

УДК 577.325:54.057

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФИЦИНА С ГРАФТ-СОПОЛИМЕРОМ НАТРИЕВОЙ СОЛИ КАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЫ И *N*-ВИНИЛИМИДАЗОЛА МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА, ИНФРАКРАСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ И СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

© 2023 г. А.В. Сорокин*, **, С.С. Гончарова*, М.С. Лавлинская*, **, М.Г. Холявка*, ***,#, Ю.Ф. Зуев****, Д.А. Файзуллин****, М.С. Кондратьев*, *****, В.Г. Артюхов*

*Воронежский государственный университет, Россия, Университетская пл., 1, Воронеж, 394018, Россия

**Воронежский государственный университет инженерных технологий,
просп. Революции, 19, Воронеж, 394036, Россия

***Севастопольский государственный университет, Университетская ул., 33, Севастополь, 299053, Россия

****Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, ул. Лобачевского, 2/31, Казань, 420111, Россия

*****Институт биофизики клетки РАН — обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: holyavka@rambler.ru

Поступила в редакцию 20.10.2022 г.

После доработки 04.11.2022 г.

Принята к публикации 15.02.2023 г.

Методами гибкого молекулярного докинга, инфракрасной спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния исследован механизм взаимодействия фицина с графт-сополимером натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола. Выявлены функциональные группы и фрагменты молекул графт-сополимера, а также аминокислотные остатки, образующие первичную структуру фермента, вступающие во взаимодействия между фицином и графт-сополимером. Показано, что спектроскопия комбинационного рассеяния дает более полные представления о фрагментах макромолекул графт-сополимера, взаимодействующих с белком, по сравнению с инфракрасной спектроскопией. Установлено, что аминокислотные остатки, образующие активный центр фицина, участвуют в образовании водородных связей и гидрофобных взаимодействиях с графт-сополимером, что приводит к повышению протеолитической активности конъюгированного фермента.

Ключевые слова: фицин, графт-сополимеры, ИК-спектроскопия, КР-спектроскопия, механизм взаимодействия.

DOI: 10.31857/S0006302923020059, EDN: SAHGJT

Микроокружение макромолекул ферментов оказывает значительное влияние на их каталитическую способность и конформационное состояние. Различные типы слабых физических взаимодействий, таких как гидрофобные, ван-дер-Ваальсовы и др., а также образование водородных связей, в которые могут вовлекаться как аминокислотные остатки на поверхности глобулы, так и активный центр ферментов, часто изменяют функции белка, что может привести к гибели жи-

вой системы или затруднению использования фермента в технологических процессах. По этой причине исследование возможных механизмов взаимодействия ферментов с различными низко- и высокомолекулярными соединениями является важнейшей задачей современной энзимологии и биофизики, решение которой открывает возможности дизайна новых лекарственных препаратов или создания «умных» материалов с заданными свойствами, регулирующими активность биокатализаторов, применяемых в биотехнологических производствах.

Весьма информативным методом, позволяющим детализировать взаимодействия белковых

Сокращения: ИК-спектроскопия — инфракрасная спектроскопия, КР-спектроскопия — спектроскопия комбинационного рассеяния, НПВО — нарушенное полное внутреннее отражение.

макромолекул вплоть до номера аминокислотного остатка в последовательности, является гибкий молекулярный докинг. Благодаря этому методу можно не только оценить самопроизвольность взаимодействия, но и получить визуализацию комплекса белка, отражающую его топологию и положение лиганда относительно активного центра фермента. Кроме того, результатом *in silico* расчета является тип взаимодействия, в который вступает тот или иной аминокислотный остаток макромолекулы белка [1, 2]. Однако стоит отметить, что для подобного глубокого виртуального исследования механизма взаимодействия белков требуется наличие трехмерных моделей их макромолекул, получаемых на основании данных рентгеноструктурного и/или ЯМР-исследования.

Вибрационная молекулярная спектроскопия, включающая в себя инфракрасную (ИК) спектроскопию и спектроскопию комбинационного рассеяния (КР- или рамановскую спектроскопию), также находит широкое применение в исследовании структуры белков [3, 4]. Существует несколько методов ИК-спектроскопии, часто применяемых для получения информации о вторичной структуре белков, например, ИК-Фурье-спектроскопия с нарушенным полным внутренним отражением (НПВО). НПВО-ИК-спектроскопия показала свою эффективность при исследовании процессов кристаллизации белков, их поверхностных взаимодействий с другими высоко- и низкомолекулярными соединениями и процессов, связанных со структурными изменениями в белковых макромолекулах [5–8].

Для анализа вторичной структуры белков наиболее важными являются полосы Амид I (валентные колебания C=O), Амид II и Амид III, обусловленные деформационными колебаниями N–H и валентными колебаниями C–N. Наиболее интенсивная из них – полоса Амид I, обычно находящаяся в области $\sim 1650 \text{ см}^{-1}$, по смещению которой возможно оценить изменения во вторичной структуре белков, так как она характеризует колебательные моды пептидных связей [9]. Фактическое положение полосы Амид I определяется водородными связями, образуемыми пептидными группами. Однако полоса Амид I перекрывается с поглощением деформационных колебаний воды при 1640 см^{-1} , что осложняет ее регистрацию и анализ белковых систем в водных растворах [10]. Полоса Амид II, проявляющаяся в ИК-спектре в области $\sim 1550 \text{ см}^{-1}$, свободна от искажающего влияния воды и также используется для характеристики структурных изменений белковых молекул [11]. Так, в работе [12] с помощью НПВО-ИК-спектроскопии были оценены конформационные изменения цистеиновых протеаз – бромелина, папаина и фицина – в результате адсорбционной иммобилизации на поверхности

хитозана. Из данных по положению полос Амид I и II белков в ферментных препаратах установлено, что в ходе взаимодействия белковых макромолекул с полисахаридом происходит разрушение их α -спиральных доменов, возрастает число β -складчатых областей, а конформации всех исследуемых ферментов отклоняются от глобулярных к более вытянутым.

Метод спектроскопии комбинационного рассеяния может дать аналогичную информацию о вторичной структуре белкового остова с акцентом на состоянии хромофоров, ароматических фрагментов и других боковых заместителях полипептидных цепей, обуславливающих, в том числе, третичную структуру макромолекул [13]. Более того, известен ряд преимуществ рамановской спектроскопии над ИК-Фурье-исследованием. Например, функциональные группы, такие как S–S, C–S и S–H, характеризуются высокой поляризуемостью. Такие группы могут слабо проявляться или полностью отсутствовать в ИК-спектрах, и для их детектирования требуются концентрированные и высокоочищенные пробы [14]. С помощью рамановской спектроскопии удалось определить температуру денатурации шипового гликопротеина S1 вируса SARS-CoV-2. При этом результаты опытов коррелируют с данными, полученными методом дифференциальной калориметрии, с точностью до 2°C [15].

Таким образом, комбинируя виртуальные расчеты и методы спектроскопических исследований, можно получить комплексное представление о механизме взаимодействия фермента с компонентами его микроокружения и оценить влияние последнего на каталитическую активность фермента.

Фицин (КФ 3.4.22.3) – тиоловая папаиноподобная эндопептидаза, выделяемая из растений рода *Ficus* [16]. Активный центр фермента содержит остатки аминокислот цистеина и гистидина. Фермент широко применяется в пищевых биотехнологиях и медицине [17], однако, как и многие биологические объекты, характеризуется низкой стабильностью. Наиболее доступным способом его защиты от неблагоприятного воздействия различных факторов изменения микроокружения является иммобилизация на различных носителях. К последним предъявляется несколько требований, среди которых доступность, низкая токсичность, а также способность сохранять протеолитическую способность фермента. Для оценки влияния взаимодействия фицин-носитель на практически значимые свойства фермента целесообразно изучить механизм их связывания комплексом методов.

В связи с вышесказанным целью настоящей работы является исследование механизма взаимодействия фицина с графт-сополимером натри-

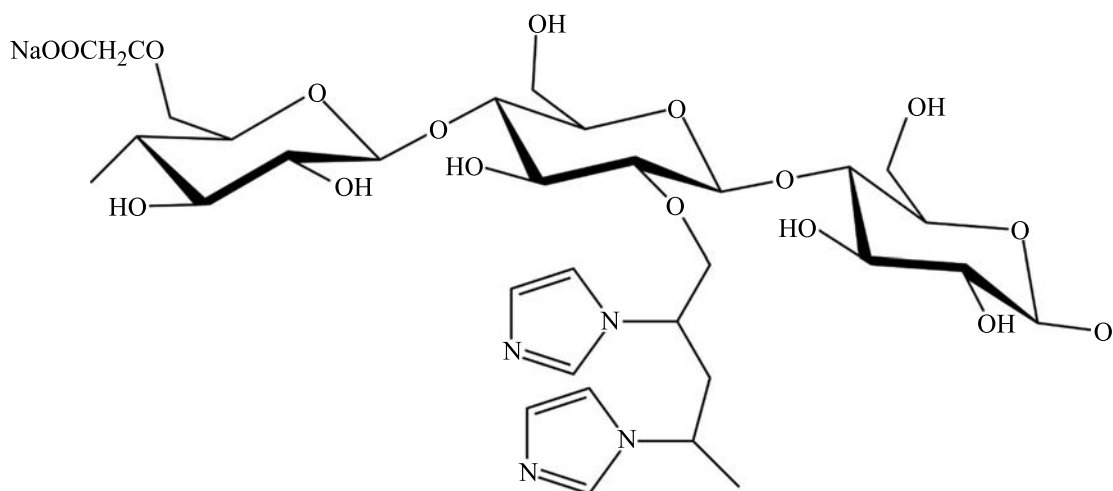


Рис. 1. Фрагмент структуры графт-сополимера натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола.

евои соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола методами молекулярного докинга, ИК- и КР-спектроскопии, а также оценка влияния этого взаимодействия на каталитическую активность фермента. Выбор предложенного носителя обусловлен его низкой токсичностью и высокой комплексообразующей способностью [18]. Более того, структура предлагаемого носителя содержит различные типы функциональных групп и углеродный остов привитых боковых цепей, способных образовывать водородные связи и различные типы слабых физических взаимодействий. Это делает графт-сополимер натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола перспективной моделью для создания микроокружения глобул фицина, влияющего на его протеолитическую активность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали фицин, субстратом для гидролиза был выбран азоказеин, оба — производства Sigma (США). Вещества использовали без дополнительной очистки.

Графт-сополимер натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола получали по следующей методике: навеску натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Sigma Aldrich, Германия; средняя молекулярная масса — 90 кДа, степень замещения 0.7) массой 0.5 г растворяли в 85 мл дистиллированной воды, после чего вносили 0.05 г растворенного в 5 мл дистиллированной воды персульфата калия. Полученную смесь дегазировали трехкратным повторением циклов замораживания—вакуумирования—оттаивания, затем вносили под током аргона навеску сухого метабисульфита натрия массой 0.04 г. Реакционную массу термостатировали в течение 20–30 мин. От-

дельно проводили вакуумную дегазацию 5.34 мл *N*-винилимидазола (Sigma Aldrich, Германия), после чего вносили в реактор под током аргона. Синтез вели в течение 18 часов при 40°C. По завершении времени процесса продукт осаждали в ацетоне («Вектон», Россия), центрифугировали и сушили в вакуумном шкафу до постоянной массы. Образовавшийся продукт очищали от примесей и гомополимера на экстракторе Сокслета этиловым спиртом со спектрофотометрическим контролем. Фрагмент структуры графт-сополимера натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола представлен на рис. 1.

Синтезированный графт-сополимер характеризовали согласно методикам, представленным в работе [18]. Эффективность прививки (*GE*) определяли как разность масс очищенного продукта реакции (m_2 , г) и используемой натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы ($m_{\text{СМС}}$, г), отнесенную к массе загруженного *N*-винилимидазола ($m_{\text{мон}}$, г):

$$GE = \frac{m_2 - m_{\text{СМС}}}{m_{\text{мон}}} \times 100\%. \quad (1)$$

Для определения молекулярной массы привитых цепей поли-*N*-винилимидазола графт-сополимер (в виде порошка) растворяли в 250 мл 0.1 N раствора NaNO_2 , добавляли эквимольное количество 0.1 N раствора HCl и выдерживали в течение суток при комнатной температуре. Затем смесь осаждали в ацетоне, осадок выделяли центрифугированием и сушили в вакуумном сушильном шкафу при $50 \pm 2^\circ\text{C}$ до постоянной массы.

Молекулярную массу и индекс полидисперсности определяли методом гель-проникающей хроматографии на хроматографе Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, США), оснащенном

изократическим насосом, рефрактометрическим детектором и колонкой PLmixC. Для этого готовили раствор выделенного полимера в *N*-метилпирролидоне с концентрацией 1 г/мл. В качестве элюента использовали 0.03 М LiCl в *N*-метилпирролидоне при 50°C, скорость потока составляла 0.5 мл/мин, объем вводимой пробы — 20 мкл. Калибровку проводили по узкодисперсным образцам полистирола.

Установлено, что эффективность прививки составила 42%, средневесовая молекулярная масса привитых цепей поли-*N*-винилимидазола — 12569 Да, индекс полидисперсности — 2.3.

Иммобилизацию фицина на матрице полученного сополимера, содержание белка в полученном препарате, а также определение его каталитической активности проводили согласно методикам, представленным в работе [19]. Иммобилизацию фицина на графт-сополимерах осуществляли адсорбционным методом. К 0.5 г носителя добавляли 10 мл раствора фермента (в концентрации 2 мг/мл в боратном буфере, pH 9.0), инкубировали в течение 2 ч. После окончания инкубации образовавшийся осадок промывали с помощью диализа против 50 мМ трис-HCl-буфера (pH 7.5) через целлофановую мембрану с размером пор 25 кДа до отсутствия в промывных водах белка (контроль осуществляли на спектрофотометре СФ-2000 при $\lambda = 280$ нм).

Содержание белка в иммобилизованном препарате определяли методом Лоури со следующей модификацией: на первом этапе анализа осуществляли разрушение связей между полисахаридом и молекулами фермента. Для этого иммобилизованный фицин обрабатывали раствором K₂Na-тарtrate (в концентрации 20 мг/мл или 0.7 М), приготовленным на 1 М NaOH, при 50°C в течение 10 мин. Отсутствие процессов разрушения фермента контролировали путем регистрации и анализа его спектра поглощения на спектрофотометре UV-2550PC (Shimadzu Scientific Instruments, Япония).

Определение протеолитической активности фицина проводили на субстрате азоказеине (Sigma, США). К 50 мг образца добавляли 200 мкл Трис-HCl-буфера, pH 7.5, 800 мкл азоказеина (0.5% в 50 мМ Трис-HCl-буфере, pH 7.5) и инкубировали 2 ч при 37°C. Далее добавляли 800 мкл трихлоруксусной кислоты (5%), инкубировали 10 мин при 4°C, затем центрифугировали в течение 3 мин при 11700 *g* для удаления негидролизованного азоказеина. К 1200 мкл супернатанта добавляли 240 мкл 3%-го NaOH для нейтрализации кислоты, после чего измеряли оптическую плотность опытной пробы при 410 нм в одноканальной кювете. Контрольная проба содержала 800 мкл азоказеина, 800 мкл трихлоруксусной кислоты, 50 мг образца и 200 мкл Трис-HCl-бу-

фера. За единицу каталитической активности принимали количество фицина, которое в условиях эксперимента гидролизует 1 мкМ субстрата за 1 мин.

Для исследования механизма взаимодействия фицина с графт-сополимером были использованы методы гибкого молекулярного докинга, ИК- и КР-спектроскопии. ИК-спектры образцов, представляющих собой сухие тонкодисперсные порошки, регистрировали на ИК-спектрометре IRAffinity1 (Shimadzu Scientific Instruments, Япония) методом НПВО с использованием приставки с призмой из селенида цинка, диапазон регистрации — 700–4000 см⁻¹. Спектр накапливали в течение четырех циклов регистрации по 72 сканирования в каждом. Эксперимент повторяли как минимум трижды на разных образцах. Суммарная погрешность измерения сдвигов полос поглощения в опыте по сравнению с контролем составляла 0.1–0.5 см⁻¹ в зависимости от ширины и интенсивности полосы. КР-спектры получали на ИК-Фурье-спектрометре с рамановской приставкой Tensor 37 Vertex 70 RAM II (Bruker Optic GmbH, Германия), мощность лазера составляла 250 мВт, длина волны излучения — 1064 нм, количество накоплений — 1024 скана. *In silico* исследование взаимодействия фицина и графт-сополимера проводили в пакете Autodock Vina (<https://sourceforge.net/projects/autodock-vina-1-1-2-64-bit/>) с использованием трехмерной структуры фицина (PDB ID: 4YYW, <https://www.rcsb.org/structure/4YYW>). Подготовку модели структуры энзима и оптимизацию матрицы полимера-носителя проводили, как описано в работе [20]. Структурную модель графт-сополимера строили в молекулярном конструкторе HyperChem (<http://www.hypercubeusa.com/>), после чего она была последовательно оптимизирована сначала в силовом поле AMBER, а затем квантово-химически в PM3. Лиганд в расчетах обладал максимальной конформационной свободой: допускалось вращение функциональных групп вокруг всех одинарных связей. Расстановка заряда на молекуле носителя и его протонирование/депротонирование осуществлялись автоматически в пакете MGLTools 1.5.6 (<https://ccsb.scripps.edu/mgltools/1-5-6/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выявления механизма взаимодействия фицина с матрицей полимера-носителя нами был применен метод гибкого молекулярного докинга. Данные расчетов демонстрируют отрицательное значение аффинности, равное –6.2 ккал/моль, подтверждающее самопроизвольное взаимодействие белка и носителя. Из анализа топологии модели комплекса фицин–графт-сополимер (рис. 2а) следует, что последний располагается в полости между доменами, образующими глобулу

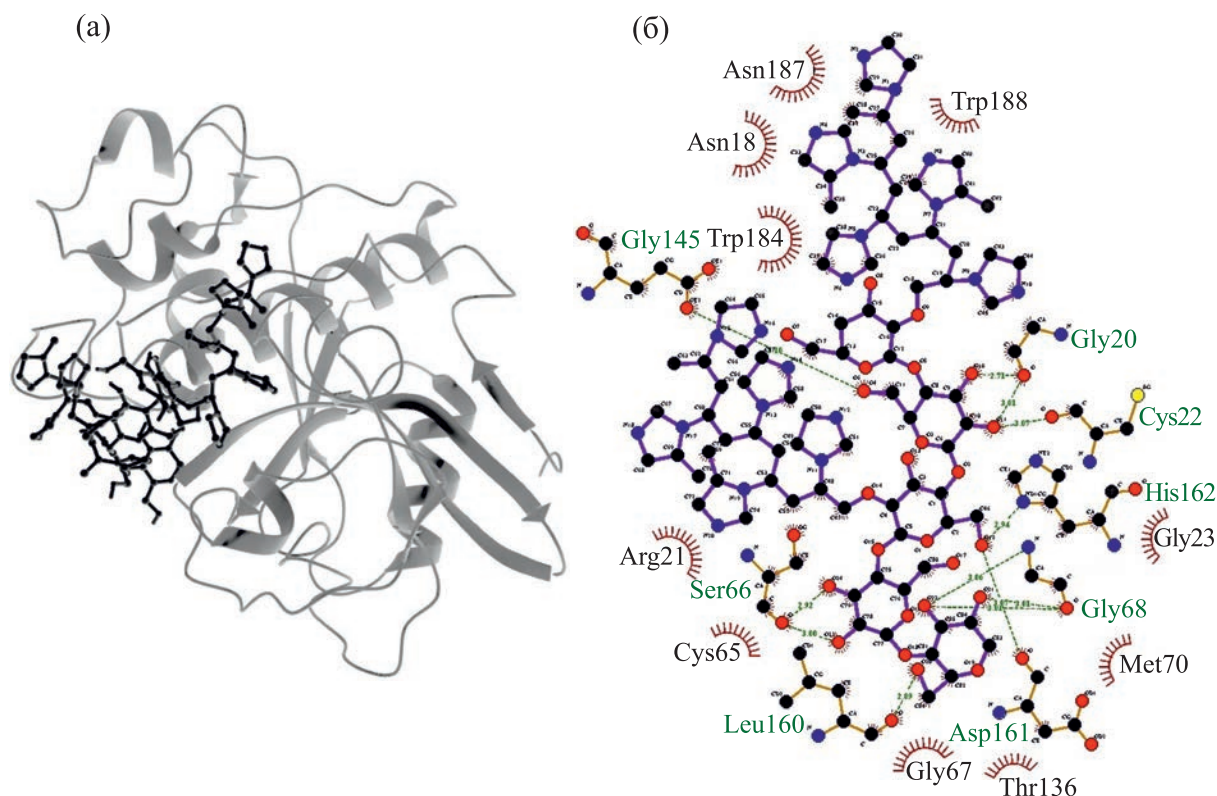


Рис. 2. Топология комплекса фицин-графт-сополимер (а) и связи и взаимодействия между ними, пунктирными линиями обозначены водородные связи, длина которых приведена в Å (б).

фицина. Вследствие разветвленного строения графт-сополимера его молекула выходит за пределы полости, содержащей активный центр фермента, и может взаимодействовать с остатками аминокислот, находящихся на поверхности глобулы белка. Более детальное рассмотрение модели показывает, что водородные связи, оказывающие наибольшее влияние на конформационное состояние и каталитическую активность фермента, образуют со стороны матрицы-носителя только гидроксильные или карбоксиметильные группы полисахаридного остова. В этих процессах

участвует в том числе и одна из аминокислот активного центра фицина — His162 (рис. 26, табл. 1). Боковые привитые звенья поли-*N*-винилимидазола вступают в прочие, в основном гидрофобные, взаимодействия, причем как азольные циклы, так и углеродные цепи. В целом, результаты расчета *in silico* хорошо коррелируют с данными спектроскопических исследований (см. ниже), указывают на участие тех же функциональных групп графт-сополимера и выявляют природу аминокислотных остатков белка в процессе образования конъюгата фицина с носителем.

Таблица 1. Аминокислотные остатки фицина, образующие связи и взаимодействия с графт-сополимером натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола*

Остатки, образующие Н-связи, и их длина, Å	Остатки, вступающие в прочие взаимодействия
Gly20, 2.71 и 3.01 Cys22, 3.07 Ser66, 2.92 и 3.00 Gly68, 3.06, 3.01; 3.01 Gly145, 5.10 Leu160, 2.89 Asp161, 3.07 His162 , 2.94	Asn18, Arg21, Gly23, Cys65, Gly67, Met70, Thr136, Trp184, Asn187, Trp188

Примечание. Жирным шрифтом выделен аминокислотный остаток, входящий в активный центр фицина.

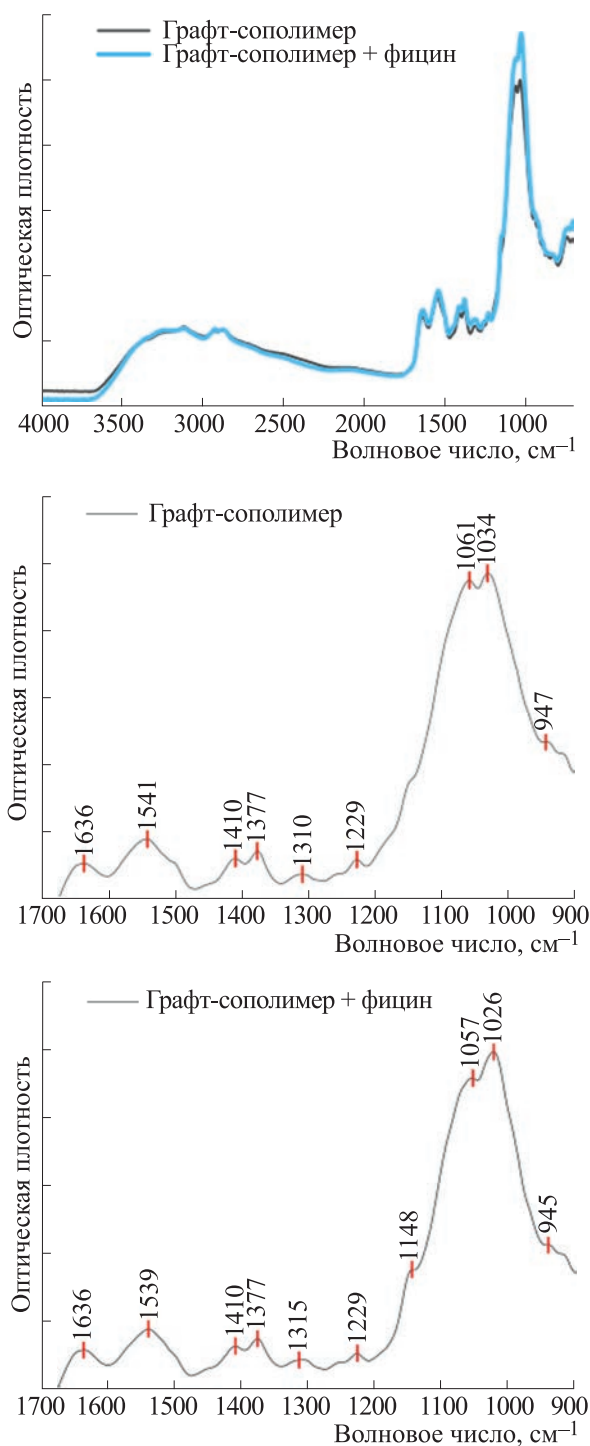


Рис. 3. ИК-спектры графт-сополимера натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола и его конъюгата с фицином.

На рис. 3 представлен ИК-спектр графт-сополимера натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола, содержащий следующие характеристические полосы поглощения — при 914, 1228 и 1635 см^{-1} , отвечающие различным проявлениям имидазольного цикла — деформа-

ционным колебаниям азольной структуры, колебаниям C—N и валентным колебаниям C=N соответственно; при 1034, 1060 и 1149 см^{-1} , соответствующие колебаниям пиранозных циклов, их эфирным и 1,4- β -гликозидным связям соответственно; ряд полос при 1377, 1410 и 1541 см^{-1} ,

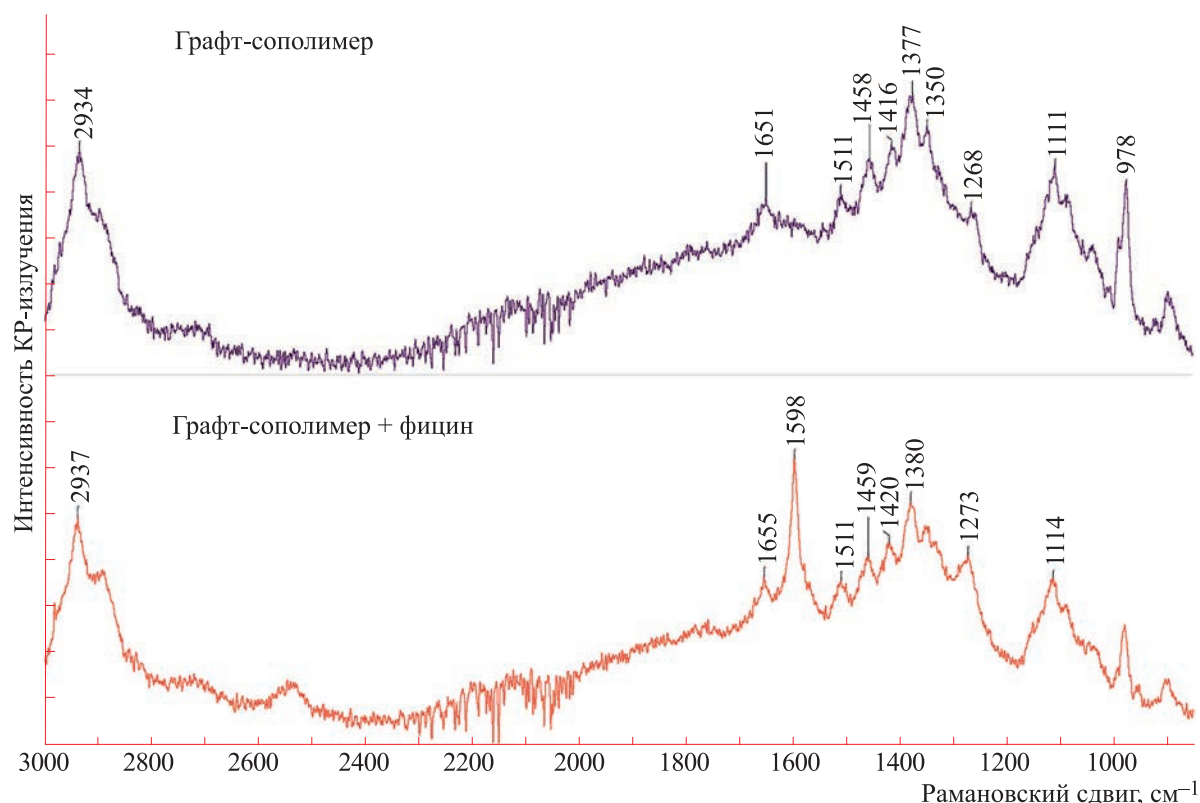


Рис. 4. КР-спектры графт-сополимера натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола и его конъюгата с фицином.

отражающих колебания диссоциированных карбоксильных групп соли карбоксиметилцеллюлозы; полосы в области $2870\text{--}2935\text{ см}^{-1}$, обусловленные колебаниями метиленовых групп, а также широкая полоса в области $3000\text{--}3400\text{ см}^{-1}$ с явно выраженным максимумом при 3111 см^{-1} , соответствующая гидроксильным группам целлюлозы [18, 19, 21]. Стоит отметить, что в ИК-спектре синтезированного графт-сополимера присутствуют полосы поглощения в области $1541\text{--}1635\text{ см}^{-1}$, критически важной для исследования структурного состояния молекул белков. Этот факт может затруднить анализ состояния молекул фицина в изучаемом препарате.

В результате определения содержания белка в полученном после иммобилизации препарате установлено, что концентрация фицина составляет 30.0 ± 1.8 мг энзима на один грамм носителя. ИК-спектр биокатализатора представлен на рис. 3 (отдельно выделена область $900\text{--}1700\text{ см}^{-1}$, представляющая наибольший интерес при исследовании белков). В спектре не проявляются новые полосы, например, Амид I или Амид II. Это может быть связано с перекрыванием амидных полос с функциональными группами матрицы-носителя или же с недостаточной концентрацией фицина в препарате. Можно отметить изменения

в интенсивности или форме некоторых полос поглощения, например, отвечающих метиленовым группам и пиранозным циклам. Для последних также выявляется смещение положения максимумов и изменение соотношения интенсивности в модах, формирующих сигнал на спектре. Положение максимума также смещается для полосы с 1541 до 1539 см^{-1} , описывающей валентные асимметричные колебания карбоксилат-аниона. Таким образом, можно заключить, что между фицином и графт-сополимером происходят слабые физические взаимодействия, в которые, по-видимому, вовлечены карбоксильные и гидроксильные группы, а также гидрофобные фрагменты матрицы-носителя. Однако из полученных данных нельзя сделать определенных выводов о конформационном состоянии фицина. Напомним, что исследование методом ИК-спектроскопии проводилось для образцов в виде тонкодисперсных порошков без какой-либо дополнительной обработки.

На рис. 4 представлены КР-спектры исследуемых порошкообразных препаратов синтезированного графт-сополимера и его комплекса с фицином. В спектре носителя также присутствуют сигналы, описывающие как фрагменты натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (1111 см^{-1} —

колебания пиранозных циклов; 1377 см^{-1} — веерные колебания метиленовых групп карбоксиметильных фрагментов, 1416 см^{-1} — симметричные валентные колебания карбоксильных групп, 2934 см^{-1} — различные колебания ОН-групп), так и привитых цепей поли-*N*-винилимидазола (978 см^{-1} — деформационные колебания имидазольных колец, 1268 см^{-1} — крутильные колебания метиленовых групп, 1651 см^{-1} — валентные колебания $\text{C}=\text{N}$) [22, 23]. В КР-спектре комплекса присутствуют описанные выше полосы, для многих из них наблюдается смещение рамановского сдвига. Наиболее ярко это выражено для сигналов, соответствующих полярным фрагментам, например, имидазольным циклам (с 1268 до 1273 см^{-1} и с 1651 до 1655 см^{-1}), карбоксильным (с 1416 до 1420 см^{-1}), пиранозным (с 1111 до 1114 см^{-1}) и гидроксильным (с 2934 до 2937 см^{-1}) группам. Смещение сигнала неполярных метиленовых фрагментов также присутствует. Таким образом, результаты КР-спектроскопии не противоречат результатам ИК-спектроскопии и указывают на то, что во взаимодействии с фицином вступают как полярные, так и неполярные фрагменты молекул графт-сополимера. Стоит отметить, что по данным КР-спектроскопии, более чувствительной к колебаниям неполярных групп, становится заметным вовлечение во взаимодействие азольных колец боковых привитых цепей, что никак не отражалось на результатах ИК-спектроскопии. Более того, в спектре иммобилизованного фицина появляется новая интенсивная полоса при 1598 см^{-1} , отвечающая колебаниям боковых заместителей ароматических аминокислот [24]. Примечательно, что в спектре иммобилизованного фицина не проявилась характеристическая полоса Амид I, по-видимому, она не разрешилась с полосой колебаний имидазольных колец в области 1650 см^{-1} . Таким образом, в результате исследования механизма взаимодействия фицина и графт-сополимера натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы с *N*-винилимидазолом методом КР-спектроскопии получены более полные представления о функциональных группах графт-сополимера, принимающих участие в процессе конъюгации, однако сделать ценные выводы о вторичной структуре фермента также не представляется возможным.

В связи с тем, что во взаимодействии с графт-сополимером принимают участие аминокислоты активного центра фермента, представляло интерес сравнить активность нативного и конъюгированного фицина. Полная (в $\text{ед}\cdot\text{мл}^{-1}$ раствора) и удельная ($\text{ед}\cdot\text{мг}^{-1}$ белка) активности нативного фермента с концентрацией $2\text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$, определен-

ная по субстрату азоказеину, составила 96.0 ± 2.0 и 48.5 ± 1.6 соответственно. Для конъюгированного препарата фермента, содержащего $30.0 \pm 1.8\text{ мг}$ фермента на один грамм носителя, эти значения равны 157.0 ± 3.3 и 103.0 ± 2.2 соответственно. Из полученных данных видно, что взаимодействие полимера с фицином приводит к увеличению протеолитической активности фермента, что, по-видимому, обусловлено модуляцией активного центра фермента.

ВЫВОДЫ

Таким образом, был исследован механизм взаимодействия цистеиновой протеазы фицина с графт-сополимером натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола методами гибкого молекулярного докинга, ИК- и КР-спектроскопии. Идентифицированы функциональные группы графт-сополимера и аминокислотные остатки фермента, вступающие во взаимодействие, и показано, что КР-спектроскопия дает более полное представление о взаимодействии компонентов изучаемой системы по сравнению с ИК-спектроскопией сухих мелкодисперсных образцов. Выявлено, что конъюгированный фицин обладает более высокой протеолитической активностью, что, по-видимому, обусловлено модуляцией активного центра фермента, индуцированной слабыми физическими взаимодействиями аминокислотных остатков активного центра белковой молекулы с фрагментами графт-сополимера.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данные ИК- и КР-спектроскопии получены с использованием оборудования Распределенного коллективного спектро-аналитического Центра изучения строения, состава и свойств веществ и материалов ФИЦ КазНЦ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 21-74-20053 (молекулярный докинг — М.С. Кондратьев, иммобилизация и характеристика ферментного препарата — С.С. Гончарова, концептуализация работы — М.Г. Холявка и В.Г. Артюхов, подготовка и оформление рукописи — М.С. Лавлинская), Совета по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук, грант МК-2517.2022.1.3 (синтез графт-сополимера натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола — А.В. Сорокин), Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Государственного задания Казанского научного

центра РАН (регистрация и анализ ИК- и КР-спектров — Д.А. Файзуллин, обсуждение результатов — Ю.Ф. Зувев).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Tu, X. Zheng, P. Liu, et al., *Sci. Total Environ.*, **763**, 142959 (2021).
2. O. Vavra, J. Damborsky, and D. Bendar, *Biotechnol. Adv.*, **60**, 108009 (2022).
3. R. Vogel and F. Siebert, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **4**, 518 (2000).
4. H. Li, R. Lantz, and D. Du, *Molecules*, **24**, 186. (2019).
5. Yu. Ozaki, M. Baranska, I. K. Lednev, et al., *Vibrational Spectroscopy in Protein Research. From Purified Proteins to Aggregates and Assemblies* (Academic Press, London, San Diego, Cambridge, Oxford, 2020).
6. S.E. Glassford, L. Govada, N.E. Chayen, et al., *Vib. Spectrosc.*, **63**, 492 (2012).
7. S. G. Kazarian and K. L. Andrew Chan, *Analyst.*, **138**, 1940 (2013).
8. S. E. Glassford, B. Byrne, and S. G. Kazarian, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.*, **1834**, 2849 (2013).
9. I. Haris and F. Severcan, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **7**, 207 (1999).
10. A. Barth and Ch. Zscherp, *Q. Rev. Biophys.*, **35**, 369 (2002).
11. D. Ami, F. Lavatelli, P. Rognoni, et al., *Sci. Rep.*, **6**, 29096 (2016).
12. M. Holyavka, D. Faizullin, V. Koroleva, et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **180**, 161 (2021).
13. C. Qu, Yu. Li, Sh. Du, et al., *Food Res. Int.*, **161**, 111805 (2022).
14. Z. Wen, *J. Pharm. Sci.*, **96**, 2861 (2007).
15. A. C. Hernández-Arteaga, H. J. Ojeda-Galván, M. C. Rodríguez-Aranda, et al., *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **264**, 120269 (2022).
16. A. Kheroufi, M. E. Brassesco, D. A. Campos, et al., *Food Biosci.*, **47**, 101707 (2022).
17. R. Morellon-Sterling, H. El-Siar, O. L. Tavano, et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **162**, 394 (2020).
18. V. A. Kuznetsov, A. V. Sorokin, M. S. Lavlinskaya, et al., *Polym. Bull.*, **76**, 4929 (2019).
19. A. V. Sorokin, S. S. Olshannikova, M. S. Lavlinskaya, et al., *Polymers*, **14**, 2279 (2022).
20. S. S. Olshannikova, N. V. Malykhina, M. S. Lavlinskaya, et al., *Polymers*, **14**, 3223 (2022).
21. A. Sorokin, P. Sukhanov, V. Popov, et al., *Cellulose*, **29**, 159 (2022).
22. H. A. Ambjörnsson, K. Schenzel, and U. Germgård, *BioRes.*, **8**, 1918 (2013).
23. L. M. Markham, L. C. Mayne, B. S. Hudson, et al., *J. Phys. Chem.*, **97**, 10319 (1993).
24. H. Takeuchi, *Anal. Sci.*, **27**, 1077 (2011).

Study on the Interaction Mechanism between Ficin and a Graft Copolymer of Carboxymethyl Cellulose Sodium Salt and *N*-Vinylimidazole Using Molecular Docking, Fourier-Transform Infrared Spectroscopy and Raman Spectroscopy

A.V. Sorokin^{*, **}, S.S. Goncharova^{*}, M.S. Lavlinskaya^{*, **}, M.G. Holyavka^{*, ***}, Yu.F. Zuev^{****}, D.A. Faizullin^{****}, M.S. Kondatyev^{*, *****}, and V.G. Artyukhov^{*}

^{*}Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia

^{**}Voronezh State University of Engineering Technologies, prosp. Revolutsii 19, Voronezh, 394036 Russia

^{***}Sevastopol State University, Universitetskaya ul. 33, Sevastopol, 299053 Russia

^{****}Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center, Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, ul. Lobachevskogo 2/31, Kazan, 420111 Russia

^{*****}Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

Flexible molecular docking, Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and Raman spectroscopy were used to investigate the interaction mechanism between ficin and a graft copolymer of carboxymethyl cellulose sodium salt and *N*-vinylimidazole. Functional groups and fragments of the graft copolymer as well as amino acid residues that form primary structure of enzyme and participate in interactions between ficin and a graft copolymer are identified. It is shown that Raman spectroscopy yields more complete information about graft copolymer fragments interacting with the protein than that FTIR can provide. It is found that the amino acid residues that form the active site of ficin are involved in the formation of hydrogen bonds and hydrophobic interactions with the graft copolymer leading to an increase in the proteolytic activity of the conjugated enzyme.

Keywords: ficin, graft copolymers, FTIR, Raman spectroscopy, interaction mechanism