

Оптические методы изучения вторичной структуры синтетических полипептидов и белков

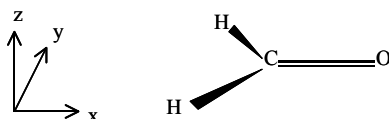
Молекулярные орбитали и электронные переходы

Прежде чем рассматривать поглощение света группами, входящими в состав белков и нуклеиновых кислот, рассмотрим свойства более простых молекул. В общем случае для ответа на этот вопрос необходимо решить стационарное уравнение Шредингера для системы из нескольких атомов частиц. Точное решение обычно получить не удастся, но при помощи приближенных методов удалось сделать некоторые полезные выводы. Главное упрощение состоит в том, что не рассматриваются электроны, которые находятся вблизи какого-либо одного ядра, поскольку их орбитали мало отличаются от орбиталей в случае изолированного атома и не принимают участия в образовании химических связей и в электронных переходах при поглощении видимого и ультрафиолетового излучения в оптическом диапазоне, т.е. между 180 и 800 нм. Рассматриваются только те электроны, которые делокализованы по орбиталям, окружают одновременно два или несколько ядер и образуют, таким образом, химические связи. Именно эти электроны участвуют в поглощении света.

Результаты приближенных квантово-механических расчетов, рассмотрим на примере молекулы формальдегида.

Молекулярные орбитали в молекуле формальдегида

Формальдегид имеет следующую структурную формулу:



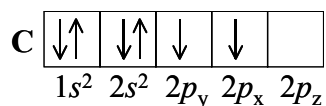
Четыре атома, входящие в состав молекулы формальдегида, содержат в общей сложности 16 электронов.

Рассмотрим вначале распределение электронов по орбиталям в атомах водорода углерода и кислорода из которых состоит молекула формальдегида.

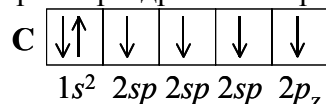
В атоме водорода единственный электрон занимает $1s$ орбиталь.



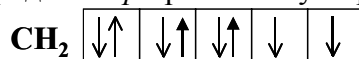
В атоме углерода из 6 электронов 4 должны занимать $1s$ и $2s$ орбитали, а еще два – орбитали $2p_y$ и $2p_x$.



Однако в результате электростатического отталкивания электронных облаков угол между $2p_y$, $2p_x$ и $2p_z$ орбиталями увеличивается с 90° до 120° , происходит *гибридизация* орбиталей $2s^2$, $2p_y$, $2p_x$ с образованием тетраэдрической конфигурации из трех $2sp$ орбиталей и орбитали $2p_z$, направленных из центра тетраэдра к его вершинам.

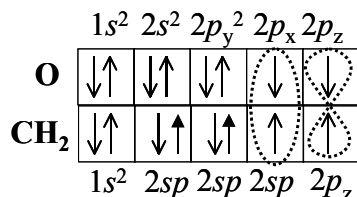


Объединение $1s$ орбиталей водорода и $2sp$ орбиталей углерода образует группу CH_2 .



Схематическое изображение образования химических связей между группой CH_2 и атомом кислорода, которое приводит к образованию молекулы формальдегида, приведено ниже. В верхней части схемы показано размещение электронов на орбиталях атома кислорода. В нижней части повторена электронная структура группы CH_2 . Пунктиром

обведены пары электронов, образующие химические связи между углеродом и кислородом. Пунктирный овал – σ -связь, пунктирная «восьмерка» – π -связь.



Первая из этих связей, σ -связь, образуется объединением орбиталей углерода и кислорода, причем образующееся электронное облако обладает осевой симметрией и не имеет узлов, т.е. участков с нулевой электронной плотностью (см. рис. 1).

Расчеты энергии молекулярных орбиталей (проведенные например методом МО ЛКАО – «Молекулярные Орбитали есть Линейная Комбинация Атомных Орбиталей»), показывают, что наивысшими заполненными молекулярными орбиталями оказываются *связывающая π -орбиталь* и несвязывающая $2p_y$ орбиталь кислорода. Последняя получила название *n-орбитали* (от слова non-bonding, несвязывающая).

Электронные переходы в молекуле формальдегида

Расчеты молекулярных орбиталей позволяют найти энергию не только верхних заполненных (ВЗМО), но и нижних свободных молекулярных орбиталей (НСМО). В случае формальдегида нижняя свободная молекулярная орбиталь образуется *разрыхляющей π -орбиталью*, обозначаемой как π^* . Схема энергетических уровней n , π и π^* орбиталей дана на рис. 2.

Электронные переходы при поглощении света пептидной связью

На рис. 3 приведена схема энергетических электронных уровней пептидной связи. Основным оказался π - π -переход, обусловленный, как и в случае формальдегида, поглощением π -связи $-C=O$.

Некоторый вклад в данную орбиталь дает азот, поскольку, как уже говорилось, связь $C-N$ в пептидной группе «чуть-чуть двойная». Поглощение при π - π^* -переходе в пептидной группе лежит в области 190 нм. Примером спектра поглощения, обусловленного таким переходом, может служить поглощение поли-L-лизина, спектр которого приведен на рис. 4.

Гипохромный эффект

Интересно, что в зависимости от конформации полимера, оптическая плотность раствора оказывается несколько разной. Наименьшим поглощением обладает α -спираль (см. рис. 4, II), в которой векторы электронных π - π^* -переходов параллельны друг другу и направлены приблизительно вдоль спирали, как это показано на рисунке 5.

При плавлении α -спирали ориентация диполей электронных переходов становится хаотической, и оптическая плотность раствора возрастает (рис. 4, I). Это позволяет изучать плавление α -спиралей, регистрируя изменения оптической плотности полипептидов при 190 нм. Впрочем в случае полипептидов более удобным показателем, чем гипохромный эффект, служит оптическое вращение и круговой (циркулярный) дихроизм, о которых речь пойдет ниже.

Линейный дихроизм ориентированных волокон полипептида

Если все диполи электронных переходов в какой-нибудь системе ориентированы совершенно одинаковым образом, то такая система будет хорошо поглощать плоско поляризованный монохроматический свет, плоскость поляризации которого *параллельна* направлению диполя электронного перехода, и совсем не будет поглощать свет с плоскостью поляризации, *перпендикулярной* этому направлению. В действительности таких идеальных образцов не бывает, да к тому же ориентация диполей слегка меняется во времени из-за теплового движения молекул. Тем не менее пленки и волокна, изготовленные из

полипептидов, в которых α -спирали или β -структуры ориентированы, обладают дихроизмом, т.е. различием в поглощении плоско поляризованного света при различном направлении вектора поляризации.

Экспериментальные приемы, позволяющие ориентировать удлиненные молекулы, такие как полипептиды со структурой α -спирали или фибриллярные белки, такие как коллаген, чаще всего основаны на ориентации этих молекул в потоке, например, внутри тонкого капилляра. Степень дихроизма d находят по уравнению:

$$d = (A_{\parallel} - A_{\perp}) / (A_{\parallel} + A_{\perp}) \quad (1)$$

$$d = \frac{A_{\parallel} - A_{\perp}}{A_{\parallel} + A_{\perp}}. \quad (1)$$

Принцип измерения дихроизма поглощения показан на рисунке 6. Луч плоско поляризованного света направляют на образец. Направление вдоль предполагаемого расположения длинной оси молекул и перпендикулярно лучу света (ось x) принимают за ось z . Измеряют интенсивность света при ориентации плоскости поляризации света вдоль оси z (I_{\parallel}) и оси y (I_{\perp}).

Поглощательную способность (absorbency) находят, как обычно, по уравнению:

$$A_{\parallel} = -\ln \frac{I_{\parallel}}{I_{\parallel}^0} \text{ и } A_{\perp} = -\ln \frac{I_{\perp}}{I_{\perp}^0}. \quad (2)$$

Затем по уравнению (1) находят степень дихроизма образца.

В качестве примера на рисунке 7 приведен спектр линейного дихроизма пленки поли-L-глутаминовой кислоты при низких рН (ниже 4,5), в которой α -спирали вытянуты в нужном направлении в результате растяжения пленки.

Излишне добавлять, что при плавлении α -спиралей линейный дихроизм поглощения образца исчезает. Плавление в данном случае может быть вызвано появлением зарядов на остатках глутаминовой кислоты при достаточно высоких рН (т.е. при рН > рК карбоксильных групп, т.е. выше 4,5).

Таким образом, линейный дихроизм, как и гипохромный эффект, могут быть использованы для изучения α -спиральных структур в полипептидах. К сожалению, эти методы мало пригодны для изучения белков, поскольку в них поглощение пептидной связи маскируется мощным поглощением ароматических аминокислот и остатков гистидина и цистина.

Вопросы к зачету

1. Молекулярные орбитали в молекуле формальдегида
2. Электронные переходы в молекуле формальдегида
3. Электронные переходы при поглощении света пептидной связью
4. Гипохромный эффект
5. Линейный дихроизм