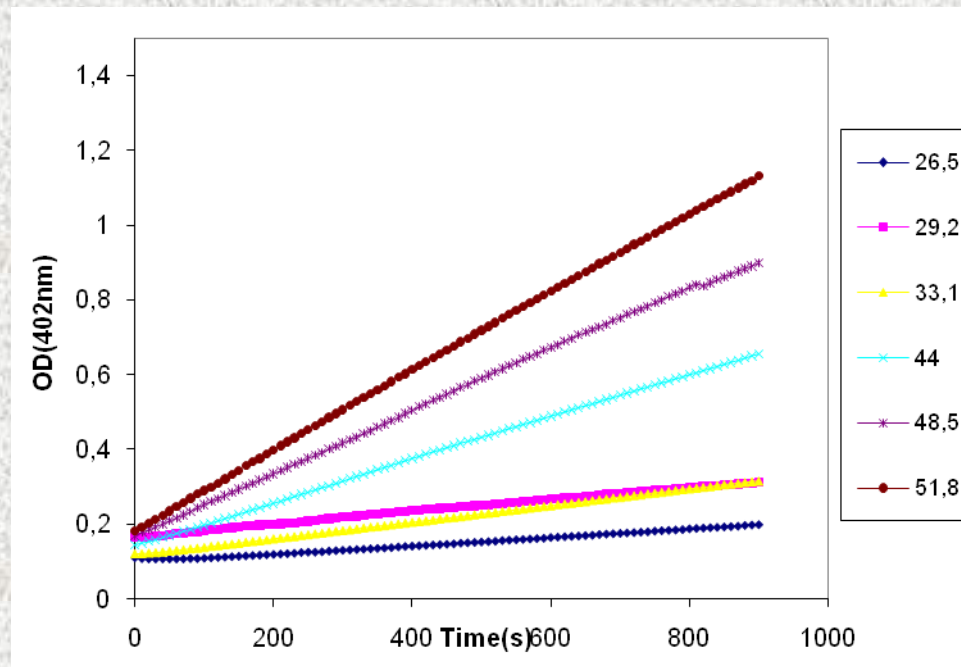
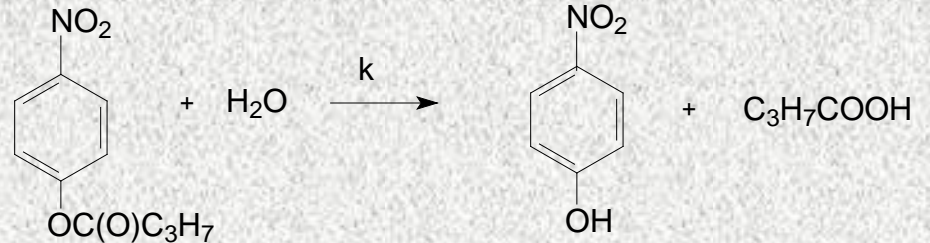
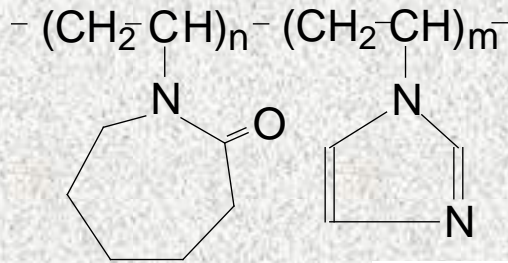
Подход	Концентрация субстрата (g/L)	k_h (min ⁻¹)	k_d (min ⁻¹)	m
I	0.4	2.76±0.71	0.044±0.007	0.84±0.04
I	0.2	0.84±0.38	0.056±0.038	0.51±0.07
I	0.1	0.81±0.14	0.022±0.010	0.56±0.02
I	Все концентрации	1.22±0.25	0.048±0.010	0.65±0.01
II	0.4	0.64±0.31	0.061±0.045	0.60±0.04
II	0.2	0.44±0.16	0.058±0.041	0.51±0.04
II	0.1	0.42±0.10	0.040±0.024	0.49±0.03
II	Все концентрации	0.45±0.11	0.052±0.025	0.51±0.03



2. Изучение кинетики гидролиза эфирных субстратов полимерными катализаторами.

Гидролиз эфирных субстратов сополимерами НВКЛ/НВИА

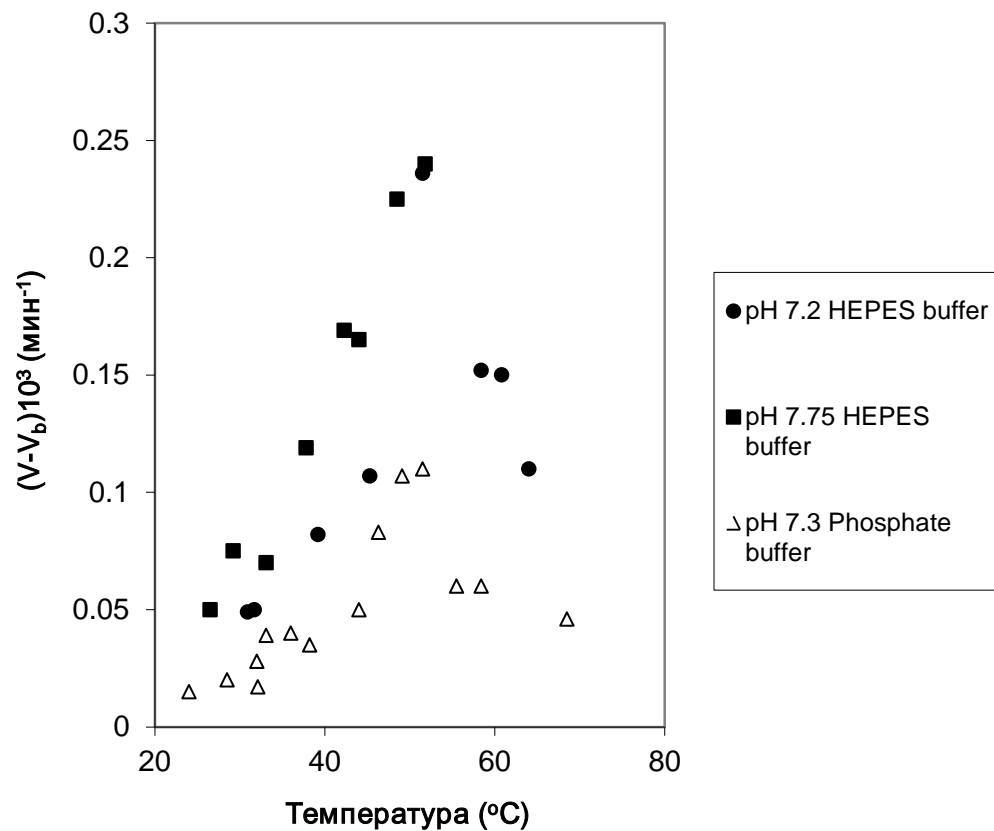
Сополимеры N-винилкапролактама и N-винилимидазола



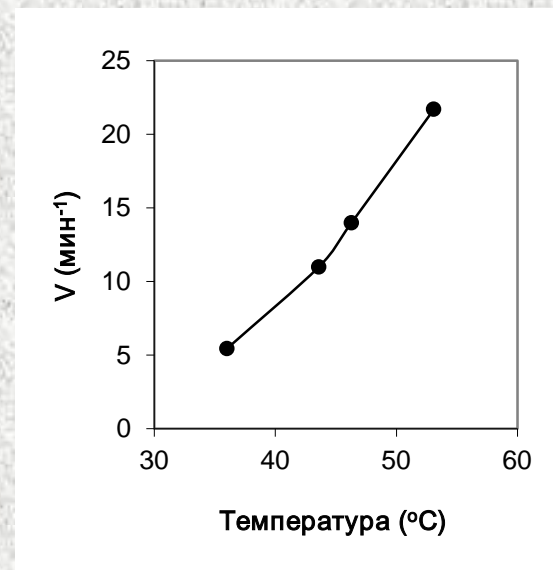
Температурная зависимость скорости гидролиза сополимером НКЛ/НВИА(65)-Р

Гидролиз сополимером НКЛ/НВИА(65)-Р

V – скорость гидролиза субстрата сополимером в буфере;
 V_b – скорость гидролиза субстрата в буфере без сополимера.



Гидролиз 1-метилимидозолом



3. Количественное изучение гидратации полимеров методом миллиметровой спектроскопии.

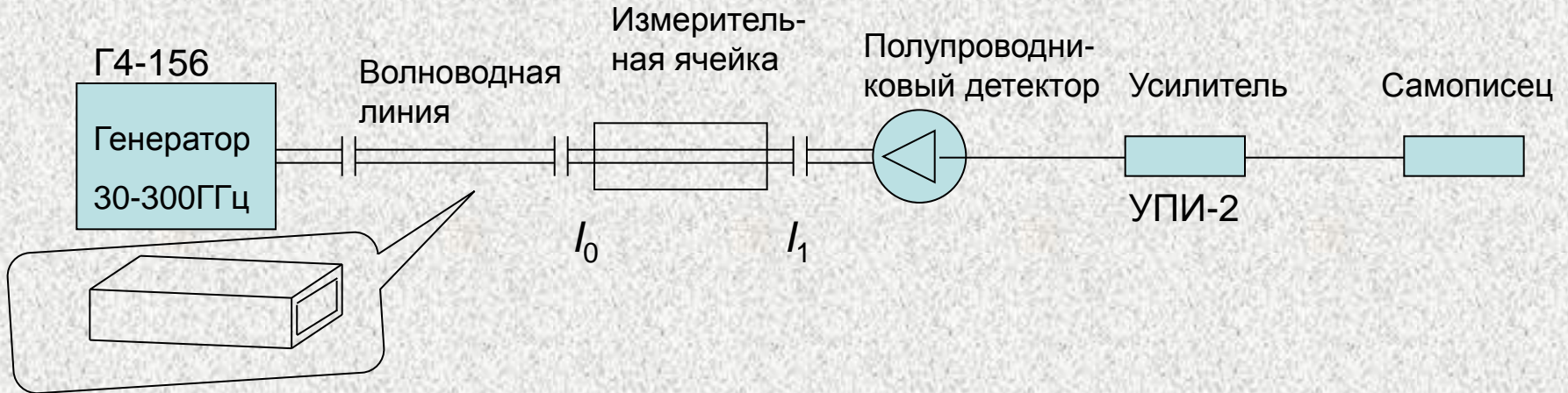
Частотный диапазон миллиметровой спектроскопии



Yu.I. Khurgin, V.A. Kudryashova, V.A. Zavizion, O.V. Betski. Millimeter Absorption Spectroscopy of Aqueous Systems, in *Adv. Chem. Phys. Series*, W. Coffey, Ed., vol. 87, J. Wiley & Sons, New York 1994, p. 483.

Vorob'ev M.M. Water mobility around kosmotropic and chaotropic solutes: Absorption spectroscopy in the millimeter range, in *Water science for food, health, agriculture and environment*. Z .Berk, R.B. Leslie, P.J. Lillford, & S. Mizrahi (Eds.) Lancaster & Basel: Technomic Publishing, 2001, p. 59-72.

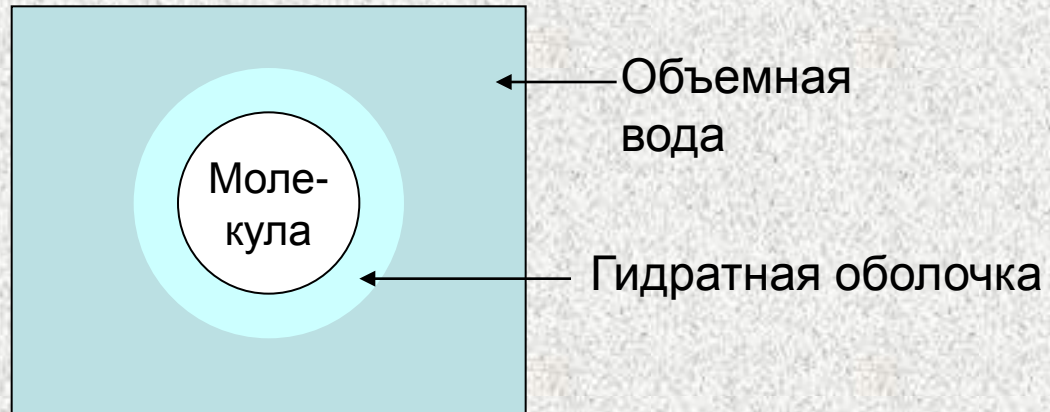
Схема экспериментальной установки



- Используется волноводная техника

- Нетепловой эффект миллиметрового излучения (1-20 мВт/см²)

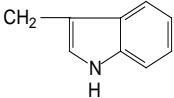
Количественное выражение гидратации

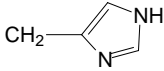
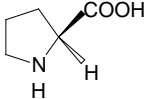


Число гидратации:
$$N = \frac{dC_1}{C_2} = \frac{a_{H_2O} - a_{\text{exp}}}{k_1 C_2}$$

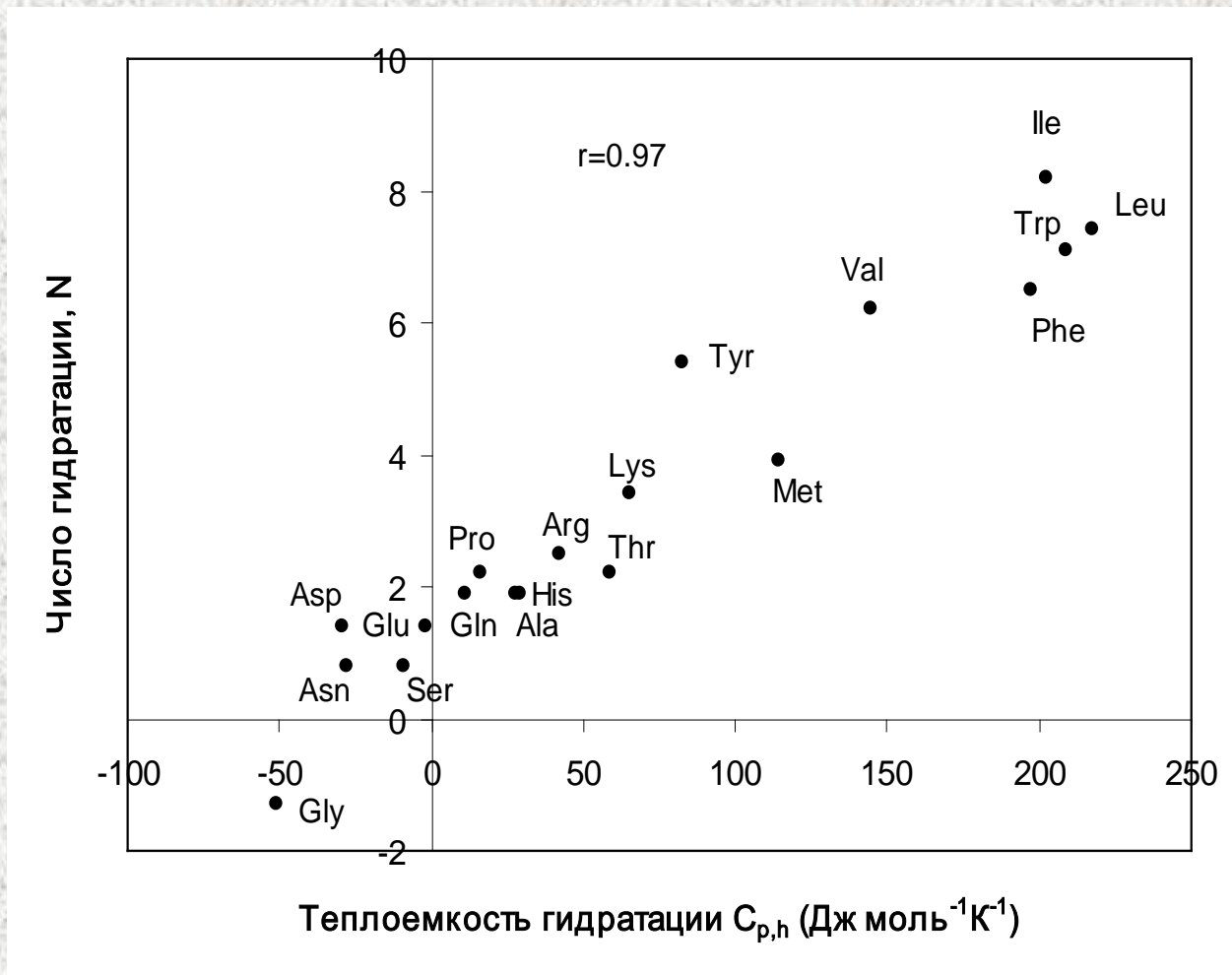
где a_{exp} измеренное поглощение раствора $-\log(I_1/I_0)$,
 a_{H_2O} вклад водной компоненты $k_1 C_1$,
 C_1 и C_2 молярные концентрации воды и растворенного соединения,
 k_1 коэффициент поглощения излучения чистой водой.

Числа гидратации природных аминокислот $\text{H}_3\text{N}^+\text{CHR}\text{COO}^-$

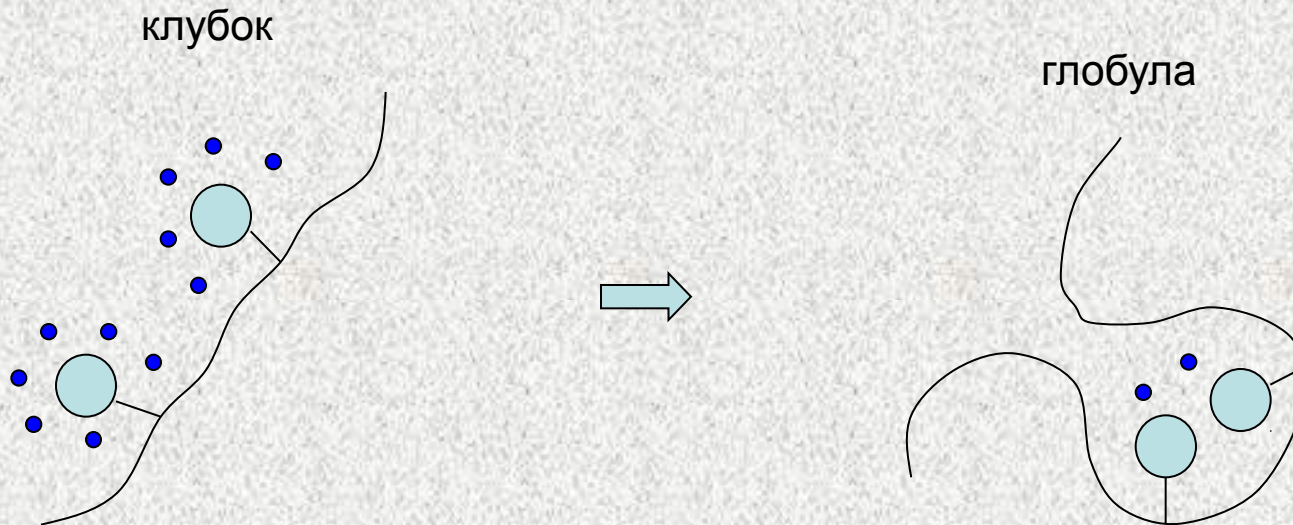
Аминокис- лота	Боковой радикал (R)	<i>N</i>
Gly	H	-1.3±0.1
Ala	Me	1.9±0.1
Val	CH(Me) ₂	6.2±0.2
Leu	CH ₂ CH(Me) ₂	7.4±0.2
Ile	CH(Me)Et	8.2±0.2
Phe	CH ₂ Ph	6.5±0.2
Tyr	CH ₂ C ₆ H ₄ OH- <i>p</i>	5.4±0.1
Trp		7.1±0.2
Met	CH ₂ CH ₂ SMe	3.9±0.1

Аминокис- лота	Боковой радикал (R)	<i>N</i>
Asp	CH ₂ COOH	1.4±0.1
Glu	CH ₂ CH ₂ COOH	1.4±0.1
Asn	CH ₂ CONH ₂	0.8±0.1
Gln	CH ₂ CH ₂ CONH ₂	1.9±0.1
Arg	(CH ₂) ₃ NHC(=NH)NH ₂	2.5±0.1
Lys	(CH ₂) ₄ NH ₂	3.4±0.2
His		1.9±0.1
Ser	CH ₂ OH	0.8±0.1
Thr	CH(OH)CH ₃	2.2±0.1
Pro		2.2±0.1

Корреляция чисел гидратации и теплоемкостей гидратации для природных аминокислот



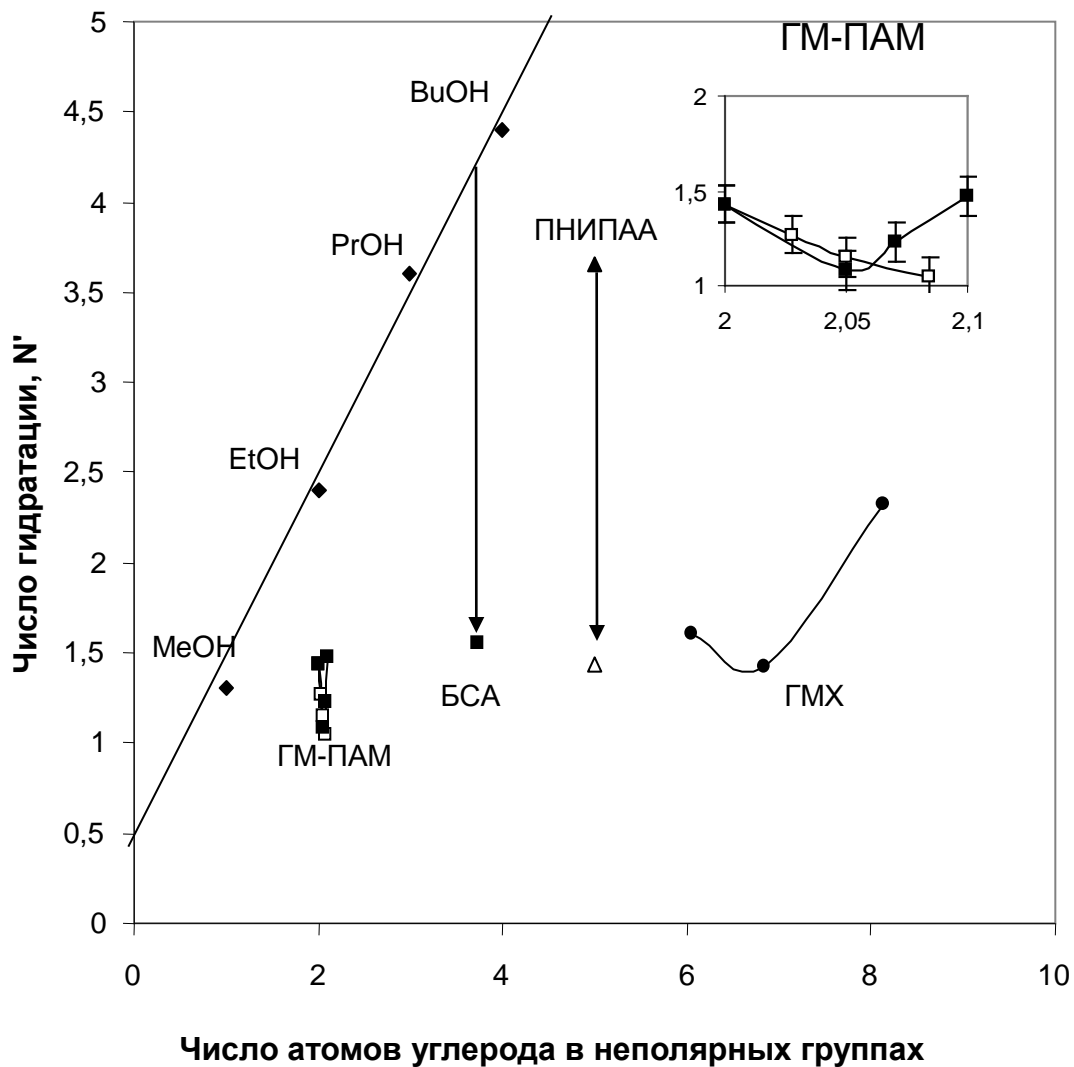
Изменение количества связанной воды при переходах клубок – глобула в полимерах



- Молекулы H₂O на границе с неполярными группами

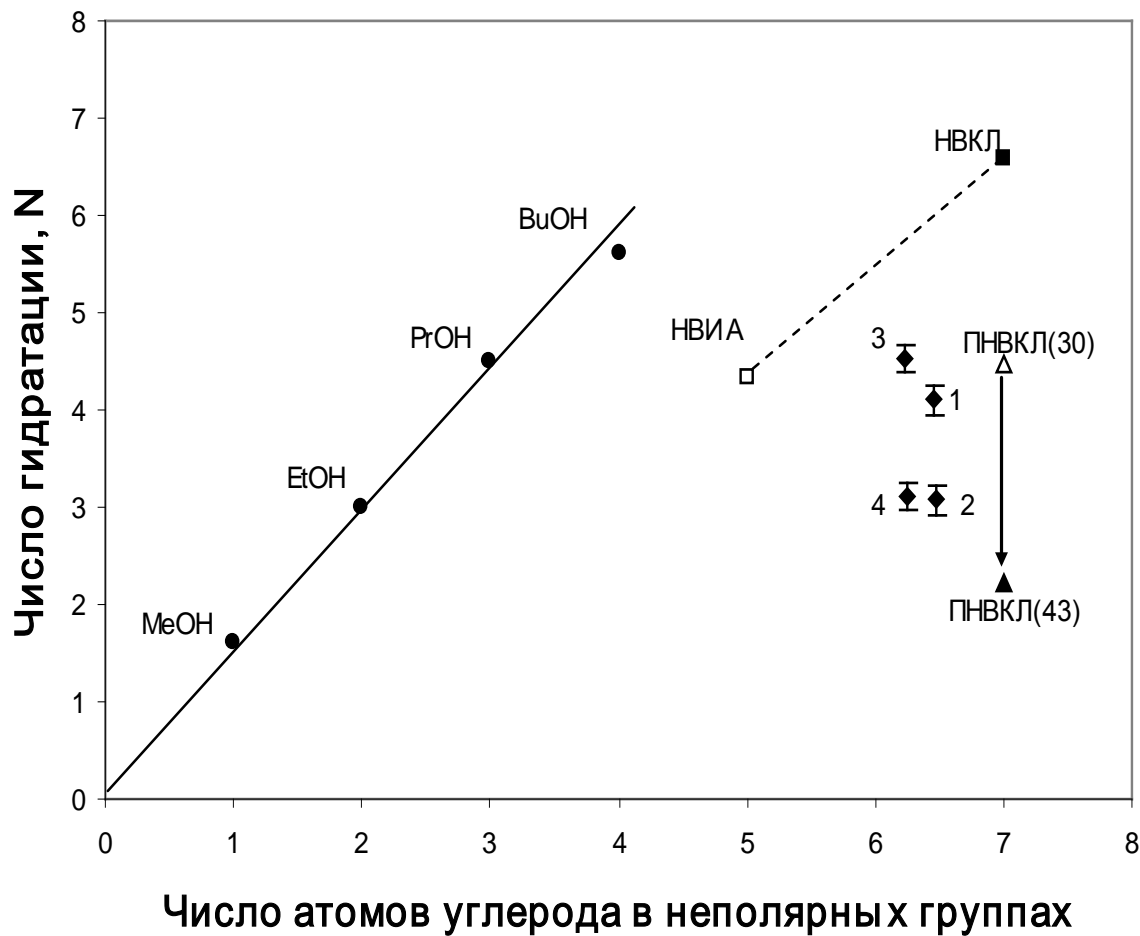
$$N_{\text{клубок}} - N_{\text{глобула}} > 0$$

Гидратация гидрофобно-модифицированных полимеров



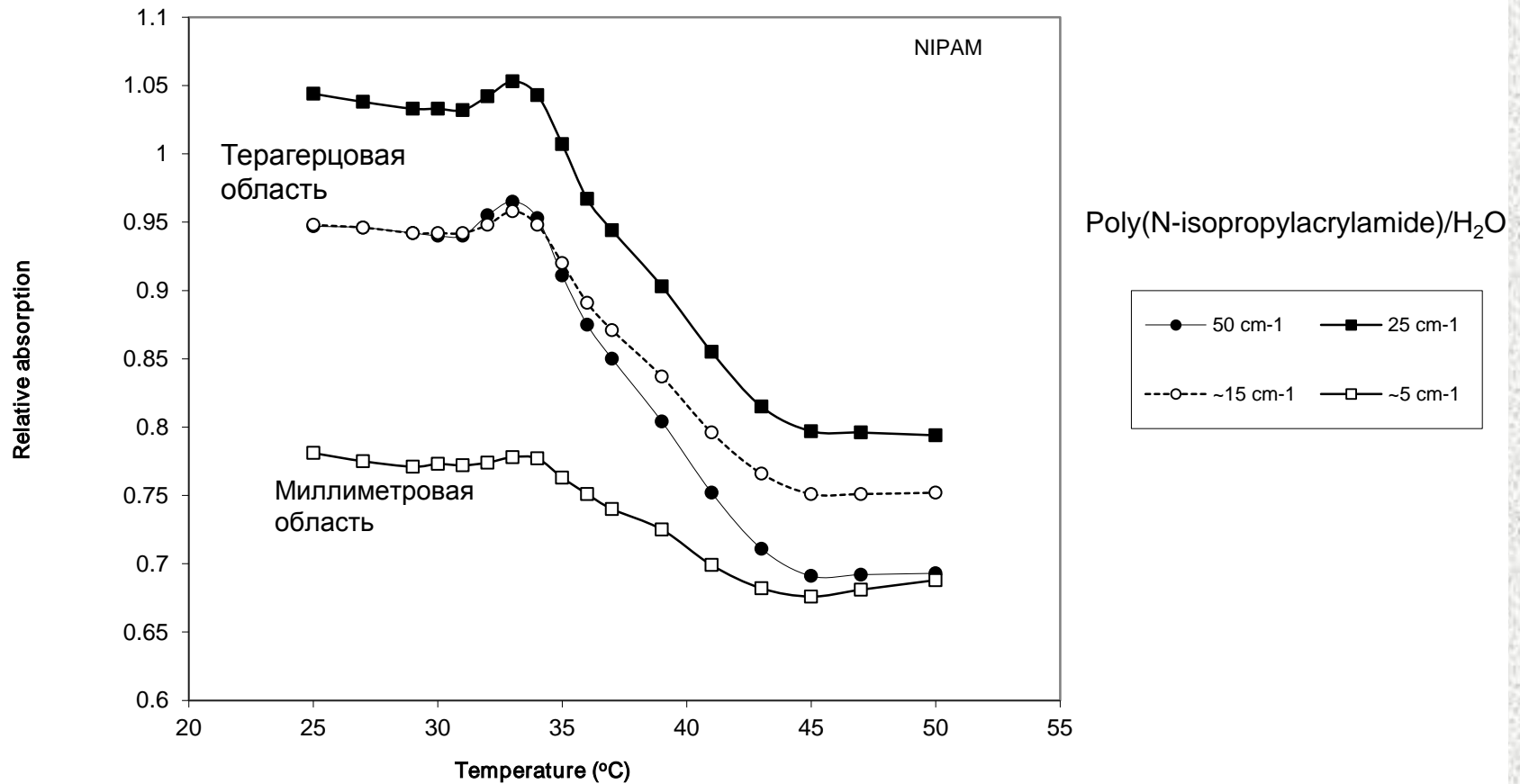
Зависимость относительного числа гидратации N' от числа атомов углерода в неполярных группах в расчете на одно звено. ПАМ и гидрофобно-модифицированный ПАМ: АМ/НМК - ■, АМ/ДДМК - □; БСА - ○; хитозан и гидрофобно-модифицированный хитозан - ●; ПНИПАА (клубок) - ▲; ПНИПАА (глобула) - Δ. Прямая линия соответствует алифатическим спиртам (◆).

Гидратация НВКЛ/НВИА сополимеров



Зависимость числа гидратации N от числа атомов углерода в неполярных группах в расчете на одно звено. Мономеры N -винилимидазола (\square) и N -винилкапролактама (\blacksquare); полимеры ПНВКЛ при 28°C (Δ) и при 43°C (\blacktriangle); сополимеры НВКЛ/НВИА (\blacklozenge) 1 - НВКЛ/НВИА(65)-Р, 2 - НВКЛ/НВИА(65)-НР, 3 - НВКЛ/НВИА(25)-Р, 4 - НВКЛ/НВИА (25)-НР. Стрелка соответствует переходу клубок \rightarrow глобула для ПНВКЛ. Растворимые (Р) и нерастворимые (НР) фракции при 65°C.

Определение конформационных переходов в терагерцовой области (Spectra3000, Bruker)



Сотрудничество

- Лаборатория физиологически активных биополимеров ИНЭОС РАН (Зав. лаб. проф., дхн Ямсков И.А.)
- Лаборатория гомолитических реакций элементоорганических соединений ИНЭОС РАН (Зав. лаб. дхн Кочетков К.А.)
- Bruker-Moscow (Зам. Ген. директора ООО Брукер к.ф.-м.н. А. Вахтель).
- Институт биофизики Университета им. Гёте (Франкфурт на Майне, Германия) (Директор института проф. W. Maentele).

Основные статьи:

- Vorob'ev M.M. Kinetics of peptide bond demasking in enzymatic hydrolysis of casein substrates // J. Mol. Catal.:B. – 2009. - V.58. – P. 146-152.
- N G. Faleev, K. V. Alferov, M. A. Tsvetikova, E. A. Morozova, S. V. Revtovitch, E. N. Khurs, M. M. Vorob'ev, R. S. Phillips, T. V. Demidkina, and R. M. Khomutov Methionine g-lyase: Mechanistic deductions from the kinetic pH-effects. The role of the ionic state of a substrate in the enzymatic activity // Biochem. Biophys. Acta. - 2009. – V. 1794, №10. – P. 1414-1420.
- M.M. Vorob'ev, T.V. Burova, N.V. Grinberg, A.S. Dubovik, N.G. Faleev, V.I. Lozinskiy Hydration characterization of N-vinylcaprolactam polymers by millimeter-wave measurements // Colloid Polym. Sci. – 2010. – V288.–P. 1457-1464.
- Guler G, Dzafic E, Vorob'ev MM, Vogel V, Mantele W. Real time observation of proteolysis with Fourier transform infrared (FT-IR) and UV-circular dichroism spectroscopy: Watching a protease eat a protein // Spectrochimica acta A. - 2011 - V79. - P. 104-111.
- Vorob'ev MM, Vogel V, Guler G, Mantele W. Monitoring of demasking of peptide bonds during proteolysis by analysis of the apparent spectral shift of intrinsic protein fluorescence // Food Biophysics. – 2011. – V.6. – P. 519-526.

Устные доклады на международных конференциях:

- Vorob'ev M.M., Microwave hydration measurements of the unfolding in aqueous systems of proteins and synthetic proteinlike polymers // XIII European conference on the spectroscopy of biological molecules. Book of abstracts. August 28- September 2, 2009. - Palermo, Italy. - P. 96.

Проекты:

Грант РФФИ 07-03-00131 «Количественное изучение гидратации ферментоподобных сополимеров с цвиттерионными группировками» (Р);

Грант РФФИ 07-04-01138 (И);

Грант РФФИ 11-04-01245 «Количественное изучение гидратации аминокислот, пептидов, белков и полиаминов» (Р);

Грант РФФИ 11-04-01535 (И).

Гранты ДААД