

Влияние гидратации на морфологию и рецепторные свойства тонкой пленки трипептида L-лейцил-L-лейцил-L-лейцин

© Зиганшин^{1*} Марат Ахмедович, Герасимов^{1*} Александр Владимирович, Бикмухаметова¹ Альсина Альбертовна, Ефимова¹ Ирина Георгиевна, Горбачук¹ Валерий Виленович, Зиганшина² Суфия Асхатовна и Бухараев² Анастас Ахметович

¹ Кафедра физической химии. Химический институт им. А.М. Бутлерова. Казанский (Приволжский) федеральный университет. Ул. Кремлевская, 18. г. Казань, 420008. Республика Татарстан. Россия. Тел.: (843) 233-73-09. Факс: (843) 233-74-16. E-mail: Marat.Ziganshin@ksu.ru

² Лаборатория физики и химии поверхности. Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского КазНЦ РАН. Ул. Сибирский тракт, 10/7. г. Казань, 420029. Республика Татарстан. Россия. Тел.: (843) 231-91-07

*Ведущий направление; +Поддерживающий переписку

Ключевые слова: олигопептид, клатрат, термогравиметрия, дифференциальная сканирующая калориметрия, масс-спектрометрия, кварцевые микровесы, атомно-силовая микроскопия, сорбция, гидратация.

Аннотация

В настоящей работе методом микровзвешивания на кварцевых микровесах (QCM-анализ) изучено влияние гидратации на рецепторные свойства трипептида L-лейцил-L-лейцил-L-лейцин по отношению к парообразным органическим соединениям. С помощью атомно-силовой микроскопии установлено влияние воды на процесс кристаллизации трипептида на поверхности высокоориентированного пиролитического графита. С помощью совмещенного метода термогравиметрии и дифференциальной сканирующей калориметрии с масс-спектрометрическим определением газообразных продуктов разложения (ТГ/ДСК/МС-анализ) определено остаточное содержание воды в порошке трипептида и параметры его термостабильности.

Введение

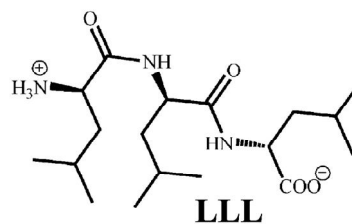
Хорошо известно, что вода играет ключевую роль в структурообразовании белков, а также определяет их свойства [1]. Увеличение содержания воды в фазе ферментов выше определенного порогового уровня приводит к кооперативному увеличению скорости катализируемой ими реакции [2-5]. Связывание антигенов антителами возможно только при достаточном уровне гидратации последних [6]. От уровня гидратации зависят так же и сорбционные свойства белков.

Увлажнение сывороточного альбумина человека и бета-лактоглобулина выше порогового значения гидратации приводит к увеличению их сорбционного сродства к крупным и/или гидрофобным органическим соединениям, которые не связывались на сухих белках [7, 8]. Следует отметить, что для неорганических цеолитов присутствие воды приводит к уменьшению их сорбционной емкости по отношению к органическим соединениям [9, 10].

Короткоцепные олигопептиды, являющиеся предшественниками белков, часто рассматриваются в качестве их моделей [11], при этом влияние воды на рецепторные свойства олигопептидов к настоящему времени остаются практически неизученными. С одной стороны известно, что кристаллы комплексов олигопептидов с органическими соединениями содержат воду [12, 13]. В тоже время для гидрофобных дипептидов L-аланил-L-валин и L-валил-L-аланин, образующих спиралевидные наноклоны, было показано, что вода не влияет на их сорбционную емкость по отношению к ксенону [14].

Таким образом, эффективное использование наноматериалов на основе олигопептидов для связывания и/или разделения органических соединений требует исследования влияния гидратации на процесс взаимодействия олигопептида с сорбатом.

В настоящей работе было изучено влияние гидратации на морфологию тонкой пленки и рецепторные свойства трипептида L-лейцил-L-лейцил-L-лейцин (**LLL**), образующего слоистые структуры, по отношению к ряду гидрофобных и гидрофильных «гостей».



Экспериментальная часть

Объекты исследования. В качестве объекта исследования в настоящей работе был использован трипептид L-лейцил-L-лейцил-L-лейцин (**LLL**) (*Chem-Impex*). Органические растворители очищались непосредственно перед применением по стандартным методикам [15]. Содержание основного вещества в растворителе, по данным газохроматографического анализа, было не менее 99.5%.

Методика проведения ТГ/ДСК/МС анализа. Остаточное содержание воды и термическая стабильность трипептида **LLL** были исследованы методом совмещенной термогравиметрии (ТГ) и дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) с помощью термоанализатора *STA 449 C Jupiter* (*Netzsch*), сопряженного с квадрупольным масс-спектрометром *QMS 403 C Aeolos* (*Netzsch, Германия*), как описано в работе [16].

Содержание воды в фазе трипептида рассчитывали по уравнению:

$$S_{ТГ} = \frac{\Delta m \cdot M_{\text{олигопептид}}}{(100 - \Delta m) \cdot M_{\text{гость}}}$$

где $S_{ТГ}$ – состав клатрата, моль воды на моль «хозяина»; Δm – потеря массы образца, %; $M_{\text{олигопептид}}$ – молекулярная масса трипептида; $M_{\text{гость}}$ – молекулярная масса воды.

Изучение морфологии тонких пленок трипептида с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ). Морфология пленок трипептида была изучена с помощью сканирующего зондового микроскопа «*Solver P47*» (*НТ-МДТ, Россия*) в полуконтактном режиме, как описано в работе [17].

Методика определения сенсорных откликов. Для исследования рецепторных свойств трипептида в тонких пленках по отношению к парообразным соединениям было использовано сенсорное устройство оригинальной конструкции типа кварцевых микровесов на основе пьезоэлектрических резонаторов (QCM-анализ). В качестве рабочих сенсоров были использованы кварцевые резонаторы с рабочей частотой 10 МГц (*ICM Co. Inc., № 131215-10*). Детально конструкция прибора описана в работе [18]. Ячейка с резонаторами термостатировалась при 298 К.

Покрытие из трипептида (~0.65 мкг) было приготовлено путем нанесения раствора **LLL** в метаноле на поверхность золотого электрода и последующей осушкой в токе теплого воздуха (45 °С) в течение 2 минут. После удаления растворителя фиксировалось изменение частоты кварцевого резонатора $\Delta F \sim 800$ Гц.

Средняя толщина полученного слоя трипептида составила ~40 нм. Эта величина была оценена исходя из площади и массы покрытия, плотности трипептида $\rho = 1.051$ г/см³ [13].

В сенсорном эксперименте жидкий сорбат дозировался микрошприцем в сенсорную ячейку в двукратном избытке по сравнению с количеством, необходимым для создания насыщенного пара в объеме ячейки.

Относительное давление паров сорбата в условиях динамического равновесия составляло $P/P_0 = 0.80 \pm 0.05$. Эта величина была определена с помощью газохроматографического анализа, как описано в работе [18]. Ошибка определения отклика пьезоэлектрического сенсора не превышала 10%. Шум базовой линии сенсора не превышал 2 Гц.

После эксперимента связавшийся сорбат удалялся продувкой теплым воздухом (45 °С) в течение 2-3 минут. Критерием полноты регенерации сенсорного покрытия служило возвращение частоты колебаний кварцевого резонатора к исходному значению.

Остаточное содержание воды в пленке (3 % масс.) определяли, как описано в работе [19].

Для изучения влияния гидратации на рецепторные свойства **LLL** по отношению к органическим соединениям в сенсорную ячейку дозировали воду, после выхода сенсорного сигнала на постоянное значение в ячейку дозировали органическое соединение (метанол, пиридин или толуол). Количество воды и органического соединения было в 3 раз больше, чем необходимо для создания насыщенного пара в объеме сенсорной ячейки.

Результаты и их обсуждение

1. Результаты ТГ/ДСК/МС анализа

Кривые ТГ/ДСК/МС анализа исходного порошка трипептида **LLL** приведены на рис. 1.

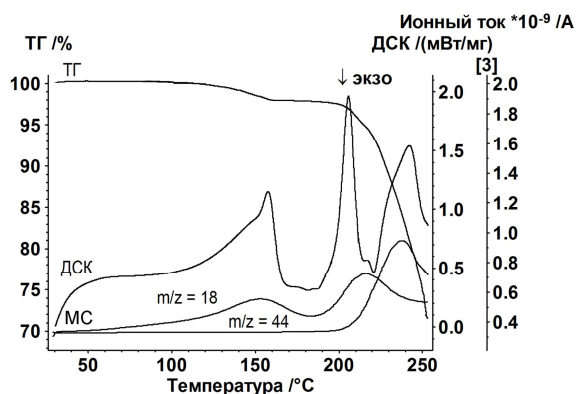


Рис. 1. Результаты ТГ/ДСК/МС анализа разложения образца трипептида **LLL**. Скорость нагрева 10 К/мин.

Согласно полученным результатам термоанализа трипептид **LLL** стабилен до 160 °С, что согласуется с литературными данными [20]. В интервале температур от 100 до 180 °С наблюдается потеря массы образца $\Delta m = 2.3\%$ (ТГ-кривая), связанная с уходом воды (МС-сигнал $m/z = 18$).

При 190 °С трипептид плавится (ДСК-кривая) с разложением, сопровождаемым выделением воды и углекислого газа (МС-сигнал $m/z = 44$), рис. 1.

Полученные результаты термоанализа свидетельствуют о присутствии в фазе трипептида воды в количестве 0.47 моль воды / моль **LLL**.

Дальнейшие исследования показали, что

осушенный при 100 °С трипептид очень быстро связывает воду из окружающего воздуха. Таким образом, было предположено, что вода является необходимым структурным элементом кристаллической упаковки трипептида.

Для проверки этого было проведено изучение кристаллизации **LLL** в присутствии осушителя.

2. Влияние гидратации на морфологию тонкой пленки трипептида

Ранее нами было установлено, что при кристаллизации трипептида из раствора в метаноле на поверхности высокоориентированного пиролиитического графита (ВОПГ) образуется пленка, неравномерно покрытая микро- и нанокристалликами трипептида, на поверхности которых присутствуют явно выраженные кристаллографические ступеньки, соответствующие росту кристалла [19].

В настоящей работе методом атомно-силовой микроскопии было проведено исследование влияния осушителя P_2O_5 на морфологию образующейся пленки **LLL**. Было установлено, что сразу после нанесения на поверхность ВОПГ тонкого слоя трипептида из метанола, большая часть его поверхности гладкая.

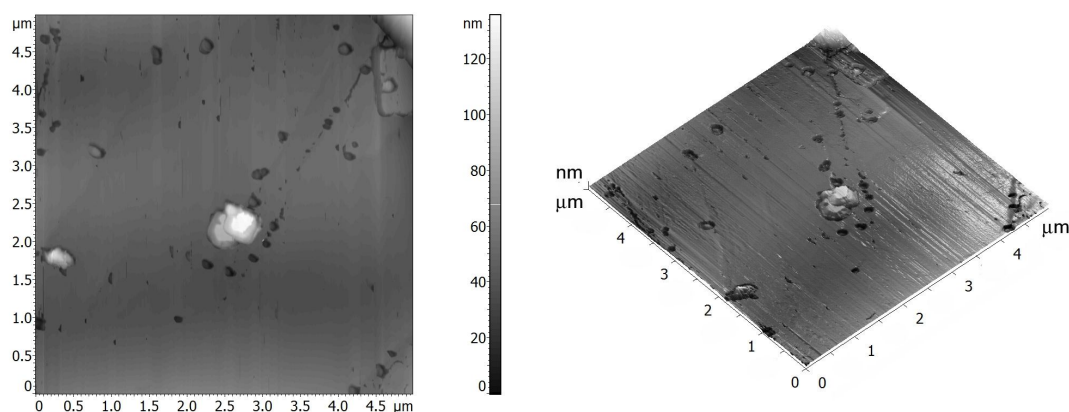


Рис. 2. АСМ изображение поверхности исходной пленки трипептида **LLL**, нанесенной на ВОПГ из раствора в метаноле

Разброс по высоте составляет 135 нм, рис. 2. АСМ изображение, полученное для этого же участка пленки, через 24 часа после ее осушки над P_2O_5 свидетельствует о существенном изменении морфологии, рис. 3.

Было установлено, что вследствие усыхания пленки в присутствии осушителя разброс по высоте уменьшился почти в 2 раза и составил 70 нм. На поверхности пленки сформировались нанообразования неправильной формы.

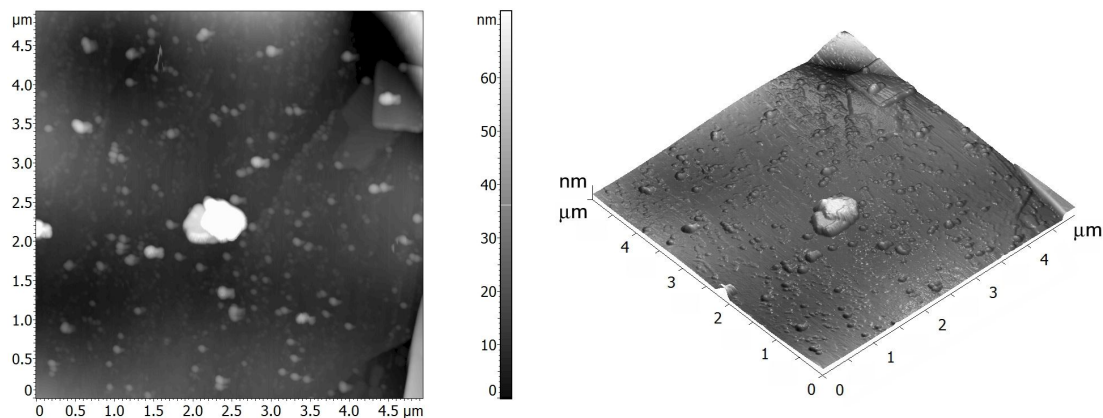


Рис. 3. АСМ изображение поверхности пленки трипептида **LLL**, нанесенной на ВОПГ из раствора в метаноле, и, осушенной над P_2O_5 в течение 24 часов

Таким образом, присутствие остаточного количества воды в пленке трипептида при его кристаллизации, даже из органического растворителя, является необходимым условием формирования кристаллов **LLL** правильной формы. Далее было изучено влияния воды на рецепторные свойства трипептида по отношению к органическим соединениям.

3. Влияние гидратации на рецепторные свойства трипептида

С помощью пьезоэлектрических сенсоров типа кварцевых микровесов были получены сенсорные отклики тонкого слоя **LLL** ΔF на пары метанола, пиридина и толуола в присутствии большого избытка воды, рис. 4.

Было установлено, что введение воды в сенсорную ячейку приводит к изменению частоты кварцевого генератора на $\Delta F \sim 20$ Гц, что соответствует составу клатрата 0.50 моль H_2O / моль **LLL**. Сенсорный отклик предварительно насыщенного парами воды сенсора при связывании метанола равен $\Delta F = 70$ Гц, рис. 4а, при сорбции толуола $\Delta F = 40$ Гц, рис. 4б, а в случае пиридина $\Delta F = 220$ Гц, рис. 4с, что соответствует составу клатратов **LLL** с этими «гостями» 1.03, 0.19, 1.29 моль «гостя» / моль **LLL**, соответственно. В то время как значения составов клатратов **LLL** с метанолом, толуолом и пиридином, полученные для осушенного олигопептида, составляют 1.41, 0.18 и 0.87 моль «гостя» / моль **LLL**, соответственно [19].

Полученные результаты свидетельствуют об уменьшении емкости **LLL** по отношению к гидрофильному метанолу в присутствии воды и об отсутствии влияния гидратации **LLL** на его сорбционную емкость по отношению к гидрофобному толуолу. В последнем случае можно говорить о независимом связывании толуола и воды в различные сорбционные места в фазе **LLL**, как это было ранее показано для фосфорорганических дендримеров на примере сорбции воды и *n*-гептана [21].

При сорбции паров метанола имеет место перекрывание части сорбционных мест с центрами связывания воды и, как следствие, конкуренция с водой, рис. 4а. Более сложное влияние воды на сорбцию органических соединений ранее было обнаружено для белков: гидратация приводила к росту сорбции гидрофобных соединений [7, 8] и уменьшению сорбции гидрофильных соединений [7].

Небольшое увеличение емкости **LLL** по отношению к пиридину при увлажнении, рис. 4в, может быть следствием образования дополнительных водородных связей между пиридином и водой.

Полученные данные позволили нам предположить, что при совместном связывании двух органических соединений можно будет зафиксировать явную конкуренцию за центры связывания. Такое исследование было проведено для пары пиридин – метанол, рис. 4г.

Предварительно пленка **LLL** была насыщена парообразным пиридином, полученный сенсорный отклик $\Delta F = 180$ Гц, соответствовал составу клатрата **LLL**·1.07 C_5H_5N , рис. 4г. При связывании паров метанола было обнаружено уменьшение величины сенсорного сигнала до значения $\Delta F = 108$ Гц, соответствующего составу клатрата **LLL**·1.5 $MeOH$. Наблюдаемое

ВЛИЯНИЕ ГИДРАТАЦИИ НА МОРФОЛОГИЮ И РЕЦЕПТОРНЫЕ СВОЙСТВА ТОНКОЙ ПЛЕНКИ... _ 155-161
 явление есть следствие конкуренции органических «гостей» за места связывания, при которой происходит замещение связанного пиридина на метанол.

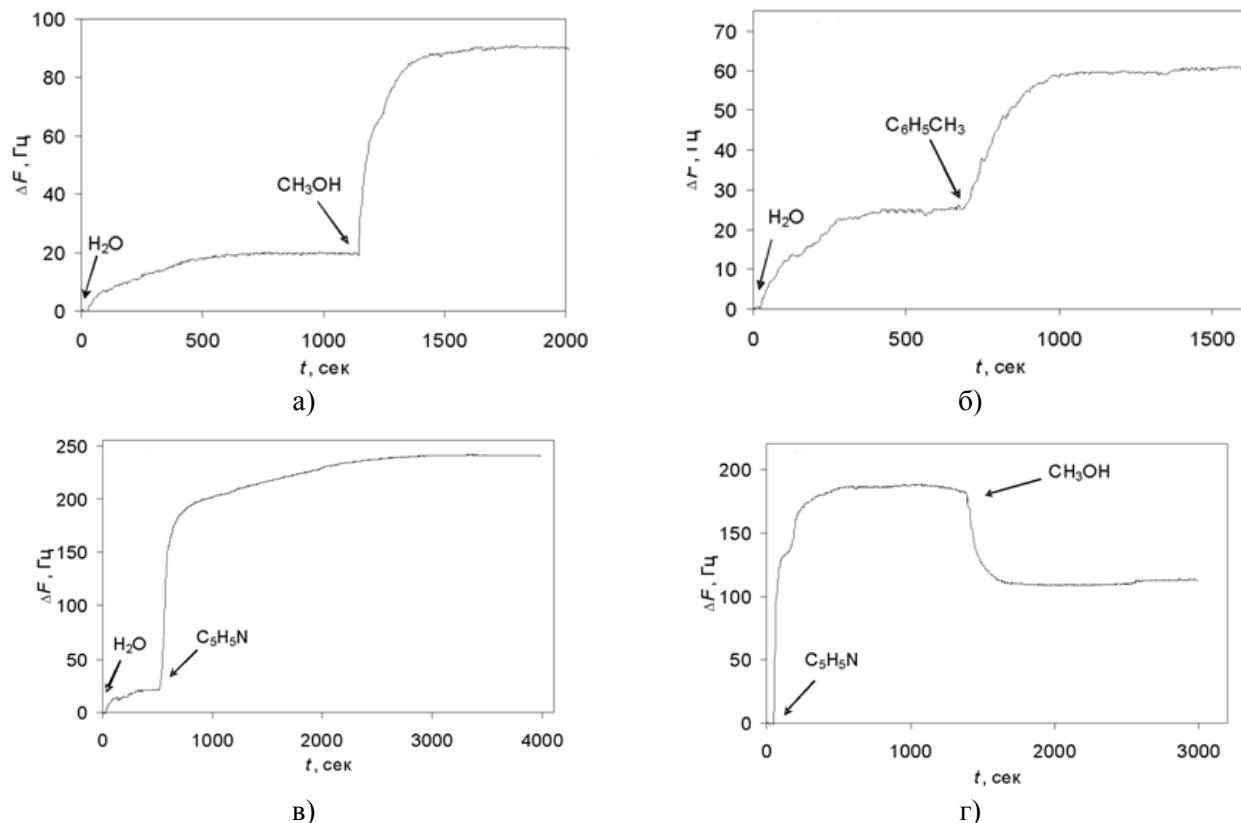


Рис. 4. Отклики QCM-сенсоров на основе трипептида **LLL** на последовательное введение в сенсорную ячейку а) воды и метанола, б) воды и толуола, в) воды и пиридина, г) пиридина и метанола. Активность органических соединений $P/P_0 = 0.80$ при 298 К. Сенсорные отклики ΔF приведены к одинаковой массе покрытия, соответствующей изменению частоты резонатора $\Delta F = 800$ Гц.

Падение сенсорного сигнала обусловлено различием молекулярных масс пиридина и метанола.

Аналогичное уменьшение сенсорного отклика QCM-сенсоров на основе адамантилкаликс[4]арена при замещении толуола на этанол было обнаружено в работе [18].

Следует отметить, что для полипептидного рецептора – сывороточного альбумина человека, ранее было обнаружено увеличение сорбционной емкости к бензолу и диоксану в присутствии второго органического компонента: этанола или ацетонитрила [7].

Подобное различие в сорбционных свойствах, по-видимому, связано с особой структурой трипептида, образующего слоистые кристаллы с антипараллельными β -слоями, в которых гидрофобные области чередуются с гидрофильными [13], что обеспечивает независимое связывание различных по природе сорбатов.

Выводы

1. Вода является необходимым структурным элементом кристаллической структуры трипептида L -лейцил- L -лейцил- L -лейцин. Присутствие остаточного количества воды ~ 0.5 моль H_2O / моль трипептида обеспечивает образование кристаллов правильной формы.
2. Влияние гидратации на сорбционные свойства трипептида L -лейцил- L -лейцил- L -лейцин неодинаково для сорбатов разной природы: гидрофобные соединения и вода связываются независимо, а гидрофильные соединения конкурируют с водой и между собой за часть сорбционных мест.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №12-03-00590-а.

Литература

- [1] D. Ringe. What makes a binding site a binding site? *Current Opinion Struct. Biol.* **1995**. Vol.5. P.825-829.
- [2] G. Bell, A.E.M. Janssen, P.J. Halling. Water activity fails to predict critical hydration level for enzyme activity in polar organic solvents: Interconversion of water concentrations and activities. *Enzyme Microb. Technol.* **1997**. Vol.20. P.471-477.
- [3] J. Partridge, P.R. Dennison, B.D. Moore, P.J. Halling. Activity and mobility of subtilisin in low water organic media: hydration is more important than solvent dielectric. *Biochem. Biophys. Acta.* **1998**. Vol.1386. P.79-89.
- [4] F. Yang, A.J. Russell. The role of hydration in enzyme activity and stability: 2. Alcohol dehydrogenase activity and stability in a continuous gas phase reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **1996**. Vol.49. P.709-716.
- [5] E. Barzana, A.M. Klibanov, M. Karel. Enzyme-catalyzed, gas-phase reactions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1987**. Vol.15. P.25-34.
- [6] S.J. Setford. Immunosensing in organic and mixed aqueous-organic phase environments. *Trends Anal. Chem.* **2000**. Vol.19. P.330-339.
- [7] V.V. Gorbachuk, M.A. Ziganshin, B.N. Solomonov. Supramolecular interactions of solid human serum albumin with binary mixtures of solvent vapors. *Biophys. Chem.* **1999**. Vol.81. P.107-123.
- [8] N.A. Mironov, V.V. Breus, V.V. Gorbachuk, B.N. Solomonov, T. Haertle. Effects of hydration, lipids, and temperature on the binding of the volatile aroma ter-penes by beta-lactoglobulin powders. *J. Agric. Food Chem.* **2003**. Vol.51. P.2665-2673.
- [9] M. Guillemot, J. Mijoin, S. Mignard, P. Magnoux. Adsorption of tetrachloroethylene (PCE) in gas phase on zeolites of faujasite type: Influence of water vapour and of Si/Al ratio. *Microporous and Mesoporous Materials.* **2008**. Vol.111. P.334-342.
- [10] M. Guillemot, J. Mijoin, S. Mignard, P. Magnoux. Adsorption of tetrachloroethylene on cationic X and Y zeolites: influence of cation nature and of water vapor. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**. Vol.46. P.4614-4620.
- [11] S.-J. Choi, W.-J. Jeong, S.-K. Kang, M. Lee, E. Kim, D.Y. Ryu, Y.-B. Lim. Differential Self-Assembly Behaviors of Cyclic and Linear Peptides. *Biomacromolecules.* **2012**. Vol.13. P.1991-1995.
- [12] C.H. Görbitz. An exceptionally stable peptide nanotube system with flexible pores. *Acta Crystallogr. B.* **2002**. Vol.58. P.849-854.
- [13] K. Go, R. Parthasarathy. Crystal structure and a twisted β -sheet conformation of the tripeptide L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucine monohydrate trimethanol solvate: conformation analysis of tripeptides. *Biopolymers.* **1995**. Vol.36. P.607-614.
- [14] R. Anedda, D.V. Soldatov, I.L. Moudrakovski, M. Casu, J.A. Ripmeester. A new approach to characterizing sorption in materials with flexible micropores. *Chem. Mater.* **2008**. Vol.20. P.2908-2920.
- [15] W.L.F. Armarego, C.L.L. Chai. Purification of laboratory chemicals, 6th ed. *Oxford: Butterworth-Heinemann.* **2009**. 760p.
- [16] Сафина Г.Д., Зиганшин М.А., Стойков И.И., Антипин И.С., Горбачук В.В. Влияние конфигурации тетракарбоксыпроизводного трет-бутилтиакаликс[4]арена на его рецепторные свойства по отношению к паробразным органическим соединениям. *Изв. Акад. Наук. Сер. Хим.* **2009**. №1. С.71-79.
- [17] Ефимова И.Г., Зиганшин М.А., Горбачук В.В., Зиганшина С.А., Бухараев А.А. Рецепторные свойства нанопористого материала на основе дипептида аланил-валин по отношению к органическим соединениям и воде. *Бутлеровские сообщения.* **2010**. Т.21. №9. С.29-36.
- [18] L.S. Yakimova, M.A. Ziganshin, V.A. Sidorov, V.V. Kovalev, E.A. Shokova, V.A. Tafeenko, V.V. Gorbachuk. Molecular recognition of organic vapors by adamantylcalix[4]arene in QCM sensor using partial binding reversibility. *J. Phys. Chem. B.* **2008**. Vol.112. No.49. P.15569-15575.
- [19] M.A. Ziganshin, I.G. Efimova, V.V. Gorbachuk, S.A. Ziganshina, A.P. Chuklanov, A.A. Bukharaev, D.V. Soldatov. Interaction of L-leucyl-L-leucyl-L-leucine thin film with water and organic vapors: receptor properties and related morphology. *J. Peptide Sci.* **2012**. Vol.8. P.209-214.
- [20] T.J. Burchell, D.V. Soldatov, G.D. Enrighta, J.A. Ripmeester. The ability of lower peptides to form co-crystals: inclusion compounds of Leu-Leu-Leu tripeptide with pyridine and picolines. *Cryst. Eng. Comm.* **2007**. Vol.9. P.922-929.
- [21] A.V. Gerasimov, M.A. Ziganshin, A.E. Vandyukov, V.I. Kovalenko, V.V. Gorbachuk, A.-M. Caminade, J.-P. Majoral. Specific vapor sorption properties of phosphorus-containing dendrimers. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**. Vol.360. P.204-210.