

УДК: 539.194

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОНКОЙ СТРУКТУРЫ ПОЛОСЫ АМИД I ИК ФУРЬЕ СПЕКТРА КОЛЛАГЕНА

Е.П. Мележик¹, М.А. Семенов¹, А.Ю. Иванов²

¹Институт радиофизики и электроники НАН Украины, ул. Академика Проскуры 12, 61085, Харьков

²Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины, пр. Ленина 47, 61103, Харьков
e-mail: ypmelzhik@tms.org.ua

Статья поступила в редакцию 1 апреля 2005 г.

Проведен расчет частотных сдвигов валентных колебаний CO - групп, вызванных динамическим резонансным взаимодействием карбонильных колебаний атомов в коллагеновых структурах (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 в диполь-дипольном приближении на основании теории молекулярных экситонов. Рассчитаны спектральные параметры основных компонентов тонкой структуры полосы Амид I ИК Фурье спектра природного коллагена и сделаны их отнесения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: коллаген, резонансное взаимодействие, диполь-дипольное приближение, ИК Фурье спектроскопия, Амид I

Коллаген принадлежит к классу фибриллярных белков и составляет основу межклеточного вещества соединительной ткани. Мономерные единицы коллагеновых фибрилл, молекулы тропоколлагена, представляют собой правые тройные суперспирали, скрученные из трёх первичных левых спиралей, аминокислотные остатки которых сдвинуты и повернуты относительно друг друга. В качестве модели коллагена используется полипептид, состоящий из повторяющихся последовательностей аминокислот глицин – пролин – пролин либо глицин – пролин – гидроксипролин. При этом принято нумеровать атомы глицина индексом 1, пролина – индексом 2, и гидроксипролина (или пролина, стоящего в 3-м положении) – индексом 3. Такой политрипептид образует тройную суперспираль, параметры которой соответствуют параметрам спирали природного коллагена [1].

Стабилизация тройной спирали молекулы политрипептида, как и тропоколлагена, достигается с помощью межпептидных водородных связей, образующихся между N₁H₁ – группами глицина одной цепи и C₂O₂ - группами соседней полипептидной цепи (рис. 1). Группы C₁O₁ и C₃O₃ образуют водородные связи с молекулами воды, что также вносит значительный вклад в стабилизацию тройной суперспирали [2, 3].

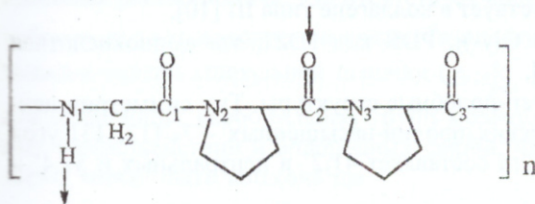


Рис.1. Структура политрипептида (Gly₁-Pro₂-Pro₃)_n. Стрелками обозначена межпептидная водородная связь.

Разнообразие аминокислотных остатков в природном коллагене и особенности структуры водородных связей в разных участках коллагеновой молекулы приводят к тому, что как форма, так и полуширина основных полос ИК спектра природного коллагена и политрипептида poly(Gly-Pro-Gly) значительно отличаются друг от друга [4].

Полоса Амид I, являющаяся наиболее сильной в инфракрасных спектрах поглощения полипептидов и белков, обусловлена, в основном, валентными колебаниями C=O – связей в составе пептидных групп. Эта полоса характеристична по частоте и интенсивности и очень чувствительна к изменению структурного состояния полипептидной цепи. По тонкой структуре полосы Амид I можно судить о наличии в молекуле белка спиральной, складчатой структуры, неупорядоченной конформации, а по интегральной интенсивности – определять их количественное содержание [5, 6, 7]. Однако для коллагеновых белков такие спектральные признаки не найдены. Строгие отнесения различных компонент полосы Амид I сделаны только для модельных коллагеновых пептидов, в которых отсутствует замещение пролина и гидроксипролина в положениях 2 и 3 другими аминокислотами [4].

В отличие от модельного политрипептида, у природного коллагена наблюдается замещение значительной части аминокислотных остатков пролина и гидроксипролина различными аминокислотами, при этом выделяются аминокислотно-дефицитные и аминокислотно-насыщенные участки коллагеновой молекулы, параметры спирали в которых несколько различаются [1].

В работе [8] был разработан алгоритм расчета частот валентных колебаний карбонильных групп в модельном коллагеновом пептиде poly(PRO-PRO-GLY) в диполь-дипольном приближении на основании теории молекулярных экситонов. При этом частота перехода рассчитывалась на основании значений частоты колебания данной группы в изолированной молекуле и частотных сдвигов, вызванных образованием водородных связей и обусловленных динамическим резонансным взаимодействием моментов переходов карбонильных колебаний.

Цель данной работы: с использованием разработанного алгоритма рассчитать резонансные сдвиги карбонильных колебаний и частоты компонент полосы Амид I природного коллагена и выполнить отнесения этих компонент.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе использовался коллаген типа I, выделенный из кожи теленка, лиофилизированный, кислотнорастворимый; производства фирмы Sigma (C9791 в каталоге). Для проведения дейтерообмена применялся оксид дейтерия (D_2O) с 99,84% изотопным замещением.

Приготовление образцов для ИК Фурье спектроскопии. Коллаген был растворен в количестве 2 мг в 500 мкл 10 мМ HCl при температуре $4^{\circ}C$ и нейтрализован добавлением 347,45 мкл буферной смеси, имеющей в своем составе: гидроксиметиламинометан, NaCl, KH_2PO_4/K_2HPO_4 буфер и H_2O . После нейтрализации pH раствора составила 7,45. Из полученных растворов готовились пленки, которые помещались в герметичные кюветы с окошками из CaF_2 . ИК Фурье спектры сухих и увлажненных пленок исследуемых веществ были получены при комнатной температуре. Полное высушивание пленки осуществлялось вакуумной откачкой кюветы с использованием азотной ловушки. Необходимая степень увлажнения пленок и их дейтерирование достигалась путем выдерживания пленок в течение нескольких суток в атмосфере паров насыщенных растворов различных солей в D_2O (NaCl для получения 76% ОВ и KCl для получения 86% ОВ) [9]. ИК Фурье спектры были получены с использованием спектральной установки на базе однолучевого вакуумируемого Фурье-спектрометра ФС-01, главные особенности которой были описаны ранее [10]. Как и в работе [11], была использована оптическая схема, позволяющая уменьшить оптический путь в атмосфере до 4 см. Это позволило минимизировать поглощение атмосферных паров воды и CO_2 . Спектры пленок регистрировались в диапазоне $950-2700\text{ см}^{-1}$ с аподизированным разрешением $3,5\text{ см}^{-1}$. Был использован светоделитель KBr и треугольная функция аподизации. Для минимизации шумов проводилось усреднение 2-4 серий спектров (32 скана в каждой серии). Из полученных спектров вычитался спектр флюоритовой кюветы сравнения и проводилась линейная коррекция базовой линии.

Методика расчета частот отдельных компонентов полосы Амид I. Для расчетов использовались координаты атомов следующих коллагеновых полипептидов:

- (Pro-Hyp Gly)₃-Ile-Thr-Gly-Ala-Arg-Gly-Leu-Ala-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₄, PDB код 1BKV, данная последовательность аминокислотных остатков присутствует в коллагене типа III [10],
- (Pro-Hyp Gly)₂-Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg-(Pro-Hyp Gly)₃, PDB код 1DZI, эта аминокислотная последовательность найдена в коллагене типа I [11].

Оба политрипептида образуют трехспиральные коллаген-подобные структуры. Тип симметрий центральных пролин-дефицитных участков 10_7 , а периферических пролин-насыщенных - 7_5 [12, 13] угол вращения аминокислотных остатков относительно друг друга составляет $41,2^{\circ}$ в центральных и $51,4^{\circ}$ в периферических участках.

Алгоритм расчета частот валентных колебаний карбонильных групп в модельных коллагеновых структурах описан в работе [8]. При расчете частот компонент полосы Амид I коллагена отдельные C=O - группы рассматривались как слабо связанные гармонические осцилляторы.

Согласно модели слабо связанных осцилляторов, рассмотренной Миядзавой в рамках теории возмущений для полипептидных структур [14, 15], 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 [16, 17, 18]. Теоретической основой расчета динамического резонансного взаимодействия электрических колебательных моментов переходов является теория молекулярных экситонов [19].

В диполь-дипольном приближении резонансный сдвиг частоты карбонильных колебаний выражается формулой [20]

Исследование тонкой структуры полосы амид I ИК Фурье спектра коллагена

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

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 C=O в элементарной ячейке; $\nu_{n\alpha, m\beta}$ - матричный элемент оператора диполь-дипольного взаимодействия моментов переходов, локализованных на двух карбонильных группах, который равен

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

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

Для неограниченной спирали активными являются полносимметричное колебание (поляризованное вдоль оси спирали) типа А и дважды вырожденное типа Е (поляризованное перпендикулярно оси спирали) [21]. В спектре комбинационного рассеяния сильные полосы соответствуют колебаниям типа А, а в ИК спектрах - колебаниям типа Е. С учетом резонансного взаимодействия карбонильных колебаний частота полосы с параллельной и перпендикулярной поляризацией определяются так [22]:

$$\nu_A = \nu_0 + \frac{2}{h} (\nu_{11,12} + \nu_{11,13} + \dots + \nu_{11,1k}), \quad (4)$$

$$\nu_E = \nu_0 + \frac{2}{h} (\nu_{11,12} \cos \varphi + \nu_{11,13} \cos 2\varphi + \dots + \nu_{11,1k} \cos k\varphi), \quad (5)$$

где k - число карбонильных групп в спиральной молекуле, φ - угол вращения карбонильных групп аминокислотных остатков относительно друг друга.

При этом невозмущенная частота ν_0 , определяется колебанием карбонильной группы в изолированной молекуле с учетом взаимодействия с окружением. В случае с молекулой коллагенового политрипептида частота ν_0 может быть представлена в виде:

$$\nu_0 = \nu_{изо} - \Delta\nu_{H-св}, \quad (6)$$

где $\nu_{изо}$ - частота карбонильного колебания в изолированном состоянии молекулы, в частности, в нейтральных растворителях, где отсутствует водородная связь, $\Delta\nu_{H-св}$ - сдвиг частоты карбонильного колебания за счет водородной связи. Резонансный сдвиг карбонильных колебаний типов А и Е рассчитывался внутри спиральной цепочки ($\Delta\nu_{рез}^{6A}$, $\Delta\nu_{рез}^{6E}$) и между спиральными цепочками ($\Delta\nu_{рез}^{6A}$, $\Delta\nu_{рез}^{6E}$) для ближайших карбонильных групп молекул политрипептидов. С учетом межсписочных резонансных взаимодействий и водородных связей, частота полос, поляризованных параллельно и перпендикулярно, может быть записана так:

$$\nu_A = \nu_{изо} - \Delta\nu_{H-св} \pm \sum_1^k (\Delta\nu_{рез}^{6A} + \Delta\nu_{рез}^{6A}), \quad (7)$$

$$\nu_E = \nu_{изо} - \Delta\nu_{H-св} \pm \sum_1^k (\Delta\nu_{рез}^{6E} + \Delta\nu_{рез}^{6E}), \quad (8)$$

Для расчета резонансных сдвигов карбонильных колебаний C_1O_1 , C_2O_2 и C_3O_3 использованы координаты атомов углерода, кислорода и азота кристаллической структуры трехспиральных коллагеновых пептидов (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 [12, 13].

Поскольку карбонильные колебания Амид I обладают высокой характеристичностью для всех пептидных структур, то центры диполей перехода можно локализовать в общей точке, которая находится на расстоянии 0,4 Å от атома кислорода в направлении O→N [16, 18] (рис. 2). Величины дипольных моментов переходов для связей C_1O_1 , C_2O_2 и C_3O_3 приняты равными 0,3 D, исходя из значения абсолютной интенсивности полосы поглощения Амид I $4,1 \cdot 10^4 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ [4].

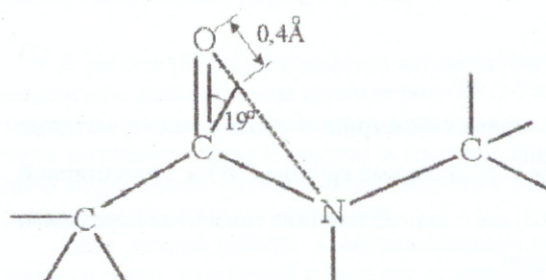


Рис. 2. Локализация центра электрического дипольного момента перехода колебания C=O – связи в полипептидных структурах [14, 16, 18].

По данным спектроскопии с использованием поляризованного ИК-излучения [14] известно, что вектор момента перехода карбонильного колебания лежит в плоскости пептидной группы и отклонен от направления связи C=O на угол 19° , что было учтено в расчетах (рис. 3). Эффективное значение диэлектрической постоянной ϵ принималось равным 2, поскольку $\epsilon \approx n^2$, где n – показатель преломления и $n \approx 1,5$ [16].

Расчет резонансного взаимодействия необходимо проводить с учетом карбонильных групп, располагающихся внутри сферы радиусом 8 Å. При расширении радиуса взаимодействия наступает эффект насыщения [8]. В сферу взаимодействия попадают 4 карбонильные группы, располагающиеся в той же полипептидной цепи, что и исследуемая, и C=O – группы ближайших аминокислотных остатков соседних полипептидных цепей.

Величины частотных сдвигов, вызванных образованием водородных связей в коллагеновых белках, были рассчитаны в работе [8].

Разложение контура полосы Амид I коллагена, полученного при ИК Фурье спектроскопии. Полученные в результате расчета частоты отдельных компонентов полосы Амид I политрипептидов были взяты за основу для разложения контура полосы Амид I, полученного при ИК Фурье спектроскопии природного коллагена, с использованием программы оптимизации. При этом форма полос описывалась линейной комбинацией функций Гаусса и Лоренца [23]:

$$D(\nu) = f_G \cdot F_G + (1 - f_G) \cdot F_L = f_G \cdot D(\nu_0) \cdot e^{-\lg 2 \cdot \left(\frac{2(\nu_0 - \nu)}{\Delta\nu_{1/2}}\right)^2} + (1 - f_G) \cdot \frac{D(\nu_0)}{1 + \left(\frac{2(\nu_0 - \nu)}{\Delta\nu_{1/2}}\right)^2}, \quad (9)$$

где ν_0 – частота максимума полосы поглощения, $\Delta\nu_{1/2}$ – ширина полосы поглощения на $1/2$ интенсивности

в максимуме полосы поглощения, f_G – фактор Гаусса, показывающий вклад распределения Гаусса в описывающую контур функцию, $D(\nu_0)$ – интенсивность в максимуме полосы поглощения. Оптимизация значений спектральных параметров отдельных полос осуществлялась методом деформируемого многогранника [24, 25] до достижения минимального значения $\sum_{i=1}^n ((D(\nu_i)_{\text{экс}} - D(\nu_i)_{\text{выч}})^2)$, где

$D(\nu_i)_{\text{экс}}$ и $D(\nu_i)_{\text{выч}}$ – экспериментальные и вычисленные значения интенсивности поглощения при i -й частоте. Из контура полосы Амид I были вычтены полосы, соответствующие поглощению боковых аминокислотных радикалов аминокислот Arg, Phe, Asp, Glu [27].

При статистической обработке результатов рассчитывалось среднее значение (M) и среднеквадратичное отклонение от среднего (sd).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В полученном ИК Фурье спектре коллагена в диапазоне $900 - 1800 \text{ см}^{-1}$ (рис. 3) можно выделить несколько характерных полос поглощения [14, 26, 27, 28]:

- область $1000-1100 \text{ см}^{-1}$ – скелетные колебания C-C и C-N групп, внеплоскостные колебания CH_2 , CH_3 групп;
- 1206 см^{-1} – деформационные колебания группы OD;
- область $1230-1260 \text{ см}^{-1}$ – полоса Амид III (результат резонансного взаимодействия деформационного колебания группы NH и валентного колебания CN недегидрированных пептидных групп коллагена);
- 1340 см^{-1} – деформационные колебания группы CCH;
- 1414 см^{-1} – деформационные колебания группы CH_2 глицина;
- 1461 см^{-1} – деформационные колебания групп CH_3 и CH_2 , полоса Амид II';

Исследование тонкой структуры полосы амид I ИК Фурье спектра коллагена

- область $1530-1590 \text{ см}^{-1}$ - полоса Амид II (результат резонансного взаимодействия деформационного колебания группы NH и валентного колебания CN недеирированных пептидных групп коллагена), поглощение атомов боковых радикалов аминокислот Arg, Phe, Asp, Glu;
- 1650 см^{-1} - полоса Амид I.

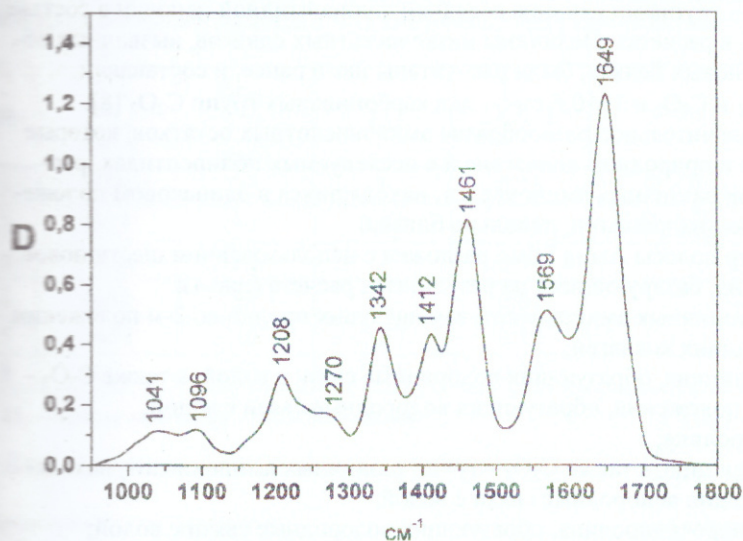


Рис. 3 ИК Фурье спектр коллагена (пленка, 86% OB в атмосфере D_2O)

С использованием координат атомов углерода, кислорода и азота кристаллической структуры трех-спиральных коллагеновых пептидов $(Gly-Pro-Hyp)_2-Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg-(Gly-Pro-Hyp)_3$ и $(Pro-Hyp-Gly)_3-Ile-Thr-Gly-Ala-Arg-Gly-Leu-Ala-Gly-(Pro-Hyp-Gly)_4$ по формуле (2) были рассчитаны частотные сдвиги, вызванные резонансным взаимодействием карбонильных колебаний. Расчет проведен для колебаний типа E, которые соответствуют сильным полосам в ИК спектрах.

По формуле (8) были рассчитаны частоты колебания карбонильных групп различных аминокислот, входящих в состав коллагена (Таб. 2).

Таб. 1. Рассчитанные частоты карбонильных колебаний C_1O_1 , C_2O_2 и C_3O_3 - групп коллагеновых политрипептидов $(Pro-Hyp-Gly)_2-Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg-(Pro-Hyp-Gly)_3$ и $(Pro-Hyp-Gly)_3-Ile-Thr-Gly-Ala-Arg-Gly-Leu-Ala-Gly-(Pro-Hyp-Gly)_4$. Рассчитанные для каждого из карбониллов C_nO_n значения частот колебаний усреднены для одинаковых аминокислотных остатков. Данные в таблице представлены в виде: среднее $M \pm s.d$

Колебат. группы	АК ¹	$\nu_{изо}^2$, (см ⁻¹) эксперим. [4]	$-\Delta\nu_{H-perp}^3, -\Delta\nu_{H-H_2O}^4$ (см ⁻¹)	$-\Delta\nu_{рез}^5$ (см ⁻¹)	$\nu_{H-perp}^6, \nu_{H-H_2O}^7$ (см ⁻¹)	ν^8 (см ⁻¹)
C_1O_1	Gly	1660	$24 \pm 0,7$	$-10 \pm 3,3$	$1626 \pm 4,0$	$1650 \pm 3,3$
C_2O_2	Pro	1693	$37 \pm 0,5$	$-12 \pm 4,0$	$1644 \pm 4,5$	-
	Ile	1660	$37 \pm 0,5$	$-13 \pm 0,4$	$1610 \pm 0,9$	-
	Leu	1660	$37 \pm 0,5$	$-16 \pm 1,0$	$1607 \pm 1,5$	-
	Ala	1660	$37 \pm 0,5$	$-15 \pm 0,9$	$1608 \pm 1,4$	-
	Phe	1660	$37 \pm 0,5$	$-14 \pm 1,8$	$1609 \pm 2,3$	-
	Glu	1660	$37 \pm 0,5$	$-16 \pm 1,4$	$1607 \pm 1,9$	-
C_3O_3	Hyp	1698	$24 \pm 0,7$	$-10 \pm 3,8$	$1664 \pm 4,5$	$1688 \pm 3,8$
	Thr	1660	$24 \pm 0,7$	$-10 \pm 0,3$	$1626 \pm 1,0$	$1650 \pm 0,3$
	Arg	1660	$24 \pm 0,7$	$-11 \pm 1,3$	$1625 \pm 2,0$	$1649 \pm 1,3$
	Ala	1660	$24 \pm 0,7$	$-12 \pm 0,5$	$1624 \pm 1,2$	$1648 \pm 0,5$

¹ АК - название аминокислотного остатка;

² $\nu_{изо}$ - частота карбонильного колебания в изолированном состоянии молекулы;

^{3,4} $\Delta\nu_{H-perp}$, $\Delta\nu_{H-H_2O}$ - сдвиг частоты карбонильного колебания в результате образования межпептидной водородной связи и водородной связи с водой;

⁵ $\Delta\nu_{рез}^E$ - резонансный сдвиг карбонильных колебаний типа E;

^{6,7,8} ν^E , ν_{H-perp}^E , $\nu_{H-H_2O}^E$ - рассчитанная частота карбонильных колебаний типа E для групп, не образующих водородные связи и групп образующих водородные связи с N_1H_1 - группами и с водой соответственно.

При этом определялись частоты колебания карбонильных групп C_1O_1 и C_3O_3 в двух различных состояниях: при образовании ими водородных связей с растворителем (в данном случае с D_2O) и в несвязанном состоянии, так как в природном коллагене отсутствие или наличие водородных связей с растворителем может зависеть от того, располагается ли данная карбонильная группа во внутренней или в наружной части фибриллы. В то же время все карбонильные группы C_2O_2 в коллагеновых белках образуют межпептидные водородные связи с N_1H_1 – группами глицина соседней полипептидной цепочки в составе тройной спирали. Это также было учтено в расчетах. Величины низкочастотных сдвигов, вызванных образованием водородных связей в коллагеновых белках, были рассчитаны нами ранее, и составляли $24 \pm 0,7 \text{ см}^{-1}$ для карбонильных групп C_1O_1 и C_3O_3 и $37 \pm 0,5 \text{ см}^{-1}$ – для карбонильных групп C_2O_2 [8].

Можно отметить, что, несмотря на значительное разнообразие аминокислотных остатков, которые могут замещать иминокислоты Pro и Nur в природном коллагене и в исследуемых полипептидах, рассчитанные частоты колебаний карбониллов различных аминокислот, находящихся в одинаковом положении в трипептидах $-(Gly-X-Y)-$, составляющих коллаген, довольно близки.

Учитывая это обстоятельство, контур полосы Амид I был разложен с использованием шести полос, каждая из которых имела четкие отнесения, базирующиеся на результатах расчета (рис.4):

- 1) валентные колебания C_2O_2 – групп различных аминокислот, замещающих пролин во 2-м положении в трипептидах $-(Gly-X-Y)-$, составляющих коллаген;
- 2) валентные колебания C_1O_1 – групп глицина, образующих водородные связи с водой, а также C_3O_3 – групп различных аминокислот в 3-м положении, образующих водородные связи с водой;
- 3) валентные колебания C_2O_2 – групп пролина;
- 4) валентные колебания C_1O_1 – групп глицина, а также C_3O_3 – групп различных аминокислот, находящихся в 3-м положении и не образующих водородные связи с водой;
- 5) валентные колебания C_3O_3 – групп гидроксипролина, образующих водородные связи с водой;
- 6) валентные колебания C_3O_3 – групп гидроксипролина, не образующих водородные связи с водой.

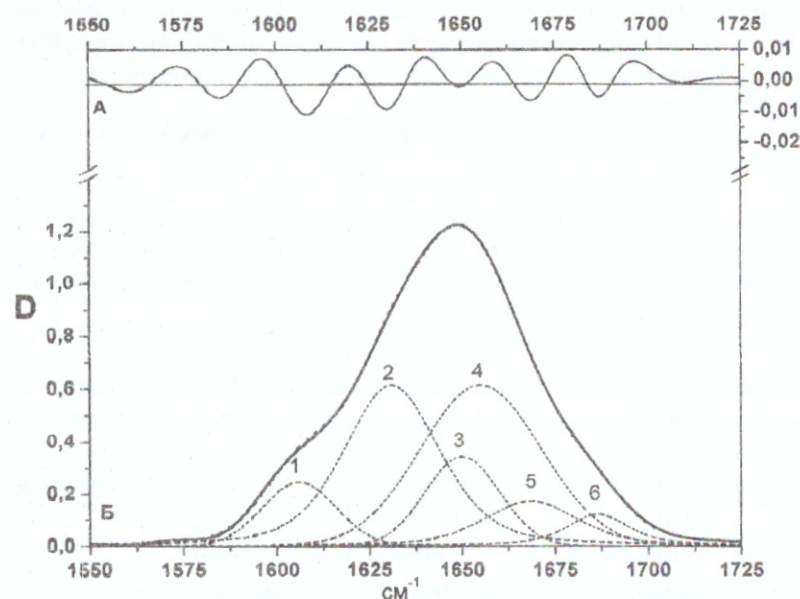


Рис.4. Разложение контура полосы Амид I ИК спектра коллагена (пленка в условиях 86% ОВ в атмосфере паров D_2O):

А) невязка между экспериментальным контуром полосы Амид I ИК спектра коллагена и контуром, полученным в результате сложения отдельных компонент;

Б) сплошная линия – контур полосы Амид I ИК Фурье спектра коллагена; штриховая линия – контур полосы Амид I, полученный в результате суммирования элементарных полос; штрих-пунктирная линия – компоненты полосы (расчет + оптимизация).

Хорошо известно, что при разложении сложного контура большим количеством полос, результаты разложения получаются неоднозначными. В данной работе количество полос и положение максимума каждой из них выбирались на основании результатов расчетов. При этом величина варьирования частоты максимума полосы поглощения составляла $\pm 2 \text{ sd}$. Свободно варьируемыми параметрами в процессе оптимизации выступали интенсивность в максимуме полосы; величина фактора Гаусса и полуширина полосы поглощения. В процессе оптимизации спектральных параметров компонент полосы Амид I была минимизирована невязка между экспериментальным контуром и контуром, полученным в результате сложения компонент полосы Амид I. Из рис. 3 видно, что контур полосы Амид I природного коллагена можно удовлетворительно разложить полосами, частоты максимумов которых были рассчитаны с использованием разработанного алгоритма. Спектральные параметры полученных полос и их отнесение отражены в таб. 2.

Учитывая, что при близких коэффициентах экстинкции исследуемых групп, соотношение интегральных интенсивностей соответствующих полос поглощения в ИК спектре позволяет судить об их процентном соотношении в исследуемом образце, была сделана оценка соотношения amino- и иминокислот в коллагене по интегральным интенсивностям компонент, полученных в результате разложения кон-

Исследование тонкой структуры полосы амид I ИК Фурье спектра коллагена

тура полосы Амид I. Соотношение (аминокислоты:Pro:Hyp) коллагена по результатам расчета составило 76%:12%:12%, что близко к такому соотношению, определенному химическими методами 79%:12%:10% [29].

Таб. 2. Спектральные параметры и отнесения компонент полосы Амид I ИК Фурье спектра коллагена в условиях 86% относительной влажности в D₂O, полученные при разложении контура полосы на составляющие.

№	ν_0^1 (см ⁻¹)	$\Delta\nu_{\frac{1}{2}}^2$ (см ⁻¹)	f_G^3	$D(\nu_0)^4$	Отнесение
1	1606	23	1	0,25	C ₂ O ₂ (Ile _{H-pept} ⁵ , Ala _{H-pept} , Leu _{H-pept} , Phe _{H-pept} , Glu _{H-pept})
2	1631	31	0,61	0,61	C ₁ O ₁ (Gly _{H-H₂O} ⁶), C ₃ O ₃ (Thr _{H-H₂O} , Arg _{H-H₂O} , Ala _{H-H₂O})
3	1650	24	1	0,34	C ₂ O ₂ (Pro _{H-pept})
4	1655	38	1	0,61	C ₃ O ₃ (Thr, Arg, Ala), C ₁ O ₁ (Gly)
5	1668	30	0,57	0,17	C ₃ O ₃ (Hyp _{H-H₂O})
6	1686	20	0,31	0,12	C ₃ O ₃ (Hyp)

¹ ν_0 - частота максимума полосы поглощения

² $\Delta\nu_{\frac{1}{2}}$ -- ширина полосы поглощения на ½ интенсивности в максимуме полосы поглощения

³ f_G - фактор Гаусса, показывающий вклад распределения Гаусса в описывающую контур функцию

⁴ $D(\nu_0)$ - интенсивность в максимуме полосы поглощения

⁵ H-pept - аминокислота образует межпептидную водородную связь с N₁H₁ - группой глицина соседней полипептидной цепочки в составе тройной спирали

⁶ H-H₂O - аминокислота образует водородную связь с водой

Современная молекулярная биология требует методик, позволяющих исследовать структурные изменения в белковых структурах, вызванные различными факторами. Такие методики должны быть достаточно чувствительны к конформационным изменениям белков и малоинвазивны, а также применимы для исследования белков в водном окружении. Такими достоинствами вполне обладает ИК Фурье спектроскопия. В настоящее время ведутся экспериментальные и теоретические работы по исследованию соответствия между ИК Фурье спектрами и различными типами вторичных белковых структур [30, 31]. Рассмотренная в работе методика может стать основой для исследования методом ИК Фурье спектров конформационного состояния трехспиральных коллагеновых структур.

ВЫВОДЫ

Таким образом, расчет компонент полосы Амид I, учитывающий гетерогенность карбонильных групп аминокислотных остатков, входящих в состав коллагена, особенности структуры сетки водородных связей различных участков коллагеновых фибрилл, а также резонансные частотные сдвиги карбонильных колебаний, позволяет объяснить тонкую структуру полосы Амид I ИК-спектра природного коллагена и сделать отнесения компонент, составляющих данную полосу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rainey J.K., Goh M.C. A statistically derived parameterization for the collagen triple-helix. //Protein Science. 2002. V.11, pp. 2748-2754.
2. Гришковский Б.А., Хромова Т.Б., Гречишко В.С., Лазарев Ю.А. Формирование гидратной структуры тройной спирали коллагенового типа при гидратации. //Молекулярная биология. 1991. Т. 25, вып.1, с. 77-82.
3. Berisio R., Vitagliano L., Mazzarella L., Zagari A. Crystal structure of the collagen triple helix model [(PRO-PRO-GLY)10]₃. //Protein Sci. 2002. V.11, pp. 262-270.
4. Lazarev Yu. A. Chishkovsky B. A., Chromova T. B. Amid I band of IR spectrum and structure of collagen and related polypeptides. //Biopolymers, 1985. V.24. N.7. pp.1449-1478.
5. Nevskaya N.A., Chirgadze Yu.N. Infrared spectra and resonance interactions of Amide I and II vibrations of α -helix. //Biopolymers. 1976. V. 15. pp. 636-648.
6. Nevskaya N.A., Chirgadze Yu.N. Infrared spectra and resonance interactions of Amide I vibration of the parallel-chain pleated sheet. //Biopolymers. 1976. V. 15. pp. 627-636.
7. Krimm S., Bandakar J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. //Adv. Protein Chem. 1986. V. 38. pp. 181-364.
8. Мележик Е.П., Семенов М.А. Резонансные взаимодействия карбонильных колебаний в коллагеновых структурах. Е. П. //Біофізичний вісник. 2003. №606. Вип.2 (13). с. 62-68.

9. Воронец Д., Козич Д. Влажный воздух: термодинамические свойства и применение. - М.: Энергоатомиздат, 1984. - 136 с.
10. Ivanov A.Yu., Plokhotnichenko A.M., Radchenko E.D., Sheina G.G. and Blagoi Yu.P. FTIR spectroscopy of uracil derivatives isolated in Kr, Ar and Ne matrices: matrix effect and Fermi resonance. //J. Mol. Struct. 1995. V. 372. pp. 91-100
11. Ivanov A.Yu., Metelkina M.K., Onyshchenko V.V., Blagoi Yu.P. The FTIR spectra and structures of Poly(rA)* Poly(rU)- Mg²⁺ complexes at different temperatures in D₂O solutions. //Біофізичний вісник. № 637. Вип. 1-2 (14). с. 16-23.
12. 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. V. 6. N. 5. pp. 454-457.
13. 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. V. 100. pp. 47-56.
14. Элиот А. Инфракрасные спектры и структура полимеров. - М.: Мир, 1972.
15. Miyazawa T.J. Perturbation treatment of the characteristic vibrations of polypeptide chains in various configurations //J. Chem. Phys. 1960. V.32. pp. 1647-1652.
16. Чиргадзе Ю.Н. Инфракрасная спектроскопия полимеров и белков. //Итоги науки и техники. Молекулярная биология. Т.1. Москва 1973.
17. Grimm S and Abe Y. Intermolecular interaction effects in the Amide I vibrations of β polypeptides. //Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. V.69. N.10. pp. 2788-2792.
18. Чиргадзе Ю.Н., Невская Н.А. Резонансные взаимодействия основных амидных колебаний в упорядоченных пептидных структурах. //Докл. АН СССР. 1973. Т.208. №2. с. 447-450.
19. Давыдов А.С. Теория поглощения света в молекулярных кристаллах. - Киев, изд-во АН УССР, 1951.
20. Семенов М.А., Большух Т.В. Резонансные взаимодействия карбонильных колебаний в спиральных полипептидах. Препринт № 190, изд-во ИРЭ АН УССР, Харьков, 1982, с. 28.
21. Грибов Л.А. Теория инфракрасных спектров полимеров. - М.: Наука, 1977.
22. Semenov M.A., Bereznyak E.G. Hydration and stability of nucleic acids in the condensed state. //Comments Mol. Cel. Biophys, 2000. V.10. N.1. pp. 1-23.
23. Eraser R.D.B., Suzuki E. Resolution of overlapping bands: functions for simulating band shapes //Anal.Chem. 1969. V. 1. pp. 37-41.
24. Химмельблау Д. Прикладное нелинейное программирование. - М.: Мир, 1975. - 534 с.
25. Semenov M.A., Starikov E.B. On infrared spectroscopic analysis of transfer RNA secondary structure //Studia biophysica. 1987. V. 120. N. 2. pp. 187-196
26. Veis A. Brownell A.G. Triple-helix formation on ribosome-bound nascent chains of procollagen: Deuterium-hydrogen exchange studies. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. N. 3. pp. 902-905.
27. Chirgadze Y.N., Fedorov O.V., Trushina N.P. Estimation of amino acid residue side-chain absorption in the infrared spectra of protein solutions in heavy water //Biopolymers. 1975. V. 14. pp. 679-694.
28. Frank S. Parker. Applications of infrared, Raman and resonance Raman spectroscopy in biochemistry. - New York: Plenum press. - 1983. - 550 p.
29. Chien J.C.W. Solid-state characterization of the structure and property of collagen. //J Macromol Sci Rev Macrob Chem. 1972. V. 1. pp. 49-104.
30. Heimburg T., Esmann M., Marsh D. Characterization of the secondary structure and assembly of the transmembrane domains of trypsinized Na,K-ATPase by Fourier transform infrared spectroscopy. //The Journal of Biological Chemistry. 1997. V. 272. N. 41. pp. 25685-25692.
31. Brauner J.W., Flach C.R., Mendelsohn R.A. Quantitative reconstruction of the Amide I contour in the IR spectra of globular proteins: from structure to spectrum. //J. Am. Chem. Soc. 2005. V. 127. pp. 100-109.