

На правах рукописи

Макшакова Ольга Николаевна

**МОДИФИКАЦИЯ СТРУКТУРЫ ГИДРАТНОЙ ОБОЛОЧКИ
ПОЛИПЕПТИДОВ АПРОТОННЫМИ ОРГАНИЧЕСКИМИ
РАСТВОРИТЕЛЯМИ: ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДАМИ
ИК-СПЕКТРОСКОПИИ И КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИХ
РАСЧЕТОВ**

03.01.02 - биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань - 2010

Работа выполнена в лаборатории биофизической химии наносистем Учреждения Российской академии наук Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Файзуллин Джигангир Асхатович

Научный консультант: доктор химических наук, профессор
Зуев Юрий Федорович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Великанов Геннадий Алексеевич
(КИББ КазНЦ РАН, г. Казань)

доктор химических наук, профессор
Ремизов Александр Борисович
(КГТУ, г. Казань)

Ведущая организация: Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, химический
факультет, г. Москва

Защита состоится 21 декабря 2010 г. в 11⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 002.005.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Учреждении Российской академии наук Казанском институте биохимии и биофизики КазНЦ РАН по адресу: 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, а/я № 30, тел/факс (843)2927347, *e-mail*: annaivanova@mail.knc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Казанского научного центра РАН

Автореферат разослан «17» ноября 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук



А.Б. Иванова

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постановка задачи и ее актуальность. Напрямую или косвенно вода участвует во всех нековалентных взаимодействиях, стабилизирующих структуру белков. Однако, для функционирования белков, в частности ферментов, в первую очередь необходима гидратная вода, образующая прилежащие к белковой молекуле слои. Гидратация белков, т.е. количество и распределение молекул воды по поверхности биополимера, является одним из основных факторов, влияющих на фолдинг белков и формирование их нативной конформации. Кроме того, гидратная оболочка белков выступает в роли «посредника» при формировании их функциональных комплексов с лигандами белковой и небелковой природы [Nakasako, 2004].

Структура гидратной оболочки белков широко исследуется на различных модельных соединениях. При этом рассматриваются различные приближения отдельных структурных компонентов белковой поверхности, включая аминокислоты или другие низкомолекулярные органические соединения с близким химическим составом, вплоть до сложных надмолекулярных полимерных структур, в том числе белковые кристаллы и пленки. Исследование сорбции воды из газовой фазы на твердых пленках белков и полипептидов позволяет последовательно изучать все стадии их гидратации от абсолютно сухого препарата до появления объемной воды [Morita *et al.*, 2007].

In vitro и *in vivo* низкомолекулярные органические соединения могут выступать как регуляторы активности ферментов [Klibanov, 2001; Minton, 2001; Ball, 2008]. При этом возможно как непосредственное влияние органических соединений на белок через межмолекулярные контакты, так и их опосредованное действие через изменение структуры и динамики гидратной оболочки [Russo, 2008].

Следует отметить, что использование органических растворителей для модификации структуры гидратной воды в белковых системах является методическим подходом, который позволяет избирательно воздействовать на структуру гидратной оболочки. Кроме того, водно-органические системы существенно расширяют представления о структурно-функциональных свойствах белков в присутствии органических соединений. В прикладном аспекте органические растворители позволяют оптимизировать различные биотехнологические процессы, существенно повышая стабильность ферментов, обеспечивая реакционный контакт химическим соединениям различной полярности и др., что зачастую недостижимо в рамках чисто водного окружения [Гладилин и Левашов, 1998]. В нашей работе исследованы два органических растворителя – диоксан и ацетонитрил (АН) как одни из самых широко используемых в препаративной биохимии, неводной энзимологии, хроматографии. Немаловажным обстоятельством является также то, что полосы поглощения в инфракрасном (ИК) спектре полярных групп этих растворителей не перекрываются со спектральными полосами воды и пептидных групп.

Гомополипептиды являются классической упрощенной моделью белка. Они состоят из аминокислотных остатков одного типа и образуют вторичную структуру. Кроме того, в последние годы исследования свойств полипептидных пленок и их взаимодействий с растворителем [Zohuriaan-Mehr *et al.*, 2009; Czapiewski and Zielkiewicz, 2010] обретают новое значение в связи с перспективами их применения в медицине и пищевой промышленности благодаря биосовместимости, способности к биологическому разложению и пр. [Haunie *et al.*, 2005].

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось исследование механизмов модификации структуры гидратной оболочки полипептидов апротонными органическими растворителями.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Смоделировать пространственную структуру исследуемых полипептидов. Провести сравнительный анализ методов – молекулярно-механических, полуэмпирических и теории функционала плотности (DFT), а также параметров расчета, выбрав из них оптимальный по затратам машинного времени и достижению необходимой точности. Рассчитать энергию взаимодействия и геометрические параметры комплексов полипептид – растворитель.
2. На основе выбранного оптимального метода рассчитать колебательные спектры полипептидов и их комплексов с растворителями.
3. На основе совместного анализа экспериментальных и расчетных спектров определить центры сорбции воды, структуру и энергию образования комплексов, реализующихся в полипептидах с боковыми цепями различной химической природы. Количественно оценить сорбцию воды в полипептидных пленках.
4. На основе совместного анализа экспериментальных и расчетных спектров определить центры сорбции и энергию взаимодействий безводных органических растворителей с полипептидами. Количественно оценить сорбцию растворителей.
5. Провести анализ ИК-спектров пленок полипептидов, гидратированных в парах водно-органических смесей. Установить механизмы влияния органических растворителей на величину сорбции и распределение воды в структуре полипептидов.

Научная новизна работы. Впервые при использовании взаимодополняющих методов ИК-спектроскопии и квантово-химических расчетов охарактеризованы структура гидратной оболочки полипептидов в присутствии апротонных органических растворителей и механизмы ее модификации.

Впервые строгие современные квантово-химические методы применены к α -спиральным полипептидам, содержащим 16 аминокислотных остатков.

Рассчитаны структуры комплексов спиральных полипептидов с водой и органическими растворителями в вакууме, определена их геометрия, энергия взаимодействия и колебательные спектры. Впервые показана роль слабых

водородных связей типа C–H...O и C–H...N в образовании комплексов между полипептидом, молекулами воды и органического растворителя.

Проведен сравнительный анализ расчетных частот нормальных колебаний с данными ИК-спектроскопии с целью определения типов комплексов, реализующихся в исследуемых системах.

Установлено, что диоксан и ацетонитрил, сорбируясь на твердом полипептиде, влияют на структуру его гидратной оболочки посредством нескольких механизмов, а именно:

- 1) изменения доступности центров гидратации полипептидов для молекул воды за счет изменения конформации полипептида;
- 2) конкуренции растворителя с водой за центры связывания на полипептиде;
- 3) дополнительного связывания воды полярными центрами органического растворителя.

При этом степень реализации каждого из механизмов определяется химической природой боковых групп аминокислотных остатков и вторичной структурой гомополипептидов.

Научно-практическая значимость работы. Полученные результаты дают новые представления о формировании гидратной оболочки полипептидов в присутствии низкомолекулярных органических соединений, что имеет фундаментальное значение для понимания структурно-функциональных свойств пептидов и белков, белковых ассоциатов и комплексов белков с различными низко- и высокомолекулярными соединениями. Результаты работы могут быть использованы с целью направленного воздействия на активность ферментов в водно-органических средах, что имеет большое значение для технологий неводного биокатализа. Разработанные представления могут быть использованы при создании новых эффективных и экологически чистых материалов на основе полипептидов для применения в медицине, пищевой промышленности, биотехнологиях.

Экспериментальные результаты и методические разработки, представленные в работе, могут быть использованы в учреждениях биологической, биотехнологической, физико-химической направленности, занимающихся квантово-химическими расчетами многоатомных биологических систем, ИК-спектроскопией белков и пептидов, исследованием взаимосвязи структуры и функций биомакромолекул, а также включены в курсы лекций по биофизике, молекулярной биологии и физической и органической химии.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследование. Исследования проводились в соответствии с планами УРАН КИББ КазНЦ РАН по теме «Межмолекулярные взаимодействия и молекулярная динамика как факторы регуляции функциональной активности белков» (номер госрегистрации № 0120.0 803026) и частично поддержаны грантами РФФИ № 02-04-48907, № 05-04-

49722, № 09-03-00778, НИОКР РТ №03-3.10-159, №03-3.10-364, а также грантом Президиума РАН (программа «Молекулярная и клеточная биология»). Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на XVII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Казань, 2003); III Съезде биофизиков России (Воронеж, 2004), 8-ой и 9-ой Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2004, 2005), X, XI, XII Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем» (Яльчик, 2003, 2004, 2005), IV Санкт-Петербургской конференции молодых ученых с международным участием «Современные проблемы науки о полимерах» (Санкт-Петербург, 2008), Научно-практической конференции «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения» (Новый Свет, АР Крым, Украина, 2009), IV Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Казань, 2009), 12-ой Конференции им. В.А. Фока по квантовой и вычислительной химии (Казань, 2009), Российской школе молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии» (Казань, 2010).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 6 статей (из них 3 в журналах из списка ВАК, в т.ч. 2 в международной печати; 3 в сборниках) и 9 тезисов.

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов и Приложения. Работа изложена на 203 страницах машинописного текста, содержит 74 рисунка и 16 таблиц. Список литературы включает 192 источника, из них 26 на русском языке.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Приготовление образцов. В работе исследованы (Рис. 1): поли-DL-аланин (**PA**), натриевая соль поли-L-глутаминовой кислоты (**Na-PGA**), поли- γ -бензил-L-глутамат (**PBG**), поли-L-лизин (**PL**) (коммерческие препараты фирмы Sigma), поли-L-глутаминовая кислота в нейтральной форме (**PGA**), полученная на основе **Na-PGA**. Для получения полипептидных пленок водные растворы **PA**, **Na-PGA**, и **PL** помещали на поверхность кюветного окна и высушивали. По данным ИК-спектроскопии в пленках полипептиды имели неупорядоченную конформацию. Пленку **PL** увлажняли парами воды с относительной влажностью 0.5 [Чиргадзе и Овсепян, 1972] в течение суток до окончания конформационного перехода в β -структуру, а затем высушивали. Пленку **PBG** в α -спиральной конформации получали осаждением из раствора в хлороформе. Для получения **PGA** в α -спиральной конформации водный раствор **Na-PGA** титровали соляной кислотой до выпадения осадка ($\text{pH} \sim 2$), осадок многократно промывали бидистиллированной водой для

удаления солей NaCl. Порошок **PGA** растворяли в диоксане, при испарении которого формировалась пленка. **PGA** в β -конформации получали из пленки **Na-PGA** по известной методике [Lemormant *et al.*, 1958]. Пленку **Na-PGA** в β -конформации выдерживали в атмосфере паров HCl в течение суток, после чего промывали водой. Уровень деионизации карбоксильных групп **PGA** контролировали по ИК-спектрам.

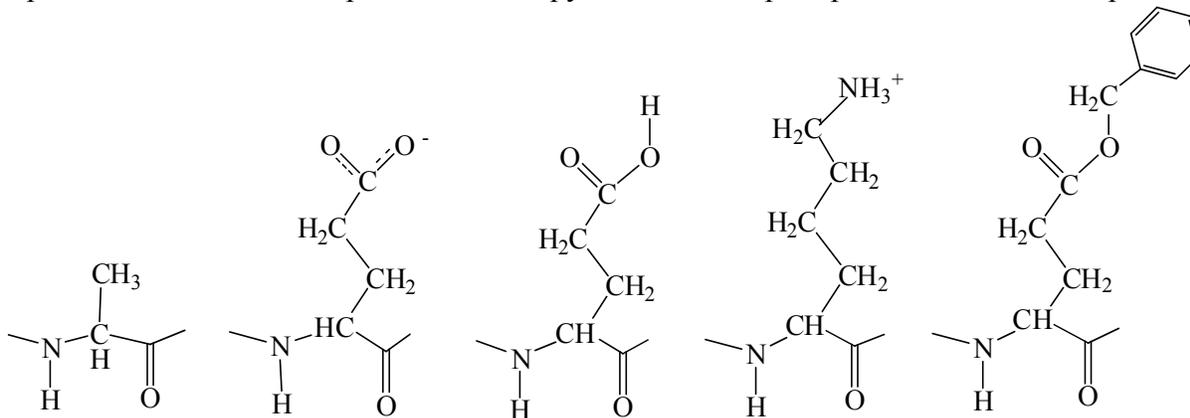


Рис. 1. Схемы аминокислотных остатков: **PA**, **Na-PGA**, **PGA**, **PL**, **PBG** (слева-направо).

Органические растворители (**ЧДА**) – ацетонитрил (**АН**) и 1,4-диоксан, очищали согласно известным методикам [Perrin *et al.*, 1980]. Осушенные растворители выдерживали над молекулярными ситами 3 Å. Использовали бидистиллированную воду.

1.2. Термодинамическая активность воды. Активность воды (a_w) в парах чистой жидкости задавали на основе разницы температур в кювете с образцом и в сатураторе [Никольский, 1963]. Температуру кюветы с образцом поддерживали при 25°C. Активность воды в органических растворителях рассчитывали по уравнению:

$$a_w = \gamma_w \cdot x_w, \quad (1)$$

где x_w — мольная доля воды в растворе, γ_w – табличный коэффициент активности воды для данной мольной доли [Коган и др., 1966].

1.3. ИК-спектроскопия. ИК-спектры регистрировали на приборе Vector-22 (Bruker) с разрешением 4 см^{-1} и накоплением 64 сканов; в качестве материала кюветных окон использовали CaF_2 . Пленки полипептидов помещали в герметичную кювету, которую устанавливали в держателе прибора. До начала эксперимента пленку в кювете продували воздухом, осушенным над P_2O_5 , до полного прекращения изменений в спектре. Во время эксперимента кювету продували парами чистой воды или водно-органических смесей с заданной активностью воды; процесс сорбции растворителя контролировали спектрально. Активность паров воды меняли от 0 до 0.99 при гидратации и обратно до 0 при дегидратации.

1.4. Количественные оценки сорбции растворителя в пленке. Сорбцию воды контролировали по поглощению в области νOH 4000 – 3000 см^{-1} ИК-спектра, сорбцию диоксана – по полосе $\nu\text{C-O}$ при 1121 см^{-1} , сорбцию **АН** – по полосе $\nu\text{C}\equiv\text{N}$

при 2250 см^{-1} . Количество сорбированного органического растворителя (A) и воды (h) определяли по формуле:

$$A(h) = S_{\text{Р-ЛЯ}} * B_{A1} / (B_{\text{Р-ЛЯ}} * S_{A1}), \quad (2)$$

где $S_{\text{Р-ЛЯ}}$ и S_{A1} – интегральные интенсивности полос поглощения растворителя и амида 1 исходно сухой пленки полипептида (рис. 2), соответственно, $B_{\text{Р-ЛЯ}}$ – интегральный молярный коэффициент экстинкции полосы растворителя (л/моль/см^2) брали равным 19100 и 886.5 – для полос диоксана и ацетонитрила, соответственно; 96000 и 48000 для широкой полосы воды и для высокочастотного дублета полос воды, соответственно [Сироткин и др., 2000]; B_{A1} – интегральный коэффициент экстинкции (л/моль/см^2) полосы амид 1, взятый с учетом содержания вторичных структур: 45000 – для неупорядоченной структуры, 75000 – для α -спирали и β -слоев [Venyaminov and Kalnin, 1990]. Для оценки количества воды, приходящейся на один гидратированный центр полипептида, вместо S_{A1} брали сумму положительных площадей из разложения разностного спектра в области амида 1, амида 2 (рис. 2) и валентных колебаний полярных групп боковых цепей с соответствующими коэффициентами экстинкции [Venyaminov and Kalnin, 1990]. Разностный спектр получали вычитанием спектра сухой пленки из спектров влажной пленки.

Гидратационные зависимости $h = f(a_w)$ полипептидов в области активностей воды 0 – 0.5 хорошо описываются уравнением БЭТ [Brunauer *et al.*, 1938]:

$$h(a_w) = w(K * a_w / (1 + K * a_w) + a_w / (1 - a_w)) \quad (3)$$

где w и K – емкость монослоя (моль воды/моль остатка) и сродство гидратных центров к воде, соответственно. Первый член уравнения описывает связывание воды на гидратных центрах полипептида в монослое, его вклад доминирует при $a_w < 0.5$, а второй член отражает образование полимолекулярного слоя воды при $a_w > 0.5$.

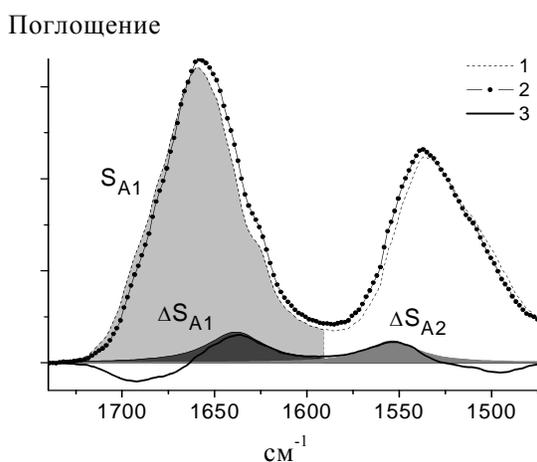


Рис. 2. Спектры поглощения сухой (1) и увлажненной (2) пленки РА и разностный спектр (3) между (2) и (1) в области амид 1 и амид 2.

Для исследования структуры гидратной оболочки полипептидов анализировались спектры в области активностей воды $0 < a_w < 0.5$.

1.5. Квантово-химические расчеты. Исходные структуры полипептидов создавали с помощью программного пакета HyperChem8.0. Далее геометрии α -спиральных полипептидов оптимизировались в силовом поле CHARMM в программе CHARMM, полуэмпирическим методом PM3, методом DFT B3LYP/3-21G в программном пакете Gaussian03, в программном пакете Priroda [Laikov,

2005] с негибридным функционалом плотности **PBE** и базисным набором L1, при использовании контрактированных схем орбитальных базисов (10s, 7p, 3d)/[3s, 2p, 1d] для атомов C, O и N и (6s, 2p)/[2s, 1p] для атома водорода. В качестве критериев сходимости устанавливался максимальный градиент 10^{-4} Хартри/Å и порог по энергии для процедуры самосогласованного поля 10^{-8} Хартри.

Неупорядоченная структура моделировалась трипептидом, складчатая β -структура – антипараллельным β -листом, состоящим из 3-х цепочек по 4 аминокислотных остатка в каждой. Чтобы исключить образование водородных связей концевыми группами, во фрагментах NH_2 и COOH по одному атому водорода замещались метильными группами.

Для получения исходных геометрий комплексов молекулу лиганда (вода, диоксан или ацетонитрил) помещали в произвольную точку пространства на расстоянии около 4 Å от поверхности полипептида. В результате расчетов 25 – 30 траекторий в программном пакете HyperChem8.0 получены статистически устойчивые комплексы. Оптимизация структуры этих комплексов более строгими методами (**PM3**, **V3LYP**, **PBE**) позволила определить энергию взаимодействия молекул и колебательные спектры. Тестовый комплекс α -спирального поли-L-аланина с молекулой воды рассчитывался методами **CHARMM**, **PM3**, а также методом **ONIOM** на основе оптимизированной на уровне **V3LYP/3-21G** структуры. Схема **ONIOM** позволяет разбить молекулярную систему на несколько областей и каждую считать на своем уровне теории. Область, ограниченную радиусом 5 Å относительно молекул воды, рассчитывали на уровне **V3LYP** с разными базисными наборами: 6-31G(d), 6-31G(d,p), 6-31+G(d,p), 6-311G(d), остаток молекулы рассчитывали на уровне **V3LYP/3-21G**. На всех уровнях расчета вычисляли суперпозиционную ошибку базисного набора (**BSSE**). При расчетах на уровне **PBE** вводили поправку на энергию нулевых колебаний (**ZPVE**); поправка на **BSSE** не выполнялась. Частоты нормальных колебаний и интенсивности **ИК**-спектров рассчитывали аналитически.

Энергия образования комплекса рассчитывали по формуле:

$$\Delta E = E_{\text{КОМПЛЕКСА}} - E_{\text{ПП}} - E_{\text{ЛИГАНДА}} \quad (4)$$

где $E_{\text{КОМПЛЕКСА}}$, $E_{\text{ПП}}$ и $E_{\text{ЛИГАНДА}}$ есть энергия комплекса, полипептида и лиганда, соответственно.

Комплексы **PA**, **PBG** и **PGA** с лигандами исследовали методом **DFT PBE**.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Выбор модели и метода расчета комплексов полипептидов с молекулами растворителя и их колебательных свойств

Вторичная структура полипептидов и химическая природа аминокислотных остатков влияют на структуру комплексов полипептид – лиганд. Регулярная упаковка

полипептидной цепи, с одной стороны, накладывает ограничения на доступность пептидных групп растворителю, с другой стороны, из-за стерической близости боковых групп создает условия для формирования комплексов более сложных, чем 1 молекула лиганда на 1 аминокислотный остаток, что особенно важно, как будет показано ниже, для полипептидов с длинными полярными боковыми цепями.

Известно, что при длине цепи 12 остатков и больше полиаланин в вакууме образует стабильную α -спираль [Wieczorek and Dannenberg, 2004]. Полипептид длиной в 16 аминокислотных остатков позволяет, с одной стороны, уменьшить влияние концевых групп, а с другой, оптимизировать используемые компьютерные ресурсы. На концах полипептидов помещались неионизованные группы COOH и NH_2 . Расчеты разными методами показали хорошее воспроизведение параметров α -спирали по сравнению экспериментальными данными [Sun *et al.*, 2000] и данными

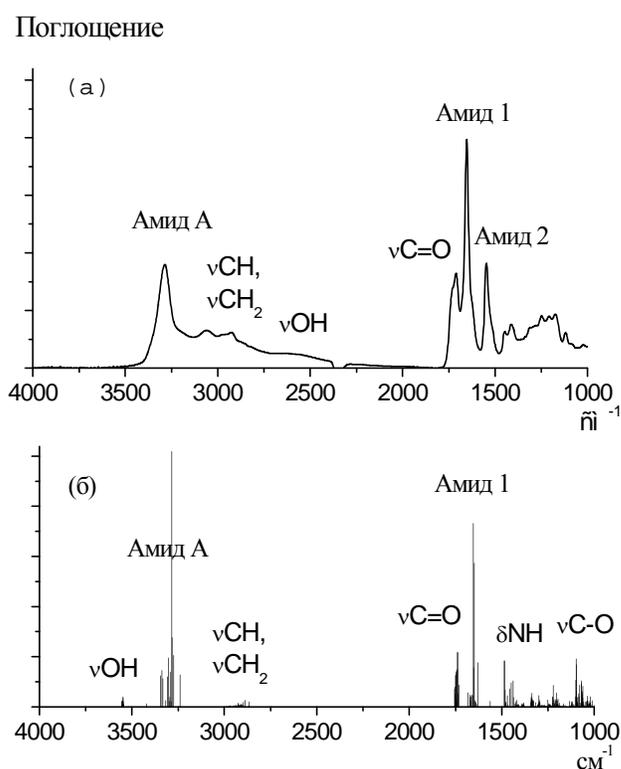


Рис. 3. Экспериментальный (а) и расчетный (б) спектр PGA.

B3LYP/6-31+G(d,p) (Табл. 1). Учет поправки суперпозиционной ошибки базисного набора (**BSSE**) приводит к коррекции значений энергии взаимодействия и нивелирует разницу в энергии, полученной с разными базисными наборами (Табл. 1). Энергия взаимодействия в комплексе, рассчитанная на уровне **PBE** с учетом поправки на энергию нулевых колебаний (**ZPVE**), имеет значение, близкое к значению, полученному с базисом **B3LYP/6-31+(d,p)**. Энергия взаимодействия в комплексе,

расчетов в кластерной модели [Wieczorek and Dannenberg, 2003] и бесконечной модели с периодическими условиями [Vener *et al.*, 2009].

Комплекс α -спирального полиаланина с водой, в котором образуется одна водородная связь между атомом водорода молекулы воды и атомом кислорода пептидной группы полиаланина, был использован в качестве тестового для определения оптимального уровня теории моделирования. Расчеты комплекса дают довольно близкие значения параметров геометрии (Табл. 1). Однако метод **PM3** немного недооценивает энергию взаимодействия, а **CHARMM** переоценивает ее по сравнению с

рассчитанная на уровне **PBE** с учетом поправки на **ZPVE**, имеет значение близкое к значению, полученному с базисом **V3LYP/6-31+(d,p)**.

Сравнение частот нормальных колебаний α -спирального полиаланина, полученных методами **PM3**, **DFT PBE** и **ONIOM(V3LYP/6-31G(d):V3LYP/3-21G)**, показывает, что наилучшее согласие с экспериментом обеспечивают расчеты методом **DFT PBE**.

Рис. 3 демонстрирует хорошее совпадение расчетного спектра и экспериментального спектра полипептидной пленки на примере спирального **PGA**. Небольшие различия относятся к поглощению боковых карбоксилов **PGA**, что вызвано взаимодействиями между соседними молекулами полипептида в пленке, которые не учитывались в расчетной модели.

Табл. 1. Геометрические параметры и энергия образования комплекса спирального полиаланина с молекулой воды, рассчитанные на разных уровнях теории

	$H_w \cdots O_p$ (Å)	$O_w \cdots O_p$ (Å)	$\angle O_w H_w O_p$ (°)	ΔE^b (ккал/моль)	$\Delta E_{\text{сог}}^b$ (ккал/моль)
CHARMM	1.769	2.733	171.68	-6.96	-
PM3	1.809	2.767	173.07	-4.86	-
PBE	1.837	2.798	164.60	-9.17	-6.85
V3LYP/3-21G	1.735	2.722	166.64	-19.31	-3.72
V3LYP/6-31G(d) ^a	1.891	2.855	168.42	-9.76	-5.28
V3LYP/6-31G(d,p) ^a	1.884	2.845	168.35	-9.80	-4.98
V3LYP/6-31+G(d,p) ^a	1.901	2.855	165.09	-6.89	-5.80
V3LYP/6-311G(d) ^a	1.885	2.841	167.94	-10.00	-5.40

^a Большой (high) базисный набор для **ONIOM** (high: **V3LYP/3-21G**) приближения

^b Энергия взаимодействия без поправки суперпозиционной ошибки базисного набора

^b Энергия взаимодействия с поправкой суперпозиционной ошибки базисного набора для **V3LYP** и с корректировкой энергии нулевых колебаний для **PBE**.

2.2. Анализ комплексов полипептидов с молекулами воды

ИК-спектры гидратной воды в исследуемых полипептидах демонстрируют существенные различия по форме и положению полосы ν_{OH} (рис. 4). В спиральном **PBG** вода имеет спектр, характерный для гидрофобных полимеров с изолированными карбонильными группами, образующими комплексы с одиночными молекулами воды [Kusanagi and Yukawa, 1994]. Два острых равновеликих пика при 3625 и 3540 cm^{-1} , соответствующих моде асимметричных и симметричных валентных колебаний **OH** связей, согласно устоявшимся в **ИК**-спектроскопии представлениям, можно отнести к поглощению молекул воды, образующих 2 равновеликие водородные связи. Пик низкой интенсивности при 3800 cm^{-1} указывает на наличие свободных осцилляторов **OH** молекул воды, образующих одну водородную связь.

Квантово-химические расчеты показали наличие двух типов комплексов (рис. 5), что подтверждает экспериментальные данные. В первом комплексе молекула воды образует одну водородную связь с карбонильным кислородом сложноэфирной

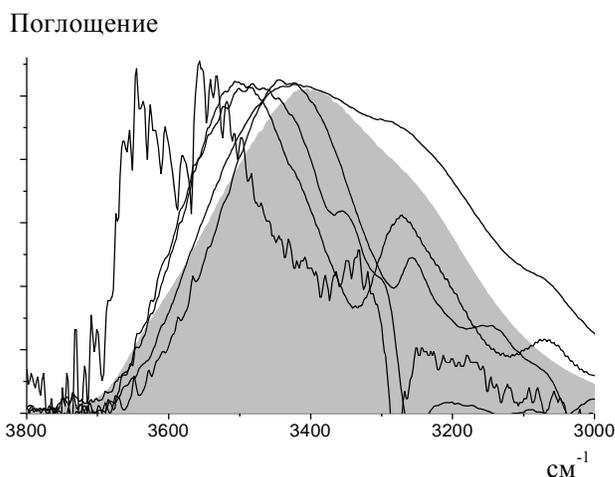


Рис. 4. Спектры гидратной воды в пленках при $a_w 0.3$ (слева-направо): **PBG**, **PA**, **PGA**, **Na-PGA**, **PL** (пунктир), спектр жидкой воды (выделен цветом). Спектры нормированы на интенсивность полосы ν_{OH} в максимуме.

группы $C=O \cdots HOH$. Во втором комплексе молекула воды образует 2 водородные связи с атомами кислорода сложноэфирной и пептидной групп: $C=O \cdots HOH \cdots O=C$. Расчетные частоты нормальных колебаний воды (Табл. 2), пептидных и сложноэфирных групп в этих комплексах находятся в хорошем согласии с экспериментом. Количественные оценки, сделанные на основании ИК-эксперимента показывают, что одна молекула воды приходится на 2 гидратных центра **PBG** (Табл. 3), что свидетельствует о преобладании в пленке **PBG** комплексов, в

которых одна молекула воды образует две водородные связи.

Количественные оценки гидратной воды на основании уравнения (2) показывают, что в пленке **PGA** на один гидратируемый центр (кислород пептидной или карбоксильной группы) приходится в среднем 2.2 молекулы воды. Квантово-химические расчеты показали существование пяти возможных комплексов спирального **PGA** с одной молекулой воды (рис. 6). Два из них по геометрии и энергии взаимодействия близки к комплексам вода-**PBG**, а именно, в комплексе **PGAW1** вода образует одну водородную связь с карбонильным кислородом карбоксильной группы, а в комплексе **PGAW3** молекула воды связывает

карбонильные атомы кислорода карбоксильной и пептидной групп. В комплексах **PGAW4** и **PGAW5** молекула воды связывает полярные группы двух соседних боковых цепей: в **PGAW4** образуются водородные связи с карбонильными атомами кислорода двух карбоксильных групп, а в **PGAW5** – с гидроксильными атомами кислорода двух карбоксильных групп.

Образование этих комплексов сопровождается реориентацией боко-

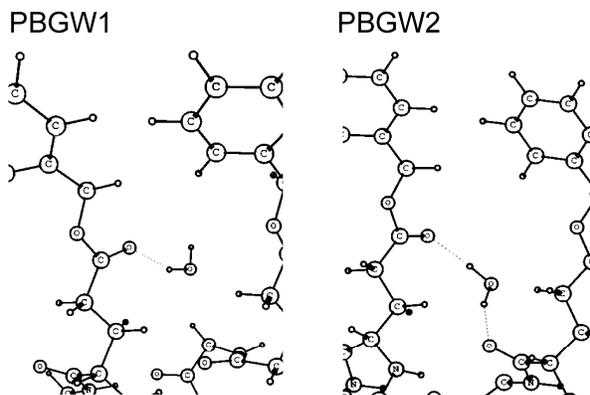


Рис. 5. Комплексы **PBG** с молекулой воды.

вых цепей полипептида. Поворот боковых групп вокруг связи $\text{CH}_2\text{--CH}_2$ достигает 95° , тогда как торсионные углы остова не меняются. Реориентация боковых групп дает вклад противоположного знака в энергию образования комплексов и делает их менее выгодными, чем другие комплексы с двумя водородными связями. В **PBG** образования комплексов данного типа не наблюдается, поскольку массивные бензильные группы затрудняют повороты боковых цепей. Кроме того, дополнительную стабилизацию комплексов обеспечивают контакты $\text{C--H}\cdots\text{O}$ между атомом кислорода воды и углеводородной частью боковых цепей. Сравнение расчетных и экспериментальных сдвигов частот колебаний групп C=O показывает, что молекулы воды в пленке **PGA** связываются с атомами кислорода этих групп, находящихся в составе пептидного остова и карбоксильного фрагмента боковой цепи.

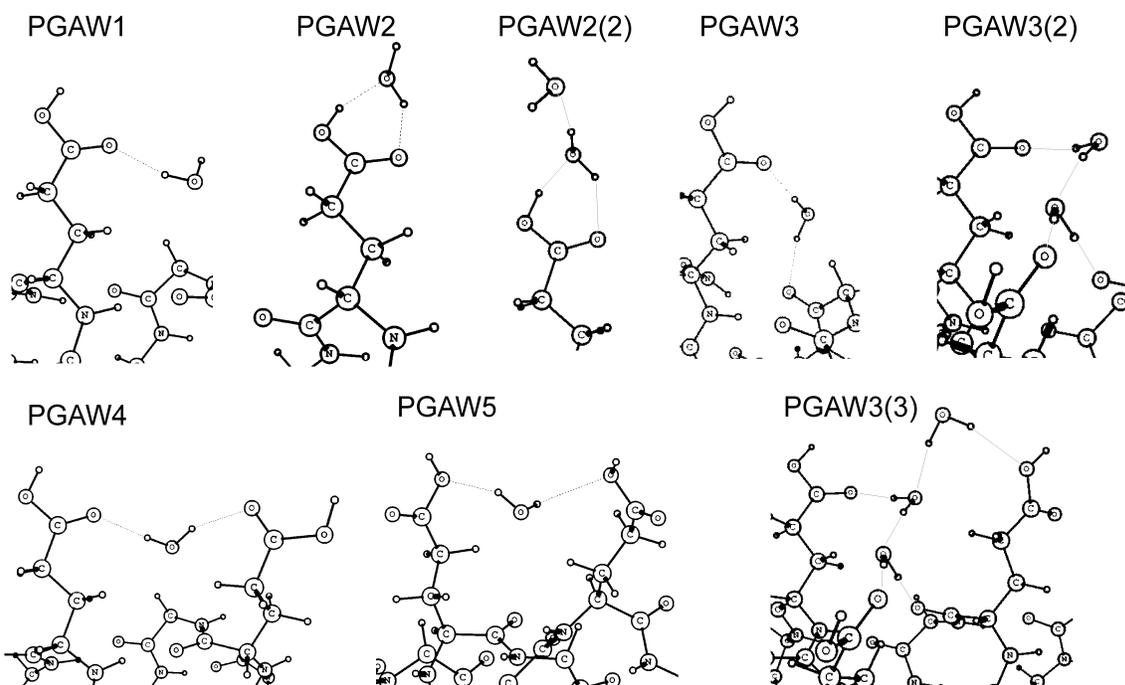


Рис. 6. Структуры пяти комплексов **PGA** с молекулой воды и некоторых комплексов **PGA** с двумя и тремя молекулами воды.

Расчетные колебательные частоты молекулы воды в полученных комплексах не совпадают с положением компонент в экспериментальных спектрах. Они дают существенно завышенные значения частоты асимметричных валентных колебаний (ν_{ac}); при этом частоты колебаний молекул воды с двумя водородными связями в комплексах **PGAW3**, **PGAW4** и **PGAW5** попадают на высокочастотный склон полосы экспериментального спектра. Добавление второй молекулы воды к наиболее выгодным комплексам **PGAW2** и **PGAW3** приводит значения расчетных

Табл. 2. Энергия взаимодействия (ккал/моль) и расчетные частоты (cm^{-1}) валентных колебаний ОН связей воды в комплексах с **PBG** и **PGA** и **tALA**

	ΔE^1	№ ²	ν_{ac} ОН	ν_c ОН
H ₂ O			3823	3717
PBGW1	-10.79	1	3776	3524
PBGW2	-12.28	1	3655	3574
PGAW1	-8.54	1	3781	3549
PGAW2	-12.7	1	3761	3344
PGAW2(2)	-20.21	1	3490	3447
		2	3805	3708
PGAW3	-10.9	1	3660	3528
PGAW3(2)	-21.34	1	3641	3465
		2	3701	3533
PGAW3(3)	-30.95	1	3623	3379
		2	3642	3467
		3	3771	3507
PGAW4	-7.84	1	3684	3551
PGAW5	-4.76	1	3747	3656
tALAW1	-6.53	1	3785	3526
tALAW2	-7.47	1	3817	3712
tALAW3	-9.97	1	3784	3433
tALAW3(2)	-16.45	1	3548	3496

¹ включает поправку на энергию нулевых колебаний

² номер молекулы воды по мере добавления

воды **PGA**. Оценки энергии образования комплексов **PGA** с двумя и тремя молекулами воды **PGAW2(2)**, **PGAW3(2)** и **PGAW3(3)** показывают, что последовательное добавление воды приводит к существенной стабилизации комплексов (Табл. 2).

В **Na-PGA** полоса воды имеет наиболее низкочастотное положение и наибольшую полуширину. Известно, что заряженные группы структурируют окружающую их воду в водородно-связанные кластеры. При этом отрицательно заряженные группы полипептида взаимодействуют с атомом водорода воды, а положительно заряженные группы с атомом кислорода воды. Геометрия подобных комплексов представлена в обзоре [Wytttenbach and Bowers, 2009]. Оценки количества воды в комплексах, сделанные на основании спектральных измерений, дают соответственно значения 4.2 и 3.5 моля воды/моль гидратных центров для **Na-PGA** и **PL** (Табл. 3), что находится в хорошем соответствии с литературными данными [Kuntz and Kauzmann, 1974]. Низкочастотные сдвиги амидных полос показывают, что молекулы воды также проникают к пептидному остову.

колебательных частот в соответствие с экспериментальными частотами. На основе комплекса **PGAW3** могут образовываться цепочки из молекул воды, как показано на рис. 6.

Интересно отметить, что хотя в **PBG** карбонильные группы имеют такое же сродство к воде, как и в **PGA**, в **PBG** водные цепочки и кластеры не образуются. По-видимому, этому препятствуют объемные гидрофобные боковые группы **PBG**. Спектр воды в **PGA** имеет существенно более низкочастотное положение, чем в **PBG**, что свидетельствует о более сильных водородных связях в структуре гидратной

Табл. 3. Количественные параметры сорбции чистых растворителей на полипептидах с различной вторичной структурой

	№*	Емкость монослоя	Кол-во воды в расчете на гидратированный центр	Сорбция диоксиана	Сорбция AN	Тип вторичной структуры
PA	1	0.267 (0.015)	1.2±0.07	0	0.3±0.05	неупорядоченная
	2	0.292 (0.013)		0.8±0.12	0.7±0.04	β-слои
PGA(α)	1	0.29 (0.001)	2.2±0.1	0.6±0.2	0.6±0.08	α-спираль
	2	0.323 (0.003)		1.2±0.1	0.6±0.13	α-спираль
PGA(β)	1	0.223 (0.011)	1.9±0.09	–	0.35±0.15	β-слои
	2	0.252 (0.01)		1.2±0.08	1±0.08	α-спираль
PBG	1	0.018 (0.001)	0.5±0.03	3±0.07	0.7±0.02	α-спираль
	2	0.018 (0.001)		3±0.08	0.7±0.01	α-спираль
PL	1	0.636 (0.031)	3.5±0.2	–	–	β-слои
	2	0.682 (0.028)		1±0.2	1.4±0.01	α-спираль
Na- PGA	1	0.513 (0.026)	4.3±0.3	–	–	неупорядоченная
	2	0.545 (0.018)		0.1±0.04	0.3±0.01	β-слои

*1 – гидратационный ход

2 – дегидратационный ход

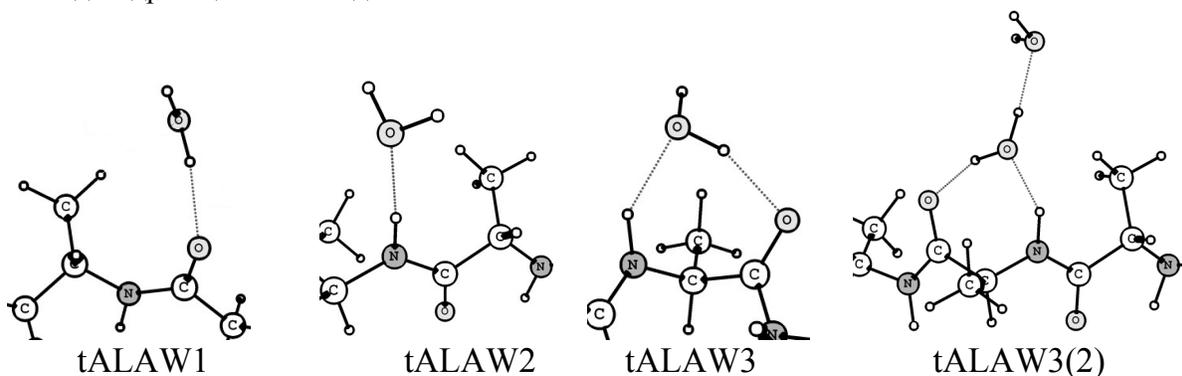


Рис. 7. Комплексы трипептида аланина с одной и двумя молекулами воды.

Моделирование взаимодействий неупорядоченной структуры **PA** с водой на трипептиде аланина (**tALA**) показало существование трех типов комплексов (рис. 7), в которых вода образует одну или две водородные связи с пептидными группами. Энергетически наиболее выгодным является комплекс, в котором вода одновременно связывает две соседние C=O и NH группы.

Добавление второй молекулы воды к этому комплексу приводит к образованию комплекса **tALAW3(2)** (Рис. 7), к поправке в колебательных частотах первой молекулы воды и хорошему согласию с экспериментом. Образование однотипных водных кластеров вблизи пептидных групп в пленке **PA** дает широкий сглаженный спектр воды, который можно удовлетворительно описать двумя - тремя гауссовыми полосами, как и спектр жидкой воды, в отличие от спектра воды в **PGA**, где

реализуется большое число различных комплексов. Оценки количества воды в комплексах с гидратными центрами **РА**, сделанные на основании спектральных изменений, показывают, что на одну пептидную группу приходится 2 молекулы воды.

2.3. Анализ комплексов полипептидов с молекулами безводного органического растворителя

Диоксан. Молекула диоксана имеет два протонно-акцепторных атома кислорода в эфирных фрагментах и большую гидрофобную область из четырех метиленовых групп, распределенных попарно между эфирными атомами кислорода в кольцевой структуре. Довольно крупные (молярный объем – 11.7 моль/л) и малополярные (дипольный момент – 0.45 Д) молекулы диоксана не могут внедриться в объем сухой пленки, поскольку для включения молекулы диоксана требуется образование полости, которое сопряжено с кооперативными перестройками конформации полипептидной цепи. Поэтому наблюдаются различия в значениях сорбции и типах структуры на прямом и обратном ходе гидратации полипептидов водно-диоксановыми смесями (Табл. 3).

В полипептидах с неполярными и ароматическими боковыми группами (**РА** и **РВG**) полоса поглощения валентных колебаний эфирных связей диоксана $\nu\text{C}-\text{O}$ сохраняет положение и высокочастотную асимметрию как в спектре жидкого диоксана (рис.8). Это свидетельствует о том, что в **РА** и **РВG** эфирные группы диоксана не образуют водородных связей, а контактируют с гидрофобными боковыми группами полипептида и с другими молекулами диоксана. В то время как в полипептидах с полярными и заряженными боковыми группами (**РGА**, **Na-РGА** и **PL**) полоса $\nu\text{C}-\text{O}$ сдвигается в низкочастотную область; при этом асимметрия меняет знак и становится

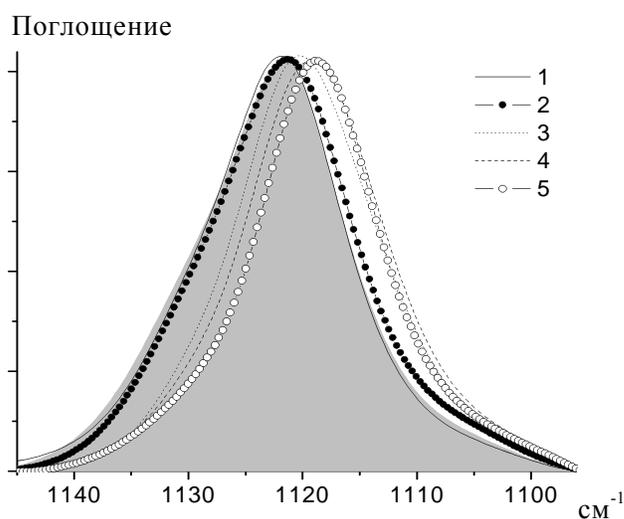


Рис. 8. Спектры безводного диоксана в пленках: 1 – **РА**, 2 – **РВG**, 3 – **РGА**, 4 – **Na-РGА**, 5 – **PL** и спектр жидкого диоксана (выделен цветом), нормированные на интенсивность полосы $\nu\text{C}-\text{O}$ в максимуме.

низкочастотной, что свидетельствует об образовании водородных связей с протонно-донорными группами полипептидов.

Квантово-химические расчеты комплексов α -спирального **РGА** с молекулой диоксана показали существование двух комплексов (рис. 9). В первом комплексе **РGAD1** два эфирных кислорода диоксана образуют водородные связи с атомами водорода карбоксильных групп пространственно соседних боковых цепей **РGА**. Энергия образования комплекса очень

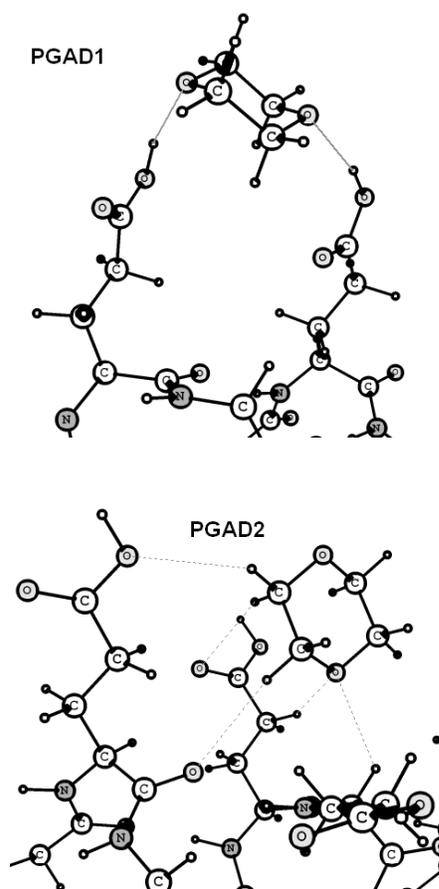


Рис. 9. Комплексы **PGA** в α -спиральной конформации с молекулой диоксана

водородных связей делает этот комплекс довольно стабильным ($\Delta E = -8.03$ ккал/моль). Показательно, что **PBG** характеризуется самой большой величиной сорбции диоксана по сравнению с другими полипептидами (Табл. 3).

Внедрение диоксана в пленку **PA** сопровождается конформационным переходом части неупорядоченной структуры в β -слои. Несмотря на то, что расчетное значение энергии взаимодействия эфирного кислорода диоксана с NH группой полипептидной цепи довольно высоко (-5.86 ккал/моль) по сравнению с энергией взаимодействия с β -листом через C-H...O контакты (-2.55 ккал/моль), сопоставление расчетных и экспериментальных сдвигов полос свидетельствует о том, что в пленке **PA** молекулы диоксана локализуются на участках с β -структурой.

В препаратах **Na-PGA** молекулы диоксана проникают к пептидным группам, образуя водородные связи с аминными фрагментами. В пользу этого заключения свидетельствует низкочастотный сдвиг полосы ν_{C-O} диоксана и сохранение значительной доли неупорядоченной конформации при сорбции диоксана по

высокая (-13.48 ккал/моль) и является даже более благоприятной, чем в комплексах с водой. Второй комплекс **PGAD2** стабилизирован несколькими слабыми взаимодействиями типа C-H...O и является менее выгодным, чем первый (-4.39 ккал/моль). При образовании данного комплекса нарушается регулярная упаковка боковых цепей и образуется довольно большая полость между цепями, что позволяет молекуле диоксана глубоко проникать в область боковых цепей. Сопоставление сдвигов предсказанных частот с экспериментальными подтверждает образование в пленке комплексов типа **PGAD1** и не исключает наличия комплексов **PGAD2**.

В **PBG** молекулы диоксана локализуются в среде боковых цепей, реализуя большое количество взаимодействий типа C-H...O (~ 2.5 Å). Такие взаимодействия дают очень слабые сдвиги частот нормальных колебаний, что согласуется с очень слабыми изменениями в экспериментальном спектре. Каждая связь C-H...O дает довольно малый вклад в энергию взаимодействия (~ 1 ккал/моль [Qingzhong *et al.*, 2007]), но большое число таких слабых

сравнению с пленкой полипептида, увлажненной в парах чистой воды, когда образуется β -структура. Молекулы диоксана оказываются стерическим препятствием для формирования упорядоченной структуры. В **Na-PGA** зарегистрировано самое низкое значение сорбции диоксана – 0.1 моль/моль аминокислотных остатков (Табл. 3).

Ацетонитрил. В отличие от диоксана, молекулы **AN** с небольшим молярным объемом (молярный объем – 19.1 моль/л) и большой полярностью (дипольный момент – 3.5 Д) легко проникают в исходно сухой препарат, вызывая лишь небольшие изменения конформации. Однако вторичная структура при этом остается неравновесной. Тогда как на дегидратационном ходе устанавливаются равновесная сорбция **AN** и структура.

Совместный анализ спектральных сдвигов нитрильной полосы **AN** (рис. 10) и групп полипептида в присутствии **AN** в эксперименте и в расчетных спектрах показал, что молекула **AN** образует водородные связи как с протоно-донорными, так и с протоно-акцепторными группами полипептидов. В **PGA** существуют два типа комплексов с **AN**, в которых молекула органического растворителя взаимодействует с полипептидом либо атомом азота, либо метильной группой (рис. 11). Из теоретических оценок следует, что комплекс, в котором метильная группа **AN** взаимодействует с карбоксильными атомами кислорода двух боковых цепей **PGA** ($C-H \cdots O \sim 2.5 \text{ \AA}$), является таким же выгодным, как комплекс с образованием водородной связи между атомом азота **AN** и карбоксильной группой **PGA** ($\Delta E = -6.3 \text{ ккал/моль}$, $OH \cdots N \text{ } 1.9 \text{ \AA}$). Комплексы с **AN** оказываются менее выгодными, чем комплексы с водой. При образовании комплекса **AN** с карбонильными кислородами боковых цепей **PGA**

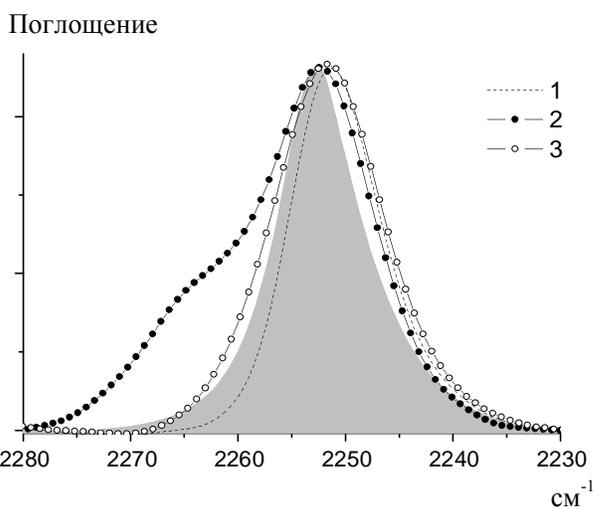


Рис. 10. Спектры безводного **AN** в пленках: 1 – **PBG**, 2 – **PGA**, 3 – **PA** и спектр жидкого **AN** (выделен цветом), нормированные на интенсивность полосы $\nu_{C \equiv N}$ в максимуме.

происходит изменение структуры, при которой боковые цепи поворачиваются на $10 - 15^\circ$ вокруг связи CH_2-CH_2 , при этом расстояние между атомами кислорода боковых карбоксилатов уменьшается. В **PBG** молекулы **AN** формируют связи между метильной группой и карбонильными атомами кислорода сложноэфирных групп; при этом, как показывают квантово-химические расчеты, атом азота молекулы **AN** взаимодействует с метиленовыми группами **PBG**, образуя связи $C-H \cdots N$ ($\sim 2.5 \text{ \AA}$). Массивные гидрофобные боковые цепи **PBG** мешают изменению

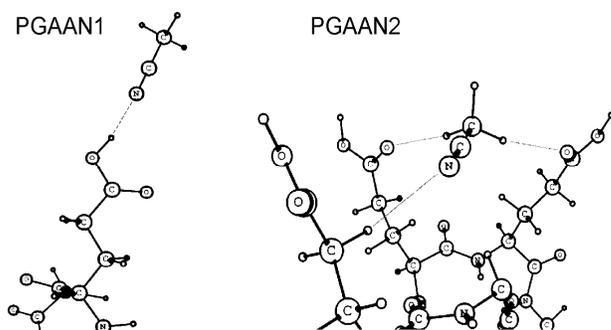


Рис. 11. Комплексы **PGA** в α -спиральной конформации с молекулой **AN**.

структуры как в **PGA**, поэтому в комплексах с **PBG** одна молекула **AN** взаимодействует только с одним карбонильным кислородом; при этом энергия взаимодействия меняется от -5.83 до -3.52 ккал/моль. В спиральных полипептидах с длинными боковыми группами молекулы **AN** локализуются в среде боковых цепей и не проникают к

карбонильным и аминным фрагментам пептидных групп.

Анализ компонент полосы $\nu\text{C}\equiv\text{N}$ при сорбции **AN** в исходно сухой пленке **PA** с неупорядоченной структурой свидетельствует о том, что молекула растворителя может существовать в трех состояниях: «свободном», аналогичном чистой жидкости, либо связанном с группой $\text{C}=\text{O}$ **PA**, либо с группой NH полипептида. На дегидратационном ходе, когда полипептид конформационно подвижен, внедрение молекул **AN** сопровождается образованием β -структуры. Анализ спектров показывает, что часть молекул **AN** связана с $\text{C}=\text{O}$ группами в составе β -слоев, а часть молекул **AN** находится в окружении себе подобных.

2.4. Анализ структуры воды в полипептидах в присутствии органического растворителя

Спектры воды в полипептидах с гидрофобными боковыми группами (**PA** и **PBG**) в присутствии молекул органического растворителя демонстрируют два набора компонент. Первый по форме и положению дает такой же спектр как при гидратации пленки в парах чистой воды и относится к гидратации полярных групп полипептидов. Второй проявляется в виде двух острых высокочастотных полос, которые по форме и положению совпадают со спектрами водно-органических растворов, и относится к поглощению воды, связанной в комплексах 2:1 с молекулами органических растворителей [Сироткин и др., 2000]. Таким образом, гидратная вода представлена двумя наборами пространственно разобщенных молекул – связанных с полипептидом и связанных с растворителем. Исключение составляет **AN** в **PA**, где благодаря большей доступности пептидных групп реализуется ситуация, сходная с описанной ниже.

В спектрах гидратной воды полипептидов с полярными боковыми группами (**Na-PGA**, **PGA** и **PL**) в присутствии органических растворителей наблюдается одна широкая полоса νOH , которая по форме и положению близка к спектрам воды, связанной с полипептидом в отсутствие органического растворителя. Спектров, подобных спектрам водно-органических растворов, не наблюдается. Однако сдвиги

полос полярных групп растворителей свидетельствуют, что молекулы диоксана и **AN** также гидратированы.

Выше мы объяснили происхождение широких полос в спектрах сорбционной воды наличием цепочек и кластеров, в которых молекулы воды формируют не менее трех водородных связей друг с другом и с полярными группами полипептида. По-видимому, в этих полипептидах **AN** и диоксан взаимодействуют с молекулами гидратной воды в составе кластеров. Пространственно близкое расположение полярных групп полипептида и органического растворителя способствует образованию комплексов вода-органический растворитель более сложных, чем 1:1 или 2:1. Таким образом, состояние воды определяется одновременным взаимодействием с полярными группами полипептида и растворителя.

Влияние органических растворителей на уровень сорбции. Сорбция диоксана на всех полипептидах, кроме **PBG**, сопровождается снижением гидратации. Вычитая из общей величины гидратации долю воды, связанную с растворителем, мы можем оценить уменьшение доли воды, связанной с полипептидом. Наблюдается линейная корреляция между увеличением доли упорядоченной структуры в присутствии органического растворителя и уменьшением уровня гидратации полипептидов (рис. 12). Это свидетельствует о едином механизме подавления гидратации для всего ряда исследованных полипептидов, а именно об уменьшении доступности гидратных центров полипептидов для воды за счет увеличения доли упорядоченной структуры. Исключение составляет **Na-PGA**, когда одновременно действуют два противоположных механизма: увеличение гидратации за счет уменьшения доли упорядоченной структуры и уменьшение гидратации за счет конкурентной сорбции растворителя на пептидных **NH**-группах.

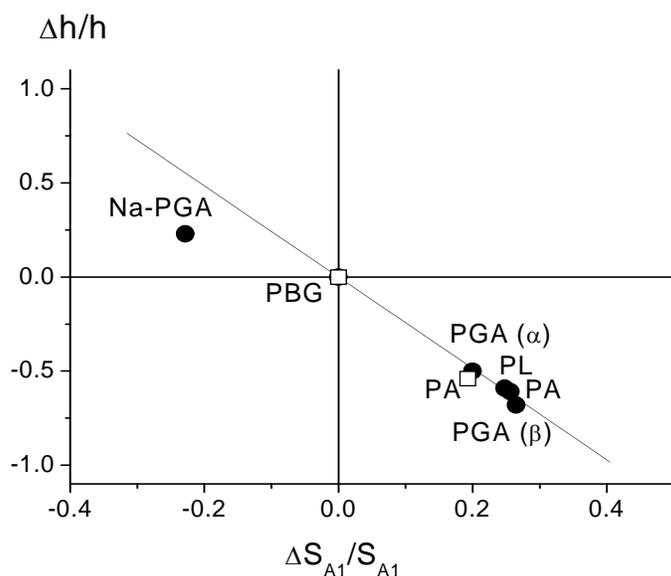


Рис. 12. Зависимость изменения гидратации пленок полипептидов в присутствии диоксана (●) и **AN** (□) от доли прироста упорядоченной структуры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Структура гидратной воды биополимеров имеет большое биологическое значение и исследуется различными методами. Благодаря высокой чувствительности к образованию водородных связей ИК-спектроскопия широко используется для изучения комплексов воды с полярными молекулами и полимерами. Основную трудность для ИК-спектроскопии в растворе представляет объемная вода, поглощение которой перекрывает спектр поглощения воды гидратной оболочки. Сорбция воды из газовой фазы растворителя на твердых пленках биополимеров позволяет последовательно изучать все стадии их гидратации от абсолютно сухого препарата до появления объемной воды.

Гомополипептиды имеют однородный аминокислотный состав, что существенно упрощает их спектральный анализ и расчеты, по сравнению с белками. Квантово-химические расчеты комплексов молекул растворителя с полипептидными фрагментами позволяют получить информацию о геометрии комплексов и энергии их образования. Расчет колебательных спектров комплексов и сопоставление их со спектрами свободных молекул позволяет выявить тонкие изменения структуры комплексов воды с полипептидом и органическим растворителем, которые сложно определить экспериментальными методами, но которые могут влиять на активность или стабильность биомакромолекул.

Проведенный нами сравнительный анализ применения молекулярно-механических, полуэмпирических методов и методов DFT расчета показал, что для исследования полипептидов наиболее оптимальным по точности и затратам компьютерных ресурсов является метод DFT PBE.

На основе совместного анализа экспериментальных данных ИК-спектроскопии и расчетных спектров выявлено, что в полярных полипептидах молекулы воды образуют цепочки и микрокластеры, чему способствует близкое пространственное расположение полярных и/или заряженных групп полипептида. В случае массивных гидрофобных фрагментов в составе боковых групп наблюдается экранирование полярных центров полипептида от молекул воды. При этом с полярными центрами полипептида взаимодействуют лишь одиночные молекулы воды.

Показано, что в упорядоченной вторичной структуре полипептидов молекулы органического растворителя локализуются в области боковых групп, не проникая к пептидному остову. При этом наиболее энергетически выгодным является образование водородных связей между протоно-акцепторными атомами молекул органического растворителя с протоно-донорными группами боковых цепей. Кроме того, исследованные органические растворители при сорбции на гидрофобных полипептидах обнаруживают тенденцию к образованию кластеров.

Для молекулы диоксана, которая обладает четырьмя метиленовыми группами, выгодными оказываются Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия и водородные связи

типа $C-H\cdots O$. Энергия образования последних мала, по сравнению с обычными водородными связями, однако образование большого числа таких связей приводит к существенной стабилизации комплекса.

Экспериментальные данные и данные расчета показывают, что для сильнополярной молекулы ацетонитрила, наряду с донорно-акцепторными взаимодействиями, оказываются выгодными диполь-дипольные взаимодействия, а также взаимодействия типа $C-H\cdots N$ между метильной группой ацетонитрила и протоно-акцепторными группами полипептида, которые несут частично-отрицательный заряд.

При сорбции из водно-органических смесей молекулы органического растворителя, локализованные в среде гидрофобных групп полипептида, гидратируются таким образом, что одиночные молекулы воды связывают по две молекулы органического растворителя. В среде полярных и заряженных боковых групп полипептида ацетонитрил и диоксан гидратируются молекулами воды, включенными в водородно-связанные цепочки (микрочластеры). Внедрение молекул диоксана и ацетонитрила в твердые полипептиды сопровождается изменением доли упорядоченной структуры полипептида. Образование упорядоченной структуры приводит к уменьшению доступности пептидных групп для воды. При этом доля воды, вытесненной из гидратных центров полипептидов в присутствии диоксана, коррелирует с долей новообразованной упорядоченной структуры в присутствии органического растворителя.

ВЫВОДЫ

1. На основании анализа структуры гидратной оболочки ряда полипептидов различного строения с использованием взаимодополняющих методов ИК-спектроскопии и квантовой химии определены факторы ее модификации низкомолекулярными соединениями на примере двух апротонных органических растворителей.
2. Показано, что при гидратации полярных полипептидов молекулы воды локализуются в виде микрочластеров, образуя водородные связи с участием полярных или заряженных фрагментов полипептидов. Наличие массивных гидрофобных групп в структуре боковых цепей приводит к экранированию полярных центров от молекул воды, ограничению образования кластерных структур воды и уменьшению количества воды в комплексах.
3. Молекулы исследованных органических растворителей в полипептидах с упорядоченной структурой образуют кластеры в области боковых цепей. Для полипептидов с полярными боковыми группами характерно образование водородных связей между протоно-акцепторными группами растворителя и протоно-донорными

группами боковых цепей. В полипептидах, содержащих неполярные и ароматические боковые группы, основной вклад при образовании комплексов с органическим растворителем вносят Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия и водородные связи типа С–Н...О.

4. При сорбции из водно-органических смесей локализация органического растворителя в структуре полипептида не меняется по сравнению с безводным растворителем.

5. В присутствии органического растворителя вода образует смешанные комплексы с одновременным участием полярных групп растворителя и полипептида. В гидрофобных полипептидах комплексы воды с полярными фрагментами боковых цепей и комплексы воды с растворителем пространственно разделены.

6. Сорбция органического растворителя из водно-органических смесей сопровождается изменением доли упорядоченной структуры. Образование межпептидных водородных связей уменьшает гидратацию, а разрыв водородных связей увеличивает ее.

7. Установлены следующие механизмы модификации гидратной оболочки полипептида органическим растворителем: а) изменение доступности гидратных центров полипептидов для молекул воды, б) прямая конкуренция с водой за гидратные центры, в) дополнительный вклад в гидратацию за счет принесения воды, связанной с полярными центрами растворителя.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сорбция диоксана на твердых полипептидах с различной структурой боковых групп / **О.Н. Макшакова**, Д.А. Файзуллин, В.Д. Федотов и др. // Сб. статей / МарГТУ – Йошкар-Ола, 2003 – Вып. X - С.169-172.

2. **Макшакова, О. Н.** Динамика боковых групп и вторичная структура твердых препаратов альбумина в ацетонитриле. / **О.Н. Макшакова**, Д.А. Файзуллин, В.Д. Федотов // Тез. докладов / XVII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии - Казань, 2003. - Т.4. - С.267.

3. **Макшакова, О. Н.** Влияние диоксана на твердые препараты полиглутаминовой кислоты в конформациях альфа-спирали и бета-структуры. / **О.Н. Макшакова**, Д.А. Файзуллин, В.Д. Федотов // Сб. тез. / Пушкино, 2004. - С.20.

4. **Макшакова, О. Н.** Пороговые явления при сорбции органического растворителя из смесей вода – диоксан на твердых препаратах белков и полипептидов. / **О.Н. Макшакова**, Д.А. Файзуллин, В.Д. Федотов // Тез. докладов / Воронежский университет – Воронеж, 2004. - Т.1. - С. 68-69.

5. Взаимодействие ацетонитрила и диоксана с твердыми препаратами полиглутаминовой кислоты с различным типом исходной структуры. / **О.Н.**

Макшакова, Д.А. Файзуллин, В.Д. Федотов и др. // Сб. статей / Казанский государственный университет - Казань, 2004 - Т.1. - С. 468-472.

6. **Макшакова, О. Н.** Связь между каталитической активностью и вторичной структурой α -химотрипсина, суспендированного в смесях вода-ацетонитрил./ **О.Н. Макшакова, Д.А. Файзуллин, В.Д. Федотов** // Вестник Казанского технологического университета – Отечество – Казань, 2004 - № 1-2. - С.114-119.

7. **Макшакова, О. Н.** Использование полипептидов в качестве модели сорбции органического растворителя на белках. / **О.Н. Макшакова, Д.А. Файзуллин, В.Д. Федотов** // Сб. тезисов / Пушино, 2005. – С 25.

8. Сравнение экспериментальных и расчетных величин сорбции органического растворителя на твердых белковых препаратах / **О.Н. Макшакова, Д.А. Файзуллин, В.Д. Федотов** и др. // Сб. статей / МарГТУ – Йошкар-Ола, 2005. – Ч.2 - С. 26-29.

9. **Makshakova, O.N** Hydration of poly- γ -benzyl-L-glutamate films from water-organic vapors by IR-spectroscopy / **O.N. Makshakova, D.A. Fauzullin, V.D. Fedotov** // Book of abstract - St.Petersburg, 2008 - P. 77.

10. **Makshakova, O.N.** Quantum chemical calculation of the structure of complexes between helix polypeptides and aprotic organic ligands. / **O.N. Makshakova, D.A. Fauzullin, E.A. Ermakova** // Books of abstracts / Mavis publisher - Kiev, 2009 – P. 123-124.

11. **Макшакова, О.Н.** Взаимодействие полипептидов с водой и органическими лигандами по данным ИК-спектроскопии и компьютерного моделирования. / **О.Н. Макшакова, Д.А. Файзуллин, Е.А. Ермакова** // Сб. тезисов / Изд-во «ФизтехПресс» КФТИ КазНЦ РАН. - Казань, 2009. – С. 173.

12. **Makshakova, O.N.** Geometry and vibrational frequencies of the helical polypeptides complexes with ligand molecules / **O.N. Makshakova, D.V. Chachkov, E.A. Ermakova** // Book of abstracts /Kazan state technological university – Kazan, 2009 – P. 51.

13. **Макшакова, О. Н.** Влияние диоксана на структуру гидратной оболочки пленок поли-DL-аланина. / **О.Н. Макшакова, Д.А. Файзуллин, Ю.Ф. Зуев** // Сб. тезисов / Изд-во Казанского Университета - Казань, 2010. – С. 31.

14. **Makshakova, O.** Computational study of hydrogen-bonding complex formation of helical polypeptides with water molecule / **O. Makshakova, E. Ermakova** // Journal of Molecular Structure: THEOCHEM. – 2010. – Vol. 942 - P. 7-14.

15. **Makshakova, O.** Geometry and vibrational frequencies of the helical polypeptide complexes with ligand molecules / **O. Makshakova, D. Chachkov, E. Ermakova** // International Journal of Quantum Chemistry. – 2010. – DOI 10.1002/qua.22644.