



ОПТИКА И СПЕКТРОСКОПИЯ. ЛАЗЕРНАЯ ФИЗИКА

Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2024. Т. 24, вып. 4. С. 340–347
Izvestiya of Saratov University. Physics, 2024, vol. 24, iss. 4. P. 340–347
<https://fizika.sgu.ru> <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2024-24-4-340-347>, EDN: BGZOZH

Научная статья
УДК 543.424.2

Сравнительный анализ низкочастотных колебательных спектров нативных и денатурированных белков

А. А. Манькова[✉], Н. Н. Брандт, А. Ю. Чикишев

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Россия, 119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1

Манькова Анна Александровна, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник кафедры общей физики физического факультета, mankova@physics.msu.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0583-2458>, Scopus AuthorID: 37081398700

Брандт Николай Николаевич, кандидат физико-математических наук, доцент, доцент кафедры общей физики и волновых процессов физического факультета, brandt@physics.msu.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1100-9652>, ResearcherID: J-9616-20126

Чикишев Андрей Юрьевич, доктор физико-математических наук, профессор, профессор кафедры общей физики и волновых процессов физического факультета, ach@ilc.msu.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7002-3775>, Scopus AuthorID: 55936209600

Аннотация. Изменения вторичной и третичной структур белковых молекул при термической денатурации приводят к изменениям их колебательных спектров. В диапазоне «отпечатков пальцев» проявляются колебания, соответствующие элементам первичной и вторичной структуры белка, в то время как в низкочастотном (НЧ) спектральном интервале ($40\text{--}500\text{ см}^{-1}$) могут наблюдаться моды колебаний крупных фрагментов, соответствующие более высоким уровням иерархии структуры белка. Проведено сравнение колебательных спектров двух белков (коллагена и химотрипсина), имеющих различные вторичные и третичные структуры, а также спектры термически денатурированных образцов этих белков в диапазоне «отпечатков пальцев» и НЧ диапазоне. Выявлены некоторые спектральные особенности, которые могут характеризовать изменения третичной структуры белковых молекул.

Ключевые слова: структура молекул белков, вторичная структура, третичная структура, химотрипсин, коллаген, спектроскопия комбинационного рассеяния

Благодарности: Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития МГУ имени М. В. Ломоносова.

Для цитирования: Манькова А. А., Брандт Н. Н., Чикишев А. Ю. Сравнительный анализ низкочастотных колебательных спектров нативных и денатурированных белков // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2024. Т. 24, вып. 4. С. 340–347. <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2024-24-4-340-347>, EDN: BGZOZH

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

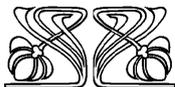
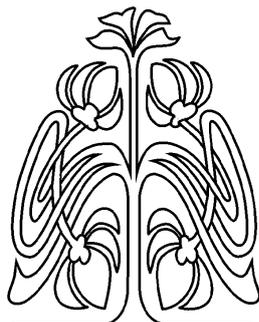
Article

Comparative analysis of low-frequency vibrational spectra of native and denatured proteins

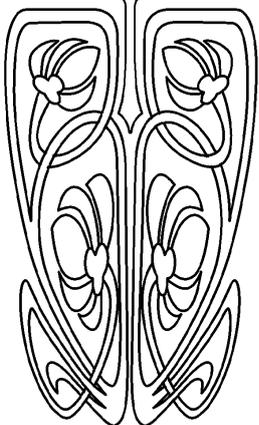
A. A. Mankova[✉], N. N. Brandt, A. Yu. Chikishev

Lomonosov Moscow State University, GSP-1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia

© Манькова А. А., Брандт Н. Н., Чикишев А. Ю., 2024



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ





Anna A. Mankova, mankova@physics.msu.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0583-2458>, Scopus AuthorID: 37081398700
 Nikolay N. Brandt, brandt@physics.msu.ru <https://orcid.org/0000-0003-1100-9652>, ResearcherID: J-9616-20126
 Andrey Yu. Chikishev, ach@ilc.msu.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7002-3775>, Scopus AuthorID: 55936209600

Abstract. Background and Objectives: Changes in the secondary and tertiary structures of protein molecules during thermal denaturation lead to changes in their vibrational spectra. Vibrations corresponding to elements of the primary and secondary structure of the protein are manifested in the fingerprint range, while vibrational modes of large fragments corresponding to higher levels of the protein structural hierarchy can be observed in the low-frequency ($40\text{--}500\text{ cm}^{-1}$) spectral range. The purpose of this work is to reveal changes in the vibrational spectra of proteins resulting from denaturation that can be used to characterize changes in the protein structure. **Materials and Methods:** Two proteins (collagen and chymotrypsin) having different secondary and tertiary structures are studied using Raman spectroscopy. The experimental data are analyzed using bandpass filtering of the Fourier transforms of the spectral curves. **Results:** Vibrational spectra of two proteins (collagen and chymotrypsin) having different secondary and tertiary structures, as well as the spectra of thermally denatured samples of these proteins have been measured in the fingerprint and low-frequency ranges. Several low-frequency spectral features that can be used to characterize structural changes of protein molecules have been considered. A few bands may correspond to vibrations of tertiary structure elements (both in the low-frequency range and in the “fingerprint” range). **Conclusion:** A comparison of the vibrational spectra of native and denatured (superhelical) collagen, as well as native and denatured (globular) chymotrypsin shows that changes in the amide I and amide III bands sensitive to the secondary structure are supplemented with spectral changes in bands that are not assigned to elements of the secondary structure and can be related to changes at higher levels of structural hierarchy. Comparison of the low-frequency vibrational spectra indicates a lower sensitivity of presumably tertiary structure of the globular protein to denaturation.

Keywords: protein structure, secondary structure, tertiary structures, chymotrypsin, collagen, Raman spectroscopy

Acknowledgements: This work was supported in part by the Lomonosov Moscow State University Development Program.

For citation: Mankova A. A., Brandt N. N., Chikishev A. Yu. Comparative analysis of low-frequency vibrational spectra of native and denatured proteins. *Izvestiya of Saratov University. Physics*, 2024, vol. 24, iss. 4, pp. 340–347 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2024-24-4-340-347>, EDN: BGZOZH

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

Введение

Функциональная активность белков взаимосвязана со структурной динамикой, включающей в себя движение крупных доменов молекулы. Такие домены могут содержать упорядоченные фрагменты: α -спиральные и β -структурные элементы. Молекулу белка можно охарактеризовать количественно на уровне первичной (последовательность аминокислот в цепочки полипептида) и вторичной структур. Однако, согласно текущим представлениям, третичная структура характеризуется лишь качественно – как взаимное расположение элементов вторичной структуры. Это обстоятельство затрудняет сравнение третичных структур различных белков. В современной литературе лишь некоторые экспериментальные работы были посвящены анализу третичных структур белковых молекул.

Методы КР спектроскопии широко применяются при изучении биологических молекул. За годы исследований накоплены обширные данные о колебательных спектрах белков. Опубликованы работы с информацией о соотношении многих линий спектра колебаниям определенных функциональных групп. Существенный вклад в колебательные спектры вносят нормальные моды колебаний пептидных связей. Известно, что линии амид А, В, I–VII чувствительны к конформационным изменениям белковой молекулы [1, 2]. Наиболее интенсивные из них (линии амид

I, III) можно использовать для определения относительного содержания элементов вторичной структуры (см., например, [3, 4]). В предыдущих работах мы показали, что специфические взаимодействия (например, связывание субстрата) вызывают конформационные изменения, которые приводят к изменению колебательных спектров [5–7]. В частности, помимо изменений линий амид, наблюдаются изменения соотношений линий тирозинового дублета ($830, 850\text{ cm}^{-1}$) и полос, характеризующих конформацию дисульфидных мостиков. Эти линии также являются конформационно чувствительными, так как известно, что соотношение интенсивностей линий тирозинового дублета зависит от количества скрытых и открытых гидроксильных групп, что определяется конформацией молекулы белка. Относительная интенсивность и положение линий КР спектра на частотах около $510, 525$ и 540 cm^{-1} показывают содержание дисульфидных мостиков в разных конформациях, также определяемое пространственной конфигурацией молекулы. Следовательно, даже при отсутствии существенных изменений вторичной структуры спектральные изменения в некоторых интервалах могут указывать на изменения на более высоких уровнях структурной иерархии.

Отсутствие общепринятых параметров, позволяющих количественно и/или качественно охарактеризовать третичную структуру, затрудняет анализ данных, полученных, в частности, метода-



ми колебательной спектроскопии. В работах [8] была предложена теория о смене знака хиральности при переходе между уровнями структурной иерархии молекулы белка. Авторы предлагают использовать ее для изучения трехмерной структуры белковых молекул: правые α -спирали (вторичная структура), состоящие из L-аминокислот (первичная структура), могут образовывать левые суперспирали (третичная структура). Однако такой подход вряд ли может быть использован при изучении неспиральных белков. В последнее время достигнут значительный прогресс в разработке алгоритмов расчета трехмерных белковых структур на основе аминокислотной последовательности (см., например, [9]). Соответствующие результаты могут помочь в количественной оценке третичной структуры белков.

Несмотря на то, что в последние два десятилетия значительно возрос интерес к изучению НЧ ($10\text{--}500\text{ см}^{-1}$ или $0,3\text{--}15\text{ ТГц}$) колебательных спектров белков [10–13], однозначных соотношений линий НЧ спектра колебаниям молекулы до сих пор нет. Оценки и расчеты методами молекулярной динамики показывают, что колебания крупных фрагментов с массой в несколько сотен и тысяч а. е. м. могут проявляться в НЧ области спектра. Таким образом, соответствующие линии спектра могут быть чувствительны к изменениям третичной структуры.

Существует ряд работ, в которых авторы соотносят линии НЧ КР спектра молекул белков и полипептидов колебаниям элементов вторичной структуры. Так, расчёт колебаний α -спиралей полиглицина [14] предсказывает появление характерных КР линий на частотах 79 и 126 см^{-1} , а колебания полипептидной цепи α -спирального поли-L-аланина могут иметь частоту 122 см^{-1} [15]. В КР спектрах α -спиральных белков (фибриногена, бычьего альбумина, коллагена, лизоцима) колебания наблюдаются в интервале $130\text{--}190\text{ см}^{-1}$ [10]. КР линии на частотах 135 и 170 см^{-1} были обнаружены в спектрах α -спиральных белков, причём положение максимумов интенсивностей характерных линий изменялось в зависимости от последовательности аминокислотных остатков в полипептидной цепи белка [16]. Частота 140 см^{-1} в работе [17] отнесена к крутильным колебаниям суперспирали коллагена. В КР спектрах α -спирального поли-L-аланина наблюдались линии на частотах 163 см^{-1} [18] и 159 см^{-1} [19], которые отнесены к крутильным колебаниям $C_\alpha\text{--}C$ и $N\text{--}C_\alpha$ и деформационным колебаниям $C\text{--}N\text{--}C_\alpha$ и $N\text{--}C_\alpha\text{--}C$ соответственно. Крутильные

колебания $C\text{--}N$ группы также наблюдались в КР спектрах модельного N-метилацетамида на частоте 190 см^{-1} [20]. По данным работы [21], интервал $159\text{--}167\text{ см}^{-1}$ в КР спектрах лизоцима и бычьего альбумина может быть также отнесён к внеплоскостным изгибным колебаниям групп $N\text{--}H$ или $C=O$, или крутильным колебаниям группы $C\text{--}N$.

Однако КР линии в интервале $100\text{--}180\text{ см}^{-1}$ также наблюдаются для белков с преобладающей концентрацией β -листов во вторичной структуре [22, 23]. Например, в работе [22] при сравнении КР спектров β -микроглобулина частоты 80 и 170 см^{-1} были отнесены к колебаниям β -листов в антипараллельной конформации, при этом колебания параллельных β -листов были отмечены на частоте 110 см^{-1} . В работах [23] в КР спектрах кристаллизованного лизоцима и его водного раствора частота $\sim 160\text{ см}^{-1}$ отнесена к деформационным колебаниям β -структур. Авторы основывались на результатах работы [14], в которой для β -формы полиглицина были рассчитаны частоты колебаний 146 и 173 см^{-1} .

Данные о полосе частот $200\text{--}240\text{ см}^{-1}$ подтверждают её принадлежность к колебаниям α -спиральных структур. КР линии вблизи частоты $\sim 200\text{ см}^{-1}$ относят к колебаниям амид VII [24]. Колебания на частоте 240 см^{-1} в КР спектрах α -спиральных лизоцима и миоглобина [25] характеризуют симметричные валентные или крутильные колебания полипептидной цепи. В КР спектрах α -спирального поли-L-аланина [19] линия на частоте 209 см^{-1} была отнесена к деформационным колебаниям $C\text{--}N\text{--}C_\alpha$ и внеплоскостным изгибным колебаниям $C=O$. В КР спектрах поли-L-аланина также наблюдаются линии на частотах 212 и 216 см^{-1} [26]. Частота 217 см^{-1} в КР спектрах полиглицина в α -спиральной конформации [19] характеризует колебания $C\text{--}N\text{--}C_\alpha$ и плоскостные изгибные колебания $C=O$. Линии на частоте $\sim 220\text{ см}^{-1}$ наблюдаются в КР спектрах бычьего альбумина [10, 21] и альбумина человека [10].

Отметим, что в большинстве процитированных работ указывается, что НЧ линии в колебательных спектрах определяются колебаниями остова белковой молекулы (связей типа $C\text{--}N\text{--}C$), что определяет важность исследования НЧ КР спектров белков при рассмотрении проблемы структура-функция.

В работе предпринята попытка анализа колебательных спектров белков с учетом возможного проявления линий, отвечающих третичной структуре молекулы и ее изменениям. Исследованы



спектры комбинационного рассеяния света глобулярного (химотрипсин) и фибриллярного (коллаген) белков, проводится сравнение спектров нативных и денатурированных белков.

Материалы и методы

Спектры комбинационного рассеяния света измерены в спектральном интервале 30–1800 см^{-1} с разрешением 5 см^{-1} с использованием микроспектрометра Thermo Scientific DXR (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны возбуждения 532 нм и мощности возбуждения до 10 мВт.

В экспериментах использовали химотрипсин («Самсон мед») и коллаген (тип IV, «MP Biomedicals», США, CAS 9007-34-5). Термическую денатурацию проводили при температуре 80°C для водных растворов химотрипсина и коллагена, время денатурации составляло 90 и 10 мин соответственно [27]. Образцы представляли собой лиофилизированные порошки.

Обработка спектров проводилась следующим образом. Для определения спектральных особенностей в НЧ интервале применялось преобразование $R(\nu)$ [28]. Затем для устранения фона и подавления шумовой компоненты применялся метод полосовой фильтрации Фурье-образов КР спектров. На рис. 1 представлен

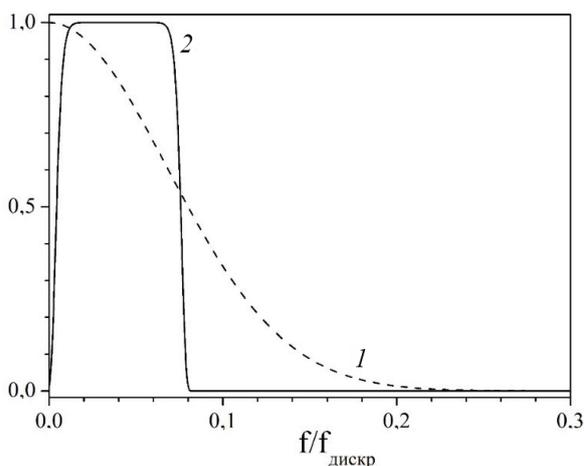


Рис. 1. Фурье-образ модельного спектра, содержащего уединенную гауссову линию с шириной по полувысоте 5 см^{-1} (1) и спектральная характеристика использованного полосового фильтра (2)

Fig. 1. Fourier transform of the model spectra containing a single Gaussian band with a FWHM of 5 cm^{-1} (1) and the spectral characteristic of the bandpass filter (2)

Фурье-образ модельного спектра, содержащего уединенную гауссову линию с шириной по полувысоте 5 см^{-1} , что соответствует КР линии

фенилаланина на частоте 1003 см^{-1} (одной из самых узких линий в спектре белка) и спектральная характеристика использованного полосового супергауссового фильтра.

Результат обработки КР спектра химотрипсина по предложенной выше схеме представлен на рис. 2.

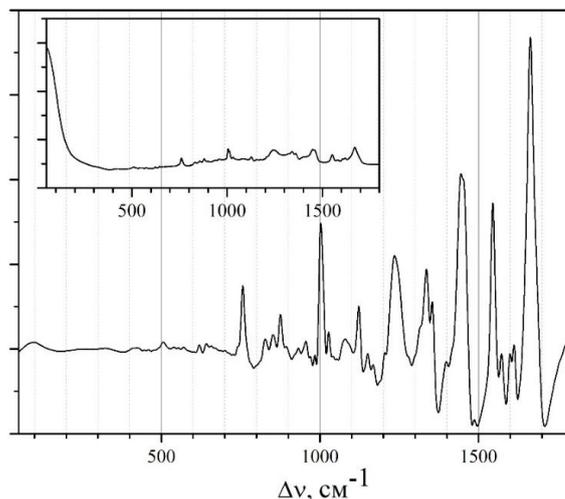


Рис. 2. Результат применения представления $R(\nu)$ и полосовой фильтрации к спектру химотрипсина (показан на вставке)

Fig. 2. Results of the $R(\nu)$ transform and bandpass filtering of the Raman spectrum of chymotrypsin (inset)

Результаты и их обсуждение

На рис. 3 представлены спектры нативного и термически денатурированного коллагена. Коллаген состоит из трех лево закрученных спиралей

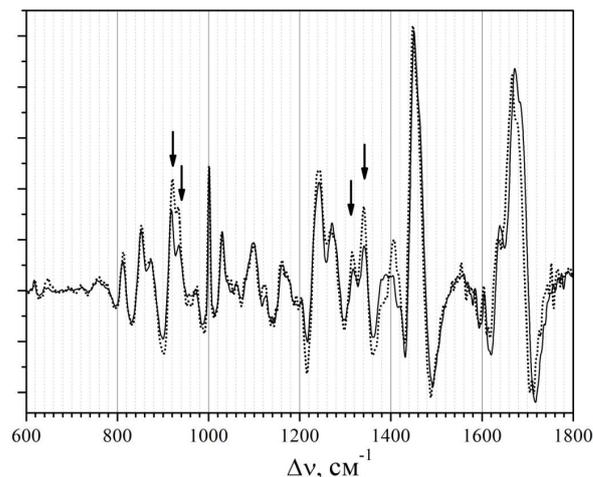


Рис. 3. КР спектры нативного (сплошная линия) и термически денатурированного (пунктирная линия) коллагена. Стрелками отмечены основные спектральные изменения

Fig. 3. Raman spectra of native (solid line) and thermally denatured (dotted line) collagen. The arrows show the main spectral changes



(элементов вторичной структуры), которые вместе образуют правозакрученную суперспираль (его третичную структуру) [29–31].

Изменения линий амид I ($1600\text{--}1710\text{ см}^{-1}$) и амид III ($1200\text{--}1300\text{ см}^{-1}$) могут быть вызваны незначительными изменениями вторичной структуры при денатурации. Обратим также внимание на изменения относительных интенсивностей двух полос с максимумами 920 и 940 см^{-1} и двух полос с максимумами 1314 и 1337 см^{-1} . В соответствии с существующими представлениями в этих спектральных интервалах проявляются колебания атомных групп N-C α -C, C-C, C-N, C-C α -H, C α -C и N-C-N [32, 33, 4]. Такие колебания могут быть чувствительны к структурным изменениям белковой молекулы. Сходство спектральных полос, определяемых вторичной структурой, позволяет предположить, что наблюдаемые спектральные изменения вызваны отличиями на более высоких уровнях иерархии структуры белка.

На рис. 4 сравниваются спектры комбинационного рассеяния нативного и термически денатурированного химотрипсина.

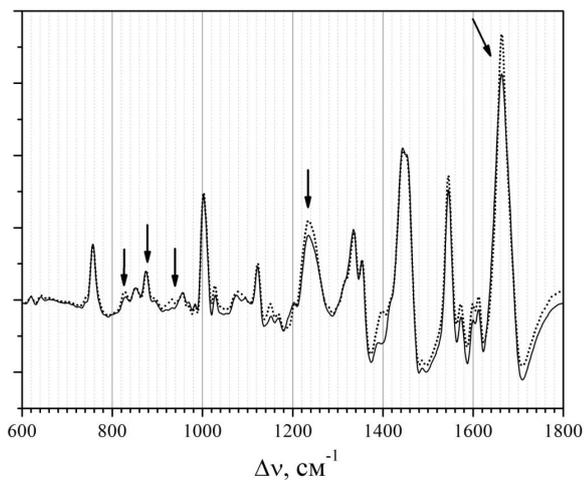


Рис. 4. КР спектры нативного (сплошная линия) и термически денатурированного (пунктирная линия) химотрипсина. Стрелками отмечены основные спектральные изменения

Fig. 4. Raman spectra of native (solid line) and thermally denatured (dotted line) chymotrypsin. The arrows show the main spectral changes

Изменения, наблюдаемые для линии амид I, указывают на изменения во вторичной структуре, возникающие в результате денатурации. Спектральные изменения относительных интенсивностей двух полос с максимумами 920 и 940 см^{-1} дополняются изменениями тирозинового дублета (830 и 850 см^{-1}).

На рис. 5, а представлены НЧ спектры комбинационного рассеяния нативного и денатурированного коллагена. Спектральные изменения в интервале $60\text{--}200\text{ см}^{-1}$ могут быть следствием изменений вторичной структуры [10].

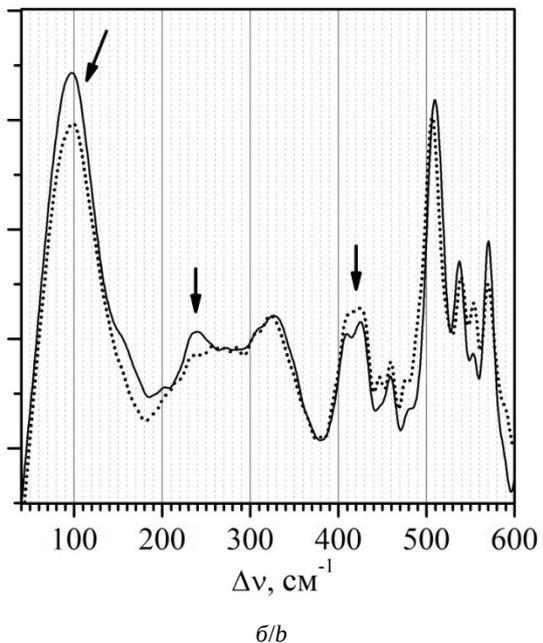
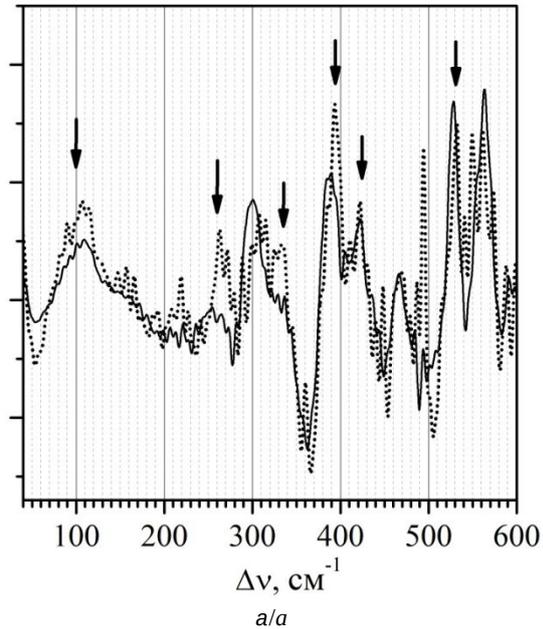


Рис. 5. КР спектры нативных (сплошные линии) и термически денатурированных (пунктирные линии) коллагена (а) и химотрипсина (б). Стрелками отмечены основные спектральные изменения

Fig. 5. Raman spectra of native (solid lines) and thermally denatured (dotted lines) collagen (a) and chymotrypsin (b). The arrows show the main spectral changes

Видно отличие интенсивностей и формы широких линий в спектрах обоих белков с центральным максимумом на частоте около 100 см^{-1} .



В образовании водородных связей в белке может участвовать NH группа, причём характерная КР линия появляется в спектрах, например, N-метилацетамида, альбумина и глобулина на частоте 100 см^{-1} , и монотонно уменьшается с увеличением температуры [34]. На этой же частоте могут происходить дыхательные колебания тройной суперспирали коллагена, зависящие также от степени его гидратации [17].

Отметим существенное отличие спектров коллагена и денатурированного коллагена в интервале $200\text{--}360\text{ см}^{-1}$. Согласно литературным данным, линия на частоте 327 см^{-1} может быть отнесена к деформационным колебаниям полипептидной цепи или валентным колебаниям N-C [35]. Согласно [35], линия на частоте 260 см^{-1} может быть соотнесена с колебаниями $C_{\alpha}\text{-N-C}$. Линии на частотах ~ 300 и $\sim 330\text{ см}^{-1}$ в КР спектрах поли-L-аланина и поли-L-аланилглицина в β -конформации отнесены к деформационным колебаниям C-N- C_{α} , N- C_{α} -C или плоскостным колебаниям C=O [36]. КР линии вблизи 280 и 330 см^{-1} наблюдались также в спектрах β -структурных химотрипсина, конканавалина и поли-L-лизина [10].

Изменяются также относительные интенсивности полос с максимумами на частотах 390 и 420 см^{-1} . В спектре денатурированного образца резко возрастает интенсивность линии на частоте 490 см^{-1} . Незначительные изменения относительных интенсивностей линий в интервале $500\text{--}570\text{ см}^{-1}$ свидетельствуют о малых изменениях конформаций дисульфидных мостиков.

НЧ спектры комбинационного рассеяния нативного и денатурированного химотрипсина

(рис. 5, б) отличаются в интервалах $80\text{--}110$, $200\text{--}360$ и $380\text{--}440\text{ см}^{-1}$. Заметим, что эти отличия меньше, чем для спектров нативного и денатурированного коллагена, что может указывать на меньшую чувствительность третичной структуры глобулярного белка к денатурации.

В таблице собрана информация по спектральным линиям, обсуждаемым в работе.

Выводы

Колебательная спектроскопия может быть использована для определения относительного содержания элементов вторичной структуры в белковой молекуле и изменений вторичной структуры, связанных с функциональной активностью. Однако конформационные изменения могут возникать и на более высоких (чем второй) уровнях иерархии структуры белка и, как любые структурные изменения, могут проявляться в колебательных спектрах. Дефицит методов описания третичной структуры затрудняет интерпретацию спектральных изменений. Тем не менее накопление соответствующих спектральных данных может помочь в анализе структурной иерархии. В связи с этим целесообразно изучать белки со сходной вторичной структурой и анализировать спектральные изменения, вызванные модификациями одной белковой молекулы (например, за счет денатурации).

Сравнение колебательных спектров нативного и денатурированного (суперспирального) коллагена, а также нативного и денатурированного (глобулярного) химотрипсина показывает, что изменения чувствительных к вторичной структуре

Типы колебаний, соответствующие НЧ линиям КР спектров
Types of vibrations corresponding to low-frequency lines of Raman spectra

Волновые числа, см^{-1} / Wave number, см^{-1}	Тип колебания / Assignment
135	N-H внеплоскостные изгибные колебания, C=O внеплоскостные изгибные колебания
260	C-N-C деформационные колебания, C=O плоскостные изгибные колебания, N-H внеплоскостные изгибные колебания
300	Деформационные колебания C-N- C_{α} , N- C_{α} -C, плоскостные колебания C=O
327	NCC деформационные колебания, NH внеплоскостные изгибные колебания, C=O плоскостные изгибные колебания
332	NCC колебания
437	То же
920	N- C_{α} -C скелетные колебания, C-N, C-N- C_{α} деформационные колебания
940	То же
1314	C-N деформационные колебания
1337	C- C_{α} -N изгибные



полос амид I и амид III дополняются спектральными изменениями полос, традиционно не относимых к элементам вторичной структуры.

Низкочастотные полосы в колебательных спектрах могут быть обусловлены меж-, а не внутримолекулярными движениями, поскольку исследуются лиофилизированные порошки (микрорекристаллы). Конформационные изменения на уровнях вторичной и третичной структуры могут влиять на параметры элементарных ячеек белкового микрокристалла. Даже если низкочастотные полосы связаны с межмолекулярными движениями, изменения вторичной и третичной структуры должны проявляться в колебательных спектрах.

На основании опубликованных данных и результатов проведенных экспериментов можно сделать предположение, что изменения НЧ КР спектров, связанные с денатурацией, определяются изменениями не только вторичной, но и третичной структуры белковых молекул.

Сравнение НЧ колебательных спектров указывает на меньшую чувствительность третичной структуры глобулярного белка к денатурации.

Список литературы / References

1. Bandekar J. Amide modes and protein conformation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, vol. 1120, no. 2, pp. 123–143.
2. Wen Z.-Q. Raman Spectroscopy of Protein Pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007, vol. 96, no. 11, pp. 2861–2878.
3. Susi H., Byler D. M. Fourier Deconvolution of the Amide I Raman Band of Proteins as Related to Conformation. *Applied Spectroscopy*, 1988, vol. 42, pp. 819–826.
4. Maiti N. C., Aperti M. M., Zagorski M. G., Carey P. R., Anderson V. E. Raman Spectroscopic Characterization of Secondary Structure in Natively Unfolded Proteins: r-Synuclein. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, vol. 126, pp. 2399–2408.
5. Brandt N. N., Chikishev A. Y., Sotnikov A. I., Savochkiba Yu. A., Agapov I. I., Tonevitsky A. G. Ricin, ricin agglutinin, and the ricin binding subunit structural comparison by Raman spectroscopy. *J. Mol. Str.*, 2005, vol. 735, pp. 293–298.
6. Brandt N. N., Sakodinskaya I. K., Chikishev A. Y. A study of interaction between alpha-chymotrypsin and 18-crown-6 in organic solvents by raman spectroscopy. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2001, vol. 75, no. 6, pp. 928–932.
7. Brandt N. N., Chikishev A. Yu., Greve J., Koroteev N. I., Otto C., Sakodinskaya I. K. Cars and raman spectroscopy of function related conformational changes of chymotrypsin. *J. Raman Spec.*, 2000, vol. 31, pp. 731–737.
8. Stovbun S. V., Skoblin A. A., Tverdislov V. A. Experimental observation of synergetic regularity of chirality sign change in hierarchies of biomimetic structures. *Biophysika* [Biophysics], 2014, vol. 59, iss. 6, pp. 1079–1084. (in Russian).
9. Senior A. W., Evans R., Jumper J., Kirkpatrick J., Sifre L., Green T., Qin C., Ёndek A., Nelson A. W. R., Bridgland A., Penedones H., Petersen S., Simonyan K., Crossan S., Kohli P., Jones D. T., Silver D., Kavukcuoglu K., Hassabis D. Improved protein structure prediction using potentials from deep learning. *Nature*, 2020, vol. 577, pp. 706–710. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1923-7>
10. Balakhnina I. A., Brandt N. N., Chikishev A. Yu., Mankova A. A., Shpachenko I. G. Low-frequency vibrational spectroscopy of proteins with different secondary structures. *J. Biomed. Opt.*, 2017, vol. 22, no. 9, pp. 091509.
11. Mankova A. A., Brandt N. N., Chikishev A. Yu. Raman and FTIR spectroscopy in the THz frequency range in the study of protein structure. *Zurnal prikladnoj spektroskopii*, 2016, vol. 83, no. 6–16, pp. 714. EDN: ZBSQCR
12. Heilweil E. J., Plusquellic D. F. Terahertz Spectroscopy of Biomolecules. In: Susan L. Dexheimer, ed. *Terahertz Spectroscopy: Principles and Applications*. CRC Press, 2007, pp. 269–297.
13. Zakaria H. A. A review: Terahertz spectroscopy as a viable dynamic tool for protein and organic molecules characterization. *Malaysian Journal of Science*, 2015, vol. 34, no. 1, pp. 93–102.
14. Genzel L., Keilmann F., Martin T. P., Wintreling G., Yacoby Y., Fröhlich H., Makinen M. W. Low-frequency Raman spectra of lysozyme. *Biopolymers*, 1976, vol. 15, no. 1, pp. 219–225. <https://doi.org/10.1002/bip.1976.360150115>
15. Tipping M., Viras K., King T. A. Low-frequency dynamics of solid poly(L-alanine) from Raman spectroscopy. *Biopolymers*, 1984, vol. 23, no. 12, pp. 2891–2899. <https://doi.org/10.1002/bip.360231213>
16. Ronen M., Kalanoor B. S., Oren Z., Ron I., Tischler Y. R., Gerber D. Characterization of peptides self-assembly by low frequency Raman spectroscopy. *RSC Advances*, 2018, vol. 8, no. 29, pp. 16161–16170. <https://doi.org/10.1039/c8ra01232f>
17. Fontaine-Vive F., Merzel F., Johnson M. R., Kearley G. J. Collagen and component polypeptides: Low frequency and amide vibrations. *Chemical Physics*, 2009, vol. 355, no. 2–3, pp. 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2008.12.005>
18. Lee S. H., Krimm S. Ab initio-based vibrational analysis of α -poly(L-alanine). *Biopolymers*, 1998, vol. 46, no. 5, pp. 283–317. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0282\(19981015\)46:5<283::aid-bip2>3.0.co;2-l](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0282(19981015)46:5<283::aid-bip2>3.0.co;2-l)
19. Krimm S., Bandekar J. Vibrational Spectroscopy and Conformation of Peptides, Polypeptides, and Proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 1986, vol. 38, pp. 181–364. [https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(08\)60528-8](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60528-8)
20. Nielsen O. F., Bigio I. J., Olsen I., Berquier J. M. Low-frequency ($20\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) vibrational spectra of N-methylacetamide in the liquid state. *Chemical Physics Letters*, 1986, vol. 132, no. 6, pp. 502–506. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(86\)87112-3](https://doi.org/10.1016/0009-2614(86)87112-3)



21. Brandt N. N., Chikishev A. Y., Mankova A. A., Sakodynskaya I. K. Effect of thermal denaturation, inhibition, and cleavage of disulfide bonds on the low-frequency Raman and FTIR spectra of chymotrypsin and albumin. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, vol. 20, no. 5, pp. 051015 (1–6). <https://doi.org/10.1117/1.jbo.20.5.051015>
22. Shigeto S., Chang C. F., Hiramatsu H. Directly Probing Intermolecular Structural Change of a Core Fragment of β_2 -Microglobulin Amyloid Fibrils with Low-Frequency Raman Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2017, vol. 121, no. 3, pp. 490–496. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b10779>
23. Kalanoor B. S., Ronen M., Oren Z., Gerber D., Tischer Y. R. New Method to Study the Vibrational Modes of Biomolecules in the Terahertz Range Based on a Single-Stage Raman Spectrometer. *ACS Omega*, 2017, vol. 2, no. 3, pp. 1232–1240. <https://doi.org/10.1021/acsomega.6b00547>
24. Kuhar N., Sil S., Umapathy S. Potential of Raman spectroscopic techniques to study proteins. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2021, vol. 258, pp. 119712. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119712>
25. Eaves J. D., Fecko C. J., Stevens A. L., Peng P., Tokmakoff A. Polarization-selective femtosecond Raman spectroscopy of low-frequency motions in hydrated protein films. *Chemical Physics Letters*, 2003, vol. 376, no. 1–2, pp. 20–25. [https://doi.org/10.1016/s0009-2614\(03\)00890-x](https://doi.org/10.1016/s0009-2614(03)00890-x)
26. Itoh K., Shimanouchi T. Breathing vibration of poly-L-alanine α -helix. *Biopolymers*, 1971, vol. 10, no. 8, pp. 1419–1420. <https://doi.org/10.1002/bip.360100812>
27. Bozec L., Odlyha M. Thermal Denaturation Studies of Collagen by Microthermal Analysis and Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.*, 2011, vol. 101, no. 1, pp. 228–236.
28. Lund P. A., Nielsen O. F., Praestgaard E. Comparison of the depolarized rayleigh-wing scattering and far-infrared absorption in molecular liquids. *Chemical Physics*, 1978, vol. 28, no. 1–2, pp. 167–173.
29. Djabourov M., Leblond J., Papon P. Gelation of aqueous gelatin solutions. I. Structural investigation. *J. Phys. France*, 1988, vol. 49, pp. 319–332.
30. Shoulders M. D., Raines R. T. Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, vol. 78, pp. 929–958.
31. Fidler A. L., Boudko S. P., Rokas A., Hudson B. G. The triple helix of collagens – an ancient protein structure that enabled animal multicellularity and tissue evolution. *Journal of Cell Science*, 2018, vol. 131, iss. 7, article no. 203950. <https://doi.org/10.1242/jcs.203950>
32. Rygula A., Majzner K., Marzec K. M., Kaczor A., Pilarczyk M., Baranska M. Raman spectroscopy of proteins: A review. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2013, vol. 44, no. 8, pp. 1061–1076.
33. Lypez-Peca I., Leigh B. S., Schlamadinger D. E., Kim J. E. Insights into Protein Structure and Dynamics by Ultraviolet and Visible Resonance Raman Spectroscopy. *Biochemistry*, 2015, vol. 54, no. 31, pp. 4770–4783.
34. Colaiani S. E. M., Nielsen O. F. Low-frequency Raman spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 1995, vol. 347, pp. 267–283. [https://doi.org/10.1016/0022-2860\(95\)08550-f](https://doi.org/10.1016/0022-2860(95)08550-f)
35. Fanconi B. Low-frequency vibrational spectra of some homopolypeptides in the solid state. *Biopolymers*, 1973, vol. 12, no. 12, pp. 2759–2776. <https://doi.org/10.1002/bip.1973.360121210>
36. Moore W. H., Krimm S. Vibrational analysis of peptides, polypeptides, and proteins. II. β -Poly(L-alanine) and β -poly(L-alanyl-glycine). *Biopolymers*, 1976, vol. 15, no. 12, pp. 2465–2483. <https://doi.org/10.1002/bip.1976.360151211>

Поступила в редакцию 28.06.2024; одобрена после рецензирования 22.07.2024; принята к публикации 30.07.2024
 The article was submitted 28.06.2024; approved after reviewing 22.07.2024; accepted for publication 30.07.2024