



М И Р Х И М И И

Принципы масс-спектрометрии в приложении к биомолекулам

Под ред. Дж. Ласкин, Х. Лифшиц

Перевод с английского С.В. Аникина,
П.С. Метальникова
под ред. д.х.н. А.Т. Лебедева

ТЕХНОСФЕРА
Москва
2012

УДК 543.51

ББК 24.4

П 76

П 76 Принципы масс-спектрометрии в приложении к биомолекулам

Под ред. Дж. Ласкин, Х. Лифшиц

Москва: Техносфера, 2012. — 608 с.

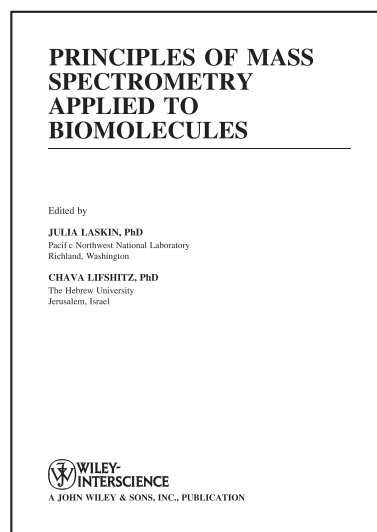
ISBN 978-5-94836-304-2

Настоящая книга — это сборник статей ведущих специалистов в области масс-спектрометрии. В издании представлены новейшие сведения о применении масс-спектрометрии в биологии, причем особое внимание уделено вопросу о том, какие требования предъявляются к методу при исследовании различных молекул. Весь материал разбит на три раздела: «Структура и динамика биомолекул в газовой фазе», «Активация, диссоциация и реакционная способность», «Термохимия и энергетические характеристики».

Книга поможет сегодняшним исследователям глубоко понять фундаментальные принципы, лежащие в основе существующих аналитических подходов в этой области, оценить возможности и ограничения, что позволит разрабатывать новые способы применения масс-спектрометрии в каждом отдельном случае.

УДК 543.51

ББК 24.4



© 2006 by John Wiley & Sons, Lnc. All rights reserved

© 2012, ЗАО «РИЦ «Техносфера», перевод на русский язык,
оригинал-макет, оформление

ISBN 978-5-94836-304-2

ISBN 978-0-471-72184-0 (англ.)

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|--|----|
| Предисловие к изданию на русском языке | 13 |
| Предисловие | 14 |
| Авторы | 17 |

Часть I

СТРУКТУРА И ДИНАМИКА БИМОЛЕКУЛ В ГАЗОВОЙ ФАЗЕ

| | |
|---|-----------|
| Глава 1. Спектроскопия нейтральных пептидов в газовой фазе: структура, химическая активность, микросольватация, молекулярное распознавание | 20 |
| 1.1. Введение и исторические предпосылки | 20 |
| 1.2. Экспериментальные устройства и методы | 21 |
| 1.2.1. Методы лазерной и СВЧ спектроскопии | 21 |
| 1.2.2. Некоторые экспериментальные средства: масс-спектрометрия, спектроскопия двойного резонанса. | 28 |
| 1.3. Спектроскопия модельных аминокислотных систем. | 30 |
| 1.4. Спектроскопия двойного резонанса и СВЧ спектроскопия аминокислот | 33 |
| 1.4.1. Фенилаланин | 33 |
| 1.4.2. Триптофан | 42 |
| 1.4.3. Применение СВЧ спектроскопии | 47 |
| 1.5. Спектральный анализ пептидных структур | 49 |
| 1.6. Молекулярное распознавание | 57 |
| 1.7. Вычисление частот колебаний | 59 |
| 1.8. Заключение и перспективы | 61 |
| Библиография | 63 |
| Глава 2. Исследование электронной структуры кластеров Fe—S — центров переноса электронов в металлопротеинах при использовании анионно-фотоэлектронной спектроскопии в газовой фазе | 72 |
| 2.1. Введение. | 72 |
| 2.2. Экспериментальные методы | 75 |
| 2.2.1. Электроспрей. | 75 |
| 2.2.2. Времяпролетный масс-спектрометр с ионной ловушкой | 76 |
| 2.2.3. Времяпролетная фотоэлектронная спектроскопия. | 77 |
| 2.3. Внутренняя электронная структура кластера кубана [4Fe—4S] | 77 |
| 2.3.1. Фотоэлектронные спектры комплексов [Fe ₄ S ₄ L ₄] ²⁻ и [Fe ₄ Se ₄ L ₄] ²⁻ | 78 |
| 2.3.2. Изучение влияния энергий фотонов и барьеры кулоновского отталкивания (БКО). | 80 |
| 2.3.3. Теоретические результаты для кластера [4Fe—4S] | 81 |
| 2.3.4. ФЭС спектры и электронные структуры | 85 |
| 2.3.5. Влияние лиганда на энергии связи электронов и окислительно-восстановительный потенциал. | 86 |
| 2.4. Влияние концевой лиганда на ядро кубана [4Fe—4S] в системах со смешанными лигандами | 87 |
| 2.4.1. Масс-спектрометрическое детектирование реакций замещения лигандов в растворе | 87 |
| 2.4.2. Фотоэлектронные спектры для [Fe ₄ S ₄ L _{4-x} L _x] ²⁻ (x = 0—4) | 88 |

| | |
|--|------------|
| 2.4.3. Влияние концевых лигандов на электронную структуру и окислительно-восстановительные свойства кубановых комплексов со смешанными лигандами | 90 |
| 2.4.4. Наблюдение линейных зависимостей энергии связи от x в $[\text{Fe}_4\text{S}_4\text{L}_{4-x}\text{L}_x]^{2-}$ | 91 |
| 2.4.5. Сравнение с окислительно-восстановительными потенциалами кубана со смешанными лигандами в растворе | 93 |
| 2.5. Наблюдение симметричного расщепления двухзарядных комплексов кубана: $[\text{Fe}_4\text{S}_4\text{L}_4]^{2-}$ ($\text{L} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{SEt}$) | 94 |
| 2.5.1. Диссоциация, индуцированная столкновениями, (ДИС) | 94 |
| 2.5.2. Сравнение ФЭС спектров анионов-предшественников и анионов-продуктов | 96 |
| 2.5.3. Механизм симметричного распада: внутрикластерное кулоновское отталкивание и антиферромагнитное взаимодействие | 98 |
| 2.5.4. Эффекты замещения кластеров $[\text{4Fe-4S}]$ на $[\text{2Fe-2S}]$ в белках | 100 |
| 2.6. Последовательное окисление кластера кубана $[\text{4Fe-4S}]$: от $[\text{4Fe-4S}]^-$ к $[\text{4Fe-4S}]^{3+}$ | 101 |
| 2.6.1. Получение чистых и частично координированных кластеров кубана $[\text{4Fe-4S}]$ с применением лазерной десорбции и ДИС | 101 |
| 2.6.2. Вре́мяпролетный фотоэлектронный спектр Fe_4S_n^- ($n = 4-6$) | 101 |
| 2.6.3. ФЭС $\text{Fe}_4\text{S}_4\text{Cl}_n^-$ ($n = 3,4$), $\text{Fe}_4\text{S}_4\text{Br}_n^-$ ($n = 2-4$) и $\text{Fe}_4\text{S}_4\text{I}_n^-$ ($n = 0-4$) | 105 |
| 2.6.4. Электронные структуры $\text{Fe}_4\text{S}_4\text{L}_4^-$ и Fe_4S_6^- с ядром кубана $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ | 107 |
| 2.6.5. Электронная структура $\text{Fe}_4\text{S}_4\text{L}_3^-$ ($\text{L} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$) с ядром кубана $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ и частичное влияние координации на кубан. | 108 |
| 2.6.6. Электронные структуры $\text{Fe}_4\text{S}_4\text{L}_2^-$ ($\text{L} = \text{Br}, \text{I}$) и Fe_4S_5^- с ядром кубана $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ | 109 |
| 2.6.7. Электронные структуры $\text{Fe}_4\text{S}_4\text{I}^-$ и Fe_4S_4^- | 109 |
| 2.6.8. Хранение электронов и последовательное окисление кластера кубана $[\text{4Fe-4S}]$ | 111 |
| 2.7. Заключение | 112 |
| Библиография | 114 |
| Глава 3. Ионно-молекулярные реакции и водородно-дейтериевый обмен для структурного исследования биомолекул | 119 |
| 3.1. Введение | 119 |
| 3.2. Методы | 119 |
| 3.2.1. Реакции переноса протона | 119 |
| 3.2.2. Водородно-дейтериевый обмен | 122 |
| 3.3. Реакции протонного переноса в газовой фазе | 128 |
| 3.3.1. Валентность в газовой фазе и участки протонирования однопротонированных аминокислот и белков | 128 |
| 3.3.2. Многопротонированные пептиды и белки | 129 |
| 3.4. Водородно-дейтериевый обмен | 131 |
| 3.4.1. Обмениваемый водород | 131 |
| 3.4.2. Структура пептидов и белков | 131 |
| 3.4.3. Водородно-дейтериевый обмен в нуклеотидах | 135 |
| 3.5. Присоединение йодида водорода | 136 |
| 3.6. Заключение | 136 |
| Библиография | 136 |

| | |
|---|-----|
| Глава 4. Изучение взаимодействия белков и их поведения в масс-спектрометре | 142 |
| 4.1. Структура белков и их взаимодействия в масс-спектрометрах | 142 |
| 4.2. Электроспрейная масс-спектрометрия биомолекул | 144 |
| 4.2.1. Масс-спектрометрические условия, подобные естественным условиям для белковых комплексов | 144 |
| 4.2.2. Наноэлектроспрей | 147 |
| 4.3. Транспортировка ионов и анализ нековалентных комплексов | 150 |
| 4.3.1. Общие аспекты масс-спектрометрии ионов с большими значениями m/z | 150 |
| 4.3.2. Транспортировка ионов и внутренняя энергия биомолекул в газовой фазе | 151 |
| 4.3.3. Масс-спектрометрия нековалентных комплексов | 154 |
| 4.4. Некоторые примеры | 156 |
| 4.4.1. Малые белки теплового удара и α -кристаллин | 156 |
| 4.4.2. Молекулярный шаперонин <i>GroEL</i> | 160 |
| 4.4.3. Исследование рибосом при помощи масс-спектрометрии | 163 |
| 4.5. Проблемы и перспективы | 164 |
| Библиография | 166 |
| Глава 5. Структура белка и свертывание в газовой фазе: убихитин и цитохром с | 168 |
| 5.1. Введение | 168 |
| 5.2. Свертывание белка — структура и энергетика | 169 |
| 5.3. Белки | 170 |
| 5.3.1. Убихитин | 170 |
| 5.3.2. Цитохром <i>c</i> | 171 |
| 5.4. Десорбция/ионизация белков | 172 |
| 5.5. Методы и оборудование для определения структуры и энергетики газообразного белка | 173 |
| 5.5.1. Измерение ионной подвижности | 173 |
| 5.5.2. Водородно-дейтериевый обмен в газовой фазе | 173 |
| 5.5.3. Диссоциация при захвате электрона | 174 |
| 5.5.4. Инфракрасная фотодиссоциационная спектроскопия | 175 |
| 5.6. Из раствора в газовую фазу | 175 |
| 5.7. Стабильные структуры в газовой фазе | 178 |
| 5.7.1. Убихитин | 178 |
| 5.7.2. Цитохром <i>c</i> | 187 |
| 5.8. Обзор и перспективы | 191 |
| Библиография | 192 |
| Глава 6. Динамическое моделирование фотоионизации небольших биологических молекул | 199 |
| 6.1. Введение | 199 |
| 6.2. Методология | 201 |
| 6.2.1. Поверхность потенциальной энергии | 201 |
| 6.2.2. Моделирование динамики методом классических траекторий | 202 |
| 6.2.3. Моделирование начального состояния для одно- и двухфотонной ионизации. | 203 |
| 6.2.4. Статистическое приближение | 204 |
| 6.3. Приложения | 205 |
| 6.3.1. Системы | 205 |
| 6.3.2. Влияние сверхбыстрого внутреннего вращения на фотоионизацию глицина и триптофана | 206 |

| | |
|---|------------|
| 6.3.3. Конформационные переходы, вызванные фотоионизацией: глицин и триптофан | 208 |
| 6.3.4. Поток внутренней энергии и ее перераспределение | 211 |
| 6.3.5. Неприменимость РРКМ для быстрых конформационных переходов | 213 |
| 6.3.6. Быстрая фрагментация при одно- и двухфотонной ионизации | 215 |
| 6.3.7. Испытание РРК для быстрой фрагментации | 216 |
| 6.4. Проблемы и возможности для динамического моделирования процессов масс-спектрометрии | 216 |
| Библиография | 217 |
| Глава 7. Внутримолекулярное перераспределение колебательной энергии и эргодичность распада биомолекул | 221 |
| 7.1. Что мы узнали из органической масс-спектрометрии | 221 |
| 7.1.1. Введение и исторические предпосылки | 221 |
| 7.1.2. Ранние эксперименты с органическими молекулами и их согласие со статистической теорией. | 223 |
| 7.1.3. Современные эксперименты | 223 |
| 7.1.4. Времена внутримолекулярного перераспределения колебательной энергии и «нерандомизированный» распад. | 225 |
| 7.1.5. Случаи «изолированных» электронных состояний | 229 |
| 7.2. Биомолекулы | 230 |
| 7.2.1. Введение | 230 |
| 7.2.2. Размер белка и его потенциал к неэргодическому поведению | 231 |
| 7.2.3. Структура белка и его потенциал к неэргодичности. | 232 |
| 7.2.4. Ионизация и возбуждение биомолекул | 233 |
| 7.2.5. Заключение: «за» и «против» внутримолекулярного перераспределения колебательной энергии и эргодического поведения биомолекул | 246 |
| Библиография | 247 |
| Часть II | |
| АКТИВАЦИЯ, ДИССОЦИАЦИЯ И РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ | |
| Глава 8. Обзор фрагментации пептидов | 254 |
| 8.1. Введение | 254 |
| 8.2. Обзор известных ионных структур пептидных фрагментов | 254 |
| 8.3. Влияние экспериментальных факторов на фрагментацию пептидов | 257 |
| 8.4. Методы изучения фрагментации пептидов. | 258 |
| 8.5. Влияние заряженных центров на фрагментацию | 260 |
| 8.6. Влияние вторичных структур на фрагментацию пептидов. | 265 |
| 8.7. Применение знаний о фрагментации пептидов для разработки алгоритма идентификации. | 268 |
| 8.8. Оставшиеся проблемы и будущие направления | 268 |
| Библиография | 269 |
| Глава 9. Пептидные катион-радикалы. | 273 |
| 9.1. Введение | 273 |
| 9.2. Образование пептидных катион-радикалов из комплексов ион металла/пептид. | 274 |
| 9.3. Факторы, стабилизирующие катион-радикалы | 278 |
| 9.4. Фрагментация катион-радикалов | 281 |

| | |
|---|------------|
| 9.4.1. Катион-радикалы аминокислот | 283 |
| 9.4.2. Катион-радикалы пептидов, содержащие только глициновые остатки. | 283 |
| 9.4.3. Катион-радикалы пептидов, содержащие только остатки глицина и триптофана | 284 |
| 9.4.4. Катион-радикалы пептидов, содержащие только остатки глицина и гистидина. | 287 |
| 9.4.5. Катион-радикалы трипептидов GlyXxxArg | 297 |
| 9.5. Заключение | 300 |
| Библиография | 300 |
| Глава 10. Фотодиссоциация биомолекулярных ионов: прогресс, возможности и аспекты, связанные с малыми ионами. | 304 |
| 10.1. Введение | 304 |
| 10.2. Спектроскопический подход | 305 |
| 10.2.1. Характерные электронные хромофоры | 305 |
| 10.2.2. Исследование координации и сольватации в УФ/видимом диапазоне | 307 |
| 10.2.3. Определение характерных колебательных мод | 313 |
| 10.2.4. Широкополосные ИК спектры. | 318 |
| 10.2.5. ИК исследование влияния сольватации (водородные валентные колебания) | 323 |
| 10.3. Аспекты активации | 324 |
| 10.3.1. Пороговая длина волны | 324 |
| 10.3.2. Зависимость энергии инфракрасной многофотонной диссоциации | 327 |
| 10.3.3. Фотодиссоциация с временным разрешением. | 330 |
| 10.3.4. Характерные спектры фотофрагментации в видимой и УФ области | 333 |
| 10.4. Перспективные биомолекулярные приложения. | 335 |
| 10.4.1. Перспективы спектроскопии | 335 |
| 10.4.2. Аспекты активации | 336 |
| 10.5. Заключение | 337 |
| Библиография | 338 |
| Глава 11. Моделирование переноса энергии и мономолекулярного распада при диссоциации, индуцированной столкновениями или поверхностью, методами химической динамики | 341 |
| 11.1. Введение | 341 |
| 11.2. Методология моделирований ДИС и ДИП | 342 |
| 11.2.1. Функции потенциальной энергии | 343 |
| 11.2.2. Начальные условия траекторий | 344 |
| 11.3. Моделирование ДИС | 348 |
| 11.3.1. Столкновения кластеров Al ₆ и Al ₁₃ с атомами инертных газов | 348 |
| 11.3.2. Столкновения атомов Ag с N-протонированными полипептидами глицина и аланина | 358 |
| 11.4. Моделирование ДИП. | 370 |
| 11.4.1. Поверхности потенциальной энергии для моделирования ДИП | 371 |
| 11.4.2. Результаты моделирования ДИП | 373 |
| 11.5. Будущие направления | 385 |
| Библиография | 386 |

| | |
|--|-----|
| Глава 12. Мягкое осаждение ионов: приборы, явления и приложения | 390 |
| 12.1. Введение | 390 |
| 12.1.1. Явления столкновений ионов с поверхностью | 390 |
| 12.2. Аппаратура для мягкого осаждения ионов: современная и использовавшаяся прежде | 404 |
| 12.2.1. Манхэттенский проект и разделение изотопов при помощи масс-спектрометрии | 404 |
| 12.2.2. Разделение небольших многоатомных молекул с использованием секторных приборов | 406 |
| 12.2.3. Кластеры, полимеры и эксперименты с использованием не отобранных по массе ионов в квадрупольных масс-спектрометрах | 409 |
| 12.2.4. Исследование ДНК и пептидов с использованием приборов ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье | 412 |
| 12.2.5. Многокаскадные секторные приборы | 411 |
| 12.2.6. Квадрупольные фильтры масс и линейные ионные ловушки для разделения белка | 415 |
| 12.3. Приложения | 417 |
| 12.3.1. Приложения мягкого осаждения ионов и рассмотрение этого метода в качестве препаративной технологии | 417 |
| 12.3.2. Мягкая ионизация для препаративной масс-спектрометрии биомолекул | 419 |
| 12.3.3. Десорбционная электрораспылительная ионизация и ее применение для анализа мягкого осаждения | 421 |
| 12.4. Заключение | 422 |
| Библиография | 423 |
| Глава 13. Диссоциация в результате захвата электрона и другие ионно-электронные реакции фрагментации | 428 |
| 13.1. Введение: история открытия реакций ионов и электронов | 428 |
| 13.2. Диссоциация при захвате электронов | 429 |
| 13.2.1. Сечение захвата электрона | 429 |
| 13.2.2. Разрыв N—C α связи | 431 |
| 13.2.3. Механизмы ДЗЭ | 436 |
| 13.2.4. Интенсивность фрагментации | 437 |
| 13.2.5. Нейтрализация заряда | 438 |
| 13.2.6. Катионизированные молекулы | 439 |
| 13.2.7. Модель «горячего» атома водорода | 440 |
| 13.2.8. Модель сольватации заряда | 441 |
| 13.2.9. Механизмы действия электрона | 442 |
| 13.2.10. Механизм водородной связи | 445 |
| 13.2.11. Другие типы диссоциации | 449 |
| 13.2.12. Потери малых групп | 451 |
| 13.2.13. Диссоциация при захвате горячего электрона (ДЗГЭ) | 455 |
| 13.2.14. Диссоциация прочных связей в присутствии слабой | 456 |
| 13.2.15. Диссоциация при переносе электрона | 457 |
| 13.3. Диссоциация при отрыве электрона (ДОЭ) | 458 |
| 13.4. Приборы с ДЗЭ | 459 |
| 13.5. Применение к исследованиям структуры | 460 |
| 13.5.1. Определение первичной последовательности | 460 |
| 13.5.2. Локализация заряда | 462 |
| 13.5.3. Вторичная и третичная структуры | 462 |

| | |
|--|------------|
| 13.5.4. Четвертичная структура | 462 |
| 13.5.5. ДЗЭ непептидных молекул. | 463 |
| 13.6. Оставшиеся проблемы | 463 |
| Библиография | 463 |
| Глава 14. Биомолекулярные ионно-ионные реакции | 467 |
| 14.1. Введение | 467 |
| 14.2. Феноменология ионно-ионных реакций биополимеров | 468 |
| 14.2.1. Реакции ионного переноса. | 468 |
| 14.2.2. Реакции переноса электрона | 477 |
| 14.2.3. Реакции конденсации | 478 |
| 14.2.4. Фрагментация в результате ионно-ионных реакций | 479 |
| 14.3. Динамика реакций биоионов с ионами. | 489 |
| 14.3.1. Перенос протона и реакции ассоциации. | 490 |
| 14.3.2. Перенос электрона | 495 |
| 14.4. Оборудование для исследования биоионно-ионных реакций. | 500 |
| 14.5. Заключение | 502 |
| Библиография | 504 |

Часть III

ТЕРМОХИМИЯ И ЭНЕРГЕТИКА

| | |
|---|------------|
| Глава 15. Термохимическое изучение биомолекул. | 508 |
| 15.1. Введение и определения. | 508 |
| 15.2. Методы термохимических измерений. | 509 |
| 15.2.1. Метод равновесия | 509 |
| 15.2.2. Метод брекетинга (скобок) | 511 |
| 15.2.3. Кинетический метод | 512 |
| 15.2.4. Пороговая диссоциация, индуцированная столкновениями (ПДИС) | 516 |
| 15.2.5. Диссоциация инфракрасным излучением абсолютно черного тела (ДИИАЧТ) | 518 |
| 15.2.6. Диссоциация, индуцированная поверхностью (ДИП) | 523 |
| 15.2.7. Фотодиссоциация с временным разрешением (ФДВР) | 526 |
| 15.2.8. Выделение кинетической энергии (ВКЭ) и распределение выделения кинетической энергии (РВКЭ) | 527 |
| 15.2.9. Излучательная ассоциационная кинетика и прямое ассоциационное равновесие | 529 |
| 15.2.10. Теория и сравнение экспериментальных методов | 531 |
| 15.3. Приложения и примеры. | 532 |
| 15.3.1. Реакции переноса протона. | 532 |
| 15.3.2. Термохимия ионов металлов | 535 |
| 15.3.3. Термохимия ионных кластеров: обнаружение солевых мостиков в газовой фазе | 542 |
| 15.4. Данные термохимии как помощь для масс-спектрометрических исследований. | 545 |
| Библиография | 547 |
| Глава 16. Влияние энергии и энтропии на диссоциацию пептидов и белков в газовой фазе | 554 |
| 16.1. Введение | 554 |
| 16.2. Диссоциация многоатомных молекул | 555 |

| | |
|--|-----|
| 16.2.1. Микрোকаническая константа скорости | 555 |
| 16.2.2. Тепловая диссоциация | 558 |
| 16.3. Исторический обзор экспериментальных методов измерения пороговой энергии и энтропии активации | 560 |
| 16.3.1. Спектроскопия фотоэлектронных-фотоионных совпадений (СФФС) | 561 |
| 16.3.2. Фотодиссоциация с временным разрешением (ФДВР) | 561 |
| 16.3.3. Масс-спектрометрия фотоионизации с временным разрешением (МСФИВР) | 564 |
| 16.3.4. Пороговая диссоциация, индуцированная столкновениями (ПДИС) | 564 |
| 16.4. Почему сложно определить параметры диссоциации биомолекул | 565 |
| 16.5. Диссоциация пептидов, индуцированная поверхностью. | 567 |
| 16.5.1. Методология | 568 |
| 16.5.2. Примеры | 570 |
| 16.6. Диссоциация посредством инфракрасного излучения абсолютно черного тела (ДИИАЧТ) | 575 |
| 16.6.1. Общие предпосылки | 575 |
| 16.6.2. Преимущества больших молекул | 577 |
| 16.6.3. Примеры: пептиды и белки | 578 |
| 16.6.4. Интерпретация параметров Аррениуса с использованием теоремы Толмана | 581 |
| 16.6.5. Компенсация энтальпии и энтропии | 584 |
| 16.7. Анализ влияния энтропии на реакции ассоциации белков | 587 |
| 16.8. Заключение | 589 |
| Библиография | 590 |
| Предметный указатель | 595 |

ПРЕДИСЛОВИЕ К ИЗДАНИЮ НА РУССКОМ ЯЗЫКЕ

Пожалуй, важнейшим достижением масс-спектрометрии за последние 20 лет стало проникновение в мир биологических природных соединений. Благодаря ионизации электрораспылением и матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации масс-спектрометрии стали доступны сахара, нуклеиновые кислоты, белки и пептиды, липиды и прочие биоорганические молекулы. Самые крупные успехи связаны именно с исследованием белков. Благодаря чувствительности, информативности, экспрессности, возможности работать со смесями масс-спектрометрия стала сегодня наиболее востребованным методом анализа этих важнейших соединений. Уже быстрое и надежное установление первичной структуры белков, т.е. последовательности аминокислотных звеньев, могло бы считаться превосходным результатом. Однако проводимые в XXI веке исследования позволяют изучать и структуры более сложных порядков (от 2 до 4), включая нековалентные взаимодействия белков с образованием надбелковых структур. Масс-спектрометрия оказалась способной устанавливать тип и место посттрансляционных модификаций, работать с гликопротеинами, липопротеинами, фосфопротеинами и т.д. Именно успехи масс-спектрометрии привели к формированию в конце прошлого века нового научного направления — протеомики.

Практические достижения масс-спектрометрии белков и пептидов неоспоримы. Тем не менее, работа со столь большими молекулами, которые ранее были недоступны классической органической масс-спектрометрии, поставила новые теоретические вопросы. Справедлива ли квазиравновесная теория для больших молекул? Какова структура молекулярных и фрагментных ионов пептидов? Отличаются ли структуры белков и пептидов в газовой фазе и растворе?

Настоящая книга — это собрание статей по основным аспектам, лежащим в основе масс-спектрометрии биомолекул. Выбранные темы разделены на три части: 1) структура и динамика биомолекул в газовой фазе; 2) активация, диссоциация и реакционная способность; 3) термодинамика и энергетика. К сожалению, в русскоязычной литературе пока отсутствуют монографии, посвященные масс-спектрометрии белков и пептидов. Немногочисленные группы масс-спектрометристов, работающие в России в этой области, ориентируются на англоязычные издания и оригинальные статьи и обзоры, хотя число наших соотечественников, работающих в масс-спектрометрии пептидов за рубежом, очень значительно. В качестве примера можно привести Романа Александровича Зубарева, создателя метода диссоциации при захвате электрона и автора одной из глав этой книги. Да и сама Юлия Ласкин имеет российские корни. Книга рассчитана на продвинутых читателей и будет интересна физико-химикам, спектроскопистам и биохимикам, работающим с белками и пептидами. Безусловно, это хорошая возможность познакомиться с современными достижениями в этой области и для российских масс-спектрометристов, особенно учитывая, что целый ряд описываемых подходов и методов пока не используется в нашей стране.

Президент Всероссийского
масс-спектрометрического общества,
доктор химических наук, профессор
А.Т. Лебедев

Эта книга посвящается памяти Хавы Лифшиц — одной из пионеров в области химии ионов в газовой фазе и основ масс-спектрометрии — великого ученого, великодушного учителя и хорошей подруги.

Джулия Ласкин

ПРЕДИСЛОВИЕ

Изобретение способов перевода биологических молекул в газообразное состояние при помощи матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) и ионизации электрораспылением (ИЭР) привело к революции в биологической масс-спектрометрии. Развитие этих методов было очень успешным благодаря свойственным им уникальным аналитическим характеристикам. После их внедрения стало возможным измерять молекулярные массы с высокой точностью, а также успешно определять последовательности аминокислотных остатков в пептидах. Сейчас с помощью масс-спектрометрии можно получить и сведения о пептидных и белковых структурах высших порядков. Исключительно высокая чувствительность, высокое разрешение по массе и быстрота анализа — ключевые факторы, благодаря которым масс-спектрометрия стала лидером среди аналитических методов, используемых для идентификации и исследования биомолекул.

Успехи данного направления в значительной степени основаны на принципах масс-спектрометрии, разрабатываемых с середины 1970-х для малых органических молекул. Однако, в процессе изучения поведения биомолекул в газовой фазе возникло множество трудностей, связанных с гибкостью и размером данных объектов. Например, было сложно достигнуть эффективной фрагментации больших молекул традиционными масс-спектрометрическими способами. Исследование фундаментальных ограничений существующих методов активации ионов привело к развитию новых аналитических подходов к изучению фрагментации больших молекул в газовой фазе. Установление механизмов фрагментации молекул и влияния первичной и вторичной молекулярных структур на наблюдаемые спектры диссоциации улучшило идентификацию биомолекул в прикладных исследованиях.

Химия биомолекулярных ионов в газовой фазе развилась во множество новых захватывающих научных направлений во многом благодаря большим размерам биомолекул, их конформационной гибкости и их способности существовать в виде многозарядных ионов. Многозарядные биомолекулярные ионы — превосходные объекты для изучения ионно-ионной химии и процессов, следующих за захватом ионами медленных электронов. В настоящее время разработаны различные способы получения феноменологического понимания образования и фрагментации катион-радикалов с избыточным содержанием водорода, молекулярных катион-радикалов и анион-радикалов пептидов и белков. Разработка новых подходов в термохимии биомолекул, находящихся в газообразном состоянии, и исследование энергетики их диссоциации — главная тема данного научного направления. Колебательная спектроскопия биомолекулярных ионов — еще одна быстро развивающаяся область. В свою очередь, новые методы спектроскопии высокого разрешения были успешно применены к большим молекулярным системам, давая ценную информацию, дополняющую масс-спектрометрические данные. Химическое взаимодействие биомолекул с твердыми мишенями создает потенциал для подготовки новых поверхностей для разнообразных приложений в биологии и биотехнологии.

Кроме того, существует несколько фундаментальных проблем, связанных с физикой процессов. Например, вопрос эргодичности и/или статистического или нестатистического поведения биомолекул при их фрагментации возник в результате разви-

тия нескольких методов диссоциации, включая диссоциацию при захвате электрона (ДЗЭ) и фотодиссоциацию. Старые вопросы, поставленные много лет назад при исследовании органических молекул, снова вышли на передний план: подвергаются ли газофазные биомолекулы внутримолекулярному перераспределению колебательной энергии (ВПКЭ) перед их диссоциацией? Все ли виды колебаний вовлечены в ВПКЭ? Существуют ли селективность и реакционная способность, управляемые зарядами? Тот факт, что большие белки фрагментируют в масс-спектрометрах за короткие промежутки времени (что абсолютно необходимо для их анализа и секвенирования), несколько удивителен, принимая во внимание наши предыдущие сведения о диссоциации относительно малых органических молекул в газовой фазе и ее описание с использованием статистических теорий [Райс-Рампспергер-Кассель-Маркус/квазиравновесная теория (РРKM/КРТ) и т.п.].

Настоящая книга — это собрание статей по основным аспектам, лежащим в основе масс-спектрометрии биомолекул. Выбранные темы разделены на три части: 1) структура и динамика биомолекул в газовой фазе; 2) активация, диссоциация и реакционная способность; 3) термодинамика и энергетика.

Фундаментальная масс-спектрометрия всегда была неразрывно связана с разнообразием методов газофазной спектроскопии, которые обеспечивают уникальные подходы к изучению структуры и динамики ионов и молекул в газовой фазе. Ультрафиолетовая и инфракрасная спектроскопия высокого разрешения, о которой рассказано в главе 1, позволяет изучать структуру и динамику индивидуальных конформеров нейтральных биомолекул, помогая в исследовании влияния растворителя на их свойства, поведения кластеров биомолекул в газовой фазе и молекулярного распознавания. В главе 2 приводится пример исследований переноса электронов в железосерных (Fe—S) кластерах с помощью фотоэлектронной спектроскопии фотоотщепления высокого разрешения. В частности, данный метод используется для изучения влияния растворителя и окружающей среды белка на электронные свойства кластера кубического типа [4Fe—4S], наиболее распространенного агента для переноса и накопления электронов в металлопротеинах.

Ионно-молекулярные реакции и водородно-дейтериевый обмен традиционно использовались в масс-спектрометрии для установления структуры частиц. В главе 3 приводится краткий обзор применения этих методов для изучения структуры и конформации биомолекул в газовой фазе. В то время как методы спектроскопии в настоящее время ограничиваются относительно малыми системами, масс-спектрометрия используется даже для исследования четвертичной структуры больших белковых комплексов. Экспериментальные подходы, используемые в таких исследованиях, изложены в главе 4. Конформации белка и его свертывание в газовой фазе обсуждаются в главе 5. Понимание динамики белка при отсутствии растворителя важно для отделения влияния растворителя от влияния собственных свойств белков на их поведение в растворе.

Динамика внутримолекулярного перераспределения колебательной энергии (ВПКЭ) для биомолекул в газовой фазе рассматривается в главах 6 и 7. Классические траекторные моделирования с использованием полуэмпирических поверхностей потенциальной энергии РМЗ, описанные в главе 6, способствуют пониманию крайне быстрой динамики процессов, следующих за фотоионизацией биомолекул, и применимости статистических теорий к диссоциации этих больших гибких молекул. Исследование ионной химии пептидов и белков в газовой фазе открыло огромное множество очень интересных явлений, некоторые из которых (например, диссоциация в результате захвата электронов и фотодиссоциация) были описаны как неэргодические процессы, в которых ВПКЭ отсутствует. Все «за» и «против» ВПКЭ и эргодического поведения биомолекул по результатам экспериментов рассматриваются в главе 7.

Фрагментация протонированных пептидов в газовой фазе — важное условие для идентификации пептидов и белков с использованием tandemной масс-спектромет-

рии (МС/МС). Понимание механистических аспектов фрагментации пептидов в зависимости от их последовательности и структуры, изложенное в главе 8, играет центральную роль в интерпретации спектров тандемной масс-спектрометрии и методов оптимизации поиска в базах данных. В большинстве масс-спектрометрических исследований используются локализованные биомолекулы (протонированные или катионизированные металлами), рожденные в результате использования мягких методов ионизации. Образование и диссоциация пептидных катион-радикалов, описанные в главе 9, — это новая быстро развивающаяся область ионной химии биомолекул в газовой фазе. Такие ионы образуются в результате фрагментации в газовой фазе комплексов нейтральных пептидов с переходными металлами и различными органическими лигандами.

Столкновительная активация и многофотонное возбуждение традиционно используются для идентификации биомолекул в различных масс-спектрометрических приложениях. О текущем положении дел в исследовании многофотонного возбуждения, спектроскопии и фотодиссоциации биомолекул в газовой фазе рассказано в главе 10. Глава 11 описывает моделирование передачи энергии в столкновениях ионов с атомарными нейтральными частицами и поверхностями методом классических траекторий. Явления, наблюдаемые после столкновений ионов с поверхностью, и аппаратура, используемая в таких исследованиях, представлены в главе 12 с уклоном на осаждение биологических молекул на разнообразные поверхности. Осаждение используется для специфической модификации поверхности при помощи пучка отобранных по массе ионов любого размера и состава или для разделения и подготовки биомолекул на подложках в чистом виде для последующего анализа.

Еще один метод активации ионов в биологической масс-спектрометрии основан на захвате медленных электронов многозарядными ионами. Диссоциация при захвате электрона (ДЗЭ), обсуждаемая в главе 13, открывает разнообразие уникальных каналов диссоциации и обеспечивает информацию о структуре иона в дополнение к известной из экспериментов по столкновительной диссоциации и многофотонному возбуждению. В главе 14 представлены фундаментальные принципы ионно-ионной химии биомолекул. Ионно-ионные реакции обеспечивают средство для управления зарядовым состоянием многозарядных пептидов и белков. Методики понижения заряда в реакциях многозарядных биомолекул с однозарядными ионами противоположной полярности разрабатываются в качестве мощного инструмента исследования структуры пептидов и белков.

Масс-спектрометрия широко используется для термохимических исследований. Однако изучение термохимии и энергетики диссоциации пептидов и белков является достаточно проблематичным из-за неприменимости большинства методов, разработанных для малых и средних по размеру ионов, к интерпретации фрагментации больших биомолекул. В главе 15 представлен краткий обзор масс-спектрометрических подходов, используемых для изучения термохимии биомолекул, и изложены текущее положение в этой области и ограничения существующих методов, с уклоном на определение сродства биомолекул к протону и ионам щелочных металлов. В главе 16 описаны экспериментальные методы изучения энергетики и энтропийных эффектов при диссоциации пептидов и белков.

Наконец, мы хотели бы поблагодарить авторов глав, которые потратили свое время и приложили значительные усилия для подготовки высококачественных статей для данной книги. Особая благодарность Джину Футреллу за его щедрую помощь на различных стадиях проекта и ценные рекомендации по содержанию нескольких глав. Мы также благодарны многим другим коллегам, которые предоставили свои комментарии и предложения по поводу содержания данной книги.

АВТОРЫ

Richard L. Beardsley, Department of Chemistry, Box 210041, University of Arizona, 1306 East University Avenue, Tucson, AZ 85721-0041.

Kathrin Breuker, Institute of Organic Chemistry and Center for Molecular Biosciences Innsbruck (CMBI), University of Innsbruck, Innrain 52a, A-6020 Innsbruck, Austria.

Guilong Cheng, Department of Chemistry, Box 210041, University of Arizona, 1306 East University Avenue, Tucson, AZ 85721-0041.

R. Graham Cooks, Department of Chemistry, Purdue University, 560 Oval Drive, West Lafayette, IN 47907-2038.

Robert C. Dunbar, Chemistry Department, Case Western Reserve University, Cleveland, OH 44106.

You-Jun-Fu, Department of Physics, Washington State University, 2710 University Drive, Richland, WA 99352; W. R. Wiley Environmental Molecular Sciences Laboratory and Chemical Sciences Division, Pacific Northwest National Laboratory, MS K8-88, P.O. Box 999, Richland, WA 99352.

R. Benny Gerber, Department of Chemistry, University of California, Irvine, CA 92697; Department of Physical Chemistry and the Fritz Haber Research Center, The Hebrew University, Jerusalem 91904, Israel.

Markus Gerhards, Heinrich-Heine Universität Diisseldorf, Institut für Physikalische Chemie I, Universitätstrasse 26.33.02, 40225 Düsseldorf, Germany.

Bogdan Gologan, Department of Chemistry, Purdue University, 560 Oval Drive, West Lafayette, IN 47907-2038.

M. Kirk Green, McMaster Regional Centre for Mass Spectrometry, Department of Chemistry, McMaster University, Hamilton, Canada.

William L. Hase, Department of Chemistry and Biochemistry, Texas Tech University, Lubbock, TX 79409-1061.

Kristin A. Herrmann, Department of Chemistry, Box 210041, University of Arizona, 1306 East University Avenue, Tucson, AZ 85721-0041.

Amy E. Hilderbrand, Department of Chemistry, Box 210041, University of Arizona, 1306 East University Avenue, Tucson, AZ 85721-0041.

Alan C. Hopkinson, Centre for Research in Mass Spectrometry and the Department of Chemistry, York University, 4700 Keele Street, Toronto, Ontario, Canada M3J 1P3.

Julia Laskin, Fundamental Sciences Division, Pacific Northwest National Laboratory, P.O. Box 999 K8-88, Richland, WA 99352.

Carlito B. Lebrilla, Department of Chemistry, University of California, Davis, CA 95616.

Chava Lifshitz, Department of Physical Chemistry and The Farkas Center for Light Induced Processes, The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem 91904, Israel.

Scott A. McLuckey, Department of Chemistry, Purdue University, 560 Oval Drive, West Lafayette, IN 47907-2084.

Samy O. Meroueh, Department of Chemistry and Biochemistry, University of Notre Dame, Notre Dame, IN 46556-5670.

Asif Rahaman, Department of Chemistry and Biochemistry, Texas Tech University, Lubbock, TX 79409-1061.

Carol V. Robinson, The University Chemical Laboratory, University of Cambridge, Lensfield Road, Cambridge CB2 1EW, United Kingdom.

Dorit Shemesh, Department of Physical Chemistry and The Fritz Haber Research Center, The Hebrew University, Jerusalem 91904, Israel.

K. W. Michael Siu, Centre for Research in Mass Spectrometry and the Department of Chemistry, York University, 4700 Keele Street, Toronto, Ontario, Canada M3J 1P3.

Frank Sobott, Structural Genomics Consortium, University of Oxford, Botnar Research Centre, Oxford OX3 7LD, United Kingdom.

Kihyung Song, Department of Chemistry, Korea National University of Education, Chongwon, Chungbuk 363-791, Korea.

Jiangping Wang, Department of Chemistry, Wayne State University, Detroit, MI 48202.

Lai-Sheng Wang, Department of Physics, Washington State University, 2710 University Drive, Richland, WA 99352; W. R. Wiley Environmental Molecular Sciences Laboratory and Chemical Sciences Division, Pacific Northwest National Laboratory, MS K8-88, P.O. Box 999, Richland, WA 99352.

Ping Wang, Department of Chemistry, The University of Akron, Akron, OH 44325.

Xue-Bin Wang, Department of Physics, Washington State University, 2710 University Drive, Richland, WA 99352; W. R. Wiley Environmental Molecular Sciences Laboratory and Chemical Sciences Division, Pacific Northwest National Laboratory, MS K8-88, P.O. Box 999, Richland, WA 99352.

Chrys Wesdemiotis, Department of Chemistry, The University of Akron, Akron, OH 44325.

Justin M. Wiseman, Department of Chemistry, Purdue University, 560 Oval Drive, West Lafayette, IN 47907-2038.

Vicki H. Wysocki, Department of Chemistry, Box 210041, University of Arizona, 1306 East University Avenue, Tucson, AZ 85721-0041.

Xin Yang, Department of Physics, Washington State University, 2710 University Drive, Richland, WA 99352; W. R. Wiley Environmental Molecular Sciences Laboratory and Chemical Sciences Division, Pacific Northwest National Laboratory, MS K8-88, P.O. Box 999, Richland, WA 99352.

Qingfen Zhang, Department of Chemistry, Box 210041, University of Arizona, 1306 East University Avenue, Tucson, AZ 85721-0041.

Roman Zubarev, Laboratory for Biological and Medical Mass Spectrometry, Uppsala University, Box 583, Uppsala S-751 23, Sweden.

Часть I

**СТРУКТУРА И ДИНАМИКА
БИОМОЛЕКУЛ
В ГАЗОВОЙ ФАЗЕ**

ГЛАВА I

СПЕКТРОСКОПИЯ НЕЙТРАЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ В ГАЗОВОЙ ФАЗЕ: СТРУКТУРА, ХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ, МИКРОСОЛЬВАТАЦИЯ, МОЛЕКУЛЯРНОЕ РАСПОЗНАВАНИЕ

Маркус Герхардс
Дюссельдорфский университет
Генриха Гейне,
Институт физической химии I,
Дюссельдорф, Германия

1.1. Введение и исторические предпосылки

Как было уже отмечено в предисловии, перевод больших молекул в газообразное состояние без их диссоциации затруднителен. Изучение такого процесса традиционно базируется на применении масс-спектрометрических методов. При этом ощущается недостаток спектроскопической информации об анализируемых молекулах. Для получения дополнительных сведений об энергиях различных электронных состояний, а также о структурных и динамических изменениях исследуемых изолированных молекул целесообразно сочетать масс-спектрометрию с различными спектроскопическими методами. Данное предложение вызвано необходимостью поиска ответов на следующие вопросы:

1. Каковы движущие силы свертывания белка или агрегации пептидов?
2. Как сольватация изменяет вторичную структуру пептидов, и как управлять данным процессом? Корректно ли при моделировании добавлять одну молекулу воды за другой, чтобы определять структурные изменения белков?

Найдя ответы на эти вопросы на молекулярном уровне, мы сможем понимать и предсказывать структуры и динамику пептидов. Основная идея данной главы — обзор комбинированных спектроскопических и масс-спектрометрических исследований. В ней будут рассматриваются только нейтральные аминокислоты и пептиды. Спектроскопия ионов, еще одно быстроразвивающееся направление, в этой главе не рассматривается.

Как будет отмечено в других главах, большие заряженные молекулы переводятся в газовую фазу с помощью МАЛДИ (Karas и Hillenkamp, 1988), ЭРИ (Fenn и др., 1989), ЛИФИЖ (лазерно-индуцированного формирования ионов из жидкости) (Kleinkefort и др., 1996) или других источников. Нейтральные молекулы могут быть десорбированы при помощи нагревания. Однако, в ходе этого процесса чистые аминокислоты и пептиды фрагментируют с выбросом молекулы CO_2 . В данной главе рассматриваются различные способы ввода нейтральных молекул в газовую фазу. Прорыв в этой области был достигнут с помощью изобретения источников с лазерной десорбцией (см. раздел 1.2) в сочетании со сверхзвуковым охлаждением и лазерной ионизацией нейтральных десорбированных молекул. Объединение масс-спектромет-

рии отобранных нейтральных молекул (ионизируемых для детектирования в виде катионов) с методами спектроскопии было инициировано пионерской работой Леви и его коллег (Cable и др., 1987, 1988a, b; Rizzo и др., 1985, 1986b). Начав с анализа аминокислот при помощи сочетания лазерной десорбции с флуоресцентной спектроскопией или резонансной многофотонной ионизацией, группа Леви увеличила размер исследуемых молекул до трипептидов (Cable и др., 1987, 1988a, b). В результате спектроскопических исследований были получены сведения о колебаниях в состоянии S_1 , преимущественно в низкочастотной области спектра, вплоть до нескольких сотен см^{-1} . Однако, области амида I или амида II, так же как и валентные колебания NH , не были исследованы. Хотя работа группы Леви привела к фантастическим спектроскопическим результатам, основной ее недостаток состоит в невозможности четкой интерпретации полученных спектров. Во-первых, нельзя исключить, что эти спектры — результат наложения спектров различных изомеров. Во-вторых, компьютеры, существовавшие в конце 1980-х, не могли быть использованы для достоверного предсказания колебательных спектров разных изомеров. Более того, структуры состояний S_1 все еще нельзя предсказать с точностью, доступной для состояний S_0 . Даже вычисление энергий и колебаний трипептидов в состоянии S_0 для сотен возможных изомеров — задача непосильная для существующих компьютеров. Кроме того, в этих вычислениях необходимо учитывать ангармоничность колебаний, особенно для области низких частот. Из-за указанных проблем спектры, полученные группой Леви, почти невозможно достоверно интерпретировать. С развитием новых методов спектроскопии (методов двойного резонанса) появилась возможность экспериментально различать изомеры и регистрировать частоты колебаний в областях амида I или II, так же как и валентные колебания NH . Соответствующие методы будут рассмотрены в разделе 1.2. К тому же, начиная с 1990-х годов, быстрое увеличение мощности компьютеров позволило получить достоверные сведения о структурах изолированных больших молекул в газовой фазе. Как результат технических усовершенствований в конце 1990-х начались исследования динамических моделей аминокислот и пептидов. Так возникла новая быстро растущая область научных исследований, которая будет подробно описана в разделах 1.3—1.6.

Хотя в данной главе в основном рассматриваются различные методы лазерной спектроскопии, разработки в области СВЧ спектроскопии также будут обсуждаться. Эти методы позволяют регистрировать спектры высокого разрешения и, на их основе, получать точную информацию о геометрии молекул.

В следующих разделах рассматриваются различные методы и их приложения, начиная с отдельных динамических моделей и заканчивая пептидами. Обзор остающихся проблем дается в конце главы.

1.2. Экспериментальные устройства и методы

1.2.1. Методы лазерной и СВЧ спектроскопии

Существует несколько спектроскопических методов анализа основного и возбужденного электронных состояний изолированных биомолекул в газовой фазе. Вращательные и колебательные спектры обеспечивают информацию о структуре исследуемых молекулярных систем. Флуоресцентные методы дают возможность получить информацию о состояниях S_0 и S_1 исследуемых аминокислот и пептидов, особенно в низкочастотной области спектра (см. разделы 1.4—1.6). При использовании флуоресцентной спектроскопии рассеяния (ФСР) (см. рис. 1.1a) частота лазера возбуждения постоянна, а флуоресцентное излучение рассеивается, обеспечивая сведения о состоя-

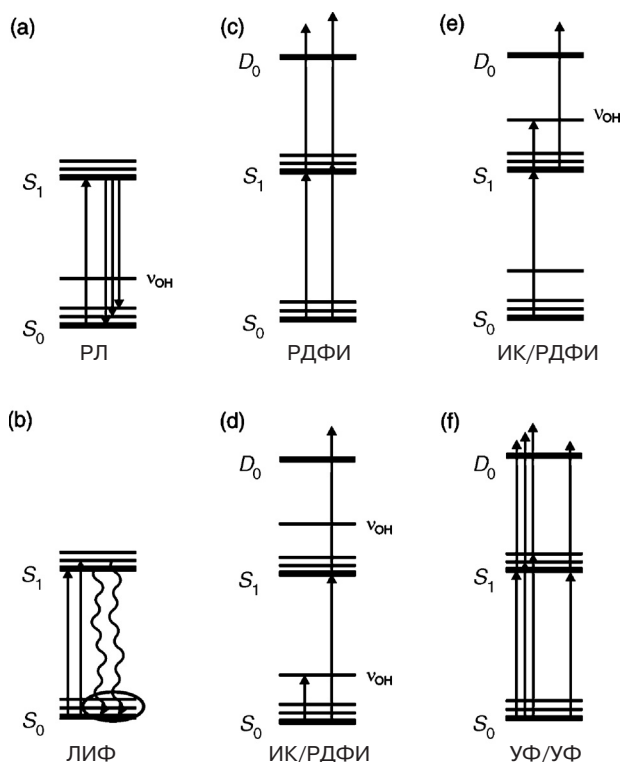


Рис. 1.1. Различные методы лазерной спектроскопии в приложении к изолированным аминокислотам и пептидам: а — лазерно-индуцированная флуоресценция (ЛИФ) с анализом колебаний в состоянии S_0 ; б — лазерно-индуцированная флуоресценция (ЛИФ) с анализом колебаний в состоянии S_1 ; в — резонансная двухфотонная ионизация, в приложении к исследованию колебаний в возбужденном состоянии; д, е — ИК/РДФИ метод исследования инфракрасных спектров основного и возбужденного состояний, соответственно; ф — ультрафиолетово-ультрафиолетовое выжигание провалов в приложении к анализу различных изомеров (см. подробнее в тексте)

нии S_0 . В лазерно-индуцированной флуоресцентной (ЛИФ) спектроскопии частота лазера возбуждения сканируется, а детектируется полное флуоресцентное излучение (рис. 1.1б). Данный метод дает информацию о низкочастотных колебаниях возбужденного электронного состояния. Еще один метод определения колебательных частот состояния S_1 — резонансная двухфотонная ионизация (РДФИ) (рис. 1.1с). Как и в ЛИФ, лазер возбуждения сканируется, но для ионизации исследуемых веществ используется второй фотон того же самого лазера (монохромная РДФИ) или другой ультрафиолетовый лазер (бихромная РДФИ). Ионы регистрируются эффективно только тогда, когда первый лазер настроен на резонанс с колебательным (вращательным) уровнем состояния S_1 . Если данный электронно-колебательный уровень существует достаточно долго в сравнении с длительностью лазерного импульса, то вероятность поглощения второго лазерного фотона увеличивается, что приводит к формированию ионов. Необходимо упомянуть, что в данной главе внимание будет сосредоточено, главным образом, на исследованиях с применением наносекундных (нс) лазерных систем.

Основное преимущество метода РДФИ по сравнению с методом ЛИФ — это возможность объединения спектроскопии с масс-спектрометрией. Таким образом, ионы, генерированные в процессе РДФИ, можно выбрать по массе и, в результате, получать информацию об исследуемых веществах (см. рис. 1.2 и раздел 1.2). В молекулярных пучках, содержащих, главным образом, мономеры, обычно присутствуют и другие комплексы, например, кластеры этого мономера или кластеры воды, которую зачастую невозможно полностью удалить из газовых коммуникаций. Поэтому РДФИ-спектроскопия с отбором молекул и комплексов по массе очень полезна в таких экспериментах.

Очень важное направление в изучении валентных колебаний NH, так же как и колебаний амида I и II, было открыто в результате развития комбинированных методов с использованием ИК/УФ излучения. В настоящее время используется сочетание инфракрасной и флуоресцентной (ИК/ЛИФ) спектроскопии с РДФИ (ИК/РДФИ; см. рис. 1.1d). В обоих методах фотон ультрафиолетового лазера имеет энергию, соответствующую переходу выбранного изомера с электронно-возбужденного на основной колебательный уровень состояния S_0 . Сканируя инфракрасный лазер, можно возбудить различные колебательные моды состояния S_0 . Если излучение инфракрас-

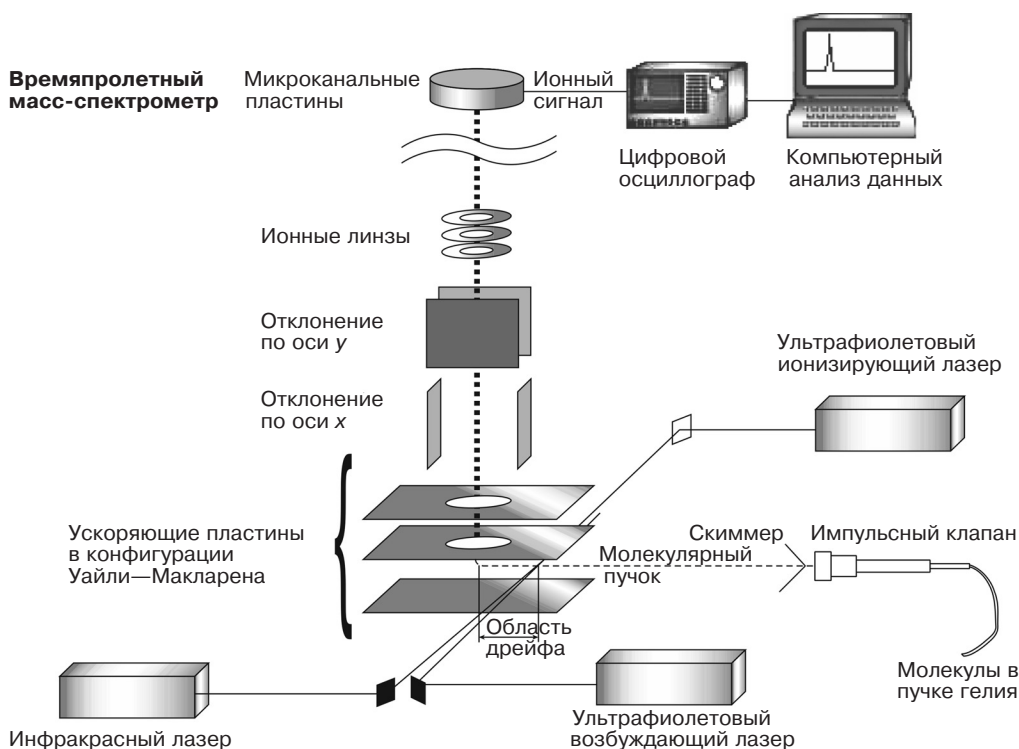


Рис. 1.2. Экспериментальная установка для исследования молекул методами РДФИ, ИК/РДФИ или ультрафиолетово-ультрафиолетовой спектроскопией выжигания провалов. Ионы, генерированные двумя ультрафиолетовыми фотонами, анализируются по массе в линейном времяпролетном спектрометре. Пептиды вводятся посредством импульсного клапана в поток инертного газа (*He* или *Ar*). Этот клапан можно нагревать. Источник с лазерной десорбцией также может быть помещен перед клапаном (не показано)

ного лазера находится в резонансе с некоторым колебательным уровнем состояния S_0 , то населенность основного колебательного состояния уменьшается. При запуске ультрафиолетового лазера после инфракрасного эффективность ультрафиолетового возбуждения снижается, так как количество молекул в основном состоянии уменьшилось при резонансном инфракрасном возбуждении. Уменьшение эффективности возбуждения ультрафиолетовым лазером приводит к снижению флуоресцентного сигнала (в случае с техникой ИК/ЛИФ) или к ослаблению сигнала РДФИ (в случае использования метода ИК/РДФИ). Таким образом, оба метода используют получение инфракрасного спектра выбранного изомера, находящегося в состоянии S_0 , путем регистрации интенсивности ЛИФ или РДФИ сигналов как функции выбранной длины волны инфракрасного фотона. Также, как и РДФИ, метод ИК/РДФИ обладает селективностью по массе и структуре. Этот метод также селективен для различных колебательных уровней состояния S_0 . Первоначально ИК/РДФИ спектр был зарегистрирован Пэйджем и его коллегами (Page и др., 1988). Впоследствии были опубликованы результаты множества других подобных исследований в этой области (см. разделы 1.3—1.6), начиная с публикаций Бручи (Riehn и др., 1992), Миками (Tanabe и др., 1993) и Цвира (Zwier, 1996) и их коллег. В данных работах зачастую вместо термина ИК/РДФИ используются другие названия: ИК/УФ двойного резонанса, ИК спектроскопия выжигания провалов и спектроскопия депопуляции в результате ИК возбуждения. Автор этой главы и его коллеги опубликовали первый ИК/РДФИ спектр области валентных колебаний $C=O$ (Gerhards и др., 2002). Это стало возможным благодаря созданию новой лазерной системы, работающей в наносекундном режиме, которая генерирует узкую полосу инфракрасного излучения (шириной менее $0,1 \text{ см}^{-1}$) высокой энергии ($\sim 1 \text{ мДж}$; теперь от 4,7 до 10 мкм) (Gerhards и др., 2002; Gerhards, 2004).

Область валентных колебаний $C=O$ важна, так как колебания амида I и амида II характеризуют структуру пептидов. Вместо лазера, описанного ранее (Gerhards, 2004), для различных пептидных приложений используется лазер на свободных электронах (ЛСЭ) (Oerts и др., 1994) (см. разделы 1.3—1.5). Данная лазерная система очень мощная (обычно $\sim 50 \text{ мДж}$ в одном макроимпульсе) и охватывает диапазон энергий $\sim 40\text{—}2200 \text{ см}^{-1}$. Но у нее есть и недостаток: довольно плохое спектральное разрешение ($\sim 15 \text{ см}^{-1}$ для волны $\sim 6 \text{ мкм}$).

Еще одна лазерная система для области излучения $\sim 6 \text{ мкм}$ (пригодная для исследований пептидов) была описана Куяновым и др. (Куянов et al., 2004). В ней инфракрасное излучение производится стимулированным обратным комбинационным рассеянием в твердом параводороде при 4 К с накачкой системой ПГ/ПУ (параметрическим генератором / параметрическим усилителем) в ближней области спектра инфракрасного излучения. В отличие от инфракрасного излучения, получаемого генерацией разностной частоты (ГРЧ) (Gerhards, 2004), ширина полосы в этом случае больше ($0,4$ вместо $0,1 \text{ см}^{-1}$), и энергия на выходе сильно зависит от частоты, варьируясь от $1,7 \text{ мДж}$ для длины волны $4,4 \text{ мкм}$ до 120 мкДж для длины волны 8 мкм (Куянов и др., 2004).

Инфракрасное излучение в области валентных NH ($\sim 3450 \text{ см}^{-1}$) или OH ($\sim 3650 \text{ см}^{-1}$ — важная для исследования водных кластеров частота) колебаний обычно производится генерацией разностной частоты, ПГ/ПУ (см., например, Huisken и др. (1993)) или комбинацией СРЧ и ПУ (например, см. Unterberg и др. (2000)). Подробно о таком лазере частично рассказано в ссылках о приложениях ИК/ЛИФ и ИК/РДФИ спектроскопии.

Наконец, необходимо упомянуть, что метод ИК/РДФИ (ИК/ЛИФ) также используют для определения колебательных переходов в электронно-возбужденном состоянии (рис. 1.1e). Данный метод был предложен Эбатой и др. (Ebata, 1996). В соответствии с методом ИК/РДФИ состояние S_1 переводится в возбужденное состояние путем

поглощения одного ультрафиолетового фотона, после чего уменьшение населенности состояния S_1 , вызванное последующим инфракрасным возбуждением, детектируется путем регистрации снижения сигнала РДФИ, обусловленным ионизацией вторым ультрафиолетовым фотоном. (В случае использования ИК/ЛИФ метода второй ультрафиолетовый фотон не нужен, так как регистрируется уменьшение флуоресценции, являющееся следствием инфракрасного возбуждения.)

Еще один метод двойного резонанса, используемый для анализа пептидов, называется УФ/УФ спектроскопией выжигания провалов (см. рис. 1.1f). Он был впервые применен Липертом и Колсоном (Lipert and Kolson, 1989) к кластеру фенол- H_2O . В отличие от техники ИК/РДФИ, сканируется не инфракрасный, а ультрафиолетовый лазер, в то время как излучение второго ультрафиолетового лазера (запущенного после первого сканирующего ультрафиолетового лазера) имеет фиксированную длину волны, соответствующую, например, электронному переходу изомера. Данный метод используется для определения принадлежности различных электронных переходов одному и тому же изомеру. А именно, когда первый (сканирующий) ультрафиолетовый лазер настроен на резонанс с электронным переходом, принадлежащим изомеру, возбужденному вторым лазером, флуоресценция или ионный сигнал, вызванный вторым ультрафиолетовым лазером, уменьшаются, так как возбуждение первым лазером уже удалило часть молекул из пучка. В отличие от инфракрасно-ультрафиолетовых методов, оба лазерных фотона УФ/УФ метода ведут к возникновению ионного или флуоресцентного сигнала. Таким образом, сигналы, образующиеся в результате действия первого и второго лазеров, необходимо различать. Лазеры обычно запускаются с задержкой в 100–300 нс так, чтобы лучи лазеров могли пространственно пересекаться. Например, если и первый, и второй лазер формируют ионы путем поглощения двух фотонов, то или 1) разрешение спектрометра должно быть достаточно хорошим для различения ионов, произведенных этими двумя лазерами, или 2) ионы разделяются при помощи быстрого переключения высокого напряжения, которым ионы, сформированные первым лазером, ускоряются в направлении, противоположном направлению движения ионов, сформированных первым лазером.

Методами двойного резонанса ИК/РДФИ и УФ/УФ спектроскопии выжигания провалов производят селекцию изомеров и идентифицируют различные молекулы по их инфракрасным спектрам, которые можно регистрировать для всех характерных колебательных переходов. Еще один метод, с помощью которого получают дополнительную информацию о динамическом поведении молекулы, — это ИК спектроскопия изменения популяции (ИКИП) (Dian и др., 2002b), которая, так же как и метод заполнения провалов, была предложена Цвиром и его коллегами (Dian и др., 2002b, 2004b) (см. рис. 1.3). При использовании данного метода молекулы в молекулярном пучке возбуждаются дважды. Сначала молекулы возбуждаются непосредственно позади скиммера импульсного клапана в области охлаждения посредством столкновений. ИК возбуждение какого-либо конформера (например, возбуждение валентного колебания NH) может привести к формированию другого конформера. При дальнейшем расширении сверхзвуковой струи сохранившееся охлаждение столкновениями может «заморозить» новую популяцию, индуцированную ИК возбуждением. Регистрация различных популяций производится посредством ЛИФ спектроскопии (или посредством РДФИ). Сравнением ЛИФ спектров, полученных после ИК возбуждения, со спектрами, полученными без него, определяют изменение популяции. Различие между методами ИКП и ИК с заполнением провалов заключается в том, что в первом методе ИК лазер сканируется, а ультрафиолетовый лазер настроен на резонансный перенос одного выбранного конформера. Таким образом, определяется эффективность формирования выбранного изомера в зависимости от ИК возбуждения. В методе заполнения провалов сканируется ультрафиолетовый лазер, а ИК лазер настроен на частоту, соответствующую одному колебательному переходу. В этом случае

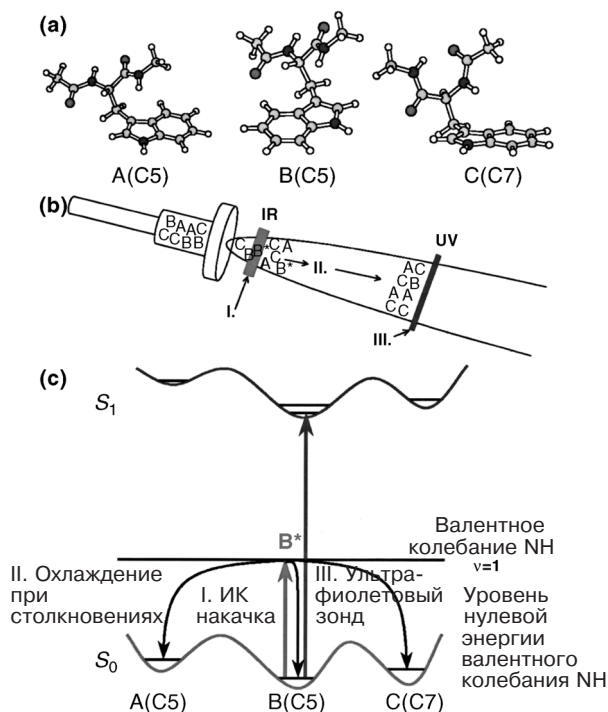


Рис. 1.3. а — три изомера NATMA (*Ac-Trp-NHMe*) (см. подробнее в разделе 1.4); б, с — схемы инфракрасного перемещения (ИКП) и спектроскопии заполнения провалов [21]. При возбуждении выборочно одного изомера ИК фотоном можно заселить популяции двух других изомеров. После дальнейшего охлаждения при столкновениях в расширяющемся пучке охлажденные молекулы *B* анализируют с помощью ультрафиолетового лазера. Из-за уменьшения населенности популяции *B* в результате ИК возбуждения флуоресцентный сигнал, вызванный ультрафиолетовым лазером, уменьшается (см. рис. 1.14). Сканируя ультрафиолетовый лазер, можно найти распределение для всех изомеров (спектроскопия заполнения провалов). (Рис. взят из Dian и др. (2002b).)

количественно исследуется образование различных изомеров в результате ИК возбуждения. Эти новые методы были успешно применены к различным молекулам, включая защищенные аминокислоты (Dian и др., 2002b, 2004a, b) (см. раздел 1.4.).

Для всех вышеупомянутых методов необходим ароматический хромофор. Метод с инфракрасным излучением и резонансным переносом энергии (ИК/РПЭ), разработанный Дефрансуа и его коллегами (Lucas и др., 2004), предполагает возможность регистрации ИК спектров веществ без такого хромофора. Данный метод — это обобщенный метод РПЭ, в котором нейтральная молекула (с большим полным дипольным моментом $\geq 2D$) сталкивается с атомом ксенона, возбужденным до высокого ридберговского состояния. Столкновение возбужденного атома ксенона с нейтралами вызывает резонансный перенос электронной энергии, что приводит к формированию анионов. Произведенные дипольно-связанные анионы или даже квадрупольно-связанные анионы (ДСА или КСА) имеют дополнительный электрон на очень размытой орбитали и сохраняют структуру нейтралей-предшественников. Так как приращение внутренней энергии практически равно нулю, то этот очень мягкий

процесс ионизации происходит без фрагментации даже слабо связанных кластеров. Из-за влияния дипольного момента нейтралей на ионизацию данный метод чувствителен к массе и структуре частицы. Если исследуемая молекула до РПЭ резонансно возбуждена ИК фотоном, то остаточная энергия может разрушить слабые межмолекулярные связи в кластерах или привести в ходе диссоциации к разделению ДСА в результате процесса РПЭ. Таким образом, процесс РПЭ при ИК возбуждении нейтралей менее вероятен, чем РПЭ для молекулы, находящейся в основном колебательном состоянии. Данный подход — это очень полезное дополнение к методам, требующим ароматического хромофора. При помощи этого метода были получены спектры димера воды и комплекса формамид-вода (Lucas и др., 2004), находящиеся в очень хорошем согласии с более ранними газофазными исследованиями. В недавней публикации та же самая группа исследовала формамид и его димер для проверки пригодности этого метода к исследованию мономеров и прочно связанных кластеров с энергиями связи большими, чем энергия связи электрона (ЭСЭ) дипольно-связанного аниона (ДСА) (Lucas и др., 2005).

Классический метод определения параметров структуры — это СВЧ спектроскопия молекулярных пучков с преобразованием Фурье (СВЧС МП ПФ) (Balle и Flygare 1981; Legon, 1983; Andresen и др., 1990; Harmony и др., 1995; Grabow и др., 1996; Storm и др., 1996; Suenram и др., 1999). В этом подходе молекулярный пучок расширяется в кювете интерферометра Фабри-Перо и поляризуется коротким СВЧ импульсом, направленным вдоль оси кюветы. Когерентное излучение вращательных переходов преобразуют в цифровую форму и обрабатывают преобразованием Фурье с целью получения частотного спектра. Метод привлек большое внимание, так как его можно использовать также и с источниками лазерной абляции (Suenram и др., 1989; Lessari и др., 2003). Подобно ИК/РПЭ СВЧ спектроскопия требует наличия у исследуемых частиц дипольного момента. Однако ей не нужен ароматический хромофор. С ее помощью можно получить отличное разрешение (в области кГц), но разрешение по массе получить нельзя.

Еще один метод, который является своего рода оптическим аналогом метода СВЧС МП ПФ, — это вращательная когерентная спектроскопия (ВКС). Это зависящий от времени метод с высоким разрешением, основанный на квантовых биениях, являющихся результатом когерентного возбуждения различных вращательных уровней электронно-колебательного состояния. Квантовые биения образуются при суперпозиции вращательных уровней, и их частоты — целые кратные вращательных констант или их комбинаций. Первоначальные эксперименты были выполнены Баскиным, Фелкером и Зевэйлом (Baskin и др., 1986; Felker и др., 1986; Felker, 1992). Линейно поляризованный пикосекундный лазер с импульсной накачкой возбуждает молекулы, которые имеют дипольный момент, параллельный поляризации лазера в нулевой момент времени. Из-за того, что молекулы вращаются с различными скоростями, синхронизация теряется и снова обнаруживается через характерные промежутки времени, связанные с вращательными константами. Такие промежутки времени и соответствующие вращательные константы можно измерять с помощью второго импульса, задержанного по времени. Таким способом находят вращательные константы, а, следовательно, и получают информацию о структуре. В контексте данной главы этот метод использовался только для модельных аминокислотных систем (Connell и др., 1990), хотя он также применим и к большим системам (см. например, Weichert и др. (2001) и Riehn (2002)).

Все методы, описанные выше, используют методы молекулярных пучков. Альтернативный подход получения ультрахолодных спектров — использование капелек гелия для исследования колебательных спектров аминокислот. Вилесов, Тоэннис и их коллеги исследовали аминокислоты, например, *Trp*, *Tyr*, (Lindinger и др., 1999; Toennies и Vilesov, 2004), защищенную аминокислоту *Ac-Trp-NH₂* (NATA; см. раздел 1.4) и

триптамин (см. раздел 1.3) (Lindinger и др., 1999; Toennies и Vilesov, 2004), которые были инжесктированы в струю сверхтекучего ^4He . Существуют две схемы детектирования резонансного ультрафиолетового возбуждения: (1) с помощью регистрации ЛИФ, или (2) контроля уменьшения размера капли He . То есть, испарение атомов He после ионизации аминокислот может регистрироваться масс-спектрометром как функция длины волны излучения ультрафиолетового лазера. Данный метод в сочетании с ИК возбуждением в области валентных колебаний OH также использовался для анализа глицина (Huisken и др., 1999) и его димера (Chocholousova и др., 2002). В случае с глицином все три конформера, наблюдаемые для данной аминокислоты при помощи СВЧ спектроскопии (см. ниже), были идентифицированы путем сравнения с результатами *ab initio* вычислений высокого уровня (Chocholousova и др., 2002). В настоящее время расширение применения метода с каплями He до больших пептидов — все еще перспектива для будущих исследований. (Для ознакомления с другими методами, включая ИК/ИК методы двойного резонанса, которые еще не применялись к аминокислотам, см., например, Douberly и др. (2005)). Интересно обратить внимание на то, что изомеры, наблюдаемые в пучках He , могут отличаться от наблюдаемых в экспериментах со сверхзвуковой струей. Это является результатом или очень низких температур (0,38 К) в каплях He , или агрегации He (см. ниже).

Наконец, необходимо упомянуть, что для некоторых аминокислот можно получить ИК спектры с преобразованием Фурье путем использования источника быстрого нагрева (Linder и др., 2005). А именно: при использовании такого метода можно задержать распад на секунды и детектировать излучение нефрагментировавшей аминокислоты.

1.2.2. Некоторые экспериментальные средства: масс-спектрометрия, спектроскопия двойного резонанса

Основная схема установки, использующей пульсирующую сверхзвуковую струю для анализа биомолекул в газовой фазе в сочетании со спектроскопией и масс-спектрометрией, показана на рис. 1.2. Данная установка (которую также используют автор главы и его коллеги) содержит несколько дифференциально откачиваемых вакуумных камер (как правило, три) для транспортировки исследуемых частиц из источника к масс-спектрометру. В экспериментах обычно используется времяпролетный масс-спектрометр (ВПМС) одной из двух конструкций: 1) линейной (ЛВПМС) (рис. 1.2) или 2) рефлектронной (РВПМС) (Mamyurin и др., 1973; Kühlewind и др., 1984; Bergmann и др., 1989; Voestl и др., 1992). В схеме с рефлектроном ионы сначала замедляются, а затем фокусируются в плоскости детектора для коррекции различий в скоростях ионов одной и той же массы. Анализаторы в ЛВПМС и РВПМС могут быть ориентированы перпендикулярно или параллельно направлению молекулярного пучка. При перпендикулярном расположении масс-анализатора (см. рис. 1.2) влияние различий в скоростях частиц на анализ минимально.

В случае с флуоресцентным спектрометром обычно используется только одна вакуумная камера, которая содержит источник и оптику для фокусировки флуоресцентного излучения на детекторе. Для разрешения флуоресцентного спектра между камерой и детектором помещают монохроматор. Детектором может служить или фотумножитель, или камера с прибором с зарядовой связью (ПЗС-камера). При использовании ПЗС-камеры можно регистрировать полный спектр для каждого лазерного выстрела.

Для экспериментов с очень высоким разрешением (электронная спектроскопия с вращательным разрешением) используется прибор с непрерывным пучком и двумя скиммерами, что требует приблизительно трех или четырех вакуумных камер с диф-

ференциальной откачкой. Флуоресценция, полученная после возбуждения непрерывным кольцевым лазером на красителе с очень высоким разрешением, регистрируется на фотоумножителе, сопряженным со счетчиком фотонов (Majewski и Meerts, 1984; Pratt, 1998; Schmitt и др., 2005).

Наиболее важная часть прибора, предназначенная для производства достаточного количества недиссоциировавших аминокислот и пептидов, — это источник. Источники, обсуждаемые в данной главе, формируют только нейтралы. Для перевода нейтральных аминокислот и пептидов в газовую фазу используются, главным образом, два типа источников. Если используются защищенные аминокислоты (см. ниже), то применяются специальные источники с нагревом (см. например, Fricke и др., 2004 и раздел 1.5). В таких источниках расстояние между небольшой камерой, изготовленной из нержавеющей стали и содержащей исследуемое вещество, и импульсным клапаном очень короткое. Кроме того, и камера, и соединители защищены стеклянными поверхностями. Нагревание в таком источнике должно быть чрезвычайно однородным. Для получения достаточного количества больших пептидов в газовой фазе могут использоваться температуры ниже 200 °С. В другом устройстве с нагреванием вещество находится не в области повышенного давления позади клапана, а перед импульсным клапаном (Snoek и др., 2000). То есть, вещество соприкасается с вакуумом камеры источника. Данная конструкция использовалась для хрупких незащищенных аминокислот (см. например, раздел 1.4.1 (Snoek и др., 2000)). Из-за наличия вакуума для перевода достаточного количества молекул в газовую фазу могут использоваться температуры ниже 150 °С.

Схожая с нагреванием лазерная десорбция также теперь применяется для перевода пептидов в газовую фазу. Сравнение теплового нагрева и лазерной десорбции показывает, что методы с нагреванием более простые и обеспечивают более устойчивый сигнал. При использовании методов уменьшения популяции посредством лазерного возбуждения (ИК/УФ, УФ/УФ) — подходов с существенным шумовым сигналом — необходимо обеспечить стабильную базовую линию для ионного сигнала, сформированного путем применения УФ лазера фиксированной частоты. Кроме того, количество необходимого для анализа вещества обычно меньше в случае использования теплового нагрева. Современные исследования в области усовершенствования лазерных десорбционных источников сосредоточены на решении данных проблем. Если нет способа перевести пептиды в газовую фазу нагревом без фрагментации, то лазерная десорбция — это единственная альтернатива. Различные группы исследователей описали свои десорбционные источники (Grotmeyer и др., 1986; Tembreull и Lubman, 1986, 1987a, b; Cable и др., 1988a, b; Meijer и др., 1990; Cohen и др., 2000; Piuzzi и др., 2000; Hünig и др., 2003). Как правило, исследуемое вещество смешивается с матрицей. В большинстве случаев применяется графит (Meijer и др., 1990; Cohen и др., 2000; Piuzzi и др., 2000; Hünig и др., 2003). В современных источниках его прессуют с небольшим количеством исследуемого вещества. В пионерской спектроскопической работе группы Леви в качестве матрицы применялся краситель (Cable и др., 1988a, b). В процессе десорбции матрица поглощает энергию короткого лазерного импульса (например, импульса длительностью 10 нс, произведенного лазером на неодимовом стекле — иттрий-алюминиевом гранате, с длиной волны 1064 нм и энергией 1 мДж). Таким образом, матрица нагревается чрезвычайно быстро, и интересующие нас молекулы испаряются из нее в газовую фазу. На следующем этапе молекулы охлаждаются в молекулярном пучке, формирующемся при расширении инертного газа, напускаемого через импульсный клапан. Источник расположен непосредственно перед скиммером. Это может быть вращающийся стержень или диск, покрытый матрицей (или чистым веществом). Процесс быстрого нагрева с последующим охлаждением настолько эффективен, что пептиды не фрагментируют. Некоторые группы исследователей также описывают десорбционные источники, использующие чистые вещества (без матрицы)

(Tembreull и Lubman, 1986, 1987a, b; Grottemeyer и др., 1996). Данные источники также упоминаются как источники с абляцией (см. ниже). Основная идея всех десорбционных источников нейтралей — это разделение процессов ионизации и транспортировки нейтральных пептидов в газовую стадию с последующим охлаждением. Это — общий подход к решению проблемы перевода больших и хрупких молекул в газовую фазу в достаточных количествах, что позволяет применять к нейтралям различные спектроскопические методы, описанные в разделе 1.2.1.

Источник с лазерной абляцией (Bondybeu и English, 1981; Dietz и др., 1981) использует в качестве мишени вместо матрицы с исследуемым веществом само чистое вещество. В результате лазерной абляции на поверхности мишени остаются небольшие дефекты, так как удаляется значительное количество вещества. В большинстве лазерных экспериментов, представленных в данной главе, используются частоты повторения лазерных импульсов от 10 до 20 Гц. Следовательно, источники с десорбцией и абляцией специально конструируются для использования низких частот повторения импульсов. В настоящее время уже существуют абляционные источники, предназначенные для использования более высоких (килогерцовых) частот (Smits и др., 2003). Они очень хорошо сочетаются с фемтосекундными лазерными системами, работающими при частотах повторения импульсов порядка нескольких кГц. Еще одно интересное приложение — это комбинация источника с лазерной абляцией и СВЧ спектроскопии (Suenram и др., 1989; Lessari и др., 2003) (см. раздел 1.2.1). Конечно, использование методов абляции обычно требует большего количества вещества, что ограничивает их применение для исследования больших пептидов.

1.3. Спектроскопия модельных аминокислотных систем

Применение современных методов двойного резонанса начиналось с модельных систем. Такие системы, как, например, N-фенилформамид (Manea и др., 1997; Dickinson и др., 1999; Fedorov и Cable, 2000; Robertson, 2000; Mons и др., 2001; Robertson и Simons, 2001), 2-фенилацетамид (Robertson и др., 2001) и N-бензилформамид (Robertson и др., 2000) (см. рис. 1.4), содержат одну связь $\text{H}-\text{N}-\text{C}=\text{O}$, которая может служить моделью амидной связи в пептиде. Необходимо указать, что данные молекулы не обеспечивают реалистичного описания пептидной связи, так как она не полностью идентична связям в аминокислотах или пептидах, а именно: в пептиде атомы α -C расположены на конце каждой амидной группы, и NH_2 -группа расположена на N-конце пептида. Хотя модель исследуемых амидов и несовершенна, она дает возможность получить сведения о структурных особенностях изолированных амидов. Более того, гидратационные оболочки были подробно исследованы с помощью этих моделей. Ароматический хромофор использовался для всех динамических моделей, так как этот выбор позволяет применение ИК/РДФИ.

В случае с N-фенилформамидом можно наблюдать цис- и трансизомеры относительно связи $\text{H}-\text{N}-\text{C}=\text{O}$. Цисизомер немного более стабилен, чем трансизомер (рис. 1.4a) (Manea и др., 1997; Dickinson и др., 1999). Для N-бензилформамида (Robertson, 2000) трансизомер становится намного более устойчивым (рис. 1.4d), что типично и для реального пептида (см. ниже). Введение группы CH_2 приводит к увеличению гибкости структуры (фенил заменяется на бензил), а также позволяет лучше моделировать основную аминокислотную цепь. В случае с 2-фенилацетамидом (Robertson и др., 2001) (см. рис. 1.4f) боковая цепь прикреплена к карбонильной функциональной группе, сохраняя первичную амидную NH_2 -группу.

Выбранные модели — хорошие кандидаты для исследования последовательной гидратации. В случае с N-фенилформамидом энергии протон-донорной связи одной молекулы воды с группой $\text{C}=\text{O}$ или протон-акцепторной связи с группой $\text{N}-\text{H}$ почти

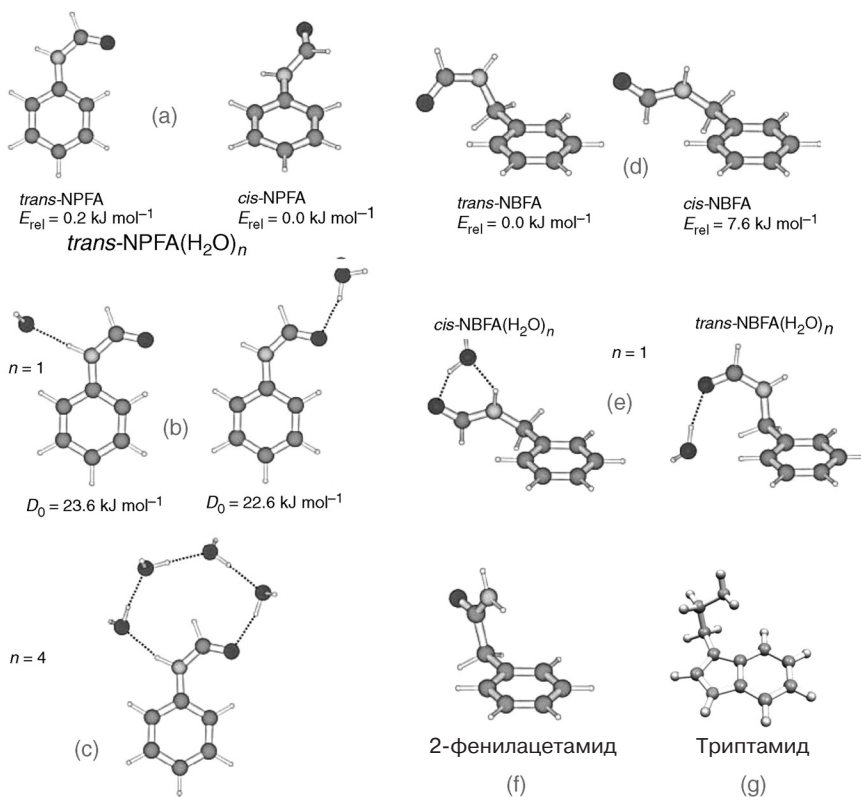


Рис. 1.4. Модельные системы различных аминокислот: а — N-фенилформамид и его кластер с одной (б) и тремя (с) молекулами воды; d — N-бензилформамид и его кластер с одной молекулой воды (е); f — 2-фенилацетамид; г — триптамин. (Рисунок частично взят из Robertson и Simons (2001).)

равны (Монс и др., 2001) (рис. 1.4b). В противоположность мономеру, трансизомер N-фенилформамида более стабилен после гидратации и сохраняется во всех кластерах с водой (Dickinson и др., 1999; Fedorov и Cable, 2000). Применение накачки излучением дает возможность исследовать перемещения молекулы воды от одного участка связи к другому (Clarkson и др., 2005a). В случае с группой, содержащей две молекулы воды, димеры воды связаны или с C=O, или с группой N—H (Dickinson и др., 1999; Fedorov и Cable, 2000). Изомер, содержащий группу N—H донора, дополнительно стабилизируется в результате взаимодействия O—H...π. В случае с кластером с тремя молекулами воды получается циклическая конфигурация между донорной связью (C=O...H) и акцепторной связью (N—H...O) (рис. 1.4c). Такая геометрическая конфигурация напоминает структуру протонной нити (Tanner и др., 2003; Smedarchina и др., 2000), которая может вести к формированию амфионных структур в аминокислотах. В отличие от кластеров N-фенилформамида и воды, цисизомер предпочтителен в N-бензилформамидной группе гидратированных кластеров. Были получены различные изомеры моно- и дигидратированного N-бензилформамида, аналогичные N-фенилформамидным кластерам (см. рис. 1.4e) (Robertson и др., 2000). Интересный здесь элемент — это донорно-акцепторная структура, в которой одна молекула воды связана одновременно с группами N—H и C=O посредством водородной связи. Опыт, полу-

ченный при анализе данных небольших модельных систем, можно применить для исследования гидратированных аминокислот и пептидов (см. ниже).

Некоторые другие молекулы также можно рассматривать в качестве аналогов аминокислот (см., например, раннюю работу Martinez и др. (1991, 1993)). Триптамин (см. рис. 1.4g) был исследован несколькими группами. Данная молекула содержит индольный хромофор подобно триптофану (см. раздел 1.4).

Первые эксперименты с молекулярными пучками нейтрального триптамина в газовой фазе были выполнены Леви и его коллегами (Park и др., 1986). Применяя индуцированную лазером флуоресценцию (ЛИФ) и резонансную двухфотонную ионизацию (РДФИ), авторы наблюдали шесть полос в электронном спектре S_1-S_0 , соответствующих шести различным конформерам. Конфигурации пяти из шести конформеров определяли, записывая спектры флуоресцентного возбуждения с высоким разрешением, что привело к определению трех скошенных и двух заслоненных структур в соответствии с положением аминокислотной группы относительно кольца индола. Также было показано, что один переход в электронном спектре состоит из двух очень близко расположенных друг к другу полос, которые (при более раннем изучении) не могли быть различены вращательным анализом (Philips и Levy, 1986, 1988). Кроме того, низшее электронно-возбужденное состояние может быть определено как 1L_b , как и для триптофана. Последующие эксперименты с дейтерированным триптамином подтвердили эти результаты и привели к более точному определению положения аминокислотной группы (Wu и Levy, 1989). Последующие исследования структуры проводились при помощи вращательной когерентности (Connell и др., 1990) и СВЧ спектроскопии (Caminati, 2004). По СВЧ спектрам в сочетании с *ab initio* вычислениями Каминати и его коллеги выделили два конформера (Caminati, 2004). Цвир и его коллеги исследовали триптамин ультрафиолетово-ультрафиолетовым выжиганием провалов и ИК/РДФИ спектроскопией и с помощью ТФП вычислений определили семь структур, включая интерпретацию двух близко расположенных друг к другу полос, которые нельзя было различить прежде (Carney и Zwieter, 2000). Та же самая группа также измерила барьеры конформационной изомеризации триптамина, применяя стимулированную эмиссию с заполнением провалов накачки (СЭЗПН) и стимулированную эмиссию с переносом заселенностей при накачке (СЭПЗН) (Dian и др., 2004a; Clarkson и др., 2005b, c). В этих методах сканируется либо УФ лазер стимулированной накачки эмиссии в процессе возбуждения-осаждения или третий лазер, анализирующий конформеры после процесса стимулированной накачки эмиссии.

Пратт и его коллеги обнаружили дополнительные полосы во вращательных спектрах двух полос и зафиксировали препятствия внутримолекулярному движению, объясняющие появление таких полос (Nguyen и др., 2005).

Микросольватированные кластеры триптамина были изучены намного менее тщательно, чем мономеры. Парк и его коллеги (1986) обнаружили, что большинство возможных конформеров при формировании кластеров с метанолом преобразуется в конформер одного вида. Сипиор и Сулкес (1988) получили тот же результат для кластеров с метанолом, этанолом и димером воды, применяя ЛИФ спектроскопию. Интересное отклонение от данной тенденции наблюдалось для кластера с диоксаном (Peteanu и Levy, 1988), который может быть только акцептором водорода. Кластеры триптамина с водой (до трех молекул молекул воды в кластере) были исследованы при помощи РДФИ и ИК/РДФИ (Carney и др., 2001). Первая молекула воды присоединяется к неподеленной паре аминокислотной группы, а кластеры с двумя и тремя молекулами воды образуют мостик с индольной группой NH. Коннелл и его коллеги (Connell и др., 1990) выявили моногидратированный кластер с мостиком, используя вращательную когерентную спектроскопию. Этот результат подтвердили Шмитт и его коллеги (Schmitt и др., 2005), которые зарегистрировали лазерно-индуцированный флуоресцентный спектр разрешением вращательных уровней для шести мономерных кон-

формеров и моногидратированного кластера триптамина. Авторы наблюдали дополнительное стабилизирующее взаимодействие воды с одной из ароматических связей С—Н. Экспериментальные наблюдения были подтверждены *ab initio* вычислениями. Это взаимодействие приводит к ситуации, когда различия по энергии для всех возможных кластеров триптамина с водой намного больше, чем между различными мономерами.

Мелантонин (N-ацетил-5-метокситриптамин) и его кластер с водой также были исследованы при помощи ИК/УФ спектроскопии (Florio и др., 2002; Florio и Zwiер, 2003). Пять конформеров мономера — три структуры с транс- и две с цисконфигурацией амидной группы, а также четыре моногидрированных и два дигидрированных конформера были обнаружены и изучены.

1.4. Спектроскопия двойного резонанса и СВЧ спектроскопия аминокислот

Три природные ароматические аминокислоты — это фенилаланин (Phe), тирозин (Tyr) и триптофан (Trp) (см. рис. 1.5). Благодаря ароматическим хромофорам (бензол в Phe, фенол в Tyr, индол в Trp) их можно исследовать при помощи методов отбора по массе и изомерно-селективных методов двойного резонанса (УФ/УФ и ИК/УФ). В данном разделе описаны применения данных методов для ароматических аминокислот.

1.4.1. Фенилаланин

Первая ароматическая аминокислота, исследованная при помощи ИК/УФ спектроскопии двойного резонанса, — это *Phe* (Snoek и др., 2000). По ЛИФ спектрам и по измерениям насыщения, выполненным ранее группой Леви (Martinez и др., 1992), было идентифицировано, по крайней мере, пять изомеров. Доказательство этого факта при помощи УФ/УФ двухрезонансной спектроскопии является очень хоро-

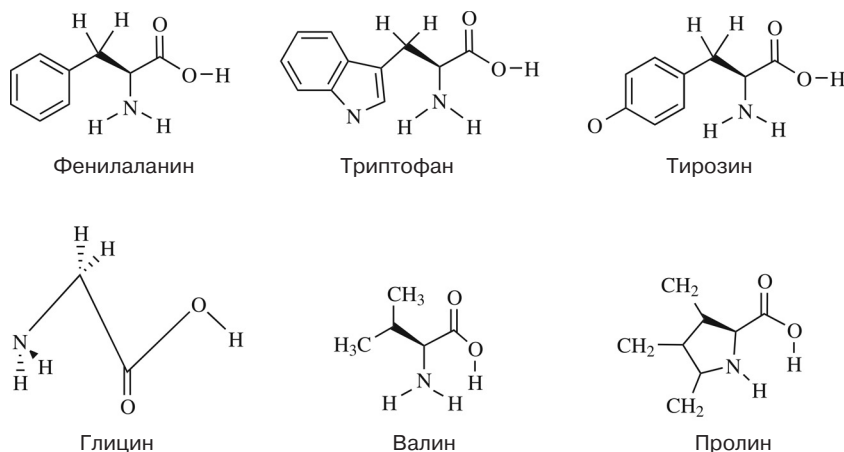


Рис. 1.5. Шесть природных аминокислот, три из которых — ароматические (*Phe*, *Trp*, *Tyr*). Структура, показанная для глицина, — самая устойчивая в газовой фазе

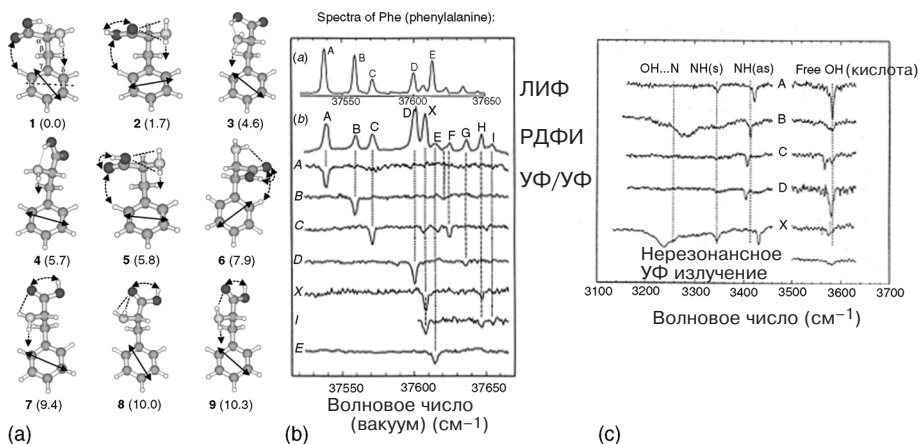


Рис. 1.6. а — девять самых устойчивых структур *Phe*, вычисленные на уровне MP_2 [базисный набор 6-311 G(d, p)] (Snoek и др., 2000). Переходы $S_1 \leftarrow S_0$, полученные из *CIS* вычислений, указаны стрелками; б — ЛИФ (Martinez и др., 1992), РДФИ и УФ/УФ с выжиганием провалов (Snoek и др., 2000) спектры *Phe*. Спектр с выжиганием провалов ясно указывает на то, что, по крайней мере, шесть различных изомеров (A, B, C, D, X, E) принадлежат РДФИ спектру; в — ИК/РДФИ спектрам изомеров A, B, C, D, X. Корреляция экспериментально наблюдаемых структур с девятью возможными структурами рассматривается в этом разделе. (Части (а) и (б) взяты из Robertson и Simons (2001); часть (в) взята из Snoek и др. (2000).)

шим учебным примером (см. рис. 1.6b). Шесть изомеров имеют различные энергии возбуждения $S_1 \leftarrow S_0$. Для пяти изомеров можно зарегистрировать ИК/РДФИ спектры (см. рис. 1.6c), что дает некоторые сведения об их структурах. Внутримолекулярные водородные связи между группами NH_2 и $COOH$ доминируют в структурах изомеров *Phe* (см. рис. 1.6a). Разнообразие изомеров частично возникает из-за того, что функциональные группы могут действовать как водородный донор и водородный акцептор. В этом первоначальном исследовании эти шесть изомеров коррелировали с шестью самыми стабильными структурами *Phe* (см. рис. 1.6).

В дальнейшем Ким и его коллеги исследовали изомеры *Phe*, анализируя их потенциалы ионизации. Для получения данных значений сканировали второй лазер (метод РДФИ, см. рис. 1.1b), и регистрировали ионный ток в зависимости от частоты второго ионизирующего лазера (Lee и др., 2002a, b, 2003). Не было зафиксировано отчетливого возрастания тока в спектрах, указывающего на сильное изменение геометрии. Однако, согласно первичным данным, спектры можно разделить на две группы. Для четырех изомеров ионный ток резко возрастает при энергии $\sim 8,8$ эВ, для двух изомеров — при энергии большей, чем 9 эВ. Данное расхождение, вероятно, является результатом различий в расположении фенильного кольца и основной цепи *Phe*. То есть, потенциал ионизации зависит от взаимодействия ионизированного фенольного хромофора с группой NH_2 , которая может образовывать водородную связь с фенильным кольцом. Если не существует заметного π -взаимодействия, то потенциал ионизации будет ниже, чем в случае сильного π -взаимодействия. Результаты, полученные при изучении потенциалов ионизации, соответствуют данным Снука и его коллег (Snoek 2000), за исключением одного изомера E.

В дальнейшем Саймонс и его коллеги снова исследовали шесть изомеров *Phe*, выполняя контурный анализ вращательных полос РДФИ спектров (Lee и др., 2004).

Оказалось, что идентификация четырех конформеров (1 = X, 2 = D, 3 = B, 6 = C; см. сокращения на рис. 1.6) согласуется с данными, полученными на основе спектров ИК/РДФИ (Snoek и др., 2000). Повторное определение было сделано для изомера А, который теперь коррелирует со структурой 7. И, наконец, изомер Е был сопоставлен со структурой 9 (см. рис. 1.6а). Стоит обратить внимание на то, что самые устойчивые изомеры были найдены экспериментально и были также четко идентифицированы различными спектроскопическими методами. Однако были пропущены изомеры (особенно 4 и 5), энергия которых ниже, чем у изомеров 7 и 9.

Еще один аспект, который рассматривали Ли и его коллеги (2004), — это время жизни S_1 изомеров, полученных в результате задержанной ионизации облученной пробы. В отличие от всех изомеров, имеющих времена жизни в состоянии $S_1 \sim 80$ нс (изомеры 2, 3, 6, 7) или 120 нс (изомер 9), основной изомер 1 существует всего 20 нс. Данный изомер стабилизирован внутримолекулярными водородными связями (см. рис. 1.6а), что способствует эффективному безызлучательному распаду.

Также проводились исследования производных аминокислот, а именно: группа NH_2 N-конца была ацетилирована, а группа OH C-конца заменялась или на эфирную, или на амидную группу.

В то время как при исследовании чистого *Phe* благодаря взаимодействию кислотных и основных концевых групп были получены превосходные спектры, анализ защищенных аминокислот и пептидов предложил хорошие модели описания внутренней части большого пептида, так как взаимодействуют только функциональные группы основной цепи.

Структура пептида характеризуется схемой Рамачандрана (Ramachandran и др., 1966), на которой показаны углы ϕ и ψ основных цепей аминокислот. Данный подход можно также применить и к защищенным аминокислотам (см. рис. 1.7). Соответствующим примером может служить определение углов в *Ac-Phe-OMe* (IUPAC, 1974; Schulz и Schirmer, 1979; Gerhards и Unterberg 2002): $\phi \leq (C', C^\alpha, N, C_3)$ и $\psi \leq (O_1, C', C^\alpha, N)$ с $-180^\circ < \phi, \psi \leq 180^\circ$; см. рис. 1.7. Першель и его коллеги (1991) в их работе, касающейся различных частично защищенных аминокислот, указали на то, что для каждого из углов ϕ и ψ существует три различных значения, соответствующих минимумам потенциальной энергии. Это приводит к девяти возможным конформациям основных цепей пептидов. Для описания девяти возможных конфигураций применяются обозначения $\alpha_D, \alpha_L, \beta_L, \gamma_L, \gamma_D, \epsilon_D, \epsilon_L, \delta_L$ и δ_D (Perczel и др., 1991). Изомеры $\alpha_D(\phi \approx 0-120^\circ, \psi \approx 0-120^\circ)$ и $\alpha_L(\phi \approx -120-0^\circ, \psi \approx -120-0^\circ)$ описывают спиралевидные структуры. $\beta_L(\phi \approx -120-120^\circ, \psi \approx -120-120^\circ)$ описывает структуру β -пластов. $\gamma_L(\phi \approx -120-0^\circ, \psi \approx 0-120^\circ)$ и $\gamma_D(\phi \approx 0-120^\circ, \psi \approx -120-0^\circ)$ соответствуют инверсионным и нормальным поворотам γ , $\epsilon_D(\phi \approx 0-120^\circ, \psi \approx -120-120^\circ)$ и $\epsilon_L(\phi \approx -120-0^\circ, \psi \approx -120-120^\circ)$ представляют обратную и нормальную структуры полипролина II. Соответствующие углы структур $\delta - \delta_L(\phi \approx -120-120^\circ, \psi \approx 0-120^\circ)$ и $\delta_D(\phi \approx -120-120^\circ, \psi \approx -120-0^\circ)$. Углы кручения $\chi_1 \leq (N, C^\alpha, C^\beta, C_1)$ и $\chi_2 \leq (C^\alpha, C^\beta, C_1, C_2)$ определяют структуру боковой цепи *Ac-Phe-OMe*. Углы χ_1 и χ_2 описывают вращение вокруг осей $C^\alpha-C^\beta$ и $C^\beta-C_1$, соответственно. В случае с углом χ_1 три положения фенильной группы соответствуют минимумам потенциальной энергии. Данные положения обозначаются как $g +$ (гош +, $\chi_1 \sim 60^\circ$), α (противоположный, $\chi_1 \sim 180^\circ$) и $g -$ (гош -, χ_1 приблизительно -60°) (IUPAC, 1974; Gelin и Karplus, 1979). Другой важный параметр, описывающий относительное положение группы NH_1 относительно группы CO ацетильного фрагмента — это угол ω . Данный угол определяет транс- и цисизомеры относительно положения амидной группы. Обычно транс-структуры аминокислот более стабильны, чем соответствующие цис-структуры. Для углов ϕ, ψ и χ_1 27 различных конформеров (девять вариантов положения основной цепи пептида, умноженные на три различных значения χ_1) могут соответствовать минимумам на поверхности потенциальной энергии *Ac-Phe-OMe*,

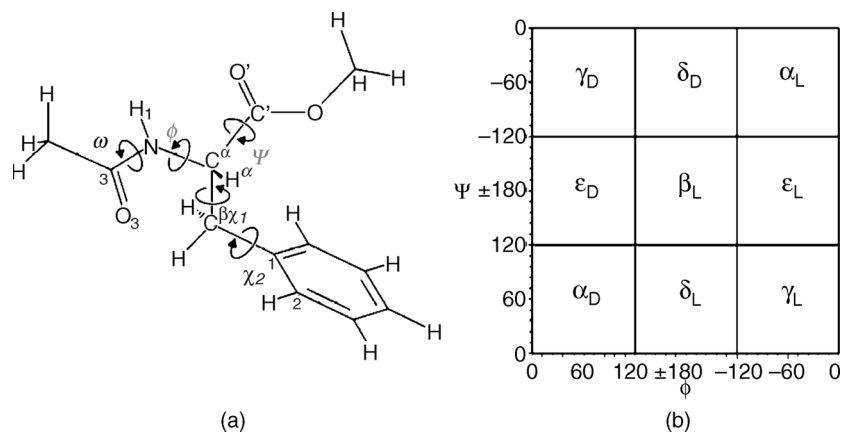


Рис. 1.7. а — структура *Ac-Phe-OMe*. Показаны пять самых важных углов (Φ , ψ , χ_1 , χ_2 , ω), которые описывают основу (Φ , ψ) и боковую цепь (χ_1 , χ_2), а также цис-транс-изомерию (ω). В *Ac-Phe-OMe* N-конец *Phe* ацетилирован, а C-конец содержит функциональную эфирную группу; б — схема Рамачандрана, на которой показаны девять различных конфигураций основной цепи относительно углов Φ и ψ . (Рисунок частично взят из Gerhards и Unterberg (2002).)

но только одна структура была получена в спектрах РДФИ (Gerhards и Unterberg, 2002; Gerhards и др., 2002). Спектры ИК/РДФИ были зарегистрированы в области валентных колебаний NH и в области колебаний амида I/II (валентные колебания C=O, деформационные колебания NH) (Gerhards и Unterberg, 2002; Gerhards и др., 2002). Сравнивая экспериментально наблюдаемые колебательные частоты со значениями, полученными в результате *ab initio* вычислений и вычислений методом теории функционала плотности (ТФП), можно сделать вывод, что *Ac-Phe-OMe* имеет структуру β_L (см. рис. 1.8а) с боковой цепью в анти- или левовращающем + положении. То есть, образуется структура β_L (а) или β_L (g+). Дальнейшие исследования вплоть до характеристичной области ясно указывают на то, что для мономера формируется структура β_L (g+) (Fricke и др., 2006а).

Молекула *Ac-Phe-NHMe* — еще один пример защищенной аминокислоты на основе *Phe*. Она содержит две амидных группы (O=C—N—H) и поэтому является дипептидной моделью. В спектре РДФИ *Ac-Phe-NHMe* было обнаружено пять изомеров (Gerhards и др., 2004). В соответствии с *ab initio* вычислениями и вычислениями ТФП самая устойчивая структура — это снова β_L (а) (см. рис. 1.8а и 1.9), но вторые и третьи по устойчивости структуры содержат внутримолекулярные водородные связи и имеют форму γ_L (см. рис. 1.8b, в случае с защитной эфирной группой эти типы структуры невозможны). Необходимо упомянуть, что γ -структуры также называют структурами C7, и из-за взаимодействия атома H в группе NH—CH₃ и атома O ацетилированной карбоксильной группы оба атома находятся в положениях 1,7 относительно друг друга (см. рис. 1.8b). Структуры, относящиеся к β -пласту, называют структурами C5 из-за слабого взаимодействия между атомами H и O при параллельной ориентации группы NH и карбонильной, которые находятся в положениях 1,5 (см. рис. 1.7а и 1.8а).

В качестве примера спектры ИК/РДФИ изомера β_L (а) *Ac-Phe-NHMe* показаны на рис. 1.9. Это очень типично для вытянутого (относящегося к β -пласту) расположения для всех NH колебаний с частотами более 3400 см⁻¹, так как соответствующие

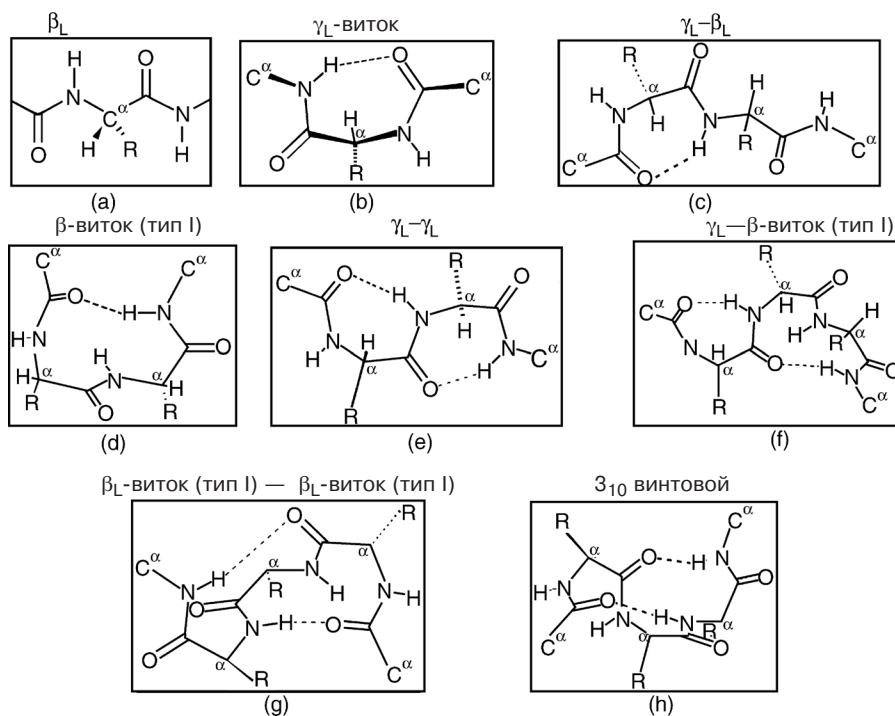


Рис. 1.8. Схемы различных вариантов связи, описывающие положение основной цепи пептида: а — структура, относящаяся к β -пласту (β_L -конфигурация C5); б — γ -виток (структура γ_L , C7); в — комбинационная структура γ_L - β_L ; д — β -виток (тип I) (структура C10); е — расположение γ_L - γ_L ; ф — комбинационный γ_L - β -виток (тип I); г — последовательные β -витки (тип I); ж — винтовая структура Z_{10} (идентичная комбинационному повороту β (тип III) — поворот β (тип I))

группы NH свободны и не связаны с водородом. Особенность данного изомера *Ac-Phe-NHMe* заключается в том, что можно наблюдать только одно колебание в области валентных колебаний C=O. Согласно вычислениям предсказанная интенсивность второго валентного колебания C=O намного ниже. В случае со структурой поворота γ_L частота одной группы NH, связанной с водородом, ниже 3400 см^{-1} , тогда как другое валентное колебание NH выше 3400 см^{-1} (Gerhards и Unterberg, 2002; Gerhards и др., 2004). Кроме того, переходы, которые принадлежат группам NH, связанным с водородом, обычно шире, чем наблюдаемые для валентного колебания свободной NH группы. Вообще можно утверждать, что информацию об основной структуре исследуемых молекул получают из положения, интенсивности и ширины колебательного перехода. Если, кроме того, колебательные переходы зарегистрированы в широком спектральном диапазоне (характеристичная область, амид I, II, валентные колебания NH, обертоны), то для интерпретации спектра имеется достаточно информации. В подобных системах (например, в *Ac-Trp-NHMe*) также наблюдают структуры β -пласта и γ -витка.

Третий пример защищенной аминокислоты на основе *Phe* — это *Ac-Phe-NH_2*. В данном случае группа NH_2 ацелирована, и используется чистый амид. Такая модель менее эффективна для описания внутренней структуры пептида (который не содержит никаких первичных групп NH_2), но вводит дополнительную частоту валент-

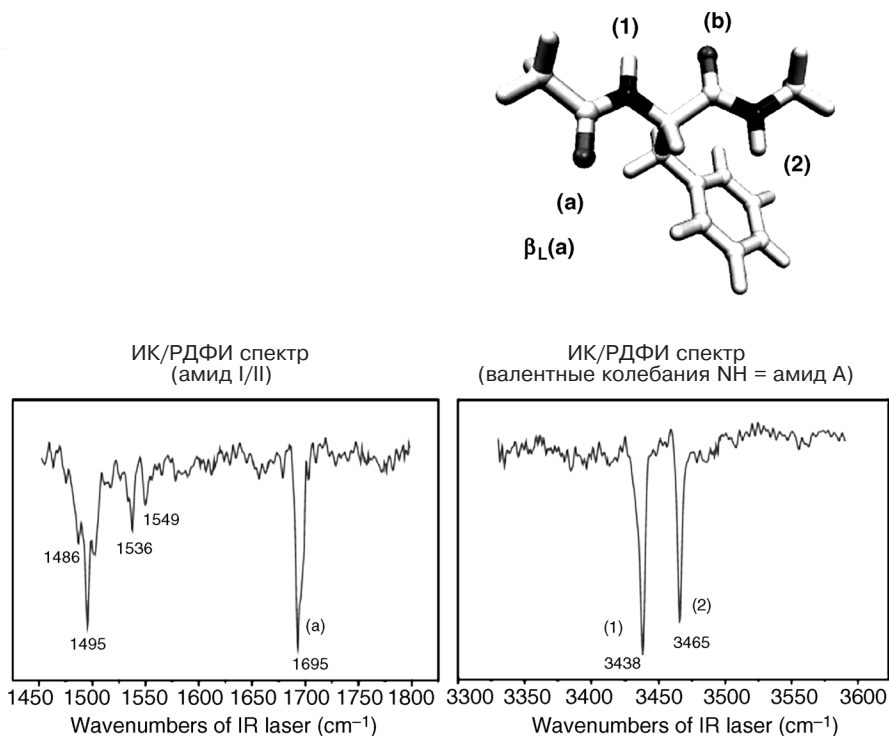


Рис. 1.9. Структура и ИК/РДФИ спектр модельного дипептида *Ac-Phe-NHMe* (Gerhards и др., 2004). Спектр показан в областях переходных колебаний амидов I/II ($1450\text{--}1800\text{ см}^{-1}$) и валентных колебаний N—H (амид A). Все переходы в области валентных колебаний NH имеют частоты, существенно большие 3400 см^{-1} , что указывает на наличие структуры β -пласта. (Рисунок частично взят из Gerhards и др. (2004).)

ных колебаний NH, которая может быть полезна для интерпретации структуры. Анализ *Ac-Phe-NH₂* с применением ИК/РДФИ приводит к трем конформерам (Chin и др., 2005d). Как и в *Ac-Phe-NHMe* (Gerhards и др., 2004), самой устойчивой оказывается структура, относящаяся к β -пласту, тогда как у двух других структур есть элементы γ_L -витка. Очень интересно обратить внимание на тот факт, что конформер, содержащий γ_L структуру (гош +), показывает очень низкий выход флуоресцентных квантов (Chin и др., 2005d). Это может быть результатом взаимодействия связи N—H с π -системой, что приводит к быстрому безызлучательному распаду (см. ниже).

γ -витки также наблюдаются в пептиде *Z-Pro-NHMe* (с $Z=C_6H_5-CH_2-O$, Pro см. на рис. 1.5). Данная система базируется на пролине, и так как у этого вещества нет хромофора в боковой цепи, ароматический хромофор представлен в защитной группе (Comragnon и др., 2005).

γ -витки — важные элементы вторичной структуры. Другие типы вторичной структуры включают спирали, β -пласты и β -витки (см. рис. 1.8 и 1.10). β -виток и спирали представлены ниже, но даже для защищенных аминокислот можно рассмотреть наиболее простые структуры с β -пластами. Модель β -пласта — это совокупность, по крайней мере, двух защищенных аминокислот или пептидов, в которых у аминокислот то же положение, что и у аминокислот в большом пептиде (см. рис. 1.10). Для обсуждения динамических моделей с β -пластами лучше использовать защищенные аминокис-

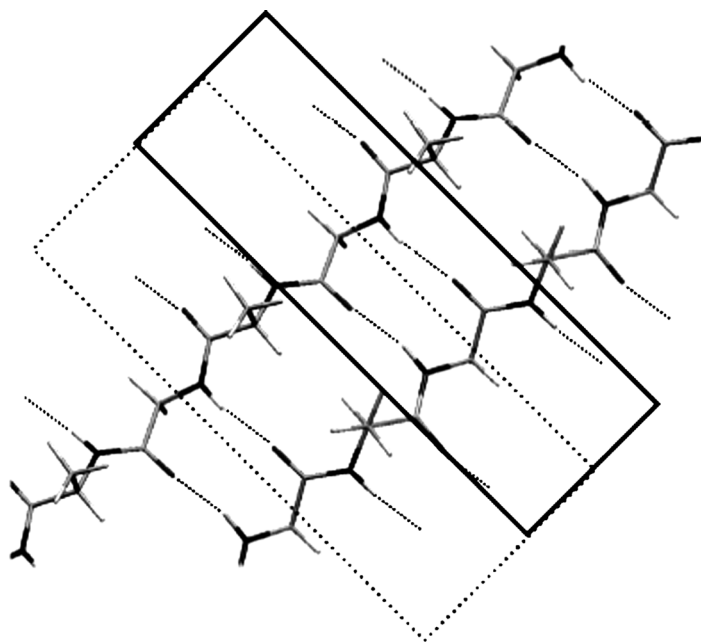


Рис. 1.10. Часть белка шелка, содержащая вторичную структуру антипараллельного β -пласта. Сплошным прямоугольником обозначена малая модель β -пласта с малым расстоянием между соседними связями $N-H \cdots O=C$, тогда как пунктирным прямоугольником обозначена модель с большим расстоянием $N-H \cdots O=C$. Обе структуры можно взять за образец большого β -пласта. Оба прямоугольника могут быть рассмотрены как полный антипараллельный β -пласт. Таким образом, повторяя этот элемент (содержащий оба образца), можно воспроизвести полный β -пласт (Gerhards и др., 2006a)

лоты вместо незащищенных, так как в данном случае наиболее полярные группы расположены в основной цепи молекулы, а не на ее концах. В незащищенных аминокислотах (см., например, шесть самых устойчивых изомеров *Phe* на рис. 6 в Spock и др. (2000)) кислотная группа $COOH$ и группа NH_2 обладают тенденцией к формированию межмолекулярных водородных связей, тогда как молекулы, подобные *Ac-Phe-OMe* или *Ac-Phe-NHMe* (или *Ac-Phe-NH_2*), обычно имеют вытянутые структуры, относящиеся к β -пласту, которые идеальны для формирования димеров. Такие димеры являются подходящими примерами моделей с β -пластами, что приводит к вопросу о том, существуют ли движущие силы формирования более сложной вторичной структуры для изолированных молекул в газовой фазе (без окружающей среды).

Действительно, в случае с *Ac-Phe-OMe* и *Ac-Phe-NHMe* анализ спектров ИК/РДФИ в сочетании с *ab initio* вычислениями показывает, что димеры — это модели β -пласта (см. рис. 1.11). Для дипептида *Ac-Phe-NHMe* существуют две различные модели с β -пластами: конфигурация с внешними связями с группами NH N концов (группы $NHMe$) с водородными связями двух групп CO с C -концами (ацетильные группы) (рис. 1.11a) и структура с внутренними связями с группами NH аминокислоты с водородными связями с группой CO амидной группы (рис. 1.11b). Сравнивая спектры ИК/РДФИ с колебательными спектрами, предсказанными для различных структур, можно сделать вывод о том, что формируется димер с внешними связями (Gerhards и др., 2004). В случае с *Ac-Phe-OMe* образуется только кон-

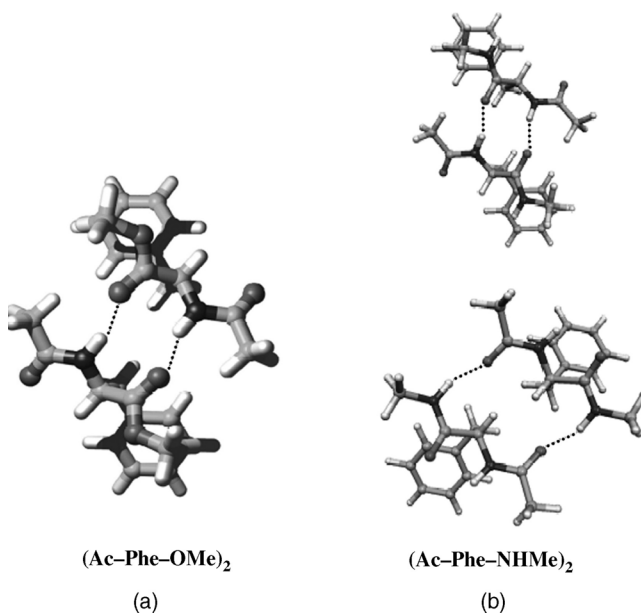


Рис. 1.11. Динамические модели с β -пластами для двух структур, описанных на рис. 1.10: а — для димера *Ac-Phe-OMe* наблюдается конфигурация с внутренними связями (Gerhards и др., 2002; Gerhards и Unterberg, 2002); б — в случае с *Ac-Phe-NHMe* возможны структуры и с внутренними, и с внешними связями, но только конфигурация с внешними связями была экспериментально обнаружена (Gerhards и др., 2004). (Рисунок частично взят из Gerhards и др. (2004).)

фигурация с β -пластами и внутренними связями, что было определено экспериментально (Gerhards и Unterberg, 2002; Gerhards и др., 2002). Важно заметить, что формируется более чем один димер с внутренними или внешними связями. Три возможных ориентации боковой цепи (g^+ , g^- , a) для каждого мономера дают девять возможных структур димера с внутренними или внешними связями. Количество колебательных частот для NH и CO, наблюдаемых в ИК/РДФИ спектрах, указывает на то, что это симметричные структуры, а именно: структуры, в которых у этих двух мономеров одинаковая ориентация боковой цепи. Таким образом, остаются только три возможных структуры димеров с внутренними или внешними связями. В случае с *Ac-Phe-NHMe* только расположение $\beta_L(g^+)-\beta_L(g^+)$ соответствует экспериментально наблюдаемым частотам и интенсивностям в областях колебаний C=O и NH (Gerhards и др., 2004). Для (*Ac-Phe-OMe*)₂ конфигурации $\beta_L(g^+)-\beta_L(g^+)$ и $\beta_L(a)-\beta_L(a)$ соответствуют полученным экспериментально спектрам (Gerhards и Unterberg, 2002; Gerhards и др., 2002). Вновь исследования в характеристичной спектральной области указывают на то, какая структура присутствует. Так как большое количество информации об основной цепи можно получить с помощью ИК спектроскопии, детальный анализ положения боковых цепей может стать интересной задачей для измерений вращательных спектров с высоким разрешением, которые теперь возможны для систем размера защищенной аминокислоты или ее димера.

Для построения большей модели с β -пластами размер системы увеличивают, систематически добавляя одну за другой аминокислоты. Это приводит к формированию пептидных структур, что будет рассматриваться в следующем разделе.

Для исследования процесса микросольватации представляют интерес кластеры *Phe* с водой. Ким и его коллеги анализировали кластер *Phe* с одной молекулой воды, применяя метод РДФИ (Lee и др., 2002a, b). Структуру идентифицировали исключением конформеров в результате гидратации. Выяснилось, что кластер можно получить из мономера А (см. рис. 1.6; $A = 7$), форма которого не изменяется существенным образом при образовании комплекса с одной молекулой воды. Согласно *ab initio* вычислениям (одноточечные энергии по теории *MP2* для конфигураций, оптимизированных по теории ТФП, базисный комплект 6-31 + G(d)) самая устойчивая структура содержит молекулу воды, соединенную с карбоксильной группой. Таким образом, ОН карбоксильной группы действует как протонный донор по отношению к молекуле воды, тогда как атом Н воды образует связь с С=О группой СООН. Полезно также применять метод ИК/РДФИ к системе *Phe*/вода, так как он дает непосредственную информацию о структуре. Важно, что этот метод также работает, когда возбужденные кластеры фрагментируют, так как ИК возбуждение происходит до УФ возбуждения, то есть ИК фотон возбуждает неповрежденный кластер.

Эффект микросольватации защищенной аминокислоты был исследован автором с коллегами (Fricke и др., 2006b), которые анализировали кластер *Ac—Phe—OMe* с молекулами воды (в количестве до трех). Данные структуры были проанализированы с помощью метода ИК/РДФИ в области валентных колебаний NH и OH, а также в области валентных колебаний амида I и II. В отличие от незащищенных аминокислот, воду нельзя присоединить к полярным концевым группам СООН и NH₂. Два метода присоединения одной молекулы воды показаны на рис. 1.12 (a) и (b). Существует конкуренция между группами амидной связи NH (протонный донор) и СО (протонный акцептор). В структуре (a) образуется связь между группами NH и СО, тогда как в (b) одна молекула воды прикреплена в качестве протонного донора к группе СО амидной функции. Интересно обратить внимание на то, что обе структуры получены экспериментально (Fricke и др., 2006b). Для кластера с двумя молекулами воды фак-

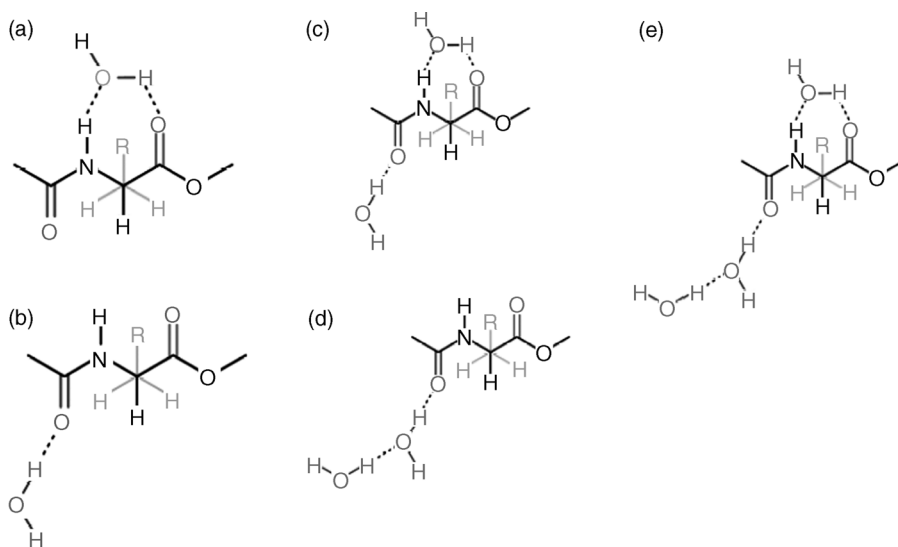


Рис. 1.12. Экспериментально наблюдаемые структуры для кластера *Ac—Phe—OMe* с одной (a, b), двумя (c, d) и тремя (e) молекулами воды (Fricke и др., 2006b). Четко видны конкурирующие эффекты для воды, выступающей в качестве протонного донора или акцептора

тически была получена структура, где одна молекула воды расположена с каждой стороны от $Ac-Phe-OMe$ (см. рис. 1.12c). Данная структура — это наложение двух кластерных структур с одной молекулой воды. Однако, также наблюдается и второй изомер, в котором димер воды связан водородной связью с CO амидной группы (рис. 1.12d) (Fricke и др., 2006b). Наконец, только один изомер был получен для кластера с тремя молекулами воды, который состоит из соединения с одной молекулой в качестве мостика между группами NH and CO с одной стороны, и с димером воды с водородной связью с группой CO с другой стороны. Первый слой сольватации заполнен тремя дополнительными молекулами воды. Очень интересный результат — это то, что в случае с $Ac-Phe-OMe$ первый слой сольватации фактически никак не влияет на основную цепь. То есть, основное положение вытянутой структуры, относящейся к β -пласту, остается. Интересно посмотреть на изменения структур в случае, если сольватацию больших пептидов исследовать пошагово (то есть добавляя молекулу воды одну за другой).

1.4.2. Триптофан

Триптофан — это аминокислота, наиболее эффективно поглощающая УФ излучение. При помощи методов лазерной десорбции Леви и его коллеги в 1980-х получили его РДФИ и ЛИФ спектры (Rizzo и др., 1985, 1986a, b; Philips и др., 1988). Из измерений зависимости сигнала от мощности излучения можно предположить, что вклад в РДФИ сигнал вносят шесть изомеров. То есть, переходы в РДФИ спектрах принадлежат одному и тому же конформеру, если интенсивности их пиков одинаковы (Rizzo и др., 1986b). Пики, принадлежащие различным конформерам, не имеют одинаковых интенсивностей из-за различий в популяциях молекул, находящихся в состоянии S_0 . Еще одно доказательство существования шести изомеров было получено с помощью спектров рассеянной флуоресценции (РФ), зарегистрированных для переходов из состояния S_1 . РФ спектры не идентичны. В частности, широкий флуоресцентный сигнал с красным смещением, наблюдаемый для изомера A (конформера с самой низкой энергией возбуждения), дает основание для предположения о том, что в электронно-возбужденном состоянии может быть образована амфионная форма (Rizzo и др., 1986a). Другим объяснением этого явления может служить сильное взаимодействие электронно-возбужденных состояний 1L_a и 1L_b конформера A . Согласно измерениям рассеяния флуоресценции с высоким временным разрешением конформер A оказывается нейтралью с самым коротким временем жизни в электронно-возбужденном состоянии (Engh и др., 1986; Philips и др., 1988). Более поздние эксперименты показали, что спектры ЛИФ и РФ являются практически зеркальным отражением друг друга (Snoek и др., 2001). Уширение пиков в спектре РФ может возникать из-за неразрешенной электронно-колебательной структуры Trp , сигнал которой усиливается (из-за больших коэффициентов Франка-Кондона) в спектре РФ.

Ранняя работа группы Леви получила очень важные, но, в основном, косвенные свидетельства существования различных конформеров Trp . Применение методов двойного резонанса позволило проверить эти предположения. Действительно, как УФ/УФ выжигание провалов (Piuzzi и др., 2000), так и ИК/РДФИ (Snoek и др., 2001) спектроскопия подтвердили существование шести изомеров Trp . Исследования в области валентных колебаний NH привели к идентификации, по крайней мере, пяти изомеров. Самая устойчивая структура A (см. рис. 1.13a) содержит внутримолекулярную водородную связь между OH карбоксильной группы и группой NH_2 с атомом водорода группы NH_2 , направленными в сторону ароматического индольного кольца боковой цепи (Snoek и др., 2001). Во второй самой устойчивой структуре E группа NH_2 действует как донор протонов по отношению к $C=O$ карбоксильной группы.

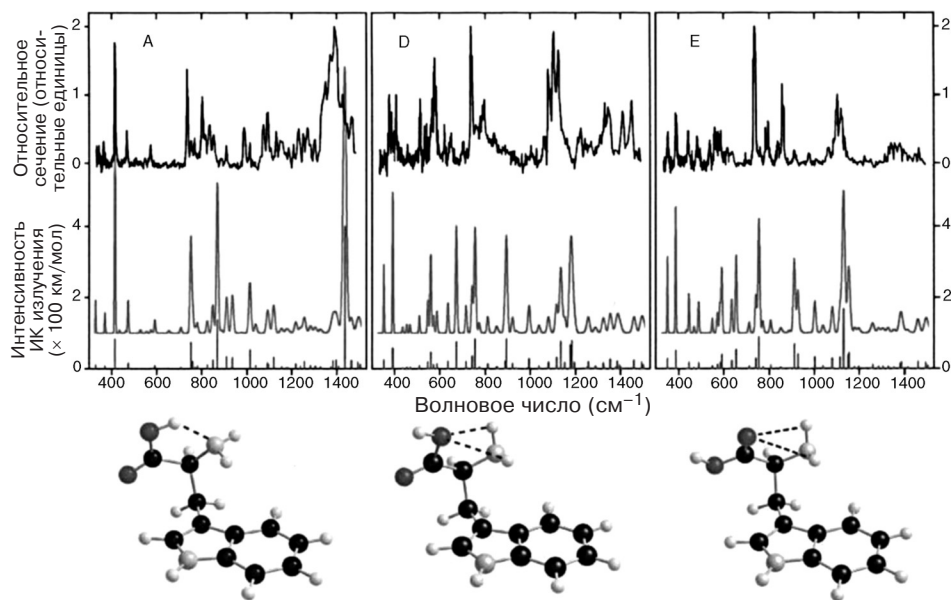


Рис. 1.13. Спектры ИК/РДФИ трех изомеров *Trp* в характеристичной области и области амида II от 330 до 1500 см^{-1} (Bakker и др., 2003). Экспериментальные спектры (вверху) сравниваются с расчетными спектрами (ниже), полученными с помощью ТФП уровня B3LYP/6-31 + G(d). Данные спектры приводятся и как линейчатые спектры, и как спектральные профили лазера на свободных электронах (Oepts и др., 1994). Соответствующие структуры изомеров *A*, *D* и *E* приводятся внизу (подробно в тексте). (Рисунок взят из Bakker и др. (2003).)

Структуры *A* и *E* в дальнейшем были подтверждены измерениями в ИК характеристичной области от 330 до 1500 см^{-1} (Bakker и др., 2003) (см. рис. 1.13). Третий изомер *D* содержит водородную связь между группой NH_2 и OH карбоксильной группы, которая является акцептором протонов. Хотя это пока полностью не подтверждено ИК-спектроскопией, сходство расчетных и экспериментальных спектров и в характеристичной области ИК спектра, и в области валентных колебаний NH подтверждает данную гипотезу. Интересно обратить внимание на то, что исследования *Trp* в капелях гелия (Lindinger и др., 2001) продемонстрировали полное подавление структуры *A*, которая является самой устойчивой в экспериментах с молекулярным пучком и во всех вычислениях, выполненных в данной системе до уровня *MP2*, включая тройной- ζ базисный набор (Snoek и др., 2001). Возможным объяснением данного экспериментального результата может быть агрегация атомов *He* около ароматического хромофора (индольного кольца), что приводит к дестабилизации структуры *A*. Этот результат показывает, что сверхтекучий *He* существенно влияет на самые устойчивые структуры.

Процесс микросольватации *Trp* был исследован путем добавления к нему молекул воды. В двух экспериментах были исследованы водные кластеры при помощи сочетания ИК/УФ спектроскопии и *ab initio* вычислений методом ТФП (Snoek и др., 2002; Tascabal и др., 2004). Исследования амидной области (Snoek и др., 2002) были расширены до характеристичной области при помощи лазера на свободных электронах (Tascabal и др., 2004). Существенная проблема получения правильной структуры со-

стоит во фрагментации кластеров более высоких порядков до моногидратированных кластеров. Выяснилось, что экспериментально полученный ИК спектр дает, главным образом, трехгидратированный кластер. Для кластера *Trp*/вода важно обратить внимание на то, что конформер *Trp*, наблюдаемый в кластере, не идентичен тому, который был получен для одиночной молекулы *Trp*. То есть, вода не просто присоединяется к мономеру *Trp*, но и перестраивает *Trp* в конфигурацию, оптимальную для формирования оболочки сольватации. Кроме того, можно сделать вывод, что в кластерах с тремя или меньшим числом молекул воды амфионная структура не образуется. В более ранней статье добавление других молекул (метанола, этанола, хлороформа, бензола и ацетона) исследовали ЛИФ спектроскопией и рассеянной флуоресцентной спектроскопией (Teh и др., 1989). Согласно результатам электронной спектроскопии молекула растворителя присоединена к α -амину (то есть к группе NH основной цепи), а не к группе NH индольной структуры.

Как и в случае с *Phe*, несколько производных *Trp* были исследованы различными методами. В ранних статьях группа Леви (Park и др., 1986; Tubergen и др., 1990) проанализировала методами ЛИФ, РДФИ и РФ следующие производные: 3-индол-уксусную кислоту, 3-индолпропионовую кислоту, триптамин, N-ацетилтриптофанэтиловый эфир (NATE), различные амиды триптофана, N-ацетилтриптофан, N-ацетилтриптофанамид (NATA) и N-ацетилтриптофан-диметиламид (NATDMA). В последней молекуле *Trp* ацетилирован по NH_2 -группе и амидирован в кислотном участке (использовался или чистый или диметилированный амид). Цель всех этих исследований состояла в том, чтобы понять, почему подобные вещества дают различные электронные спектры. В частности, некоторые спектры имеют отчетливые пики в области низких частот и широкий флуоресцентный пик с красным смещением, тогда как другие конформеры тех же самых веществ дают четкие резонансные флуоресцентные спектры без явных низкочастотных переходов. Предполагается, что вероятность формирования внутримолекулярной водородной связи между группой NH и карбонильной группой может вести к различным электронным спектрам. Относительные положения основной и боковой цепей (индольного кольца) также сильно влияют на спектроскопические результаты. Важно заметить, что индольное кольцо обладает двумя близкими электронными состояниями: 1L_a и 1L_b . Спектроскопические данные являются следствием возмущения электронной структуры, обусловленного типом производного аминокислоты и конфигурацией исследуемых молекул. Данный аспект также рассматривала группа Цвира, опубликовавшая ряд статей по NATA, в частности, по N-ацетилтриптофан-метиламиду (NATMA, Ac-Trp-NHMe) (Dian и др., 2002a, b; 2003, 2004a, b, c; Evans и др., 2004). Как и Ac-Phe-NHMe (см. выше), NATMA (Ac-Trp-NHMe) представляет собой дипептид. С помощью спектроскопии УФ/УФ выжигания провалов были определены электронно-возбужденные состояния для трех различных конформеров NATMA. В отличие от двух других конформеров, третий имеет широкий электронный переход (см. спектр выжигания провалов во вставке на рис. 1.14 и структуры на рис. 1.3) (Dian и др., 2002a). При дальнейшем применении ИК/УФ спектроскопии двойного резонанса были получены частоты колебаний, сравненные с расчетными спектрами (подробно о вычислении спектров см. раздел 1.7). Оказалось, что вещество с широким электронным переходом имеет γ -виток C5. Необычное поведение данной структуры объясняется возможным взаимодействием состояния ${}^1\pi\sigma^*$ с состоянием 1L_b . Данное взаимодействие может быть результатом ориентации и силы дипольного момента, а также ориентации боковой цепи относительно основной цепи (с группой NH, которая может быть направлена к π -системе). Прямое свидетельство о взаимодействии состояния ${}^1\pi\sigma^*$ с состоянием 1L_b получают по ИК/РДФИ спектрам состояния S_1 . В спектрах, принадлежащих изомерам с γ -витком и имеющим широкий пик УФ поглощения, индольные валентные колебания не обнаруживаются, что указывает на диссоциацию из состояния ${}^1\pi\sigma^*$ по

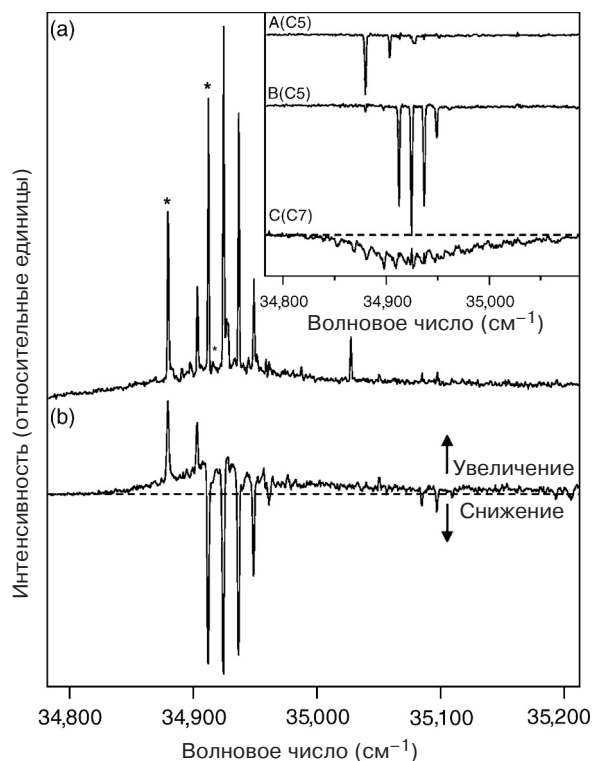


Рис. 1.14. а — ЛИФ спектр *NATMA* (*Ac-Trp-NHMe*), проанализированный спектроскопией УФ/УФ выжигания провалов (вставка). Таким образом был определен вклад от трех изомеров *NATMA* (см. рис. 1.3); б — спектр, полученный методом заполнения провалов, зарегистрированный при возбуждении одного валентного колебания *NH* изомера *B*. Сканируя УФ лазер, можно наблюдать уменьшение флуоресценции для изомера *B* и увеличение флуоресценции для изомеров *A* и *C* (Dian и др., 2002b). Для *C* проявляются только широкие спектральные переходы, что указывает на наличие очень эффективных каналов релаксации электронного возбуждения (Dian и др., 2003) (подробнее см. в тексте). (Рисунок взят из Dian и др. (2002b).)

связи *NH* (Dian и др., 2003). Этот результат ясно показывает, что фотофизика зависит от структуры частиц, а не только от типа растворителя.

NATMA представляет интерес не только с точки зрения исследования различных электронных состояний, но также может быть использована для демонстрации методов ИК спектроскопии изменения популяции и ИК спектроскопии заполнения провалов (см. рис. 1.14 (Dian и др., 2002b, 2004c)). В случае с *NATMA* популяция может очень эффективно перераспределяться между различными изомерами, хотя в ходе экспериментов наблюдалась лишь умеренная селективность конформеров. Другими словами, возбуждение одного изомера, например, самого устойчивого *C5*, ведет к образованию двух других изомеров, но никогда к формированию изомера, не принадлежащего к трем наиболее стабильным. Распределение популяции моделировали с помощью потенциалов силовых полей (*Amber*, *OPLS*) в сочетании с РПКМ вычислениями (Evans и др., 2004). Экспериментальные результаты моделировали функцией, зависящей от избыточной энергии и скорости охлаждения. Охлаждение после ИК

возбуждения является важным фактором, влияющим на это перераспределение. Условия охлаждения менялись при изменении давления и относительного расстояния x/D (где x — расстояние до скиммера, D — диаметр отверстия скиммера). Для нескольких значений x/D , давления и длин волн ИК и УФ излучения были зарегистрированы ИК/УФ спектры при различных временах задержки между импульсами ИК и УФ лазеров. Результаты оказались чрезвычайно чувствительны к изменению параметра x/D , так как охлаждение происходит за несколько сотен наносекунд (Dian и др., 2004b).

Для получения более четкого понимания о влиянии различных факторов на изменение популяции изомеров исследования были распространены на мелантонин, который дает больший чем *NATMA*, сигнал и имеет в основной цепи всего одну группу NH (Dian и др., 2004b). Оказывается, что перераспределение можно изменить, варьируя условия охлаждения. Кроме того, перераспределение после ИК возбуждения наблюдалось между различными транс-изомерами, но не для цис-структур. Это является результатом влияния высоты барьера транс-цис-изомеризации, который невозможно преодолеть при поглощении одного ИК фотона. Таким образом, выбранный метод пригоден для определения высоты барьера (Dian и др., 2004b). Вопросы, касающиеся селективности метода в химических процессах, остаются открытыми. Они могут быть исследованы при помощи ИКИП спектроскопии и спектроскопии заполнения провалов. Как было упомянуто выше, необходимо принять во внимание многие параметры (например, выбранную длину волны ИК излучения, интенсивность охлаждения, количество изомеров, относительную энергию изомеров). Кроме того, исследования состояния S_1 требуют более сложного описания, чем состояние S_0 , вследствие влияния возмущений, вызванных различными электронными состояниями.

Другой причиной исследования защищенного *Trp* является анализ элементов вторичных структур. Из данных РДФИ и ИК/РДФИ спектроскопии и *ab initio* вычислений следует, что мономер *Trp* имеет структуру β -пласта (Gerlach и др., 2005). Данный результат подобен полученному для защищенных аминокислот *Ac-Phe-OMe* и *Ac-Phe-NHMe* (Gerhards и Unterberg, 2002; Gerhards и др., 2002, 2004), для которых структуры β -пласта самые устойчивые. Как и в случае с защищенными аминокислотами, содержащими *Phe* (*Ac-Phe-OMe* и *Ac-Phe-NHMe*), димер *Ac-Trp-OMe* мог бы служить моделью β -пласта. Однако основное различие между аминокислотами *Phe* и *Trp* заключается в наличии полярной группы в боковой цепи *Trp*. В частности, индольная NH группа участвует в образовании межмолекулярных водородных связей с группами CO второго *Trp* (см. рис. 1.15b, c). Действительно, анализ димера (*Ac-Trp-OMe*)₂ дает структуру, в которой одна из индольных групп NH образует водородную связь с С=O эфирной группы, тогда как другая образует водородную связь с СО ацетильной группы (Gerlach и др., 2005). Эта структура асимметрична (см. рис. 1.15c), тогда как в симметричной структуре (рис. 1.15b) обе индольные группы NH были бы соединены водородной связью или с СО эфирных или ацетильных групп. Модельная система для β -пласта (рис. 1.15a) с водородными связями между группами NH основной цепи и СО эфирных групп (которые параллельны группам NH основной цепи) не наблюдается, так как индольные группы NH более кислотные. Данное различие между *Phe* и *Trp* указывает на сильное влияние боковой цепи на структуры аминокислот. Такое влияние боковой цепи может усилиться при возникновении водородных связей между группами NH и π -системами боковой цепи. Исследования различных защищенных аминокислот показывают, что взаимодействие между боковыми и основными цепями влияет на структуры как изолированных пептидов, так и на структуры их кластеров. В частности, для наблюдения β -пластов следует избегать боковых цепей с полярными группами (например, NH или OH). Интересен вопрос: приводит ли добавление воды, например, к димеру *Ac-Trp-OMe* к трансформации димера в β -пласт с сольватированными группами NH индольной бо-

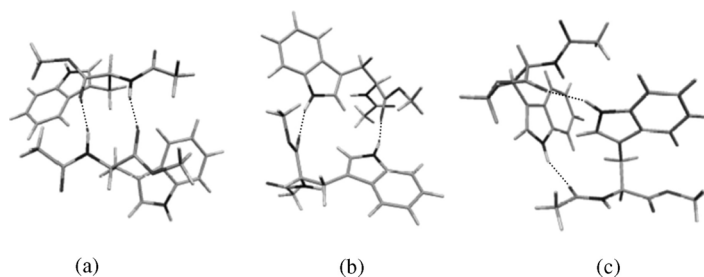


Рис. 1.15. Различные структуры димера *Ac-Trp-OMe* (Gerlach и др., 2005): а — динамическая модель β -пласта со связями $N-H \cdots O=C$ между основными цепями; б — димер с водородными связями между *NH* индольной группы и $C=O$ эфирной группы. Его называют симметричным димером, так как у обоих мономеров водородные связи принадлежат одному и тому же типу. В отличие от этой структуры с — асимметричный димер, где *NH* одной индольной группы соединена водородной связью с $C=O$ эфирной группы, тогда как *NH* другой индольной группы образует водородную связь с $C=O$ амидной группы. (Рисунок взят из Gerlach и др. (2005).)

ковой цепи или сольватированы лишь свободные функциональные группы основной цепи (NH или CO) при сохранении структуры несольватированного димера? Эксперименты, похоже, указывают на то, что первая молекула воды присоединяется через водородную связь $NH \cdots O=C$ димера. Получается, что при большем количестве молекул растворителя можно получить структуру с β -пластами димера *Ac-Trp-OMe*.

1.4.3. Применение СВЧ спектроскопии

Свободные аминокислоты интенсивно изучались при помощи СВЧ спектроскопии в газовой фазе. Глицин, самая простая аминокислота, был предметом многих исследований. Начиная с ранней работы Брауна и его коллег (Brown и др., 1978) и Сьюнрама и Ловаса (Suenram и Lovas, 1978), СВЧ спектр глицина рассматривался несколько раз с целью полного структурного анализа трех возможных конформеров глицина (Berulis и др., 1985; Bludsky и др., 2000; Brauer и др., 2004; Brown и др., 1978; Godfrey и Brown, 1995; Godfrey и др., 1996; Guelin и Cernicharo, 1989; Hollis и др., 1980; Lovas и др., 1995; McGlone и др., 1999; Miller и др., 2005; Senent и др., 2005; Snyder и др., 1983; Suenram и Lovas, 1978, 1980; Suenram и др., 1989). В самой устойчивой структуре группа NH_2 образует разветвленную внутримолекулярную водородную связь с группой $C=O$ (изомер I). То же самое наблюдается для аланина (Blanco и др., 2004; Brauer и др., 2004; Csaszar, 1996; Godfrey, 1993; Godfrey и др., 1996; McGlone и др., 1999).

Гистамин был исследован Фогельсангером и его коллегами (1991). Они регистрировали вращательный спектр в спектрометре со свободно расширяющейся сверхзвуковой струей. Наблюдались четыре конформера (Vogelsanger и др., 1991). Два различных конформера аланина наблюдали Годфри и его коллеги (Godfrey и др., 1996) с помощью спектрометра со свободно расширяющейся сверхзвуковой струей и модулирующей Штарка. Развитие методов абляции (Suenram и др., 1999; Lessari и др., 2003) открыло путь к исследованию других аминокислот, которые ранее было невозможно изучать в газовой фазе из-за фрагментации при нагревании. Алонсо и его коллеги зарегистрировали вращательные спектры пролина, валина (Lessari и др., 2002, 2004) и аланина (Blanco и др., 2004), применяя СВЧ спектроскопию молекулярных пучков

с лазерной абляцией и использованием преобразования Фурье (СВЧС МП ПФ). Для пролина (Allen и др., 2004; Czinski и Csaszar, 2003) были обнаружены два конформера с водородной связью между *ОН* карбоксильной группы и одиночной парой электронов азота. Этот экспериментальный факт отличается от наблюдаемого для самых устойчивых конформеров глицина и аланина с вышеупомянутой разветвленной внутримолекулярной водородной связью между группами NH_2 и $C=O$. Для валина было найдено два конформера с двумя различными типами водородной связи, описанными выше.

Начиная с середины 1990-х несколько производных и аналогов аминокислот были исследованы путем регистрации вращательных спектров. Туберген и его коллеги зарегистрировали вращательные спектры семи изотопных аналогов аланинамида (Lavrich и др., 1999). Они выявили структуру с водородной связью между амидом и амином, в которой амидная группа играла роль донора. В более поздней работе Лаврич и Туберген исследовали кластер аланинамида с водой, который является интересным примером производного аминокислоты с водородной связью (без ароматического хромофора) (Lavrich и Tubergen, 2000). Здесь вода действует и как водородный донор по отношению к группе $C=O$, и как водородный акцептор по отношению к NH_2 амидной группы, образуя циклическую структуру с водородной связью, похожую на структуру изомера $Ac-Phe-OMe(H_2O)_{1-3}$ (см. рис. 1.12а, с, е).

Модель дипептида *N*-ацетилаланин *N*-метиламид и его изотопный аналог $^{15}N(^{15}N_2)$ были успешно изучены посредством спектроскопии СВЧС МП ПФ. В данной системе была обнаружена свернутая структура γ -типа (Lavrich и др., 2003b), похожая на полученную для других дипептидных моделей таких, как, например, $Ac-Phe-NHMe$ или $Ac-Trp-NHMe$ (см. выше). Кроме того, были изучены производные валина, глицина и пролина. Исследование валинамида не привело к однозначному соответствию между теоретическими и экспериментальными результатами, но согласно *ab initio* вычислениям у трех самых устойчивых конформеров есть внутримолекулярные водородные связи (Lavrich и др., 2002). У *N*-ацетилглицина был обнаружен только один конформер с внутримолекулярной водородной связью между карбонильной группой кислоты и амидным протоном (Lovas и др., 2004). Были также обнаружены два конформера каждой молекулы в экспериментальных исследованиях 4(*S*)- и 4(*R*)-гидроксипролина (Lessari и др., 2005). И снова у каждого конформера была обнаружена внутримолекулярная водородная связь или между одной парой электронов атома азота кольца и *ОН* карбоксильной группы, или между NH и $C=O$.

Исследование дикетопиперазина предложило интересное объяснение конформационных свойств циклопептидов (Bettens и др., 2000). Был обнаружен только один изомер, который имеет структуру, отличную от структуры в твердой фазе, получаемой с помощью рентгеновской кристаллографии.

Кроме того, модели пептидов (Lavrich и др., 2003а; Ohashi и др., 2004) и аналоги тирозина и триптофана, тирамина (Melandri и Maris, 2004) и триптамина (см. раздел 1.3) были изучены посредством СВЧ спектроскопии.

Наконец, необходимо упомянуть о том, что все изолированные аминокислоты, исследованные в газовой фазе до сих пор, не являются амфионами. Данные структуры возникают в результате агрегации с водой. Возникает вопрос, сколько молекул воды необходимо для образования амфиона. За исключением теоретических подходов (см. например, Ding и Krogh-Jespersen (1992), Jensen и Gordon (1995), Gutowski и др. (2000), Kassab и др. (2000), Chaudhari и др. (2004, 2005а, б)), Боуэн, а также Джонсон и его коллеги (Diken и др., 2004, 2005; Xu и др., 2003) анализировали кластеры группы анионов глицина/воды, применяя масс-спектрометрию, фотоэлектронную спектроскопию (Xu и др., 2003) и методы ИК фотодиссоциации (Diken и др., 2004, 2005). Хотя эти системы являются анионами, утверждают, что роль дополнительного электрона зависит от гидратации. Таким образом, по результатам, получен-

ным из исследования анионов, можно сделать вывод о том, что для формирования амфиона в нейтральном кластере необходимо меньшее число молекул воды. Боуэн и его коллеги нашли, что амфионная структура образуется при добавлении пяти молекул воды. Джонсон и его коллеги наблюдали формирование кластеров (глицин/ H_2O) $_{12}$. Будущие ИК исследования эффективно охлажденных анионов глицина/воды сделают возможным изучение формирования структур кластеров различных размеров. Первый ИК спектр фотодиссоциации, зарегистрированный для «теплого» кластера, глицин/ $(\text{H}_2\text{O})_6$ не может быть однозначно интерпретирован (Diken и др., 2005).

Кроме кластеров глицина с водой, Боуэн и его коллеги исследовали анионные кластеры *Trp* и *Phe* с водой. Было найдено, что для образования амфиона необходима сольватация четырьмя молекулами воды (Ху и др., 2003).

1.5. Спектральный анализ пептидных структур

Стимулом исследования поведения пептидов является получение информации о движущих силах трансформации белков. В экспериментах в газовой фазе можно исследовать изолированные пептиды. Также можно определить зависимость формирования различных вторичных структур от последовательности аминокислотных остатков. Даже для защищенных аминокислот могут быть рассмотрены различные мотивы вторичных структур (γ -виток, β -пласт и т.д.), см. раздел 1.4. Рассмотрение агрегации пептидов помогает изучению селективности и эффективности межмолекулярных пептидных связей. Наконец, последовательное добавление молекул воды (процесс микросольватации) позволяет проанализировать влияние сольватации на структуру пептидов.

Были исследованы три основных типа аминокислот и пептидов:

1) незащищенные пептиды со свободной кислотной группой COOH , а также группой NH_2 ; 2) частично защищенные пептиды с ацетилированной группой NH_2 и COOH группой, которая или не модифицирована, или метилирована; 3) циклопептиды, у которых соединены концы (COOH и NH_2).

Как уже было сказано во введении, первую экспериментальную работу по изучению пептидов выполнили Леви и его коллеги. Они применяли РДФИ и ЛИФ спектроскопию для дипептидов *Trp*—*Gly*, *Gly*—*Trp*, *Phe*—*Trp*, *Trp*—*Phe* и *Trp*—*Trp* и трипептидах *Trp*—*Gly*—*Gly* и *Gly*—*Gly*—*Trp* (Cable и др., 1987, 1988a, b). Спустя более чем 10 лет де Ври и его коллеги продолжили эту работу и исследовали ряд дипептидов (*Gly*—*Tyr*, *Ala*—*Tyr*, *Tyr*—*Ala*) и трипептид *Phe*—*Gly*—*Gly* (Cohen и др., 2000). В этой работе также применялась спектроскопия УФ/УФ выжигания провалов для определения числа конформеров различных веществ, которые вносят вклад в РДФИ спектр. Более того, было сделано предварительное определение возможных структур путем сравнения пиков РДФИ спектров с вычислениями, выполненными для соответствующих молекул, находящихся в состоянии S_0 . Подобные же исследования (с применением УФ/УФ спектроскопии двойного резонанса) выполнили Кляйнерманс и его коллеги (Hünig и др., 2003) для дипептидов *Gly*—*Trp*, *Trp*—*Ser* и *Pro*—*Trp* (см. рис. 1.16).

Все эти приложения дают возможность определить число конформеров. Однако, в отличие от УФ/УФ спектроскопии двойного резонанса, применение методов ИК/УФ двойного резонанса позволяет получить информацию о структурах в состоянии S_0 . Таким образом, сравнивая колебательные частоты, полученные экспериментально, с расчетными значениями и значениями, полученными для меньших субъединиц, можно получить сведения о структурах. Группа автора этой главы сначала применяла ИК/РДФИ для защищенного дипептида *Ac*—*Val*—*Phe*—*OMe* (Unterberg и

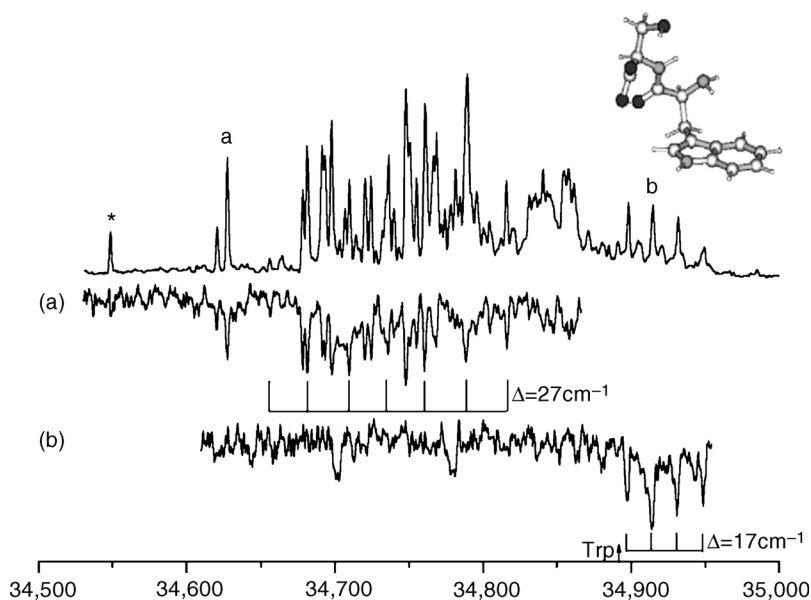


Рис. 1.16. РДФИ и УФ/УФ спектры выжигания провалов для дипептида *Trp-Ser*, указывающие на присутствие двух изомеров (Hünig и др., 2003). Кроме того, видны низкочастотные пики. Структура, показанная на этом рисунке, не обязательно связана с одним из спектров, так как прямой информации о структуре из УФ спектров не получено. (Подробнее см. в тексте.) (Рисунок взят из Hünig и др. (2003).)

др., 2003) (см. рис. 1.17). Спектры регистрировались в области NH и области амида I/II. Использование новой ИК системы с высоким разрешением в области амида I/II позволило нам определить близко расположенные колебательные частоты связи C=O. Согласно данным, полученным для *Ac-Phe-OMe* и согласующимися с вычислениями методом Хартри-Фока в приложении к дипептидам, для данной молекулы возможна структура β -пласта. Интересно, что для дипептидов был получен только один изомер, что указывает на конформационную преселекцию в газовой фазе. Это частично является следствием влияния защитных групп, которые исключают образование изомеров, формирующих межмолекулярные структуры с водородными связями между кислотными и основными концевыми группами.

Начиная с 2004 года, был опубликован ряд статей об исследованиях защищенных пептидов с применением ИК/РДФИ техники. Монс и его коллеги исследовали различные дипептиды и трипептиды с целью получения моделей различных элементов вторичных структур (Chin и др., 2004, 2005b, c). Были исследованы конформеры *Ac-Pro-Phe-NH₂* и *Ac-Phe-Pro-NH₂* (Chin и др., 2004), а также *Ac-Phe-Gly-NH₂* и *Ac-Gly-Phe-NH₂* (Chin и др., 2005c) (см. рис. 1.18). Кроме того, ряд трипептидных моделей вида *Ac-X-Phe-NH₂* ($X = Gly, Ala, Val$) (Chin и др., 2005b) был проанализирован при помощи ИК/РДФИ спектроскопии в сочетании с *ab initio* ТФП вычислениями. В случае с *Ac-Pro-Phe-NH₂* последовательность, состоящая из двух γ_L -витков, оказалась самой стабильной структурой (см. рис. 1.8e), тогда как для *Ac-Phe-Pro-NH₂* β_L (гош-)- γ_L наиболее устойчива структура, показанная на рис. 1.8c. Менее выгодный конформер образует структуру β -витка (рис. 1.8d; такие структуры также называют структурами C10). Хотя добавление *Pro* в аминокислотную

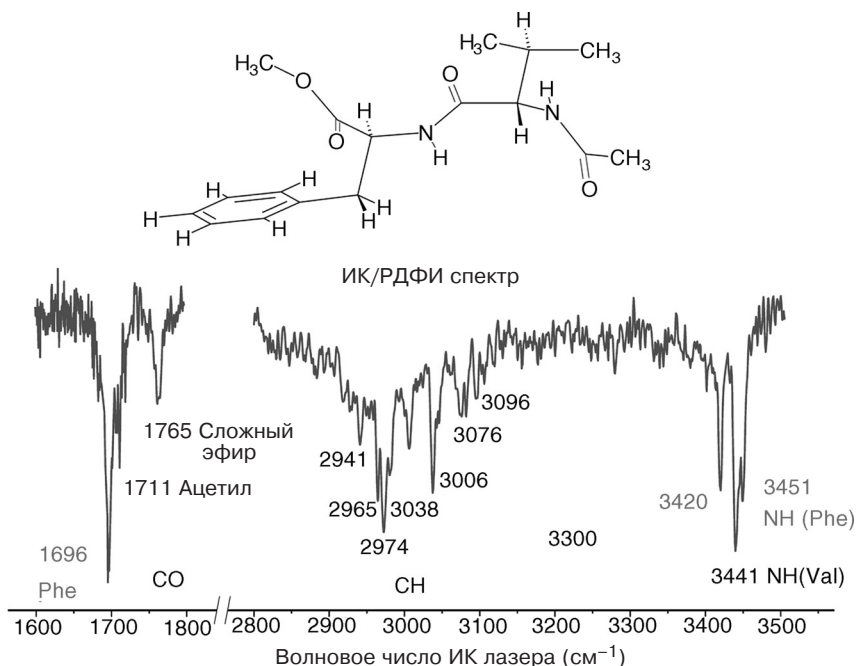


Рис. 1.17. ИК/РДФИ спектры *Ac-Val-Phe-OMe* в областях амида I (C=O), валентных СН и амида А колебаний (Unterberg и др., 2003). Структура, показанная на этом рисунке, получена в результате анализа ИК спектра в сочетании с *ab initio* вычислениями. Переходы для NH с частотами более 3400 см⁻¹ (с одним обертоном при 3420 см⁻¹) указывают на структуру, относящуюся к β-пласту. Подробнее см. статью Unterberg и др. (2003). (Рисунок взят из Unterberg и др. (2003).)

последовательность пептида может благоприятствовать образованию структуры β-витка, *Pro* оказался не самым важным компонентом. Всегда существует баланс между прочностью межмолекулярных водородных связей (которые прочнее в структурах γ-витка и относительно слабы в β-витках, что определяется по небольшому красному смещению для группы NH, вовлеченной в водородную связь) и натяжением основной цепи пептида (которое слабее для β-витка). Кроме того, взаимодействия вида NH...π могут повлиять таким образом, что структуру будет невозможно предсказать на основании последовательности аминокислот.

Конкуренция различных взаимодействий приводит к двум конформерам трипептидов *Ac-Phe-Gly-NH₂* и *Ac-Gly-Phe-NH₂*. Наиболее устойчивый изомер *Ac-Phe-Gly-NH₂* имеет структуру β_L(a)-γ_L, а менее выгодный изомер имеет конфигурацию β-витка. В случае с *Ac-Gly-Phe-NH₂* образуется последовательность двух γ-витков (см. рис. 1.18) и одного β-витка (Chin и др., 2005c). Для *Ac-Phe-Gly-NH₂* предпочтительнее β-виток типа II, тогда как для *Ac-Gly-Phe-NH₂* наиболее вероятен виток типа I. Различные типы β-витков различаются по ориентации основной цепи пептида, характеризуемой двумя наборами углов ψ и φ (Venkatachalan, 1986; Hutchinson и Thornton, 1994). Подобная структура также наблюдается у других дипептидов ряда *Ac-X-Phe-NH₂* (где X = *Ala*, *Val*). В частности, были обнаружены два изомера со структурами γ- или β-витков (Chin и др., 2005b).

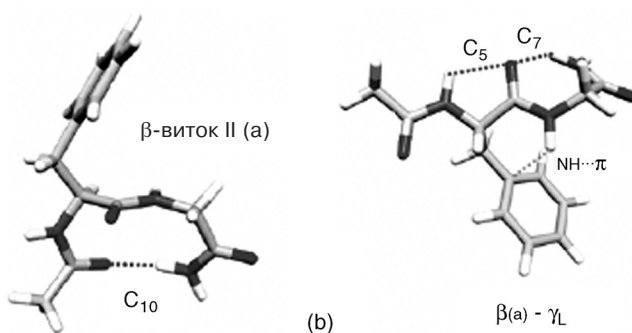
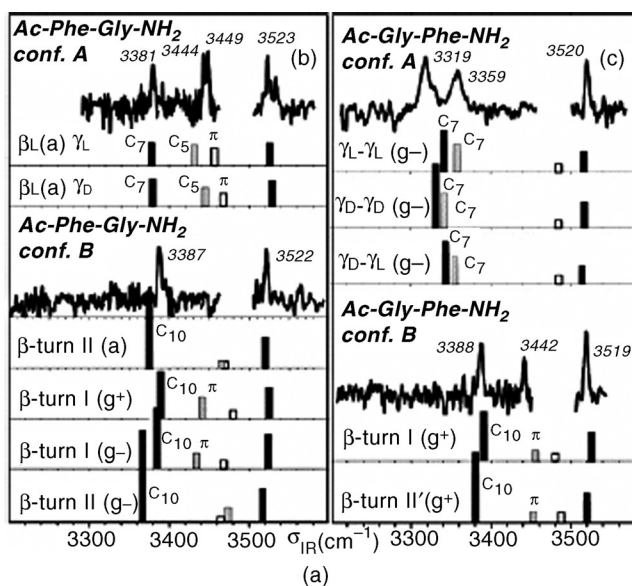


Рис. 1.18. а — ИК/РДФИ спектры области амида А (колебания NH) для различных изомеров пептидов $Ac-Phe-Gly-NH_2$ и $Ac-Gly-Phe-NH_2$. Наиболее интенсивные изомеры А трипептидов $Ac-Phe-Gly-NH_2$ и $Ac-Gly-Phe-NH_2$ имеют структуры $\beta_L-\gamma_L$ (сравните с подобной структурой на рис. 1.8с) и $\gamma_L-\gamma_L$ (сравните с рис. 1.8е), соответственно. Второй компонент В представляет различные структуры β -витка (типы II и I) для двух модельных трипептидов. Вычисленные колебательные частоты получены методом ТФП (уровень V3LYP/6-31 + G(d)). Подробнее см. Chin и др. (2005).) (Рисунок взят из Chin и др. (2005с).); б — самые устойчивые структуры у $Ac-Phe-Gly-NH_2$. Структура $\beta_L(a)-\gamma_L$ включает не только взаимодействие C5 и C7, но также и взаимодействие N—H... π между основной и боковой цепями, что стабилизирует связь. (Рисунок взят из Chin и др. (2005с).)

Изучение дипептидов было продолжено для защищенных трипептидов, которые используются как модели тетрапептидов. В недавних публикациях группа Монса исследовала системы $Ac-Phe-Gly-Gly-NH_2$ (Chin и др., 2005a), $Ac-Ala-Phe-Ala-NH_2$, $Ac-Ala-Ala-Phe-NH_2$ и $Ac-Phe-Ala-Ala-NH_2$ (Chin и др., 2005e). $Ac-Phe-Gly-Gly-NH_2$ имеет структуру с двумя последовательными β -витками (см. рис. 1.8g) при отсутствии винтовой структуры. $Ac-Phe-Ala-Ala-NH_2$ содержит комбинацию структур β -пласта и двух γ -витков ($\beta_L(a)-\gamma_L-\gamma_L$). $Ac-Ala-Ala-Phe-NH_2$ формирует структуру, содержащую β -виток и мотив γ_L (Chin и др., 2005e) (см. рис. 1.8f). Третий изомер, $Ac-Ala-Phe-Ala-NH_2$, служит первой динамической моделью для описания винтовой структуры типа 3_{10} , в которой наблюдаются два последовательных β -витка (типа III и типа I), что указывает на начало винтовой структуры, состоящей из трех аминокислотных остатков на одном витке (Chin и др., 2005e) (рис. 1.8h).

Группа автора этой главы продолжила работу с модельным трипептидом $Ac-Val-Tyr(Me)-NHMe$ (Fricke и др., 2004). Хромофор здесь — тирозин, содержащий группу OMe вместо группы OH . Такая модификация была сделана для того, чтобы исключить образование любых внутримолекулярных водородных связей с группой OH боковой цепи. Для данной молекулы был получен только один изомер. Его структура может быть интерпретирована как $\beta_L-\beta_L$ (структура, полностью относящаяся к β -пласту) (Fricke и др., 2004) (см. рис. 1.19). Так как спектральные параметры для β -витков очень схожи, то для модельного трипептида был записан полный спектр вплоть до частот 1000 см^{-1} при помощи нашей лазерной системы с высоким разрешением (см. рис. 1.19 (Fricke и Gerhards, 2005)). Можно сказать, что $Ac-Val-Tyr(Me)-NHMe$ — наиболее хорошо спектроскопически исследованная молекула такого размера. Наша лазерная система с высоким разрешением помогла зарегистрировать спектры в области валентных колебаний NH и амида I/II вплоть до характеристичной области $\sim 1000\text{ см}^{-1}$. Тем не менее, спектры, наблюдаемые для двух полностью различных структур, описанных здесь, очень похожи. Это является хорошим примером того, что спектральные исследования иногда неоднозначны. Хотя обширная спектральная информация и может быть получена (см. например, интерпретацию $Ac-Phe-OMe$ в разделе 1.4), надежная идентификация структуры возможна только по полному спектру.

Наконец, был исследован модельный тетрапептид $Ac-Leu-Val-Tyr(Me)-NHMe$, в результате чего были получены две структуры, содержащие или набор трех последовательных γ -витков, или комбинацию β - и γ -витков (Fricke и др., 2006c). Поводом для выбора такого варианта тетрапептида послужила идея моделирования пептида $KLIVFF$ ($Lys-Leu-Val-Phe-Phe$) (в нашей модели вместо Phe присутствует Tyr), важного для изучения болезни Альцгеймера (см. раздел 1.6).

Можно сказать, что большая часть исследований защищенных пептидов была выполнена до сих пор с целью систематического исследования элементов вторичных структур и понимания движущих сил и механизмов свертывания пептидов. По незащищенным пептидам были опубликованы две статьи, рассматривающие системы $Trp-Gly$, $Gly-Trp$ и $Trp-Gly-Gly$ с помощью ИК/РДФИ спектроскопии в области валентных колебаний NH (Hünig и Kleinermanns, 2004), а также в характеристичной области спектра при применении лазера на свободных электронах (Bakker и др., 2005). В случае с $Trp-Gly$ были обнаружены, по крайней мере, четыре конформера. Однако ИК спектры были получены только для двух из них. Наиболее интенсивный изомер практически полностью развернут. Однако взаимодействие $N-H\cdots NH_2$ между группой NH Trp и группой NH_2 свободной кислоты все еще имеет место. Для $Gly-Trp$ наблюдаются два конформера, и для обоих наблюдается (как и для $Trp-Gly$) взаимодействие $N-H\cdots NH_2$. Однако один конформер более вытянутый (развернутый), тогда как другой содержит прочную водородную связь $OH\cdots O=C$ между груп-

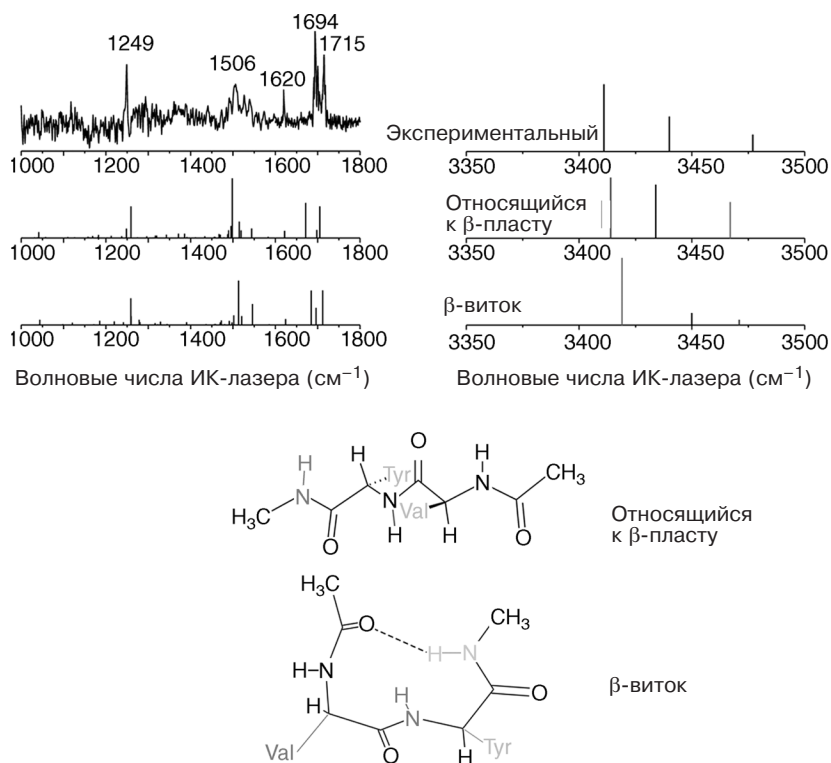


Рис. 1.19. ИК/РДФИ спектр модельного трипептида *Ac-Val-Tyr(Me)-NHMe* в областях амида A (колебания NH) и амида I/II (см. также Fricke и др. (2004)), а также в характеристичной области спектра вплоть до 1000 см⁻¹. Сравнивая экспериментальный спектр с расчетным (ТФП, функционал *B3LYP*, базисный комплект 6-31 + *G(d)*), невозможно сделать однозначный выбор между структурой β-пласта и структурой β-витка, что указывает на трудности, которые могут возникнуть в некоторых случаях несмотря на наличие спектральной информации

пой COOH глицина и группой CO *Trp*. Для трипептида *Trp-Gly-Gly* наблюдаются два изомера. В одном изомере обнаруживается прочная водородная связь OH...O=C между группой COOH и первым, и вторым глициновыми остатками. Кроме того, образуется водородная связь между NH индольной группы и C=O группы COOH. За исключением взаимодействия N-H...NH₂, второй изомер практически полностью развернут. Структуры, полученные на основе ИК спектров, не совсем однозначны, и из-за дополнительных свободных групп COOH и NH₂ необходимо рассчитывать больше структур для свободных пептидов, чем для защищенных систем. Данные группы могут участвовать в нескольких водородных связях (см. например, простую молекулу *Phe* (Snoek и др., 2000)), что приводит к усложнению анализа структуры.

Третий класс важных пептидов — это циклопептиды, у которых N- и C-концы соединены. Данные молекулы представляют интерес с точки зрения выполнения ими различных биологических функций таких, как, например, перенос ионов (Duax и др., 1996; Kubik и др., 2002). Первые спектроскопические исследования изолированных пептидов, отобранных по массе, были выполнены Вайнкауфом и

его коллегами. Они исследовали циклический пептид *Trp—Gly* с помощью РДФИ и УФ/УФ спектроскопии двойного резонанса (Wiedemann и др., 2004). Де Ври и его коллеги первыми применили ИК/РДФИ метод. Они изучали циклопептид *Phe—Ser* (Abo-Riziq и др., 2005). Для него было обнаружено пять различных изомеров (также с помощью УФ/УФ спектроскопии двойного резонанса). ИК спектры изомеров, а также соответствующие структуры и их расчетные колебательные частоты показаны на рис. 1.20. Превосходное совпадение расчетных и экспериментальных значений указывает на то, что идентификация различных изомеров может быть достаточно достоверной.

Всего одна статья была опубликована по микросольватации пептидов. В ней был исследован комплекс *Ac—Val—Tyr(Me)—NHMe(H₂O)₁* (Fricke и др., 2004). По ИК/РДФИ спектру можно сказать, что молекула воды действует как акцептор водорода и соединена водородной связью с защитной группой *NHMe*. Исследование больших кластеров (с большим количеством молекул воды), а также исследования различных кластеров пептид/вода — важное направление будущих экспериментов. Необходимо упомянуть, что наблюдение больших кластеров пептидов с несколькими молекулами воды при помощи масс-спектрометрии — не проблематично, но значительная фрагментация таких кластеров после УФ возбуждения мешает получить однозначную корреляцию между наблюдаемым ИК/РДФИ спектром и размером кластера. Таким образом, необходимо регистрировать бихромные РДФИ спектры (см. рис. 1.1 и 1.2), процесс получения которых характеризуется пониженной фрагментацией.

В настоящее время проводится значительная работа по изучению других типов пептидов (защищенных или незащищенных, циклопептидов). Область применения анализа больших пептидов в газовой фазе быстро растет, и некоторые группы ученых уже преуспели в исследованиях больших систем. Что касается незащищенных разновидностей, дельта-сониндуцирующий нонапептид (ДИСП) был исследован с помощью лазера на свободных электронах в области 600—2200 см⁻¹. Но только с помощью экспериментов в характеристичной области спектра и области амида I/II невозможно отличить свернутые структуры от развернутых (Vakker и др., 2005). Однако этот эксперимент — только первый шаг, который указывает на возможность исследования больших систем. Точно так же циклический грамицидин *S*, состоящий из 10 аминокислотных остатков, был исследован с применением ИК/РДФИ метода в области валентных колебаний NH. У него было обнаружено несколько изомеров (de Vries, 2005). Наконец, модельная система для β-пласта, образованного агрегацией двух трипептидов (димер *Ac—Val—Tyr—NHMe*), была исследована в области валентных NH и C=O колебаний с использованием новой лазерной системы с высоким разрешением (Gerhards и др., 2006а). Этот димер — первая модель β-пласта, которая содержит и «внутренние», и «внешние» связи (см. рис. 1.10). Таким образом, β-пласт служит моделью ячеек, из которых можно составить большой β-пласт путем простого масштабирования.

Все стратегии и результаты схожи тем, что они подтверждают эффективность комбинированной ИК/УФ спектроскопии в качестве мощного инструмента исследования больших пептидных систем. Хотя РДФИ спектры в целом содержат очень широкие пики, соответствующие ИК/РДФИ спектры демонстрируют спектральные переходы с хорошим разрешением. Более того, ширина пика — это признак типа перехода. Узкие пики указывают на наличие свободных NH или CO групп, тогда как более широкие пики соответствуют структурам с водородными связями. Однако данные тенденции незначительно зависят от размера системы. На вопрос, почему ИК спектроскопия намного менее чувствительна, чем УФ спектроскопия, к размеру системы, ответить нелегко. По всей видимости, частично это происходит из-за ситуации, когда в большой молекуле многие существенные колебательные переходы локализова-

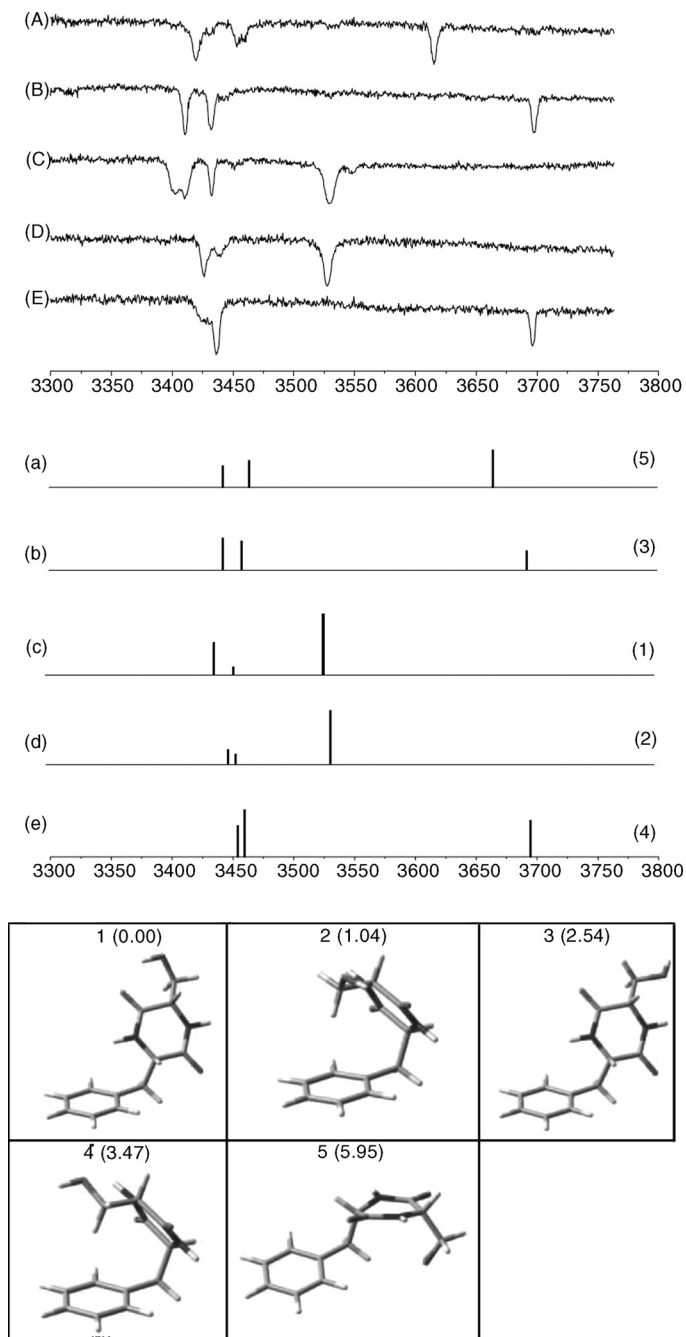


Рис. 1.20. ИК/РДФИ спектры циклопептида *Phe-Ser* для всех пяти экспериментально полученных изомеров. Колебательные частоты рассчитаны методом ТФП (*B3LYP/6-31G(d, p)*). Расчетные частоты превосходно совпадают с экспериментальными значениями, что приводит к однозначному определению (Abo-Riziq и др., 2005) пяти структур, которые приводятся внизу. (Рисунок взят из Abo-Riziq и др. (2005).)

ны. Можно также утверждать, что УФ лазер взаимодействует только с небольшим фрагментом молекулы и что (для некоторых систем) в рамках этого взаимодействия не существует достаточного числа колебательных частот.

Для получения достоверных результатов из комбинированных ИК/УФ исследований необходимо придерживаться следующих правил:

1. Подход должен быть одинаков и для малых, и для больших систем. Как было уже описано в данном обзоре, такой метод оказался очень успешным.
2. Необходимо охватывать широкую спектральную область ИК спектра путем использования лазерных источников наносекундного режима.
3. Если систему невозможно определить с точностью до относительно небольшого числа альтернативных структур, то можно применять спектроскопию высокого разрешения (вращательную), которая в настоящее время имеет большие ограничения на размеры систем, чем ИК/УФ методы.
4. В дополнение ко всем измерениям необходимы тщательные вычисления.

Обычно первоначальный выбор изомера выполняется при помощи вычислений методом силовых полей и молекулярной динамики. Самые устойчивые конформеры затем рассчитывают методами *ab initio* и ТФП, и, если возможно, также на уровне теории *MP2* (см. раздел 1.7). Представляется также логичным учитывать ангармонические связи, особенно для спектров в середине ИК диапазона с частотами ниже 1000 см^{-1} .

1.6. Молекулярное распознавание

Процесс распознавания молекул чрезвычайно важен для изготовления лекарств. Молекулы, обладающие фармацевтическим эффектом, должны соединяться с рецептором селективно и эффективно. Для производства фармацевтически действенных веществ нужно использовать молекулы, которые точно соответствуют участку связи. Процесс блокирования (связывания) специфических участков — одна из стратегий подавления активности белков, вызывающих заболевания. Так, например, образование больших агрегатов β -пластов вызывает коровью губчатую энцефалопатию (КГЭ), болезнь Якоба-Крейтцфельда (губчатую энцефалопатию человека) и другие прионовые заболевания. β -амилоиды считают первичной причиной возникновения болезни Альцгеймера (Mestel, 1996; Prusiner, 1996; Riesner и др., 1996; Lansbury, 1996; Carrell и Lomas, 1997; Wisniewski и др., 1998; Pitschke и др., 1998). Последовательность *KLIVFF* — это фрагмент в центральной области $A\beta$, которую можно ингибировать блокированием (Kirsten и Schrader, 1997; Rzepecki и др., 2004a, b; Rzepecki и Schrader, 2005; Schrader и Kirsten, 1996; Kirsten и Schrader, 1997; Tjernberg и др., 1996). У всех патогенных белков, которые вызывают КГЭ и болезни Якоба-Крейтцфельда и Альцгеймера, есть явно выраженные структуры β -пластов. Используя стратегию получения шаблонных молекул, которые могут соединяться в β -пласты, был проверен класс аминопиразоловых молекул (Kirsten и Schrader, 1997; Rzepecki и др., 2004b; Schrader и Kirsten, 1996). Аминопиразолы образуют по два таутомера. Таким образом, они способны соединяться с пептидами с образованием двух или трех водородных связей (см. рис. 1.21). Эффективность и селективность этих шаблонов для различных пептидов требует детального анализа молекулярных взаимодействий, особенно прочности водородной связи между шаблоном и пептидом. Для того, чтобы определить влияние межмолекулярных водородных связей на взаимодействие шаблона с пептидом, группа автора предприняла систематическое исследование различных изолированных кластеров пептидов с шаблонными молекулами. Первоначальные ис-

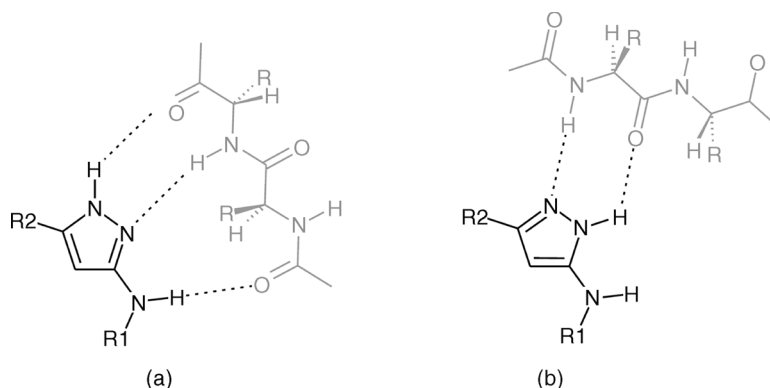


Рис. 1.21. Различные возможности аминокимидазольных производных агрегировать к основе пептида. Могут образоваться два различных таутомера, и только один, показанный на рис. (а), имеет три межмолекулярных водородных связи (участки связи). Количество и сила связей отвечают за селективность и эффективность агрегата и влияют на выбор заместителей R1 и R2

следования были выполнены для самых простых моделей: кластеров пиразола или (метил)аминопиразола с защищенной аминокислотой *Ac—Phe—OMe* (Unterberg и др., 2002). Полученный кластер имеет две очень устойчивые водородные связи, характеризующиеся большим красным смещением колебательных частот группы NH (по сравнению с мономерами) в ИК/РДФИ спектрах. Дальнейшие исследования были распространены на кластеры дипептида *Ac—Val—Phe—OMe* и модельных трипептидов *Ac—Val—Tyr(Me)—NHMe* с различными аминокимидазолами (с заменами в положениях R1 и R2; см. рис. 1.21) (Gerhards и др., 2006b). Данные исследования четко указывают на сильную конкуренцию между межмолекулярными водородными связями в пределах пептида и внутримолекулярными водородными связями с аминокимидазолами в зависимости от кислотности соответствующего аминокимидазола (Gerhards и др., 2006b).

Еще один очень интересный класс пептидов — это карбопептоиды. В данном случае молекулы сахара включены в пептидную цепь и используются для имитации элементов вторичных структур. Эта концепция также используется при моделировании лекарственных препаратов (*drug design*). Карбопептоиды могут служить жестким шаблоном, влияющим на конформацию основной цепи пептида. Первые эксперименты с молекулярными пучками данных молекул выполнила группа Симонса (Jokusch и Simons, 2005).

Цель всех этих исследований заключалась в том, чтобы понять действие лекарственных препаратов на молекулярном уровне, что должно привести к появлению новых стратегий молекулярного дизайна. Интересный побочный аспект этих исследований — это обнаружение того факта, что фармацевтически действенная молекула не должна иметь массу, превышающую 500 атомных единиц массы, так как иначе органы (например, желудок, кишечник) не смогут ее поглотить. Такое ограничение размеров молекул позволяет провести очень детальный анализ систем высокоспецифическими методами двойного резонанса.

1.7. Вычисление частот колебаний

Основная проблема при определении правильной структуры, сформированной в экспериментах с молекулярным пучком, — это большое разнообразие всевозможных изомеров на поверхности потенциальной энергии (ППЭ) аминокислоты или пептида. Как было упомянуто выше, даже для защищенной аминокислоты нужно рассматривать минимум 27 разновидностей, если принимать во внимание только два угла основной цепи ψ и ϕ и угол χ_1 , который характеризует ориентацию боковой цепи. Если необходимо принять во внимание дополнительные углы, например, ω (характеризующий *цис-/транс*-изомеры) или χ_2 (характеризующий боковую цепь; см. рис. 1.7) для более чем одного набора углов ψ и ϕ , то количество возможных изомеров значительно возрастает. Если необходимо исследовать большие пептиды или кластеры пептидов с молекулами растворителя (обычно воды), то количество изомеров возрастает в большей степени. Для определения самых устойчивых изомеров необходимо сначала рассмотреть ППЭ наиболее дешевым методом. Поэтому сначала выполняют вычисления силовых полей в сочетании с методами молекулярной динамики, используя различные потенциалы, например, *Amber* (Cornell и др., 1995; Kollman и др., 1997), *OPLS-AA* (Jorgensen et al., 1996) или *CFF* (Клен et al., 1998; CFF, 2000). Первые два потенциала используют, например, группы Уэльса и Цвира (Evans и др., 2004), тогда как *CFF* применялся нашей группой (Gerhards и др., 2004). *CFF* — это силовое поле класса II, которое параметризуется на основе *ab initio* данных и может быть использовано для предсказания колебательных частот. На первом шаге вычислений конформационный рельеф интересующей системы сканируют модифицированным методом дискретной динамики (Stillinger и Weber, 1983; Kratochvil и др., 2000). При произвольной начальной геометрии выполняются расчеты для укороченного цикла молекулярной динамики (обычно ~2 пс с шагом в 1 фс) при некоторой температуре T . Геометрия полностью оптимизируется и сохраняется для последующего анализа. Полученная структура повторно нагревается до температуры T (т.е., генерируется новый набор импульсов), и выполняется еще один укороченный цикл. Данная процедура выполняется до обнаружения новых минимумов и повторяется для различных температур моделирования. Все минимумы сортируются по их относительной энергии.

После отбора самых стабильных конформеров, полученных при использовании сочетания вычислений методами силовых полей и молекулярной динамики, производятся *ab initio* и ТФП вычисления для нахождения достоверных колебательных частот (см. ниже) и относительных энергий. Использовались различные уровни *ab initio* вычислений, начиная с методов Хартри-Фока (ХФ) и теории функционалов плотности (ТФП) и заканчивая вычислениями Меллера-Плессета (*MP2*). Для больших систем полностью оптимизированные ТФП вычисления выполняются для ряда возможных изомеров, что занимает много времени. Таким образом, только *MP2* вычисления в одной точке можно выполнить для геометрии, оптимизированной методом ТФП. Необходимо указать, что в случае энергетически очень близких изомеров необходима полная оптимизация на уровне *MP2*, что, конечно, также требует больших базисных наборов (по крайней мере, тройной ζ -уровень). Метод *RI-MP2* также может быть полезен (Feuerstein и Fitzgerald, 1993; Weigend и др., 1998). Однако полностью оптимизированные *MP2* вычисления для больших систем (ди- и трипептидов) все еще отнимают очень много времени.

Следующее заключение основано на множестве публикаций для различных типов защищенных аминокислот и пептидов, упомянутых выше (Gerhards и др., 2002, 2004; Fricke и др., 2004, 2006; Snoek и др., 2000, 2001; Gerhards, Unterberg, 2002; Chin и др., 2005a-e; Compagnon и др., 2005; Bakker и др., 2003; Dian и др., 2002, 2003; Unterberg и др., 2003; Hünig, Kleinermanns, 2004; Bakker и др., 2005; Abo-Riziq и др., 2005). Колебательные частоты коррелируют с геометрическими размерами. У незащищенной

аминокислоты частоты свободных валентных колебаний OH равны приблизительно 3580 см^{-1} и имеют сильное красное смещение $\sim 3220\text{--}3280\text{ см}^{-1}$ в случае наличия водородных связей. Антисимметричные валентные колебания NH наблюдаются между 3400 и 3430 см^{-1} , а симметричные валентные колебания NH — между 3340 и 3370 см^{-1} . У защищенной аминокислоты со свободной группой NH_2 в амидной группе $\text{O}=\text{C}-\text{NH}_2$ антисимметричные валентные колебания NH обычно наблюдаются при $\sim 3510\text{--}3550\text{ см}^{-1}$. Невозмущенные (т.е., в отсутствие водородной связи) симметричные валентные колебания NH группы NH_2 имеют частоту $\sim 3425\text{ см}^{-1}$. В случае с защищенными аминокислотами и пептидами, содержащими группу NHMe вместо группы NH_2 , валентные колебания NH имеют частоту $\sim 3470\text{ см}^{-1}$, если группа NH не участвует в образовании водородных связей. Валентные колебания NH, которые принадлежат свободной группе NH основной цепи пептида, обычно расположены в диапазоне $\sim 3400\text{--}3470\text{ см}^{-1}$. Точная частота сильно зависит от выбранной аминокислоты и от вторичной структуры. Например, если свободная группа NH — часть структуры, относящаяся к β -пласту или γ -витку, значения частоты немного другое. Однако для определения таких структурных деталей необходимо большее количество данных, полученных при исследовании дипептидов и трипептидов. В области $\sim 3400\text{ см}^{-1}$ находятся частоты, которые соответствуют слабым водородным связям с группой NH, появляющимся, например, в структурах с β -витками. Взаимодействие группы NH с π -системой приводит к небольшому красному смещению наблюдаемой частоты. Частоты значительно меньшие, чем 3400 см^{-1} , определенно принадлежат группе NH, участвующей в образовании водородных связей. Красное смещение сильно зависит от прочности водородной связи, т.е. значения частот валентных колебаний в этом случае могут находиться в диапазоне от 3260 до 3390 см^{-1} . Обычно данные группы NH, участвующие в водородных связях, входят в состав γ -витка. Если группа NH_2 входит в структуру с водородными связями, то уменьшаются частоты не только группы NH, но также и асимметричных валентных колебаний группы NH. Последняя частота находится теперь в более низкочастотной области диапазона $3510\text{--}3550\text{ см}^{-1}$, упомянутого выше. Наиболее стабильная колебательная частота принадлежит свободной группе NH индольной боковой цепи *Trp*. Независимо от типа пептида или аминокислоты частота постоянна в пределах нескольких волновых чисел в диапазоне $\sim 3520\text{--}3525\text{ см}^{-1}$.

При исследовании пептидов наиболее пристальное внимание уделяется группам NH и CO, так как валентные колебания связи CO находятся в области амида I с частотами $\sim 1600\text{--}1800\text{ см}^{-1}$. Частота колебаний связи CO карбоксильной группы свободной аминокислоты равна $\sim 1790\text{ см}^{-1}$. Для эфира эта частота равна $\sim 1760\text{ см}^{-1}$. Если группа CO принадлежит амидной группе основной цепи пептида или защитной амидной группе конца пептида, ее частота равна $\sim 1700\text{ см}^{-1}$, в диапазоне от 1650 до 1730 см^{-1} . Различия между валентными колебаниями $\text{C}=\text{O}$ в этом случае очень незначительны (несколько волновых чисел). Однако спектры, полученные для подобных связей, очень характеристичны и позволяют различать разные конформеры основной цепи пептида. То же самое относится и к группам $\text{C}=\text{O}$, участвующим в создании водородных связей. Красное смещение соответствующих колебаний вследствие образования водородной связи мало (иногда всего 10 см^{-1}), но различимо.

Для разрешения очень близлежащих валентных колебаний CO необходимо использовать лазерные системы с высоким разрешением. Иначе наблюдается только один широкий нехарактеристичный переход, охватывающий все валентные колебания $\text{C}=\text{O}$ (колебания амида I). Наконец, необходимо упомянуть и о том, что в области от 1000 до $\sim 1400\text{ см}^{-1}$, в которой находится высокочастотная характеристичная область ИК спектра, находятся деформационные колебания $\text{C}-\text{H}$. В диапазоне от ~ 1400 до 1600 см^{-1} область амид II имеет окно, содержащее деформационные колебания NH.

Во всех публикациях, касающихся пептидных моделей, колебательные частоты характеристичной части ИК спектра ($>1000\text{ см}^{-1}$) вплоть до области валентных колебаний NH и OH (в случае со свободными группами COOH или гидратированными кластерами) рассчитывают на основе анализа нормальных колебаний. Выбирают различные уровни, начиная с ХФ и до ТФП (обычно с функционалом *B3LYP*) и метода *MP2* (обычно используемого только для вычисления отдельной точки для оптимизированной структуры). Оказывается, что вычисления методом ХФ с использованием малого базисного набора (*3-21G(d)*) приводят к очень полезным результатам, если принимать во внимание только масштабированные колебательные частоты. Таким образом, интерпретацию спектра можно осуществить с помощью этого простого метода. Однако порядок расположения различных изомеров в соответствии с возрастанием их энергий может быть неправильным. По мере возможности должны использоваться вычислительные методы высокого уровня. Однако большой базисный набор, особенно в случае использования *MP2*, просто необходим. Для дипептидов ТФП-вычисления с использованием функционала *B3LYP* и двойного базисного набора $\zeta\text{-6-31} + G(d)$ (который частично содержит поляризационную и диффузную функции) являются своего рода стандартом для вычислений частот. Еще один подход был проверен с помощью частот, непосредственно полученных из вычислений методом силовых полей (Jansen и др., 2006). Использовался метод *CFE*. За исключением групп C=O, участвующих в водородных связях, и групп N—H с π -связями, были получены многообещающие результаты. Настоятельно рекомендуется систематическое использование методов низкого уровня для предсказания частот вследствие быстрого прогресса экспериментальных методов исследования больших пептидов.

При интерпретации характеристичной области ИК спектра с частотами ниже 1000 см^{-1} гармоническое приближение не работает. Таким образом, необходимо рассчитывать ангармонические частоты различных колебательных режимов (см., например, Wagner и др. (2005)). Если бы было возможно надежно предсказывать параметры таких колебаний, то огромное количество известных колебательных частот помогло бы правильному определению конформеров.

1.8. Заключение и перспективы

Приложения, описанные в этой главе, демонстрируют разнообразие экспериментальных методов, позволяющих анализировать структуры для различных электронных состояний. Эти методы позволяют получить подробные сведения о стандартных пептидных блоках на молекулярном уровне. Экспериментальная спектроскопия высокого разрешения и методы двойного резонанса с отбором изомеров в сочетании с масс-спектрометрией применяются вместе с теоретическим анализом, начинающимся с силовых полей и заканчивающимся *ab initio* вычислениями высокого уровня. По сравнению с ситуацией, описанной в более ранних обзорах (Pratt, 1998; Robertson и Simons, 2001; Simons, 2003; Zwieter, 2001; см. также специальные издания Mol. Phys. **20**, 2005; Phys. Chem. Chem. Phys. **6**, 2004; Eur. Phys. J. D, 2002), очень большие изменения в этой области произошли в прошлом году. Исследования начались с аминокислот и дипептидов. Впоследствии методы стали применяться к системам больших размеров, и стал возможен анализ процессов свертывания и агрегации пептидов.

Перспективная область исследований — это изучение протонированных (или, более широко, заряженных) частиц высокоселективными методами (двойного резонанса). Эти приложения не рассматривались в данной главе. Однако можно привести один пример, который показывает, что большие протонированные пептиды можно исследовать ИК спектроскопией в газовой фазе: анализ цитохрома *c* с помощью лазера на свободных электронах в ячейке ионного циклотронного резонанса (Oomens



Рис. 1.22. Схема в дополнение к показанной в (Simons, 2003). Указаны два различных направления исследований структур и функций пептидов, начинающихся или с изолированной молекулы в газовой фазе, или с комплексной биофазы. Один из наиболее точных подходов к анализу биологических структур и процессов на молекулярном уровне — это сочетание спектроскопических и масс-спектрических исследований. (Рисунок частично скопирован из Simons (2003).)

и др., 2005). В этих экспериментах была зарегистрирована фрагментация вследствие резонансного ИК возбуждения. Хотя для данного большого белка и нельзя ожидать спектрального разрешения отдельных аминокислотных остатков, возможности исследования больших изолированных пептидов (белков) с помощью ИК спектроскопии были показаны.

Обзор направлений анализа структур и функций биомолекул приводится на рис. 1.22. Один предельный случай — это биофаза, из которой извлекаются большие изолированные (сольватированные) комплексы и анализируются в конденсированном состоянии. Данные системы можно исследовать с точки зрения их биологических функций, но нельзя точно изучить на молекулярном уровне. Другой предельный случай — это небольшая изолированная молекула в газовой фазе, которую можно описать во всех деталях (вращательные константы, колебательные частоты), что дает относительно точное определение ее структуры и динамики. Из данных систем можно составлять кластеры с формированием микросольватационных слоев для моделирования развернутых вторичных структур. С одной стороны, можно определить различия между изолированными частицами и конденсированной фазой. С другой стороны, можно пошагово моделировать влияние окружающей среды (добавляя, например, воду, другие пептиды или частицы молекула за молекулой). Когда размеры пептидов и их оболочки

сольватации, исследуемые в газовой фазе, увеличиваются, размерности систем, анализируемых в растворе, можно уменьшить рассмотрением влияния на специфическую последовательность аминокислот в белке (например, *KLFFF*). Для цели понимания на молекулярном уровне механизмов, ответственных за молекулярное распознавание и формирование вторичных (и, возможно в будущем, также и третичных) структур, мы идем с обеих сторон, проводя исследования в газовой и конденсированной фазах.

Библиография

- Abo-Riziq AG, Crews B, Bushnell JE, Callahan MP, de Vries MS (2005): Conformational analysis of cyclo(Phe-Ser) by UV-UV and IR-UV double resonance spectroscopy and ab initio calculations. *Mol. Phys.* **103**:1491–1495.
- Allen WD, Czinki E, Csaszar AG (2004): Molecular structure of proline. *Chem. Eur. J.* **10**:4512–4517.
- Andresen U, Dreizler H, Grabov J-U, Stahl W (1990): An automatic molecular beam microwave Fourier transform spectrometer. *Rev. Sci. Instrum.* **61**:3694–3699.
- Bakker JM, Aleese LM, Meijer G, von Helden G (2003): Fingerprint IR spectroscopy to probe amino acid conformations in the gas phase. *Phys. Rev. Lett.* **91**:203003/1–203003/4.
- Bakker JM, Plützer C, Hünig I, Häber T, Compagnon I, von Helden G, Meijer G, Kleinermanns K (2005): Folding structures of isolated peptides as revealed by gas-phase mid-infrared spectroscopy. *Chem. Phys. Chem.* **6**:120–128.
- Balle TJ, Flygare WH (1981): Fabry-Perot cavity pulsed Fourier transform microwave spectrometer with a pulsed nozzle particle source. *Rev. Sci. Instrum.* **52**:33–45.
- Baskin JS, Felker PM, Zewail AH (1986): Doppler-free time-resolved polarization spectroscopy of large molecules: Measurement of excited state rotational constants. *J. Chem. Phys.* **84**:4708–710.
- Bergmann T, Martin TP, Schaber H (1989): High-resolution time-of-flight mass-spectrometer. *Rev. Sci. Instrum.* **60**:792–793.
- Berulis II, Winnewisser G, Krasnov VV, Sorochenko RL (1985): A search for interstellar glycine. *Sov. Astron. Lett.* **11**:251–253.
- Bettens FL, Bettens RPA, Brown RD, Godfrey PD (2000): The microwave spectrum, structure, and ring-puckering of the cyclic dipeptide diketopiperazine. *J. Am. Chem. Soc.* **122**:5856–5860.
- Blanco S, Lesarri A, Lopez JC, Alonso JL (2004): The gas-phase structure of alanine. *J. Am. Chem. Soc.* **126**:11675–11683.
- Bludsky O, Chocholousova J, Vacek J, Huisken F, Hobza P (2000): Anharmonic treatment of the lowest-energy conformers of glycine: A theoretical study. *J. Chem. Phys.* **113**:4629–4635.
- Boesl U, Weinkauff R, Schlag EW (1992): Reflectron time-of-flight mass-spectrometry and laser excitation for the analysis of neutrals, ionized molecules and secondary fragments. *Int. J. Mass Spectrom Ion Proc.* **112**:121–166.
- Bondybey VE, English JH (1981): Laser-induced fluorescence of metal-clusters produced by laser vaporization — gas-phase spectrum of pb-2. *J. Chem. Phys.* **74**:6978–6979.
- Brauer B, Chaban GM, Gerber RB (2004): Spectroscopically-improved, semi-empirical potentials for biological molecules: Calculations for glycine, alanine and proline. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **6**:2543–2556.
- Brauer B, Gerber RB, Kabelac M, Hobza P, Bakker JM, Riziq AGA, de Vries MS (2005): Vibrational spectroscopy of the G· · · C base pair: Experiment, harmonic and anharmonic calculations, and the nature of the anharmonic couplings. *J. Phys. Chem. A.* **109**:6974–6984.
- Brown RD, Godfrey PD, Storey JWV, Bassez MP (1978): Microwave-spectrum and conformation of glycine. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1**:547–548.
- Cable JR, Tubergen MJ, Levy DH (1987): Laser desorption molecular beam spectroscopy: The electronic spectra of tryptophan peptides in the gas phase. *J. Am. Chem. Soc.* **109**:6198–6199.
- Table JR, Tubergen MJ, Levy DH (1988a): Electronic spectroscopy of small tryptophan peptides in supersonic molecular beams. *J. Am. Chem. Soc.* **110**:7349–7355.
- Table JR, Tubergen MJ, Levy DH (1988b): The electronic spectra of small peptides in the gas phase. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **86**:143–152.
- Taminati W (2004): The rotational spectra of conformers of biomolecules: Tryptamine. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **6**:2806–2809.