

УДК: 539.194

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

ВАЛЕНТНЫЕ КОЛЕБАНИЯ КАРБОНИЛЬНЫХ ГРУПП В РАМАН СПЕКТРАХ КОЛЛАГЕНА И POLY(GLY-PRO-PRO): РАСЧЕТ И ЭКСПЕРИМЕНТ

Е.П. Борискина, Т.В. Большух, М.А. Семенов

*Институт радиофизики та електроніки НАН України, вул. Академіка Проскури 12, 61085, Харків
e-mail: selenia@ire.kharkov.ua*

Статья поступила в редакцию 23 декабря 2005 г.

Получены Раман спектры политрипептида poly(Gly-Pro-Pro) и коллагена I типа в растворах оксида дейтерия. Частоты валентных карбонильных колебаний типа А рассчитаны согласно модели слабо связанных осцилляторов, в рамках теории возмущений для полипептидных структур с учетом динамических резонансных взаимодействий диполей перехода. Рассчитанные частоты удовлетворительно согласуются с экспериментальными частотами полосы Амид I в Раман спектрах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: poly(Gly-Pro-Pro), коллаген, Раман спектры, динамические резонансные взаимодействия, карбонильные колебания, Амид I

Из теории колебательных спектров полимеров известно, что для неограниченной спирали активными являются полносимметричное колебание типа А, поляризованное вдоль оси спирали, и дважды вырожденное типа Е, поляризованное перпендикулярно оси спирали [1, 2]. В инфракрасных спектрах сильные полосы соответствуют колебаниям типа Е, а в спектре комбинационного рассеяния - колебаниям типа А.

Одним из методов определения частот валентных карбонильных колебаний типов А и Е является расчет с помощью модели слабо связанных осцилляторов, рассмотренной Миядзавой в рамках теории возмущений для полипептидных структур, при этом учитываются динамические резонансные взаимодействия диполей перехода, которые возникают в упорядоченных структурах в результате воздействия света, а отдельные С=О - группы рассматриваются как слабо связанные гармонические осцилляторы [3].

Согласно [3], частота карбонильных колебаний определяется так:

$$\nu(\delta, \delta') = \nu_0 + \sum D_s \cos s\delta + \sum D'_s \cos s\delta', \quad (1)$$

где ν_0 частота невозмущенного карбонильного колебания, δ и δ' - фазовые углы, на которые отличаются колебания соседних карбонильных групп по цепи и через водородную связь; D_s и D'_s - коэффициенты взаимодействия колебаний по цепи внутри молекулы и между молекулами соответственно. В основном значение коэффициента D_s для пептидных структур определяется динамическим резонансным взаимодействием электрических колебательных моментов переходов [4].

Резонансный сдвиг частоты карбонильных колебаний в диполь-дипольном приближении выражается так [4]:

$$\Delta\nu_{рез} = \frac{1}{h} \sum_{nm} C_\alpha^f C_\beta^f \nu_{n\alpha, m\beta}, \quad (2)$$

где C_α^f и C_β^f - коэффициенты симметрии для колебания с типом симметрии f ; m, n - числа, которые нумеруют элементарные ячейки; α, β - числа, нумерующие карбонильные группы С=О в элементарной ячейке; $\nu_{n\alpha, m\beta}$ - матричный элемент оператора диполь-дипольного взаимодействия моментов переходов, локализованных на двух карбонильных группах, который равен

$$\nu_{n\alpha, m\beta} = \frac{1}{\epsilon \bar{R}_{n\alpha, m\beta}^3} \left[\Delta\vec{\mu}_{n\alpha} \Delta\vec{\mu}_{m\beta} - \frac{3(\Delta\vec{\mu}_{n\alpha} \cdot \vec{R}_{n\alpha, m\beta})(\Delta\vec{\mu}_{m\beta} \cdot \vec{R}_{n\alpha, m\beta})}{\bar{R}_{n\alpha, m\beta}^2} \right], \quad (3)$$

где $\Delta\vec{\mu}_{n\alpha}$ и $\Delta\vec{\mu}_{m\beta}$ - векторы дипольных моментов переходов, $\vec{R}_{n\alpha, m\beta}$ - вектор, направленный от центра диполя $n\alpha$ к диполю $m\beta$, ϵ - эффективная диэлектрическая проницаемость.

Частота карбонильных колебаний типов А и Е может быть вычислена по формулам [4]:

$$\nu_A = \nu_{iso} + \Delta\nu_{H-cv} + \Delta\nu_{рез}, \quad (4)$$

$$\nu_E = \nu_{iso} + \Delta\nu_{H-cv} + \Delta\nu_{рез} \cdot \cos\varphi, \quad (5)$$

где ν_{iso} - частота карбонильного колебания в изолированном состоянии молекулы, в частности, в нейтральных растворителях, $\Delta\nu_{H-cv}$ - сдвиг частоты карбонильного колебания за счет водородной связи, $\Delta\nu_{рез}$ - резонансный сдвиг частоты карбонильных колебаний, φ - угол вращения карбонильных групп аминокислотных остатков относительно друг друга.

В многочисленных экспериментальных и теоретических работах хорошо изучены частоты валентных карбонильных колебаний типов А и Е для α -спирали, β -конформации, и неупорядоченного состояния. Это сделало возможным количественное определение соотношения разных типов вторичной структуры в сложных белках по тонкой структуре полосы Амид I [4-8].

Коллаген, основной белок соединительной ткани, характеризуется особым типом вторичной структуры. Его молекулы представляют собой правые тройные суперспирали, скрученные из трёх первичных левых спиралей типа полипролин II, аминокислотные остатки которых сдвинуты и повернуты относительно друг друга. Первичная структура тропоколлагена складывается из следующих один за другим трипептидов $-(Gly-X-Y)-$, где в положении X в $\sim 37,8\%$ случаев находится иминокислота пролин, а в положении Y - в $\sim 28,8\%$ случаев - гидроксипролин. Тройная спираль стабилизируется сетью межпептидных водородных связей между N_1H_1 - группами остатков глицина одной цепи и C_2O_2 - группами иминокислотных остатков соседней полипептидной цепи, группа C_1O_1 связывается с одной, а группа C_3O_3 - с двумя молекулами воды (рис. 1).

В работах [9, 10] проведен расчет $\Delta\nu_{рез}$ и ν_E для коллагеновой трехспиральной вторичной структуры, на примере полипептидов $poly(Gly-Pro-Pro)$, $(Gly-Pro-Hyp)_2-Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg-(Gly-Pro-Hyp)_3$ и $(Pro-Hyp-Gly)_3-Ile-Thr-Gly-Ala-Arg-Gly-Leu-Ala-Gly-(Pro-Hyp-Gly)_4$ (рис. 1). Данные полипептиды были выбраны объектом расчета, так как $poly(Gly-Pro-Pro)$ является идеализированной моделью трехспиральной вторичной структуры коллагена, а последовательности $(Gly-Pro-Hyp)_2-Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg-(Gly-Pro-Hyp)_3$ и $(Pro-Hyp-Gly)_3-Ile-Thr-Gly-Ala-Arg-Gly-Leu-Ala-Gly-(Pro-Hyp-Gly)_4$ присутствуют в природном коллагене [11, 12].

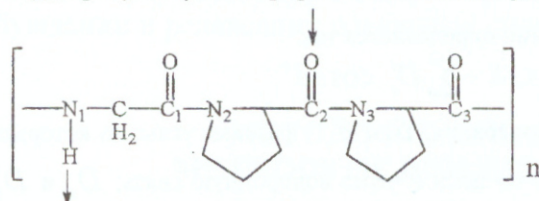


Рис. 1. Структура $poly(Gly-Pro-Pro)$. Стрелками показаны атомы, образующие межпептидную водородную связь $N_1H_1 \cdots C_2O_2$.

В расчетах, проведенных в [9, 10], учитывались сдвиги частот карбонильных колебаний, вызванные 1) динамическими резонансными взаимодействиями карбонильных колебаний и 2) включением карбонильных групп в упорядоченную сетку водородных связей. Расчет резонансных сдвигов частот карбонильных колебаний проводился с учетом взаимодействия групп внутри одной цепи и соседних полипептидных цепей. Рассматривались межпептидные водородные связи $N_1H_1 \cdots C_2O_2$ и водородные связи групп C_1O_1 и C_3O_3 с водой. Проведенный расчет дал возможность, объяснить тонкую структуру инфракрасных спектров увлажненных пленок коллагеновых структур, а также получить сведения об энергии разных типов водородных связей в коллагене и политрипептиде, что важно для понимания физических факторов стабильности коллагеновых молекул.

Однако, если в работах [9, 10] нам удалось сравнить частоты колебаний типа Е, рассчитанные с учетом резонансных взаимодействий, с экспериментальными ИК спектрами коллагеновых структур, то из-за отсутствия надежных Раман спектров коллагена и $poly(Gly-Pro-Pro)$ для колебания типа А такого сравнения до настоящего времени проведено не было.

Целью настоящей работы было получить Раман спектры политрипептида $poly(Gly-Pro-Pro)$ и коллагена I типа в растворах оксида дейтерия и сравнить частоты компонент полосы Амид I с рассчитанными частотами колебаний типа А.

Материалы и методы

Материалы. Использовался коллаген типа I, из кожи телянка, лиофилизированный, кислотнорастворимый, Sigma (C9791), модельный коллагеновый политрипептид $poly(Gly-Pro-Pro)$ Sigma (P6665). Для проведения дейтерообмена применялся оксид дейтерия с 99,84% изотопным замещением.

Валентные колебания карбонильных групп...

Раман-спектроскопия. Раман спектры растворов poly(Gly-Pro-Pro) и коллагена в D₂O были получены с помощью Раман-спектрометра DILOR Z-16 (Франция) с двойным монохроматором. Концентрация растворов 5 мг/мл. Источником возбуждающего света был аргоновый лазер формы Innova-70 (Англия) с $\lambda=514,5$ нм, мощность лазерного излучения 50-75 мВт. Раман спектры записывались при температуре 20°C. Спектральная ширина щели составляла 2-4 см⁻¹, скорость сканирования 50 см⁻¹ в мин. Растворы политрипептида и коллагена помещали в квадратные кварцевые кюветы с длиной оптического пути света 10 мм и герметизировали.

Расчет частот карбонильных колебаний типа А. Расчет частот валентных колебаний карбонильных групп типа А проводился с использованием полученных методом рентгеновской дифракции координат атомов полипептидов poly(Gly-Pro-Pro), (Gly-Pro-Hyp)₂-Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg-(Gly-Pro-Hyp)₃ и (Pro-Hyp-Gly)₃-Ile-Thr-Gly-Ala-Arg-Gly-Leu-Ala-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₄ [11, 12]. Расчет проводился по формуле (4) с использованием значений $\Delta U_{\text{рез}}$, полученных в работах [9, 10].

Результаты и обсуждение

Poly(Gly-Pro-Pro). Раман спектры poly(Gly-Pro-Pro) в растворе D₂O были получены в широком диапазоне частот 1100-3100 см⁻¹ (рис. 2). Отнесения полос Раман спектра даны в таб. 1.

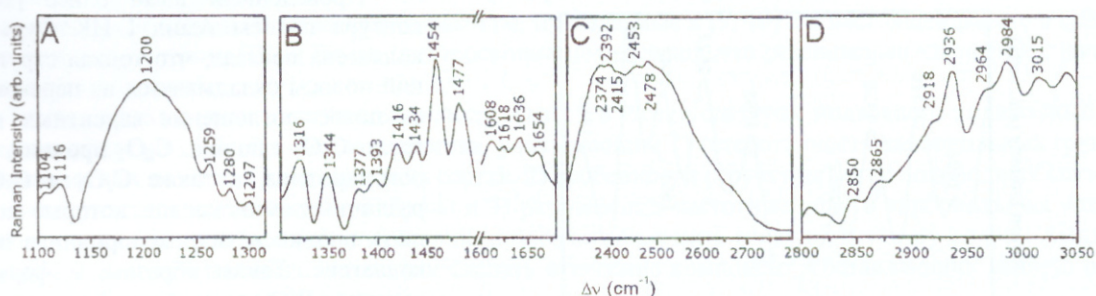


Рис. 2. Раман спектр poly(Gly-Pro-Pro) в растворе D₂O в областях: А) 1100-1330 см⁻¹, В) 1300-1700 см⁻¹, С) 2300-2800 см⁻¹, D) 2800-3100 см⁻¹. Интенсивности Раман полос в отдельных спектральных областях нормированы. Источник возбуждающего света Ar⁺ лазер с $\lambda=514,5$ нм.

Таб. 1. Основные Полосы Раман спектра poly(Gly-Pro-Pro) в растворе D₂O и их отнесения [13].

Полоса	Отнесение	Полоса	Отнесение	Полоса	Отнесение	Полоса	Отнесение
3015	$\nu(\text{CH})$	2478	Амид А'	1654	Амид I	1377	
2984		2453		1636		1344	$\gamma_w(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$
2964	$\nu(\text{CH}_3)$ ас.	2415	Амид В'	1616		1316	$\gamma_t(\text{CH}_3, \text{CH}_2), \delta(\text{CH})$
2936		2392		1608	$\delta(\text{CH}_3)$ ас., $\delta(\text{CH}_2), \delta(\text{CH})$	1297	
2918	$\nu(\text{CH}_2)$ ас.	2374		1477		1280	
2865	$\nu(\text{CH}_3)$ с.			1454		1259	
2850	$\nu(\text{CH}_2)$ с.			1434		1200	$\delta(\text{HD})$
				1416	$\delta(\text{CH}_2)$ глицина	1116	
				1393	$\delta(\text{CH}_3)$ с.	1104	

Рассмотрим подробно спектральную область 1600-1680 см⁻¹. Это полоса Амид I, в которую вносят вклад валентные колебания карбонильных групп остатков глицина C₁O₁ и пролина C₂O₂ и C₃O₃. В табл.2 приведены экспериментально полученные и рассчитанные частоты валентных колебаний типа А этих карбонильных групп. Видно вполне удовлетворительное согласие экспериментальных и рассчитанных частот. Ранее в работе [9] также было получено хорошее согласие частот компонент тонкой структуры полосы Амид I в инфракрасных спектрах poly(Gly-Pro-Pro) и частот валентных колебаний типа Е, рассчитанных с учетом резонансных взаимодействий карбонильных колебаний.

Таким образом, согласие рассчитанных частот валентных колебаний групп C₁O₁, C₂O₂ и C₃O₃ типов А и Е и частот полосы Амид I в инфракрасных спектрах и в спектрах комбинационного рассеяния

света свидетельствуют о необходимости учета резонансных взаимодействий при расчете спектров карбонильных колебаний.

Таб. 2. Экспериментальные и рассчитанные частоты карбонильных колебаний групп C_1O_1 , C_2O_2 и C_3O_3 в Раман-спектрах политрипептида poly(Gly-Pro-Pro)

Колебательная группа	Экспериментальные частоты полос в СКР (cm^{-1})	Рассчитанные частоты колебаний типа А (cm^{-1})
C_1O_1	1618±2	1620±0,7
C_2O_2	1636±2	1636±0,5
C_3O_3	1654±2	1658±0,7

Коллаген. На рис. 3 представлен Раман спектр коллагена в области $1400-1700\text{ cm}^{-1}$ в растворе D_2O . В спектре коллагена наблюдаются все полосы, характерные для poly(Gly-Pro-Pro) в данном спектральном диапазоне. Кроме того, имеется ряд полос, связанных с колебаниями атомов в боковых цепях аминокислотных остатков. Подробно проанализируем область $1600-1700\text{ cm}^{-1}$, в которую вносят вклад валентные колебания карбонильных групп C_1O_1 , C_2O_2 и C_3O_3 .

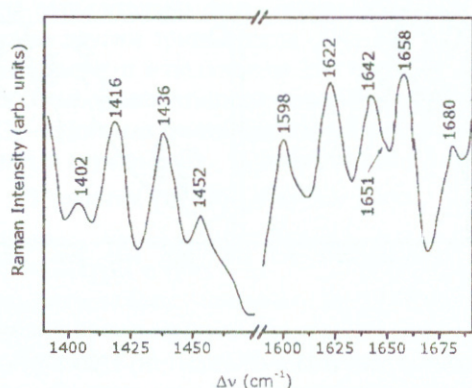


Рис.2. Раман спектр коллагена I типа в растворе D_2O в области $1400-1700\text{ cm}^{-1}$. Источник возбуждающего света Ag^+ лазер с $\lambda=514,5\text{ nm}$.

Проведенный нами ранее [10] анализ контура полосы Амид I ИК Фурье спектра коллагена показал, что тонкая структура данной полосы складывается из перекрывающихся полос поглощения валентных колебаний групп C_1O_1 глицина, C_2O_2 пролина, C_3O_3 гидроксипролина, а также C_2O_2 и C_3O_3 -групп различных аминокислот, которые могут замещать пролин и гидроксипролин в природном коллагене. Таким образом, в формировании контура ИК-полосы Амид I вносит вклад поглощение карбонильных осцилляторов различных аминокислотных остатков, по-разному включенных в сетку межпептидных водородных связей и водородных связей с растворителем. Тем не менее, было выделено [10] шесть основных полос тонкой структуры Амид I (таб. 3).

Таб. 3. Экспериментальные и рассчитанные частоты карбонильных колебаний групп C_1O_1 , C_2O_2 и C_3O_3 в ИК и Раман-спектрах коллагена. Приведено также расщепление $\Delta\nu = \nu_A - \nu_E$.

Частота колебания в ИКС, [10] ν_E (cm^{-1})	Интегральный вклад (%) [10]	Отнесение [10]	Частота колебания в СКР ν_A (cm^{-1})		Расщепление $\Delta\nu = \nu_A - \nu_E$	
			Эксперимент	Расчет	Эксперимент	Расчет
2	3	4	5	6	7	8
1606	8	C_2O_2 (Ile _{H-pept} ⁵ , Ala _{H-pept} , Leu _{H-pept} , Phe _{H-pept} , Glu _{H-pept})	1598±2	1603	8±3	3
1631	31	C_1O_1 (Gly _{H-H2O} ⁶), C_3O_3 (Thr _{H-H2O} , Arg _{H-H2O} , Ala _{H-H2O})	1622±2	1621	9±3	10
1650	12	C_2O_2 (Pro _{H-pept})	1642±2	1637	9±3	13
1655	35	C_3O_3 (Thr, Arg, Ala), C_1O_1 (Gly)	1651±2	1645	4±3	10
1668	9	C_3O_3 (Hyp _{H-H2O})	1658±2	1659	10±3	9
1686	5	C_3O_3 (Hyp)	1680±2	1683	6±3	3

В таб. 3 приведены некоторые результаты анализа [10] полосы Амид I ИК спектра коллагена. Показаны максимумы основных компонентов тонкой структуры полосы Амид I и относительные вклады интегральных интенсивностей данных компонент в общую интенсивность полосы. Видно, что основной вклад в спектр поглощения Амид I вносят три компонента с максимумами при 1631 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} и 1655 cm^{-1} . Также приведены рассчитанные и экспериментально наблюдаемые значения частот карбонильных колебаний типа А, активных в спектре комбинационного рассеяния. Видно

вполне удовлетворительное согласие наблюдаемых и рассчитанных частот. Показаны также экспериментальные и рассчитанные значения расщепления $\Delta\nu = \nu_A - \nu_B$ частот полос карбонильных колебаний в Раман и ИК спектрах. С учетом ошибки видно согласие величины расщепления $\Delta\nu$ для эксперимента и расчета. Таким образом, при расчете и интерпретации тонкой структуры полосы Амид I как ИК, так и Раман спектров коллагена [9, 10], необходимо учитывать резонансные взаимодействия карбонильных колебаний.

Ранее в работах [4-8], с учетом колебательных взаимодействий карбонильных групп, были рассчитаны частоты полосы Амид I для других типов вторичной структуры. Было показано, что для α -спиральных структур в Раман спектре в кристаллическом состоянии характерна одна полоса при $\nu=1655\pm 5$ см⁻¹. В растворе D₂O она занимает более низкочастотное положение $\nu=1632$ см⁻¹. Частота полосы Амид I для полипептидов, вторичная структура которых соответствует антипараллельному β -слою, равна $\nu=1665\pm 3$ см⁻¹ для кристаллического состояния и $\nu=1661\pm 3$ для раствора D₂O. Для неупорядоченного состояния $\nu=1658\pm 2$ см⁻¹ в растворе D₂O.

Что касается тройной спирали коллагенового типа, то в работе [14] был сделан комплексный анализ контура полосы Амид I модельного коллагенового полипептида [(Gly-Pro-Pro)₃]₈. Были сделаны отнесения трех компонент тонкой структуры полосы спектра валентным колебаниям трех типов карбонильных групп C₁O₁, C₂O₂ и C₃O₃, входящих в состав данного политрипептида. Однако резонансные частотные сдвиги валентных колебаний карбонильных групп за счет колебательных взаимодействий не были учтены. В то же время, расчеты, проведенные в [9, 10] и в настоящей работе и сравнение их с результатами ИК- и Раман спектроскопии показывают, что резонансные частотные сдвиги необходимо учитывать.

Таким образом, расчет компонент полосы Амид I в Раман спектрах модельного коллагенового политрипептида poly(Gly-Pro-Pro) и коллагена, учитывающий 1) гетерогенность карбонильных групп аминокислотных остатков, входящих в их состав, 2) особенности структуры сетки водородных связей различных участков коллагеновых фибрилл и 3) резонансные частотные сдвиги карбонильных колебаний за счет колебательных взаимодействий, позволяет объяснить тонкую структуру полосы Амид I трехспиральных коллагеновых структур и сделать отнесения компонент, составляющих данную полосу.

Литература

1. Грибов Л. А. Теория инфракрасных спектров полимеров. - М.: Наука. - 1977.
2. Элиот А. Инфракрасные спектры и структура полимеров. - М.: Мир. - 1972.
3. Miyazawa T.J. Perturbation treatment of the characteristic vibrations of polypeptide chains in various configurations //J. Chem. Phys. - 1960. - 32. - P.1647-1652.
4. Chirgadze Yu. N., Nevskaya N.A. Infrared spectra and resonance interactions of Amide-I vibration of the antiparallel-chain pleated sheet. //Biopolymers. - 1976. - 15, P.607-625.
5. Chirgadze Yu. N., Nevskaya N.A. Infrared spectra and resonance interactions of Amide-I vibration of the parallel-chain pleated sheet. //Biopolymers. - 1976. - 15. - P.627-636.
6. Nevskaya N.A., Chirgadze Yu. N. Infrared spectra and resonance interactions of Amide-I and II vibrations α -helix. //Biopolymers. - 1976. - 15. - P.637-48.
7. Moore W.H., Krimm S. Vibrational analysis of peptides, polypeptides and proteins. I. Polyglycine I. //Biopolymers. - 1976. - 15. - P.2439-2464.
8. Moore W.H., Krimm S. Vibrational analysis of peptides, polypeptides and proteins. II. β -Poly(L-alanine) and β -Poly(L-alanilglycine). //Biopolymers. - 1976. - 15. - P.2465-2483.
9. Мележик Е.П., Семенов М.А. Резонансные взаимодействия карбонильных колебаний в коллагеновых структурах. //Біофізичний вісник. - 2003. - 606(13). - С.62-68.
10. Мележик Е.П., Семенов М.А., Иванов А.Ю. Исследование тонкой структуры полосы Амид I ИК-Фурье спектра коллагена. //Біофізичний вісник. - 2005. - 665(15). - С.35-42.
11. Kramer R.Z., Bella J., Mayville P., Brodsky B., Berman H.M. Sequence dependent conformational variations of collagen triple-helical structure. //Nature Structural Biology. - 1999. - 6(5). - P.454-457.
12. Emsley J., Knight C.G., Farndale R.W., Barnes M.J., Liddington R.C. Structural basis of collagen recognition by integrin $\alpha 2\beta 1$ //Cell. - 2000. - 100. - P.47-56.
13. Parker F.S. Application of Infrared, Raman and resonance Raman spectroscopy in biochemistry. New York: Plenum Press. - 1983. - 550 p.
14. Lazarev YA, Grishkovsky BA, Khromova TB, Lazareva AV, Grechishko VS. Bound water in the collagen-like triple-helical structure. //Biopolymers. - 1992. - 32(2). - P.189-95.