

Univerzita Karlova v Praze  
Matematicko-fyzikální fakulta

## DIPLOMOVÁ PRÁCE



Bc. Jana Hrudíková

# **Ramanova optická aktivita a konformační flexibilita peptidů v roztoku**

Fyzikální ústav Univerzity Karlovy

Vedoucí: Doc. RNDr. Vladimír Baumruk, DrSc.

Konzultanti: Doc. RNDr. Petr Bouř, CSc. (ÚOCHB AV ČR, v.v.i.)

RNDr. Vladimír Kopecký Jr., Ph.D.

Studijní program: fyzika, biofyzika a chemická fyzika

2009

## Poděkování

Ráda využívám příležitosti poděkovat zejména Vladimíru Baumrukovi a Petru Bouřovi. Oba pro mě byli během řešení diplomové práce nepostradatelní.

Vladimír Baumruk mě s Ramanovou optickou aktivitou seznámil již během mé bakalářské práce. Díky němu jsem se dostala k velice zajímavé, i když náročné práci. Děkuji mu za přátelský přístup a trpělivé provázení všemi úskalími, které se během experimentální části mé práce vyskytly.

Stejně důležitým člověkem je pro mě i Petr Bouř, pod jehož vedením byly provedeny veškeré výpočty uvedené v této práci. Právě on mě uvedl do kvantově-chemických výpočtů a trpělivě mě učil zacházet s programy, z nichž mnohé sám vytvořil nebo upravil.

Mé poděkování patří i kolektivům zaměstnanců a doktorandů Oddělení fyziky biomolekul Fyzikálního ústavu UK a Oddělení Molekulární spektroskopie na Ústavu organické chemie a biochemie za vytvoření velmi inspirujícího pracovního prostředí.

Dále bych chtěla poděkovat svému konzultantovi Vladimíru Kopeckému za čas, který strávil při nastavování ROA spektrometru, na kterém byla moje diplomová práce měřena.

Své rodině děkuji za podporu při studiu i sepisování této práce.

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci napsala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce.

V Praze dne 6. 8. 2009

Jana Hrudíková

**Název práce:** Ramanova optická aktivita a konformační flexibilita peptidů v roztoku

**Autor:** Jana Hrudíková

**Katedra (ústav) :** Fyzikální ústav Univerzity Karlovy

**Vedoucí diplomové práce:** Doc. RNDr. Vladimír Baumruk, DrSc.

**E-mail vedoucího:** [baumruk@karlov.mff.cuni.cz](mailto:baumruk@karlov.mff.cuni.cz)

**Abstrakt:** Molekulární flexibilita výrazně ovlivňuje intenzitu a polohu pásů v Ramanových spektrech a v případě ROA spekter i znaménka pásů. Proto je nezbytné ve výpočtech spekter zohlednit dynamické aspekty chování studovaných molekul v roztoku prostřednictvím konformačního středování. První ze studovaných systémů, histidin, hraje díky svému imidazolovému kruhu důležitou roli v metaloenzimech a při sbalování proteinů. Na ROA aparatuře vybudované na Fyzikálním ústavu UK v Praze byla změřena ROA spektra histidinu při několika hodnotách pH, komplexu histidinu s mědí a dipeptidů His-Gly a Gly-His jako předstupeň k dalšímu studiu. Druhý systém, cyklický hexapeptid c-(Phe-D-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp), představuje model pro studium  $\beta$ -otoček a antiparalelního skládaného  $\beta$ -listu a byl již studován pomocí VCD a IČ spektroskopie. Z molekulárně dynamických simulací bylo vybráno 10 konformací, pro které byla *ab initio* spočítána Ramanova a ROA spektra. Pro modelový fragment Phe-D-Pro, jehož příspěvek je v Ramanově spektru dominantní, bylo provedeno Boltzmannovo středování příspěvků od 36 konformací.

**Klíčová slova:** Ramanova optická aktivita, konformační flexibilita,  $\beta$ -otočka, cyklický peptid, histidin

**Title:** Raman optical activity and conformational flexibility of peptides in solution

**Author:** Jana Hrudíková

**Department:** Institute of Physics of Charles University

**Supervisor:** Doc. RNDr. Vladimír Baumruk, DrSc.

**Supervisor's e-mail address:** [baumruk@karlov.mff.cuni.cz](mailto:baumruk@karlov.mff.cuni.cz)

**Abstract:** Molecular flexibility can significantly modify Raman and ROA spectral intensities, band positions and the ROA signs. Taking into account dynamic aspects of behavior of studied molecules in solution via conformational averaging therefore seems to be crucial for spectral interpretation. The first of studied models, histidine, plays an important role in metallo-enzymatic reactions and peptide folding, due to its imidazole ring. ROA spectra of His at different pH, His complexed with  $\text{Cu}^{2+}$  and dipeptides His-Gly and Gly-His were recorded on the spectrometer built at the Institute of Physics of the Charles University as a first step of the subsequent study. The second studied system, a cyclic hexapeptide c-(Phe-D-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp), serves as a convenient model for  $\beta$ -hairpin and anti-parallel  $\beta$ -sheet. It was previously studied by means of VCD and IR. From molecular dynamics simulations 10 peptide geometries were selected for spectral modeling. The Raman and ROA spectra were calculated *ab initio*. For a model fragment Phe-D-Pro, which dominates in the Raman spectrum, Boltzmann averaging over 36 conformations has been done.

**Keywords:** Raman optical activity, conformational flexibility,  $\beta$ -turn, cyclic peptide, histidin

# Obsah

Seznam použitých zkratk.....	6
Úvod.....	7
Náplň diplomové práce .....	9
1. Struktura peptidů z pohledu ROA spektroskopie.....	10
1.1 Struktura proteinů.....	10
1.1.1 Primární struktura proteinů .....	10
1.1.2 Sekundární struktura proteinů .....	11
1.1.3 Terciální a kvartérní struktura proteinů .....	14
1.1.4 Vibrační módy peptidové vazby .....	15
1.2 Ramanova optická aktivita (ROA).....	16
1.2.1 Experimentální uspořádání pro ROA spektroskopii .....	17
1.2.2 Pražský ROA spektrometr .....	18
1.2.3 Zpracování spekter .....	20
1.3. Aplikace ROA spektroskopie.....	23
1.3.1 ROA aminokyselin.....	23
1.3.2 ROA peptidů .....	25
1.3.3. ROA proteinů .....	27
2. Výpočet ROA spekter <i>ab initio</i> metodami.....	29
2.1 Základy kvantové chemie .....	29
2.1.1 Schrödingerova rovnice .....	29
2.1.2 Born-Oppenheimerova aproximace .....	30
2.1.3 Harmonická aproximace .....	31
2.2 Přehled <i>ab initio</i> výpočetních metod .....	32
2.2.1 Vlnová funkce .....	33
2.2.2 Hartree-Fockova metoda (HF) .....	35
2.2.3 Teorie elektronové hustoty (DFT) .....	37
2.3 Základy teorie ROA .....	40
2.4 Výpočet ROA spekter .....	43
2.4.1 Modely rozpouštědla .....	43
2.4.2 Optimalizace geometrie .....	45
2.4.3 Výpočet silového pole a harmonických frekvencí .....	47
2.4.4 Výpočet intenzit Ramanových a ROA spekter .....	47
2.4.5 Přenos tenzorů molekulárních vlastností .....	48
2.4.6 Nastavení pološířky pásů ve vypočtených spektrech.....	49

2.4.7 Porovnání změřených a vypočtených spekter .....	50
2.5 Molekulární dynamika (MD) .....	52
3. Histidin .....	54
3.1 Ramanova a ROA spektra histidinu .....	55
3.2 Histidin s kovem .....	61
3.3 Dipeptidy histidinu s glycinem .....	64
3.4 Shrnutí výsledků .....	66
4. Cyklický hexapeptid c-(Phe-D-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp).....	67
4.1 Modelový systém pro studium $\beta$ -otoček .....	67
4.2 Experimentální část .....	68
4.3 Molekulární dynamika (MD) .....	70
4.3.1 Torzní úhly v peptidové páteři .....	71
4.3.2 Torzní úhly v postranních řetězcích .....	78
4.4 DFT výpočty pro deset konformací vybraných z MD .....	81
4.4.1 Ramanova spektra .....	82
4.4.1.1 Nastavení pološířky pásů v simulovaných spektrech.....	82
4.4.1.2 "Škálování" vibračních frekvencí .....	84
4.4.1.3 Srovnání vypočtených Ramanových spekter s experimentem.....	85
4.4.2 ROA spektra .....	88
4.4.2.1 Výpočet ROA spekter s použitím polarizačního modelu.....	88
4.4.2.2 Výpočet ROA intenzit na nižší úrovni .....	90
4.4.2.3 Srovnání ROA spekter .....	92
4.4.3 Srovnání fitování Ramanových a ROA spekter .....	94
4.5 Výpočet pro tisíc konformací z MD.....	95
5. Modelový fragment Phe-D-Pro .....	98
5.1 Výpočetní část .....	98
5.1.1 Výpočet ROA spekter pro vybrané konformace.....	98
5.1.1.1 Redukce počtu konformací .....	102
5.1.1.2 Numerické nestability v programu Gaussian .....	104
5.1.1.3 Polarizační model .....	106
5.1.1.4 Kombinovaný výpočet ROA spekter .....	108
5.1.2 Zpracování ROA spekter.....	110
5.2 Experimentální část .....	115
Závěr .....	118
Seznam použité literatury .....	120

## Seznam použitých zkratek

2D	dvojměrné
3D	trojměrné
B3LYP	funkcionál DFT (Becke, Lee, Yang, Parr)
BPW91	funkcionál DFT (Becke, Perdew, Wang)
CCD	metoda spřažených klastrů (coupled clusters)
CCD	mnohokanálový detektor (charge coupled device)
CI	metoda konfigurační interakce (configurated interaction)
DCP	duální kruhová polarizace (dual circular polarization)
DFT	teorie elektronové hustoty (density functional theory)
EOM	elektrooptický modulátor (electrooptical modulator)
FCI	kompletní konfigurační interakce (full CI)
FF	silové pole (force field)
GTO	Gaussovy funkce
HF	Hartree - Fockova metoda
ICP	kruhová polarizace budícího záření (incident circular polarization)
IČ (IR)	infračervený (infrared)
LDA	aproximace lokální hustoty (local density aproximation)
LSDA	aproximace lokální hustoty se zahrnutím spinu (local spin density approximation)
MD	molekulární dynamika
MO-LCAO	molekulové orbitály jako lineární kombinace atomových orbitalů (molecular orbitals - linear combination of atomic orbitals)
MP	Møllerova-Plessetova poruchová metoda
NMR	nukleární magnetická rezonance
PPII	levotočivý polyprolin II helix
ROA	Ramanova optická aktivita
SCF	metoda selfkonzistentního pole - iterační procedura (self-consistent-field)
SCP	kruhová polarizace rozptýleného záření (scattered circular polarization)
SR	Schrödingerova rovnice
STO	funkce Slaterova typu
vac	vakuum
VCD	vibrační cirkulární dichroismus
VOA	vibrační optická aktivita

## Úvod

Stanovení struktury proteinů a peptidů je jedním z klíčových úkolů dnešní molekulární biologie a biofyziky. Struktura pomáhá pochopit roli proteinu v organismu a zároveň otevírá bránu k navrhování nových, přesněji zacílených léčiv. Mezi základní metody studia struktury patří rentgenová strukturní analýza a nukleární magnetická rezonance (NMR). Nezastupitelné místo zejména v oblasti studia dynamiky proteinů mají metody vibrační spektroskopie. A to i přesto, že nemohou poskytnout tak podrobnou informaci o 3D struktuře proteinů.

Vibrační spektroskopie má totiž ve srovnání s jinými metodami některé výhody. Je vhodná především pro studium dynamiky strukturních změn, neboť doba vibračních přechodů  $10^{-13}$  až  $10^{-14}$  s je řádově kratší než doba nejrychlejších konformačních přechodů. Vibrační spektrum tak představuje superpozici příspěvků od všech konformací, které jsou ve vzorku přítomny. Je možné zkoumat vazbu enzymu na substrát, změnu konformace molekuly vyvolanou například navázáním kovu, rozpad uspořádané dvoušroubovicové struktury nukleové kyseliny, denaturaci proteinu. Často se analyzuje série mnoha spekter, kde každé odpovídá definovanému stavu nějakého parametru (např. teploty, pH, koncentrace iontů). Vibrační spektroskopie je schopná studovat širokou škálu molekul v různém skupenství (pevná fáze, kapalina a plynná fáze), navíc se jedná o nedestruktivní techniku.

Metody vibrační spektroskopie umožňují zkoumat strukturu molekul pomocí jejich vibračních módů. Každá nelineární molekula obsahující  $N$  atomů má  $3N-6$  vibračních stupňů volnosti. Vibrační spektrum každé látky je charakteristické a v principu představuje její jednoznačný identifikátor (fingerprint neboli otisk prstu). Vibrační spektroskopie se skládá ze dvou základních metod: infračervené spektroskopie (IČ) založené na absorpci infračerveného záření a Ramanovy spektroskopie spočívající v nepružném rozptylu zpravidla viditelného světla.

Podstatná část živých systémů je složena z látek, které jsou opticky aktivní. Tyto látky se vyskytují ve dvou prostorových formách, které se vůči sobě se mají jako zrcadlové obrazy, ačkoliv jsou jinak chemicky totožné. Takové molekuly označujeme jako chirální a zmíněné prostorové formy nazýváme enantiomery. Proteiny se skládají z aminokyselin, které jsou všechny s výjimkou glycinu chirální, proto je k jejich studiu velmi vhodné využít metody zahrnující enantiomerní selektivitu. V případě vibrační spektroskopie je takovým rozšířením vibrační optická

aktivita (VOA) pracující s kruhově polarizovaným světlem. VOA v sobě spojuje stereochemickou citlivost „konvenční“ (elektronové) optické aktivity s bohatým strukturním obsahem vibrační spektroskopie, který je dán vysokým počtem rozlišených pásů ve spektru.

VOA se, stejně jako vibrační spektroskopie, skládá ze dvou komplementárních metod: vibračního cirkulárního dichroismu (VCD), který měří rozdíl v absorpci levo- a pravotočivě kruhově polarizovaného infračerveného záření, a Ramanovy optické aktivity (ROA) měřící rozdíl v intenzitě Ramanova rozptylu pravo- a levotočivě kruhově polarizovaného záření. Poprvé byly tyto techniky použity ke studiu malých chirálních molekul na počátku 70. let 20. století.

Na rozdíl od VCD, jehož spektrální rozsah je v současnosti experimentálně zdola omezen hranicí zhruba  $600\text{ cm}^{-1}$ , můžeme při měření ROA v jednom experimentu zaznamenat vibrační spektra látek v téměř celém rozsahu fundamentálních vlnočtů. Navíc lze díky tomu, že voda má pouze slabý Ramanův rozptyl, pomocí ROA bez problémů studovat biomolekuly v jejich přirozeném prostředí - vodných roztocích. ROA je metoda využitelná např. ke studiu lokálních struktur peptidů (vlásenky,  $\beta$ -otočky a smyčky, krátké úseky šroubovic), kde za generaci signálu jsou odpovědné krátkodosahové interakce. Intenzita ROA signálu závisí na absolutní chiralitě, a proto může dojít k vyrušení příspěvků od mnoha dostupných konformací. To je zdrojem zvýšené citlivosti ROA k dynamice molekul.

ROA spektroskopie je diferenční technika založená na odečtu blízkých hodnot; proto je zapotřebí provádět měření s velmi vysokou přesností. ROA spektra byla zpočátku interpretována pouze na základě čistě empirické korelace. Je možné dále využít statistických metod, například faktorovou analýzu. Nejkomplexnější je interpretace na základě modelových *ab initio* kvantově-chemických výpočtů spekter, které se rozvíjí do jisté míry společně s rozvojem počítačů. Základním kritériem úspěšnosti výpočtu ROA spekter je dosažení shody znaménka pásů, popřípadě i relativní intenzity, s experimentálními daty. Pro výpočty je omezující velikost molekul i jejich flexibilita a přítomnost velkého množství konformací, které je nutné propočítat odděleně. Právě kvůli nemalé náročnosti experimentu i výpočtů ROA dosud není, i přes svůj velký aplikační potenciál, rutinní a běžně používanou spektrální technikou. Po celém světě existuje jen několik laboratoří, kde se ROA spektroskopii systematicky zabývají. V České republice byla postavena unikátní aparatura pro měření ROA spekter na Fyzikálním ústavu Univerzity Karlovy v Praze.



## Náplň diplomové práce

Práce je členěna do pěti kapitol. První kapitola se věnuje struktuře peptidů z pohledu ROA spektroskopie. Ve druhé kapitole jsou shrnuty základy kvantové teorie a *ab initio* metod používaných při simulacích ROA spekter. Kapitoly tři až pět pojednávají o studovaných problémech.

Ve třetí kapitole jsou uvedena pilotní měření pro histidin a odvozené dipeptidy s glycinem jako předstupeň ke studiu peptid-kovových komplexů. Imidazolová skupina v histidinu je schopna více způsoby navázat kov, v enzymem katalyzovaných reakcích je tímto kovem nejčastěji měď. Cílem studia je zmapovat konformační chování a interakce s rozpouštědlem a později s kovy nejdříve na jednodušším dipeptidu, u kterého by už mohla být „pozorovatelná“ změna konformace způsobená navázáním kovu. Během řešení dizertační práce, která bude následovat, plánujeme přejít ke složitějším modelovým systémům, například částem prionové molekuly.

V návaznosti na předchozí spolupráci experimentální skupiny Doc. RNDr. Vladimíra Baumruka, DrSc. na MFF UK a výpočetní skupiny vedené Doc. RNDr. Petrem Bouřem, CSc. na ÚOCHB AV ČR, v.v.i. byl jako hlavní objekt diplomové práce zvolen model cyklického hexapeptidu c-(Phe-D-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp), který byl studován pomocí IČ a VCD spektroskopie, ale jeho již změřené ROA spektrum čekalo na detailnější interpretaci. O tomto modelovém systému pojednává čtvrtá kapitola. V páté kapitole jsme se zaměřili na fragment cyklického hexapeptidu Phe-D-Pro, jehož pásy dominují v Ramanově spektru cyklického hexapeptidu, a bylo možné jej propočítat na lepší úrovni výpočtů.

V závěru jsou shrnuty dosažené výsledky.

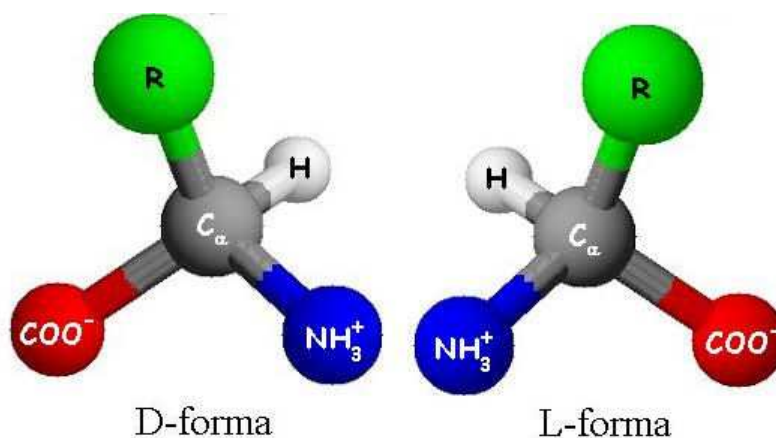
# 1. Struktura peptidů z pohledu ROA spektroskopie

## 1.1 Struktura proteinů

Proteiny se v buňce nevyskytují jako dlouhé lineární řetězce, ale zaujímají složitou prostorovou strukturu. Proces, při kterém protein zaujme svoji nativní strukturu, jenž je mu vlastní při fyziologických podmínkách, se nazývá sbalování (folding). Strukturu proteinu studujeme na několika úrovních.

### 1.1.1 Primární struktura proteinů

Primární struktura je dána vlastním pořadím aminokyselin v řetězci a je pro každý protein specifická. Existuje 20 standardních aminokyselin lišících se postranním řetězcem R. Všechny přirozené aminokyseliny kromě glycinu jsou chirální. Jednou ze základních vlastností těchto opticky aktivních molekul je schopnost stáčet rovinu polarizovaného světla. Podle toho, zda ji stáčí ve směru nebo proti směru hodinových ručiček, rozlišujeme pravotočivou (D) a levotočivou (L) formu aminokyselin. V přirozených proteinech vyskytujících se na Zemi je preferována L-forma aminokyselin, přestože neexistuje zjevný fyzikálně-chemický důvod pro její preferenci. V uměle syntetizovaných peptidech je možné kombinovat L- i D-formu. L- a D-aminokyseliny se liší prostorovou orientací skupin připojených na asymetrický uhlík  $C_{\alpha}$  a navzájem si jsou zrcadlovými obrazy, jak je ukázáno na obr. 1.1.

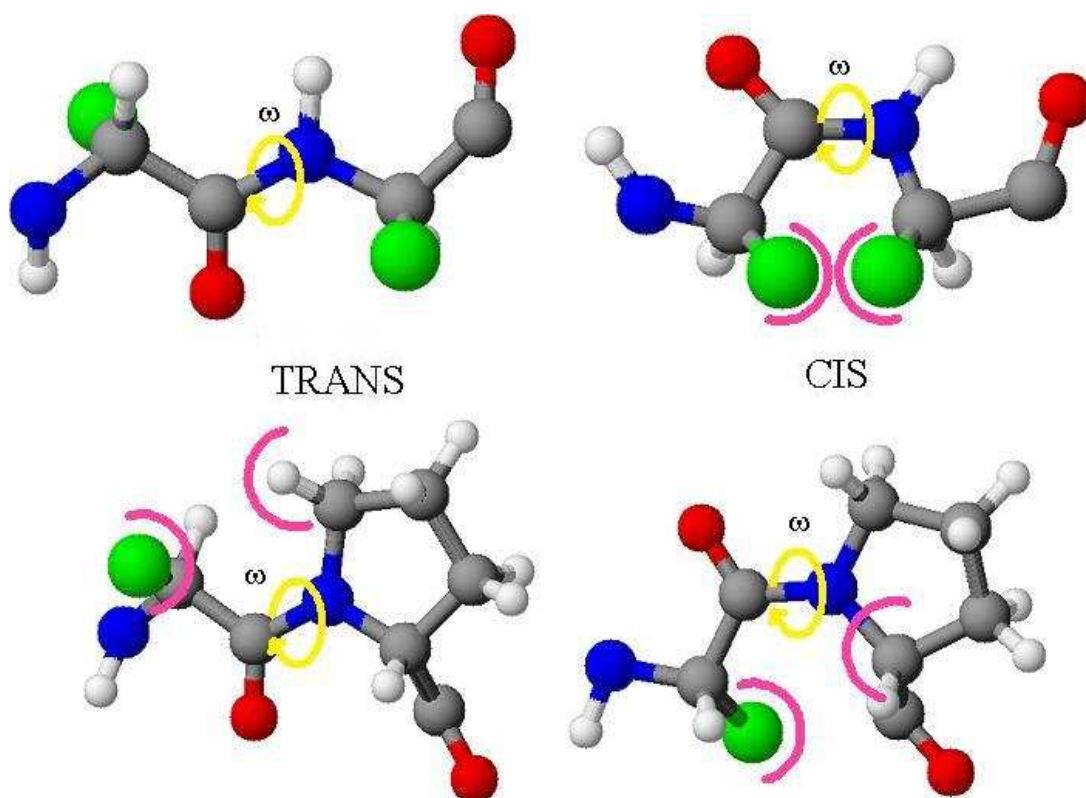


**Obr. 1.1:** Chirální aminokyseliny existují ve dvou enantiomerních formách lišících se prostorovou orientací skupin připojených na  $C_{\alpha}$ .

Aminokyseliny obsahují dvě funkční skupiny: karboxylovou a aminoskupinu. Ve vodných roztocích se při neutrálním pH tyto skupiny vyskytují v podobě  $\text{-COO}^-$  a  $\text{-NH}_3^+$ ; tato forma je nazývána podvojným iontem.

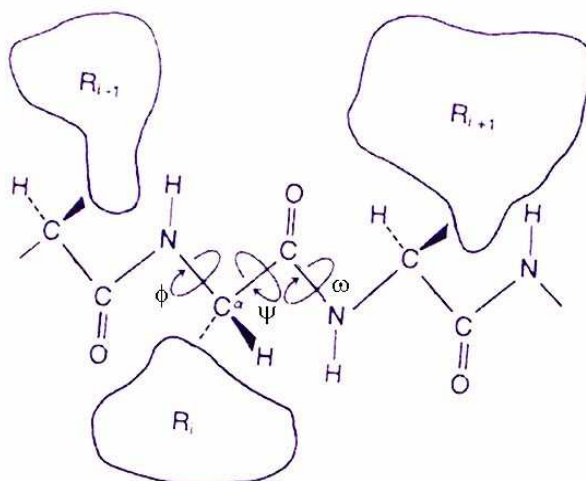
### 1.1.2 Sekundární struktura proteinů

Aminokyseliny jsou spojeny do řetězce peptidovou vazbou C – N, která má ze čtyřiceti procent charakter dvojné vazby a všech šest atomů (C, O, N, H a oba  $\text{C}_\alpha$ ) leží přibližně v jedné rovině. Existuje *cis* ( $\omega = 0^\circ$ ) a *trans* ( $\omega = 180^\circ$ ) forma peptidové vazby, avšak *trans* konformace je přibližně o 8 kJ/mol stabilnější než *cis*. Výjimku představuje prolin, u něhož se projevuje stabilní izomerizace vazby i za nízkých teplot. Obě formy peptidové vazby jsou znázorněny na obr. 1.2.



**Obr. 1.2:** *Trans* a *cis* forma peptidové vazby s vyznačenými sterickými zábranami. Na spodním obrázku jsou znázorněny pro prolin.

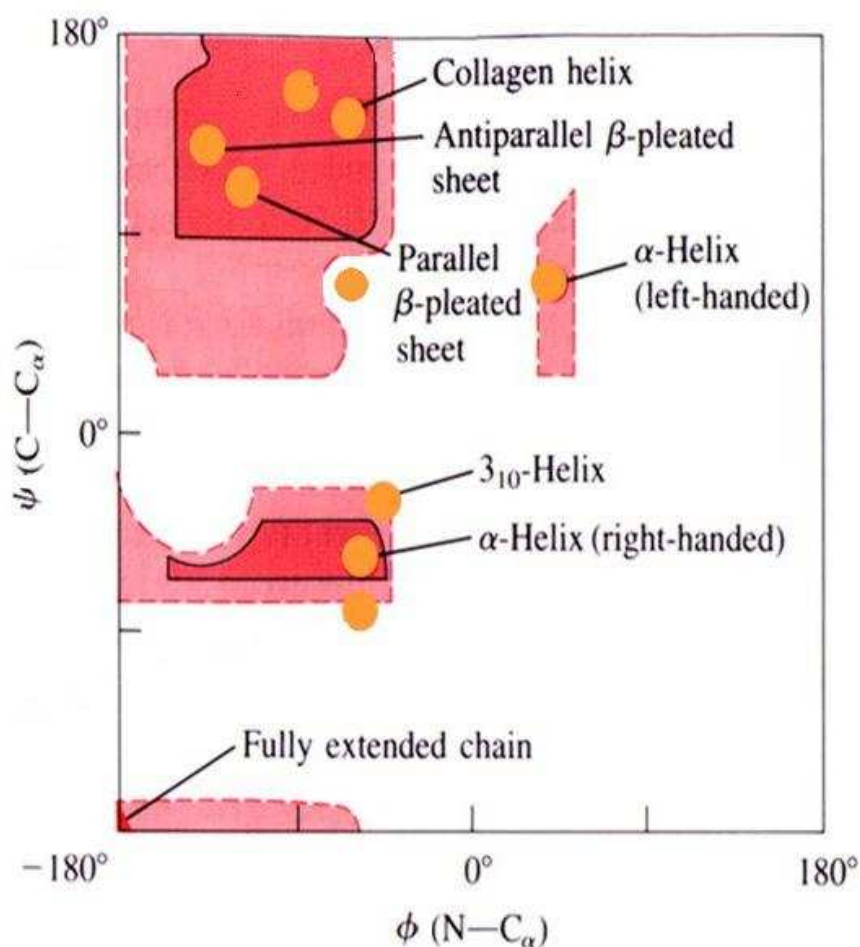
I další úhly v peptidové páteři molekuly mají své standardní značení. Úhel  $\phi$  je torzní úhel kolem vazby mezi N a  $C_\alpha$  a jako úhel  $\psi$  se označuje torzní úhel kolem vazby mezi  $C_\alpha$  a C (obr. 1.3). Některé z aminokyselin mají poměrně dlouhý postranní řetězec R. V takovém případě jsou atomy v postranním řetězci často popsány písmeny řecké abecedy počínaje C nejbližším k C=O. Torzní úhly v postranním řetězci se značí  $\chi$  a číslují se počínaje úhlem kolem  $C_\alpha - C_\beta$ .



**Obr. 1.3:** Schematické znázornění peptidického řetězce složeného ze tří aminokyselin.  $\phi_i$  a  $\psi_i$  jsou tzv. Ramachandranovy úhly,  $R_i$  je postranní řetězec  $i$ -té aminokyseliny.

Sekundární struktura představuje lokální uspořádání peptidového řetězce v prostoru. Typ sekundární struktury je určen úhly  $\psi$  a  $\phi$ . Kombinace torzních úhlů  $\phi$  a  $\psi$  definuje stericky dovolené oblasti v konformačním prostoru proteinu, v tzv. Ramachandranově diagramu (obr. 1.4).

Existuje několik standardních prostorových uspořádání proteinů. Přibližně 25 % struktury globulárních proteinů je tvořeno  $\alpha$ -helixem, který je pro L-aminokyseliny pravotočivý. Vodíkové vazby  $\alpha$ -helixu jsou uspořádány tak, že skupina C=O peptidové vazby  $i$ -tého zbytku směřuje ke skupině N-H peptidové vazby  $(i+4)$  zbytku. V globulárních proteinech jsou v průměru z 15 % obsaženy  $\beta$ -skládané listy, které jsou dvojího typu – antiparalelní, jejichž sousední polypeptidové řetězce mají navzájem opačnou orientaci, a paralelní (Branden a kol. (1991)). Další charakteristiky  $\beta$ -skládaných listů,  $\alpha$ -helixu i jiných šroubovic jsou uvedeny v tab. 1.1.



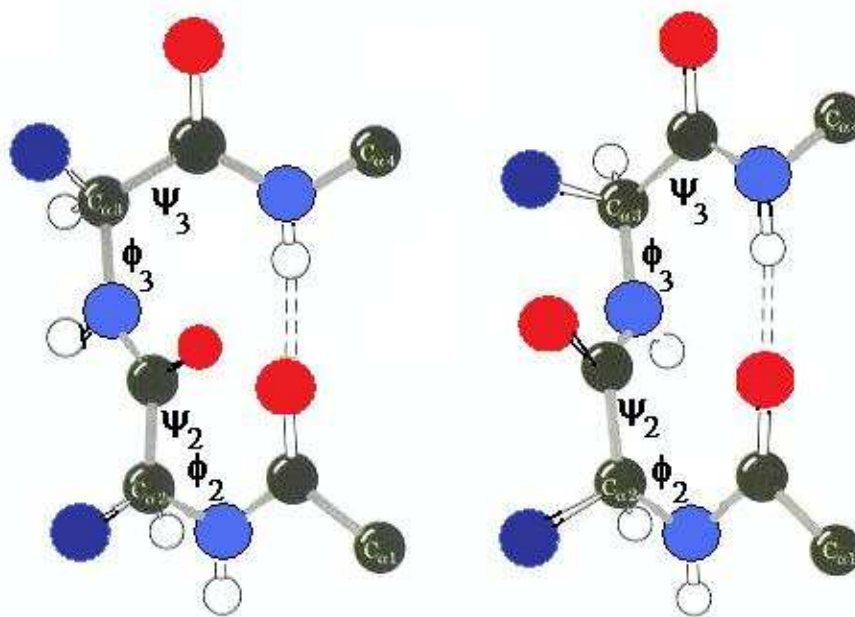
**Obř. 1.4:** Ramachandranův diagram. Přeřvato z Ramachandran a kol. (1962).

Typ sekundární struktury	Torzní úhel (°)			Počet jednotek na jednu obrátku	Stoupání na aminokyselinovou jednotku (Å)
	$\phi$	$\psi$	$\omega$		
$\alpha$ -helix	-57	-47	180	3,6	1,5
$3_{10}$ -helix	-49	-26	180	3	2
$\pi$ -helix	-57	-70	180	4.4	1,15
polyprolin I	-83	158	0	3,33	1,9
polyprolin II	-78	149	180	3	3,12
antiparalelní $\beta$ -list	-139	135	-178	2	3,4
paralelní $\beta$ -list	-119	113	180	2	3,2

**Tab. 1.1:** Základní typy sekundárních struktur. Přeřvato z Creighton a kol. (1984).

Globulární proteiny se z velké části skládají z úseků s pravidelnou sekundární strukturou, které jsou spojeny úseky měnícími směr. Nejčastěji se vyskytujícím typem takovéto nerepetitivní struktury jsou  $\beta$ -otočky, které vytvářejí vazbu mezi

skupinou C=O peptidové vazby  $i$ -tého zbytku a N-H peptidové vazby  $(i+3)$  zbytku a tak spojují vlákna antiparalelních  $\beta$ -listů. Existuje dvojí nejčastější uspořádání:  $\beta$ -otočka typu I charakterizovaná torzními úhly  $\phi_2 = -60^\circ$ ,  $\psi_2 = -30^\circ$ ,  $\phi_3 = -90^\circ$  a  $\psi_3 = 0^\circ$  je blízká deformovanému  $3_{10}$ -helixu;  $\beta$ -otočce typu II odpovídají úhly  $\phi_2 = -60^\circ$ ,  $\psi_2 = +120^\circ$ ,  $\phi_3 = +90^\circ$ ,  $\psi_3 = 0^\circ$ . Odchylky od těchto ideálních konformačních úhlů  $\pm 30^\circ$  jsou běžné. Rotace peptidové jednotky umožňuje, aby tyto otočky přecházely jedna v druhou.  $\beta$ -otočky bývají stabilizovány vodíkovým můstkem, který je na obr. 1.5 znázorněn přerušovanou čarou. Nejčastější aminokyselinou vyskytující se v  $\beta$ -otočkách je prolin. Další typy otoček, jako jsou  $\gamma$ -otočka (vazba mezi CO( $i$ ) a NH( $i+2$ )),  $\alpha$ -otočka (vazba mezi CO( $i$ ) a NH( $i+4$ )),  $\pi$ -otočka (vazba mezi CO( $i$ ) a NH( $i+5$ )), se v proteinech vyskytují méně často.



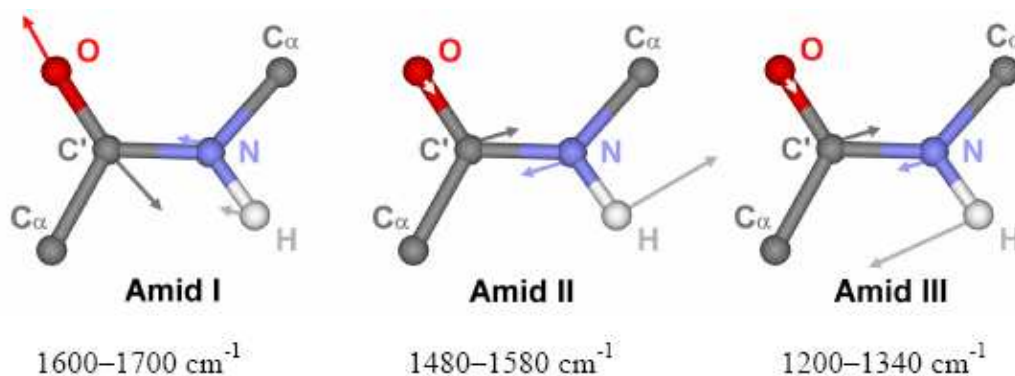
**Obr. 1.5:**  $\beta$ -otočka typu I (vlevo) a typu II (vpravo) s vyznačenými úhly, které jsou popsány v textu.

### 1.1.3 Terciální a kvartérní struktura proteinů

Terciální strukturou se rozumí uspořádání segmentů jednotlivých sekundárních struktur v prostoru. O kvartérní struktuře hovoříme tehdy, když je protein složen z několika podjednotek, které jsou vzájemně provázány, Voet a Voetová (1995).

### 1.1.4 Vibrační módy peptidové vazby

Ve vibrační spektroskopii hrají důležitou roli vibrace atomů peptidové vazby, které odrážejí silové poměry i geometrii hlavního řetězce. Jejich prostřednictvím tak můžeme nepřímo zjistit konformaci peptidového řetězce. Vibrační módy amidů v proteinech byly objasněny na molekule N-methylacetamidu jako nejjednodušším modelu. Schematické znázornění tří nejdůležitějších vibračních módů, jejichž frekvence jsou citlivé k sekundární struktuře hlavního polypeptidového řetězce, je schematicky znázorněno na obr. 1.6. Amid I ( $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ ) zahrnuje z 80% valenční vibrace C=O a dále valenční C–N a deformační  $C_{\alpha}\text{--}C'\text{--}N$  vibrace. Amid II ( $1480\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$ ) obsahuje N-H rovinné deformační (60%), C=O rovinné deformační,  $C_{\alpha}\text{--}C'$  valenční a N–C' valenční vibrace. Amid III ( $1230\text{--}1340\text{ cm}^{-1}$ ) zahrnuje  $C_{\alpha}\text{--}N$  (40%) a  $C_{\alpha}\text{--}C'$  (20%) valenční vibrace a N-H (30%) a C=O rovinné deformační vibrace, Barth a Zscherp (2002).



**Obr. 1.6:** Tři nejdůležitější vibrační módy peptidové vazby a přibližný rozsah jejich výskytu ve spektrech.

Při studiu proteinů prostřednictvím Ramanovy spektroskopie lze pomocí empirické korelace pozicí pásů amidu I a III rozlišit různé typy sekundárních struktur. Pás amidu II je pozorovatelný pouze v rezonančně zesílených Ramanových spektrech. Naproti tomu v IČ spektroskopii jsou pozorovány pásy amid I a II.

## 1.2 Ramanova optická aktivita (ROA)

Ramanova spektroskopie je založena na Ramanově rozptylu, který byl experimentálně objeven indickým fyzikem C. V. Ramanem (1928), ale předpovězen byl již dříve rakouským vědcem A. Smekalem, který ve svém modelu vycházel ze změn polarizovatelnosti molekuly při normálním vibračním módu.

Ramanův rozptyl je dvoufotonový proces, při kterém je nepružně rozptýlen dopadající foton. Rozdíl mezi energiemi dopadajícího a rozptýleného fotonu je roven energetickému rozdílu mezi dvěma vibračními hladinami v základním elektronovém stavu molekuly:  $\Delta E = h(\nu_0 - \nu_r)$ , kde  $h\nu_0$  je energie dopadajícího fotonu a  $h\nu_r$  je energie rozptýleného fotonu. Ramanův jev má velmi malý účinný průřez: neelasticky je rozptýlen pouze jeden z  $10^6$  rozptýlených fotonů.

Ramanova optická aktivita (ROA) je rozšířením Ramanovy spektroskopie pro opticky aktivní látky. Na přelomu 60. a 70. let 20. století se na základě obecné teorie polarizačních vlastností Rayleighova (pružného) a Ramanova (nepružného) rozptylu světla chirálními molekulami podařilo ukázat, že v rozptýleném světle je obsažena velmi slabá složka s kruhovou polarizací. Také intenzita rozptylu dopadajícího pravo- a levotočivě kruhově polarizovaného záření není úplně shodná, Atkins a Barron (1969).

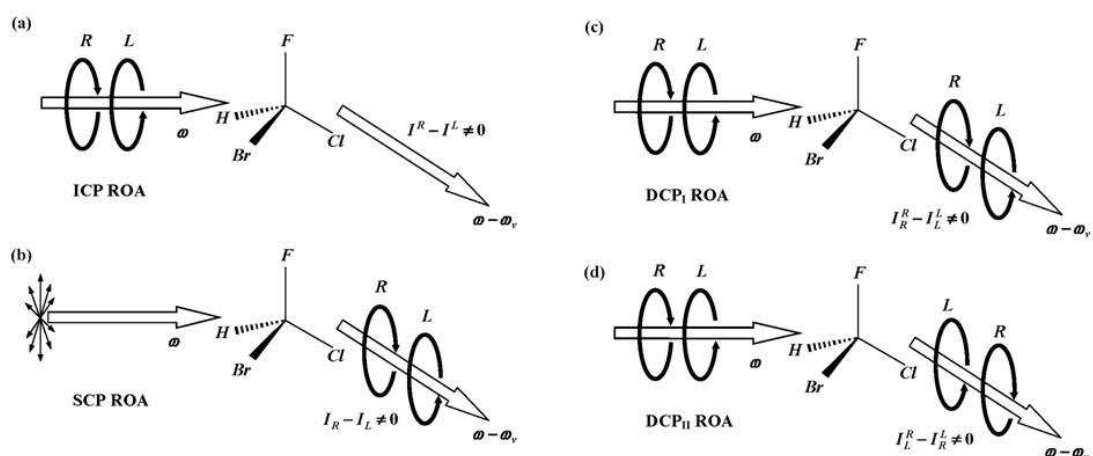
ROA byla experimentálně prokázána v roce 1973 (Barron a kol. (1973)), ale rozvoj této nové chiroptické metody byl zpočátku výrazně omezen tehdejšími experimentálními možnostmi (jednokanálová detekce a měření spekter bod po bodu). Prudký rozvoj nastal až od počátku 90. let díky použití mnohokanálových CCD detektorů. Od roku 2002 je na trhu zatím jediný komerční ROA spektrometr *ChiralRAMAN*<sup>TM</sup> od firmy BioTools Inc. Dosud publikované výsledky však byly z velké části získány na nekomerčních spektrometrech.



## 1.2.1 Experimentální uspořádání pro ROA spektroskopii

Typický ROA spektrometr se skládá z budícího laseru (zpravidla argonový nebo diodami čerpaný pevnolátkový), vysoce světelného zobrazovacího spektrografu a chlazeného CCD detektoru. Z experimentálního hlediska je možné k dalšímu uspořádání aparatury pro měření ROA spekter přistupovat více způsoby. Volitelné jsou modulační schéma a geometrie rozptylu:

Modulační schéma úzce souvisí s polarizací dopadajícího a rozptýleného záření a rozlišujeme je podle toho, ve které části rozptylového procesu se vytváří či analyzuje kruhová polarizace. V úvahu přicházejí modulační schémata znázorněná na obr. 1.7.



**Obr. 1.7:** Modulační schémata pro měření ROA.

Metoda ICP (incident circular polarization) je založena na modulaci budícího záření, kdy pomocí elektrooptického modulátoru střídavě přepínáme mezi pravo- a levotočivou kruhovou polarizací a synchronně s tím zaznamenáváme intenzity rozptýleného záření  $I^R$  a  $I^L$ . První ROA spektra byla změřena právě v tomto uspořádání, Barron a kol. (1973). ICP modulační schéma využívá i ROA spektrometr vybudovaný na Fyzikálním ústavu UK.

Dalším variantou modulačního schématu je SCP (scattered circular polarization), který vychází z originální koncepce Huga a Hangartnera (1999). Na vzorek dopadá lineárně polarizované nebo nepolarizované záření a detegována je přítomnost pravo- a levotočivě kruhově polarizované složky v rozptýleném záření. Hlavním prvkem SCP ROA spektrometru je polarizační dělič, který dokáže oddělit

tyto současně měřené komponenty, pomocí vláknové optiky je přivést na vstup spektrografu a obě je zobrazit na CCD detektoru. Současná detekce je velmi výhodná z hlediska poměru signál/šum. Takto se zbavíme jedné složky šumu (tzv. flicker noise), která je způsobena průlety prachových částic, fluktuacemi hustoty vzorku, kolísáním výkonu laseru a dalšími náhodnými ději. SCP tedy umožňuje zvýšit poměr signál/šum a přitom na polovinu zkrátit dobu měření. Právě toto schéma využívá komerční ROA spektrometr ChiralRAMAN™.

Experimentálně byly realizovány i duální varianty DCP<sub>I</sub> a DCP<sub>II</sub> (dual circular polarization), kdy je dopadající záření kruhově polarizované a v rozptýleném záření zaznamenáváme intenzitu kruhově polarizované složky se stejným (DCP<sub>I</sub>), respektive opačným smyslem kruhové polarizace (DCP<sub>II</sub>).

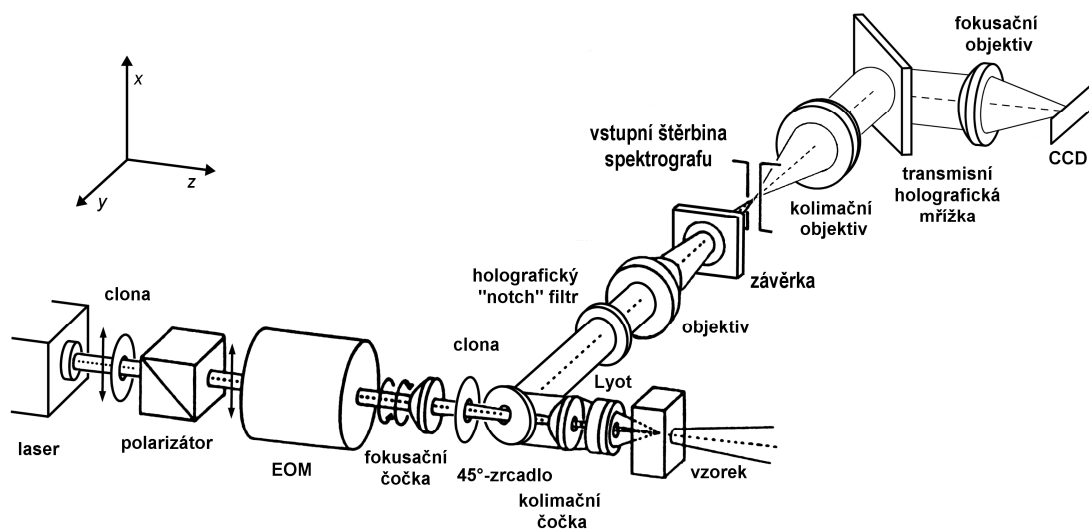
Geometrie rozptylu je určena úhlem mezi dopadajícím a rozptýleným zářením, zpravidla se volí mezi geometrií přímého rozptylu (0°), pravouhlého rozptylu (90°) anebo zpětného rozptylu (180°). Teoreticky bylo ukázáno a následně i experimentálně potvrzeno, že v případě zpětného rozptylu je poměr ROA signálu  $I^R - I^L$  ke zdrojovému Ramanovu signálu  $I^R + I^L$  nejpříznivější, a proto se využívá nejčastěji (Barron a kol., 1996).

## 1.2.2 Pražský ROA spektrometr

Aparatura pro měření ROA v Praze na Fyzikálním ústavu UK (schéma na obr. 1.8) byla inspirována aparaturou skupiny L. D. Barrona na Univerzitě v Glasgow, Hecht a kol. (1992). Aparatura využívá metody ICP v geometrii zpětného rozptylu a podrobně je (včetně postupu nastavování) popsána v dizertační práci J. Kapitána (2006a).

Zdrojem záření je kontinuální argonový laser (Coherent Innova 305) generující záření o vlnové délce 514,5 nm. Stupeň lineární polarizace budícího záření je zvýšen Glan-Taylorovým polarizátorem (GT10, Leysop). Poté svazek vstupuje do elektrooptického modulátoru (EM 565, Leysop), kterým je podélná Pockelsova cela s krystalem dideuterofosforečnanu draselného umístěným v tepelně stabilizovaném pouzdře, aby se předešlo vzniku dvojlomných posuvů vyvolaných teplotou, jež by mohly způsobit vznik polarizačních artefaktů. Pomocí PC je ovládáno přepínání

napětí přikládané na EOM. V závislosti na jeho polaritě je generováno pravo- a levotočivě kruhově polarizované budící záření.



**Obr. 1.8:** Optické schéma ROA spektrometru v Praze.

Modulovaný svazek je fokusován plosko-vypuklou čočkou (Melles Griot 01LQP013,  $f = 150$  mm, průměr 25 mm), prochází prvky s vyvrtanými otvory o průměru 2,5 mm (45°-zrcadlem, kolimační čočkou a Lyotovým depolarizátorem) a poté dopadá na kyvetu se vzorkem, která je umístěna v držáku s mikrometrickými XYZ posuvy.

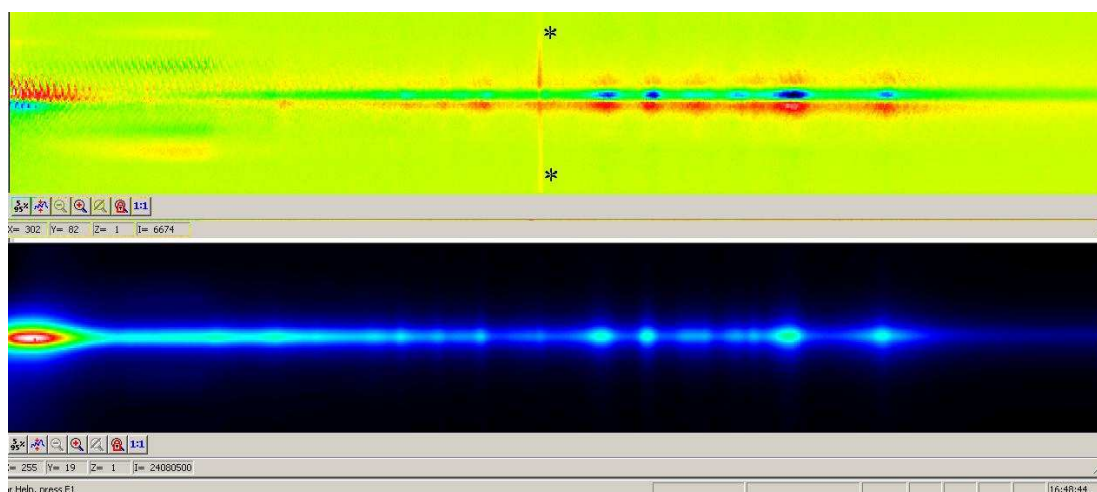
Rozptýlené záření je sbíráno pod úhlem  $180^\circ$  vzhledem k budícímu záření. Nejprve je depolarizováno Lyotovým depolarizátorem (Leysop) a poté kolimováno dvojevypuklou křemennou čočkou ( $f = 25$  mm, průměr 25 mm, zacloněna na cca  $f/1,2$ ). Pomocí 45°-zrcadla je svazek odkloněn o  $90^\circ$  od původního směru a dále prochází holografickým SuperNotch-Plus filtrem (Kaiser Optical Systems,  $514,5$  nm (optická hustota  $> 6,0$ , spektrální hrana  $< 150$   $\text{cm}^{-1}$ ), který slouží k potlačení pružného Rayleighova rozptylu.

Prošlé záření je fokusováno na vstupní štěrbinu spektrografu vysoce světelným fotografickým objektivem (AF Nikkor 50 mm  $f/1,4D$ , Nikon). Za vyměnitelnou vstupní štěrbinou spektrografu je umístěn další fotografický objektiv. Kolimované záření je pak difraktováno na holografické transmissní mřížce (HSG-514.5-LF, disperze  $2,4$   $\text{cm}^{-1}/\text{pixel}$ ). Difraktované záření je fokusováno objektivem na CCD detektor s kvantovou účinností až 80% (LN-CCD-1340/100-EB/1, Roper Scientific) skládající se z  $1340 \times 100$  pixelů na ploše  $26,8 \times 2,0$  mm. CCD detektor je chlazen kapalným dusíkem na pracovní teplotu  $-120^\circ\text{C}$ .

Základem řídicího softwaru je programový balík WinSpec32 (verze 2.5.4.4) a knihovna Macro Record Option, která umožňuje ovládat procedury WinSpecu z prostředí programu Visual Basic 6. V něm bylo vytvořeno grafické rozhraní pro ovládání aparatury, komunikaci s jejími částmi, ukládání dat a jejich zpracování. Během vlastního měření program střídavě zaznamenává intenzity rozptylu odpovídající oběma kruhovým polarizacím dopadajícího záření.

### 1.2.3 Zpracování spekter

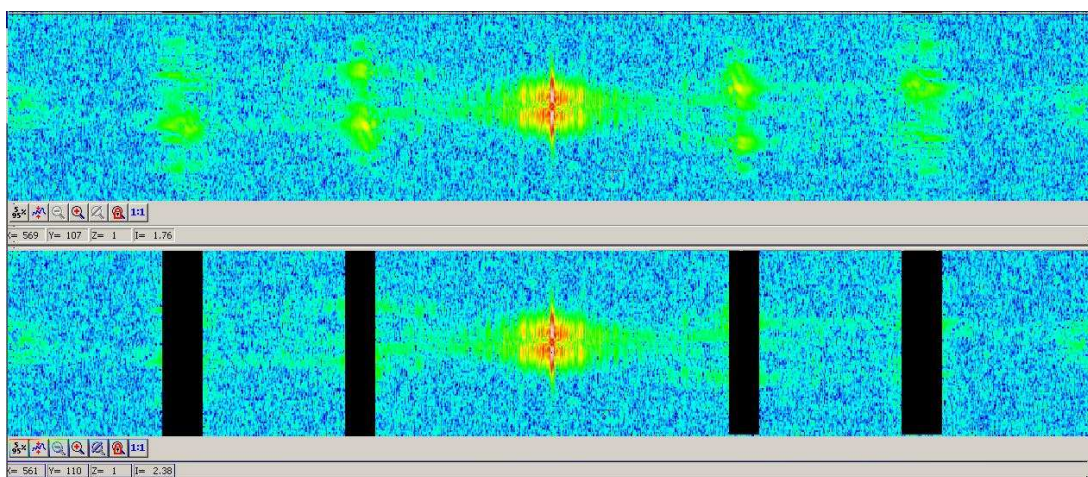
Data odpovídající součtovému (Ramanova) a rozdílovému (ROA) signálu jsou ukládána v obrazovém módu (2D), jak je ukázáno na obr. 1.9 na příkladu 1 M roztoku histidinu při pH 3,9 (uveden v kapitole 3.1). V tomto módu je možné provádět úpravy spekter, např. odstranění artefaktu v ROA spektru nebo Fourierovu filtraci.



**Obr. 1.9:** Záznam ROA (nahore) a Ramanova (dole) spektra histidinu při pH 3,9 v obrazovém módu. Hvězdičkami je označen artefakt v ROA spektru odstranitelný procedurou „Clean Field“.

Poloha artefaktu v ROA spektru, který má původ zřejmě v Lyotově depolarizátoru, je poměrně přesně definována. Příslušné oblasti označené na obr. 1.9 černými hvězdičkami je možné vyříznout pomocí rutiny „Clean Field“ a nahradit je zprůměrovaným pozadím z okolí.

K eliminaci šumu v experimentálních ROA datech je možné použít Fourierovu filtraci, jak je ukázáno na obr. 1.10. Nejprve se z ROA spektra v obrazovém módu vytvoří pomocí rutiny „Fourier Transform“ jeho Fourierův obraz. Obdélníkový notch filtr (znázorněn černě), který je schopen potlačit určité prostorové frekvence, aplikujeme na oblasti, ve kterých se objevují periodické artefakty způsobené interferenčními jevy na čelní stěně kyvety. Výsledné korigované spektrum získáme pomocí zpětné Fourierovy transformace.

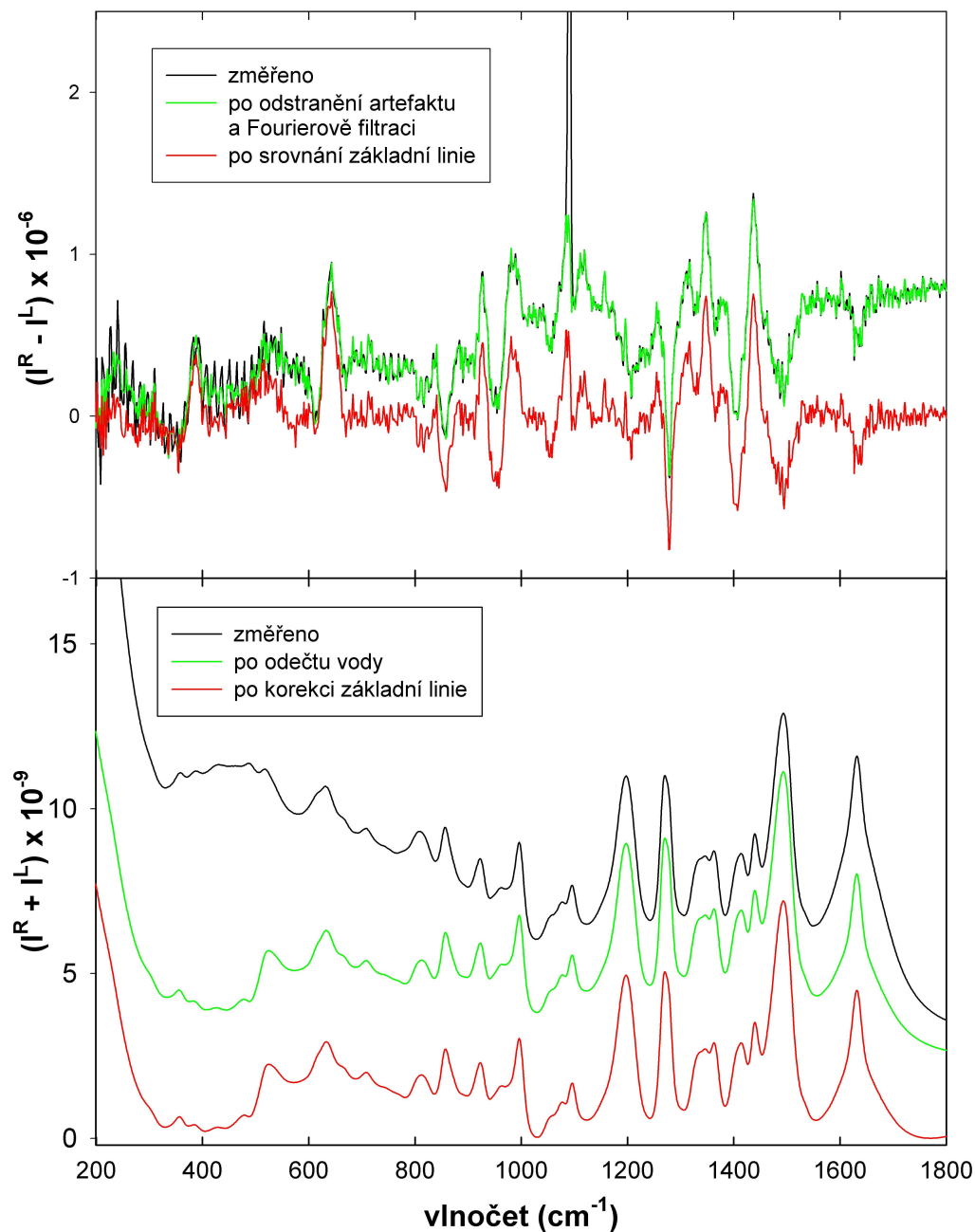


**Obr. 1.10:** Fourierova filtrace dat. Nahoře Fourierův obraz naměřeného ROA spektra histidinu při pH 3,9 v obrazovém módu. Dole tentýž obraz po aplikaci obdélníkového notch filtru.

Spektra ve spektrálním módu (1D) jsou získána pomocí procedury „binning“ umožňující sečtení řádků detektoru (buď všech 100 nebo ve vybraném intervalu). Pixelovou škálu je pak nutné převést na škálu vlnočtovou. Ke kalibraci se používá neonová výbojka, jejíž spektrum je v naší využití oblasti dobře definováno a tabelováno. Pomocí počítačového programu vytvořeného doc. RNDr. Jiřím Bokem, CSc. je vztah mezi pořadovým číslem pixelu a relativním vlnočtem aproximován polynomem třetího stupně. Spektra jsou pak ještě přepočítána tak, aby výsledná vlnočtová škála byla ekvidistantní s krokem  $1 \text{ cm}^{-1}$ .

Na obr. 1.11 je ukázáno původní změřené ROA spektrum histidinu při pH 3,9 ve spektrálním módu a upravené spektrum po odstranění artefaktu a provedení Fourierovy filtrace. Zejména v oblasti pod  $600 \text{ cm}^{-1}$  došlo k poměrně dobrému potlačení periodických artefaktů. Posledním krokem zpracování je srovnání mírně skloněné základní linie (baseline) ROA spektra.

Na obr. 1.11 je uvedeno i Ramanovo spektrum, které má mnohem vyšší poměr signál/šum než ROA spektrum, a je upraveno tak, že je od něj ve spektrálním módu odečteno Ramanovo spektrum vody a zkorigována základní linie.



**Obr. 1.11:** Nahoře černě nezpracované ROA spektrum histidinu při pH 3,9, zeleně spektrum po odstranění artefaktu a provedení Fourierovy filtrace, červeně spektrum po srovnání základní linie. Dole černě nezpracované Ramanovo spektrum, zeleně spektrum po odečtení signálu rozpouštědla (vody) a červeně spektrum po korekci pozadí (offset).

### 1.3. Aplikace ROA spektroskopie

ROA se rozvinula ve významnou spektroskopickou techniku, kterou je možné využít k získání velmi detailních informací nejen o malých molekulách, ale lze ji aplikovat na proteiny, cukry, nukleové kyseliny a dokonce viry (Barron a kol., 2000). Vibrační spektra těchto látek (nejčastěji rozpuštěných ve vodě) lze zaznamenat v celém rozsahu fundamentálních vlnočtů ( $100 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ; zpravidla se ale měří pouze oblast  $300-1800 \text{ cm}^{-1}$ ).

ROA je metoda citlivá k dynamickému chování (bio)molekulárních struktur. Událost rozptylu totiž probíhá v časové škále  $10^{-13}$  až  $10^{-14}$  s, což je doba mnohem kratší než i ty nejrychlejší konformační změny. ROA spektrum pak představuje váženou superpozici příspěvků od všech konformací, které jsou přítomny ve vzorku v rovnováze. S velikostí molekuly obvykle stoupá počet možných konformací, které mohou poskytovat rozdílná spektra. Výsledná ROA intenzita závisí na absolutní chiralitě, a proto může dojít k vyrušení příspěvků enantiomerních struktur, které mohou vznikat při tom, jak pohyblivé části molekuly procházejí celou škálou dostupných konformací. Z výpočetního hlediska je ovšem velmi obtížné najít nejstabilnější konformace.

Spektrum ROA někdy obsahuje méně pásů než zdrojová vibrační spektra biopolymerů díky tomu, že nejsilnější ROA signál pochází od vibrací nejrigidnějších a současně chirálních částí struktury, Barron a kol. (2002). V případě proteinů se jedná především o vibrace peptidové páteře.

#### 1.3.1 ROA aminokyselin

Aminokyseliny vyskytující se ve vodných roztocích při neutrálním pH v podobě podvojného iontu jsou ideálním modelovým systémem pro studium interakcí nabitých částí molekuly s rozpouštědlem. Podvojný ion není možné modelovat ve vakuu, rozpouštědlo musí kompenzovat vzájemné přitahování karboxylové skupiny  $-\text{COO}^-$  a aminoskupiny  $\text{NH}_3^+$ .

Pro správnou interpretaci experimentálních dat je nutné do výpočtu zahrnout konformační rovnováhu, molekulární flexibilitu a vliv rozpouštědla. Zatímco některé

spektrální pásy nejsou ke změnám geometrie molekuly či prostředí příliš citlivé, jiné jsou citlivější k molekulárním pohybům a další k interakci s rozpouštědlem.

V centru pozornosti ROA spektroskopie aminokyselin je často L-alanin, nejjednodušší chirální aminokyselina, která díky své velmi dobré rozpustnosti ve vodě a počtu 13 atomů představuje vhodný systém jak pro experimentální zkoumání, tak i pro hledání a optimalizaci takových výpočetních postupů, které vedou k dosažení co nejlepší shody s naměřenými daty, Barron a kol. (1991) a (1992); Jalkanen a kol. (2001) a (2004). Molekulu v roztoku nelze popisovat jako rigidní systém, naopak pro dosažení lepší shody s experimentem je nutné do výpočtu zahrnout i dynamiku její struktury. V práci Kapitána a kol. (2006b) je zkoumána citlivost spektrálních pásů v Ramanových a ROA spektrech L-alaninu na rotaci postranních skupin  $-\text{NH}_3^+$ ,  $-\text{COO}^-$  a  $-\text{CH}_3$ . Pásy citlivé k rotaci jsou v Ramanových spektrech zřetelně širší a v ROA spektrech málo intenzivní. Spektra L-alaninu byla proměřena i v oblasti nízkoenergetických vibrací od  $100 \text{ cm}^{-1}$ , která je, jak se ukazuje, pro interpretaci spekter neméně důležitá, zatímco dříve byla uváděna pouze oblast nad  $600 \text{ cm}^{-1}$ .

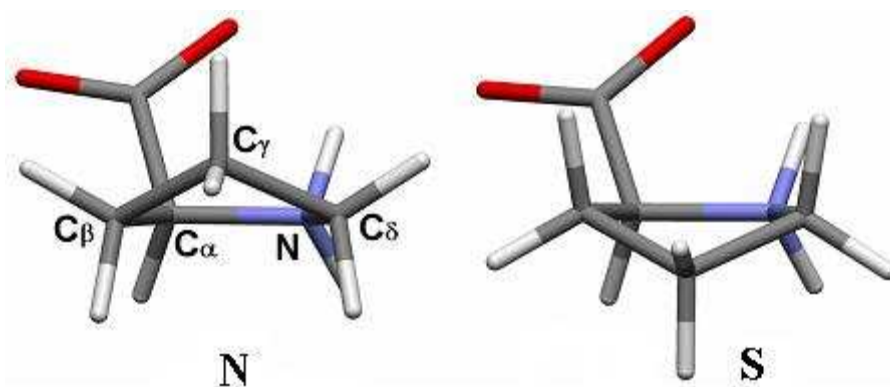
Další jednoduché aminokyseliny jsou L-serin a L-cystein. Jejich ICP ROA spektra společně s kompletním přiřazením vibračních módů uvádí Gargaro a kol. (1993). V této práci jsou uvedena spektra a částečné přiřazení pásů i pro L-valin, L-threonin and L-isoleucin.

Na příkladu tryptofanu bylo ukázáno, že i konformace postranních řetězců může mít vliv na charakter ROA spekter proteinů. Zatímco poloha vibračního módu W3 indolového kruhu tryptofanu v Ramanových spektrech odráží velikost torzního úhlu  $|\chi^{2,1}|$  popisujícího orientaci tryptofanového postranního řetězce vzhledem k hlavnímu řetězci, ROA k tomu přidává možnost určit i znaménko torzního úhlu a tak získat o tomto postranním řetězci kompletní stereochemickou informaci jinak dostupnou pouze pomocí metod s atomárním rozlišením, Blanch a kol. (2001), Jacob a kol. (2008).

Zajímavou aminokyselinou je L-prolin, který obsahuje sekundární amid. L-prolin je stavebním kamenem většiny peptidů a proteinů, zásadním způsobem ovlivňuje jejich strukturu a biologickou funkci, zvyšuje například sklon k tvorbě ohybů u  $\beta$ -skládaného listu, Yao a kol. (1994). Jedná se o modelový systém, který je zajímavý i z teoretického hlediska. Prolin a peptidy, jejichž je součástí, jsou intenzivně studovány ve spolupráci experimentální skupiny vedené Doc. RNDr.



Vladimírem Baumrukem, DrSc. na MFF UK a výpočetní skupiny Doc. RNDr. Petra Bouře, CSc. na ÚOCHB AV ČR v.v.i. V práci Kapitán a kol. (2006c) byla proměřena Ramanova a ROA spektra roztoků L- a D-prolinu ve formě podvojného iontu v H<sub>2</sub>O i D<sub>2</sub>O v oblasti 100 – 1800 cm<sup>-1</sup>. Prostřednictvím výpočtů bylo zjištěno, že zkrabacení (puckering) pětičlenného prolinového kruhu, popsané pomocí amplitudy a fáze, je korelováno s rotací skupiny COO<sup>-</sup>, a že spektra v roztoku odpovídají přibližně rovnoměrnému zastoupení dvou energeticky blízkých rovnovážných konformací prolinového kruhu (viz obr. 1.12).



**Obr. 1.12:** Dvě konformace L-prolinu (značené N a S) s nejnižší energií, energie obou konformerů je téměř stejná.

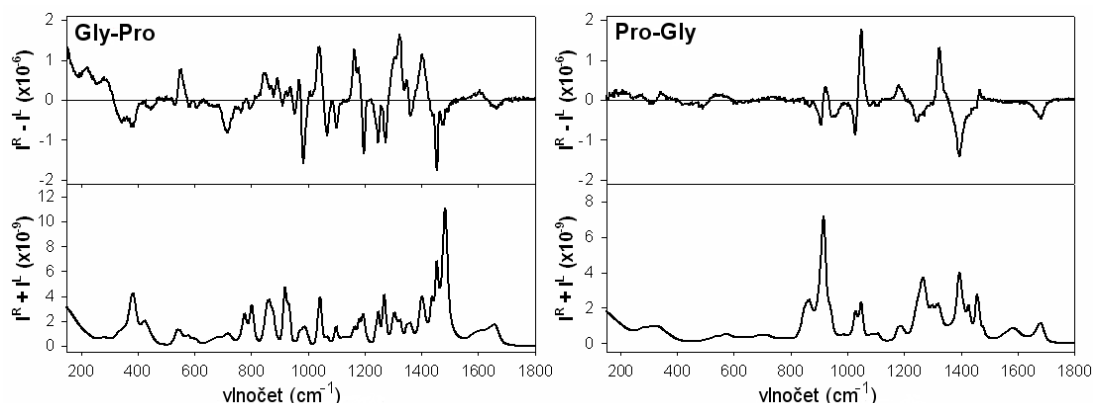
### 1.3.2 ROA peptidů

Studium peptidů představuje nezbytný mezikrok k pochopení struktury proteinů. Podobně i při studiu peptidů je vhodné směřovat od jednoduchých dipeptidů k větším modelovým systémům. Navíc pro dipeptidy je technicky možné provádět přímé *ab initio* výpočty.

ROA spektroskopie byla v minulosti aplikována na modelové systémy jako například dipeptidy L-alaninu a glycinu. Na delších peptidech byla studována závislost na délce peptidového řetězce a pořadí aminokyselin. Výsledek silně podporoval lokální původ ROA signálu, Yu a kol. (1995).

Dalším jednoduchým dipeptidem je L-alanyl-L-alanin, který je díky všeobecně známému a dobře proměřenému spektru používán i ke kontrole správnosti nastavení ROA spektrometru, Bouř a kol. (2001), Jalkanen a kol. (2003).

Na příkladu dvou jednoduchých dipeptidů Gly-Pro a Pro-Gly ve vodném roztoku je možné ukázat, jak výrazným způsobem se konformační flexibilita molekul projevuje v Ramanových a ROA spektrech, Kapitán a kol. (2006b). Zatímco dipeptid Gly-L-Pro je rigidní, neboť prolin je na C konci dipeptidu a rotace kolem vazby  $C_{\alpha}$ -N (torzní úhel  $\phi$ ) je pětičlenným kruhem výrazně omezena, L-Pro-Gly je mnohem flexibilnější díky tomu, že prolin se nachází na N konci dipeptidu a rotace kolem torzního úhlu  $\phi$  je v tomto případě volná. Z obr. 1.13 je patrné, že u rigidního systému Gly-L-Pro je ROA spektrum bohaté s úzkými dobře rozlišenými pásy a relativně intenzivním ROA signálem i v oblasti torzních vibrací (200-750  $\text{cm}^{-1}$ ). Naproti tomu u flexibilního systému L-Pro-Gly je ROA spektrum díky vyrušení signálu od různých konformerů velice jednoduché, pásy v ROA i v Ramanově spektru jsou rozšířené, v oblasti torzních vibrací jsou Ramanovy pásy široké a ROA signál je zde velmi slabý. Stejné chování bylo pozorováno i pro dvojici dipeptidů Ala-Pro a Pro-Ala.



**Obr. 1.13:** Srovnání Ramanových a ICP ROA spekter rigidního (Gly-Pro) a flexibilního (Pro-Gly) dipeptidu. Převzato z Kapitán a kol. (2006b).

Zajímavý systém pro experimentální i teoretické studium představují peptidy nabývající konformaci označovanou jako polyprolin II (PPII). PPII hraje důležitou roli v neuspořádaných polypeptidech a v tzv. misfoldingu proteinů, Shi a kol. (2002). Tuto konformaci levotočivé šroubovice s třemi aminokyselinovými zbytky na závit, která není stabilizována intramolekulárními vodíkovými vazbami, mohou zaujímat i peptidové sekvence neobsahující prolin, Stapley a kol. (1999). ROA spektra samotného poly(L-prolinu) byla publikována v práci Kapitána a kol. (2006d). Byla provedena analýza založená na srovnání spekter s *ab initio* simulacemi poloh a intenzit spektrálních pásů. Byl prokázán výskyt obou hlavních konformací

pětičlenného kruhu (S a N, viz. obr. 1.12) s přibližně stejným zastoupením. Struktura PPII v roztoku není rigidní, ale je narušována fluktuacemi, které ovlivňují spřažení vibračních módů prolinových kruhů a způsobují rozšíření ROA pásů. Ukazuje se, že příspěvek postranních řetězců a hlavního řetězce k intenzitě ROA pásů je přibližně stejný, a proto je porozumění původu obou těchto zdrojů signálu pro určování struktury peptidů pomocí ROA velmi důležité. Navíc byly nalezeny spektrální indikátory přítomnosti konformace PPII v peptidech bohatých na prolin.

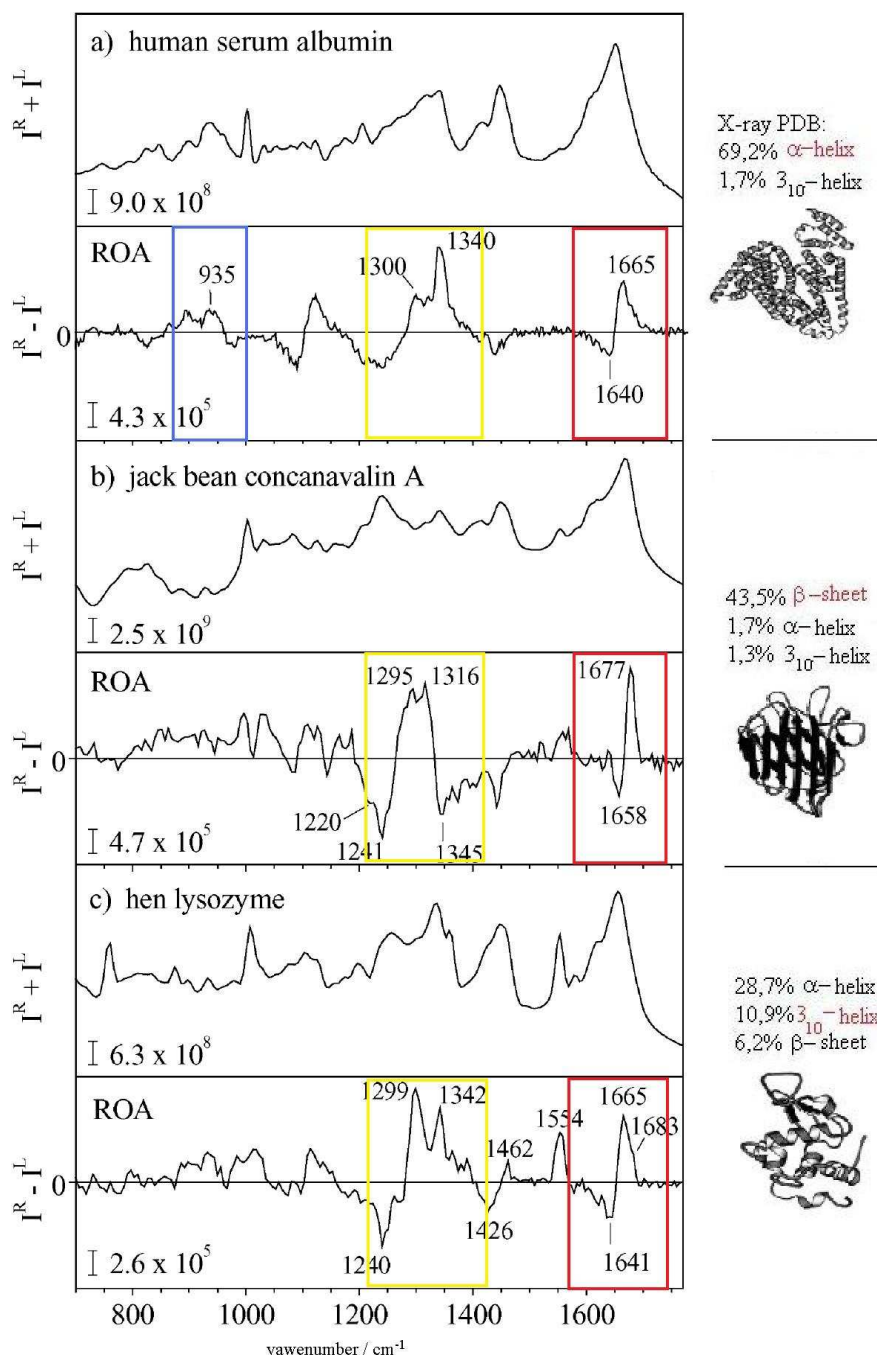
### 1.3.3. ROA proteinů

Struktura proteinů obsahujících až několik stovek aminokyselin, složená z jednotlivých typů sekundárních struktur, je často složitá a různorodá. Je nemožné provádět dostatečně kvalitní přímé *ab initio* výpočty, proto interpretace naměřených spekter spočívá zejména ve sledování strukturních markerů v naměřených spektrech, např. v oblasti amidu I a III ROA umožňuje sledování konformačních změn vyvolaných vlivem prostředí (pH, teplota). V práci Blanch a kol. (2004) je uveden souhrn znaků základních sekundárních struktur v ROA spektrech získaný pro několik typických zástupců (viz obr. 1.14).

V Ramanových a ROA spektrech proteinů je pozorovatelná oblast valenčních vibrací C=O zvaná amid I (1600-1700  $\text{cm}^{-1}$ , na obr. 1.14 vyznačena červeně) a rozšířená oblast amidu III (1230–1340  $\text{cm}^{-1}$ , obr. 1.14 vyznačena žlutě), kde jsou  $\text{C}_\alpha\text{-N}$  a  $\text{C}_\alpha\text{-C}$  valenční vibrace kombinované s rovinnými deformačními vibracemi N-H a  $\text{C}_\alpha\text{-H}$ . Ta je k určování struktury obzvláště důležitá, protože díky interakcím mezi N-H a  $\text{C}_\alpha\text{-H}$  deformačními vibracemi zde pozorujeme řadu ROA pásů velmi citlivě odrážejících geometrii peptidového řetězce. Další důležitou oblast představují valenční vibrace páteře molekuly (870-1150  $\text{cm}^{-1}$ , na obr. 1.14 vyznačena modře), které pocházejí zejména od valenčních vibračních souřadnic  $\text{C}_\alpha\text{-C}$ ,  $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$  a  $\text{C}_\alpha\text{-N}$ . Prostřednictvím Ramanovy spektroskopie lze z polohy pásů amidu I a III rozlišit různé typy sekundárních struktur. V ROA spektroskopii je možné vycházet nejen z polohy, ale i ze znaménka ROA pásů.

Na soubor naměřených ROA spekter různých sekundárních struktur je možné aplikovat vhodné statistické metody, které jsou schopny rozpoznat hlavní společné

a rozdílné strukturální znaky ve zpracovaných spektrech. Významná je například analýza hlavní komponenty (principal component analysis, PCA), která dokáže rozložit naměřená ROA spektra do subspekter. Analýzou nejvýznamnějších koeficientů rozkladu z PCA je možné rozpoznat jednotlivé typy sekundárních struktur. Podrobnosti lze najít v práci Blanch a kol. (2004).



**Obr. 1.14:** Typická Ramanova a ROA spektra základních proteinových struktur. (a) albumin z lidského séra: převážně  $\alpha$ -šroubovice, (b) konkanavalin A z fazole:  $\beta$ -barel a (c) slepičí lysozym: zastoupeny  $\alpha$  i  $\beta$  struktury. Převzato z Blanch a kol. (2004). Červeně vyznačena oblast amidu I, žlutě rozšířená oblast amidu III a modře oblast torzióní vibrací.

## 2. Výpočet ROA spekter *ab initio* metodami

Na interpretaci ROA spekter se soustředila pozornost již od doby, kdy se podařilo naměřit první spektra. V současnosti pokroky ve výpočtech molekulárních vlastností pomocí *ab initio* metod dovolují přímý výpočet ROA spekter pro relativně velké molekuly i přesto, že teorie ROA je velmi komplexní.

### 2.1 Základy kvantové chemie

#### 2.1.1 Schrödingerova rovnice

Kvantová chemie (přehled viz Skála (1994); Szabo a Ostlund (1996)) popisuje systémy elektronů a atomových jader v molekule. Představuje aplikaci kvantové mechaniky pro výpočet vlastností atomů a molekul a jejich interakcí. Většina kvantově-chemických metod se zabývá řešením nerelativistické stacionární Schrödingerovy rovnice (SR)

$$\hat{H}\psi = E\psi ,$$

(2.1)

kde operátor celkové energie  $\hat{H}$  se nazývá Hamiltonián,  $E$  je jeho vlastní hodnota a  $\psi$  je příslušná vlastní (vlnová) funkce. Hamiltonián systému elektronů a jader má tvar

$$\hat{H} = \hat{T}_{el} + \hat{T}_{jad} + V(\{r_i\}, \{R_A\}). \quad (2.2)$$

První člen v rovnici je operátor kinetické energie  $N$  elektronů:  $\hat{T}_{el} = -\frac{\hbar^2}{2m_{el}} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2$ ,

druhý je operátor kinetické energie pro  $M$  jader:  $\hat{T}_{jad} = -\sum_{A=1}^M \frac{\hbar^2}{2M_A} \nabla_A^2$ ,

třetí člen  $V(\{r_i\}, \{R_A\}) = \frac{1}{2} \sum_{A \neq B} \frac{Z_A Z_B e^2}{4\pi\epsilon r_{AB}} + \frac{1}{2} \sum_{i \neq j} \frac{e^2}{4\pi\epsilon r_{ij}} - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A e^2}{4\pi\epsilon r_{Ai}}$ , kde  $i, j$  značí

elektrony a  $A, B$  jádra,  $Z_A$  a  $Z_B$  jsou náboje jader, zahrnuje repulzi mezi jádry a mezi elektrony a coulombickou interakci mezi elektrony a jádry.

Nalézt přesné analytické řešení SR obecně není možné. Předmětem kvantové teorie molekul zůstává především nalezení numerického řešení. Kvantově mechanické metody vždy využívají nějaké aproximace.

### 2.1.2 Born-Oppenheimerova aproximace

S využitím skutečnosti, že rozdíl hmotností elektronů a jader je nejméně tři řády, si v prvním přiblížení můžeme představit, že se elektrony pohybují v poli nehybných jader, přičemž rychle se pohybující elektrony vytvářejí pro jádra efektivní pole. Díky tomu můžeme předpokládat, že celkovou vlnovou funkci v (2.1) lze přepsat na tvar součinu vlnové funkce jader a elektronů

$$\psi(\{r_i\}, \{R_A\}) = \Phi_{\{R_A\}}^{el}(\{r_i\}) \cdot \Phi_{jad}(\{R_A\}) \quad (2.3)$$

Elektronová vlnová funkce splňuje Schrödingerovu rovnici s fixní konfigurací jader

$$\left(\hat{T}_{el} + V(\{r_i\}, \{R_A\})\right) \Phi_{\{R_A\}}^{el}(\{r_i\}) = \varepsilon(\{R_A\}) \Phi_{\{R_A\}}^{el}(\{r_i\}) \quad (2.4)$$

Pokud dále předpokládáme, že se část vlnové funkce pro elektrony mění s polohou jader jen málo, získáme po dosazení Schrödingerovu rovnici pro pohyb jader, která je vyjádřením Born-Oppenheimerovy aproximace

$$\left(\hat{T}_{jad} + \varepsilon(\{R_A\})\right) \Phi_{jad}(\{R_A\}) = E \Phi_{jad}(\{R_A\}), \quad (2.5)$$

kde  $\varepsilon(\{R_A\})$  má význam efektivní potenciální energie pro jádra.

Born-Oppenheimerova aproximace je považována za hlavní aproximaci kvantové chemie. Pro většinu systémů se jedná o velmi dobré přiblížení a všechny následující metody ji předpokládají.

Ve Schrödingerově rovnici pro pohyb jader (2.5) vystupuje  $3N$  souřadnic, ale potenciální energie izolované molekuly  $\varepsilon(\{R_A\})$  závisí pouze na vzájemné poloze jader, to znamená na  $3N-6$  souřadnicích (v případě nelineární molekuly, případ lineární molekuly s  $3N-5$  souřadnicemi nebude dále uvažován). Na zbývajících 6 souřadnic působí pouze operátor kinetické energie a reprezentují translační a rotační pohyb molekuly. Při řešení problému jader je vhodné translační, rotační a vibrační stupně volnosti oddělit.

Translační pohyb lze exaktně separovat přechodem do těžišťové soustavy souřadnic. Separace vnější rotace molekuly je kvůli Coriolisovým silám možná jen přibližně, a to přechodem do rotující těžišťové soustavy tvořené hlavními osami

tenzoru momentu setrvačnosti. Po odseparování vnějšího pohybu molekuly zůstává Schrödingerova rovnice pro jádra (2.5) ve tvaru

$$\left(\hat{T}_{jad}^{vnitřní} + \varepsilon(\{R_A\})\right)\Phi_{jad}(\{R_A\}) = E^{vnitřní}\Phi_{jad}(\{R_A\}) \quad (2.6)$$

### 2.1.3 Harmonická aproximace

Pro stabilní molekuly, jejichž jádra se nacházejí v polohách blízkých minimu energie daného elektronového stavu, tedy  $\Delta R_i \ll R_i^0$ , je možné použít aproximaci malých výchylek. Okamžitá hodnota vnitřní souřadnice se vyjadřuje pomocí odchylky od její hodnoty pro rovnovážnou polohu

$$R_i = R_i^0 + \Delta R_i \text{ pro } i = 1, 2, \dots, 3N \quad (2.7)$$

Za tohoto předpokladu lze operátor kinetické energie vystupující v rovnici (2.6) napsat ve tvaru

$$\hat{T}_{jad}^{vnitřní} = -\sum_{j=1}^{3N} \frac{\hbar^2}{2M_j} \frac{\partial^2}{\partial \Delta R_j^2} \quad (2.8)$$

Potenciál pro pohyb jader  $\varepsilon_{R_A}$  v rovnici (2.6) můžeme vyjádřit rozvojem do Taylorovy řady

$$\varepsilon(\{R\}) = \varepsilon(\{R^0\}) + \sum_{j=1}^{3N} \left. \frac{\partial \varepsilon}{\partial \Delta R_j} \right|_{\{R\}=\{R^0\}} \cdot \Delta R_j + \frac{1}{2} \sum_{j,k=1}^{3N} \left. \frac{\partial^2 \varepsilon}{\partial \Delta R_j \partial \Delta R_k} \right|_{\{R\}=\{R^0\}} \cdot \Delta R_j \Delta R_k + \dots \quad (2.9)$$

První člen rozvoje je možné položit roven nule, pro rovnovážnou polohu jader je  $\frac{\partial \varepsilon}{\partial R}$  rovno nule a první nenulový člen je až kvadratický. V harmonické aproximaci zanedbáváme všechny další členy. Po zavedení matice silového pole (FF) zvané Hessián s prvky

$$f_{jk} = \frac{\partial^2 \varepsilon}{\partial \Delta R_j \partial \Delta R_k} \quad (2.10)$$

můžeme přepsat vibrační část Schrödingerovy rovnice jader (2.6) jako

$$\begin{aligned} & \sum_{j,k=1}^{3N} \frac{1}{2} \left( (F)_{jk} \cdot \Delta R_j \Delta R_k - \frac{\hbar^2}{M_j} \frac{\partial^2}{\partial \Delta R_j^2} \right) \cdot \Phi_{jad}(\{\Delta R\}) \\ & = \left[ E^{vnitřní} - \varepsilon(\{R^0\}) \right] \cdot \Phi_{jad}(\{\Delta R\}) \end{aligned} \quad (2.11)$$

Rovnici (2.11) lze vyřešit diagonalizací matice silového pole (2.10) pomocí lineární transformace kartézských souřadnic do normálních vibračních módů  $Q_k$

$$Q_k = \sum_{j=1}^{3N} S_{kj}^{-1} \Delta R_j \quad (2.12)$$

tak, že platí

$$\sum_{i,j=1}^{3N} f_{ij} \cdot \Delta R_i \Delta R_j = \sum_{k=1}^{3N} \omega_k^2 Q_k^2 \quad \text{a} \quad \sum_{j=1}^{3N} \frac{1}{M_j} \frac{\partial^2}{\partial \Delta R_j^2} = \sum_{k=1}^{3N} \frac{\partial^2}{\partial Q_k^2} \quad (2.13)$$

Rovnice (2.12) definuje  $3N$  normálních módů  $Q_k$ , zatímco vibračních stupňů volnosti je po odseparování vnějšího pohybu molekuly pouze  $3N - 6$ . Ve výsledku se to neprojeví, neboť pro módy odpovídající translacím a rotacím je  $\omega_k = 0$ . Provedenou transformací dostáváme vibrační Hamiltonián ve tvaru součtu  $3N-6$  Hamiltoniánů lineárních harmonických oscilátorů odpovídajících nezávislým vibračním pohybům molekuly

$$\hat{H}_{vib} = \sum_{j=1}^{3N-6} \frac{1}{2} \left( -\hbar^2 \frac{\partial^2}{\partial Q_j^2} + \omega_j^2 Q_j^2 \right) = \sum_{j=1}^{3N} \hat{H}_j \quad (2.14)$$

Celkovou vlnovou funkci pro jádra z rovnice (2.6) lze pak vyjádřit jako součin vlnových funkcí závislých na jedné normální vibrační souřadnici

$$\Phi_{jad}(\{X\}) = \prod_{j=1}^{3N-6} \varphi_j(Q_j) \quad (2.15)$$

a Schrödingerova rovnice (2.6) se rozpadne na jednodimenzionální rovnice ve tvaru

$$\hat{H}_j \varphi_j = \left( \frac{1}{2} + n_j \right) \hbar \omega_j \varphi_j, \quad (2.16)$$

kde  $\omega_j$  je frekvence  $j$ -té vibrace a  $n_j$  je vibrační kvantové číslo nabývající hodnot  $0, 1, \dots$

## 2.2 Přehled *ab initio* výpočetních metod

Mnohaelektronovou Schrödingerovu rovnici (2.4) není možné v naprosté většině případů řešit přesně. *Ab initio* metody ji řeší numericky. Na rozdíl od semiempirických metod nevyužívají experimentálních parametrů, případně využívají jen malý počet univerzálních konstant (DFT). Pojem *ab initio* pochází z latinského „od počátku“. Teoretický základ *ab initio* metod začal budovat Slater zhruba v roce 1930. Slater popsal vlnovou funkci molekuly pomocí determinantu dnes označovaného jako Slaterův. Ve 30. letech byla vypracována metoda



selfkonzistentního pole (SCF) zvaná také Hartree-Fockova aproximace, která představuje výchozí bod pro řadu dalších metod. Dalšími mezníky byly publikace Roothanových prací roku 1950 a Popleho prací roku 1965. Počátky dalšího přístupu, založeného na možnosti reprezentovat mnohaelektronový systém elektronovou hustotou (DFT), se objevují v pracích Thomase, Fermiho a Diraca už na konci 20. let 20. století. Impulsem pro hlubší výzkum se pak staly studie Hohenberga, Kohna a Shama z poloviny 60. let. Metody založené na DFT jsou v kvantové chemii široce využívány od 80. let. V 70. letech byl vytvořen programový balík Gaussian, který obsahuje *ab initio* i semiempirické metody.

### 2.2.1 Vlnová funkce

Přibližná vlnová funkce mnohaelektronového systému je v kvantové chemii zpravidla konstruována z jednoelektronových funkcí zvaných molekulové spinorbitaly. Obecně jsou to komplexní, ortonormální funkce, které mají tvar součinu prostorové a spinové komponenty

$$\chi(\vec{x}_i) = \psi(\vec{r}_i) \cdot s(\sigma_i), \quad (2.17)$$

kde  $\vec{x}_i$  je zobecněná souřadnice  $i$ -tého elektronu skládající se z prostorové souřadnice  $\vec{r}_i$  a spinové souřadnice  $\sigma_i$  nabývající hodnot  $\pm \frac{1}{2}$ .

Při sestavování vlnové funkce popisující soubor  $N$  elektronů je nezbytné respektovat Pauliho vylučovací princip, ze kterého plyne požadavek antisymetrie vlnové funkce vůči záměně libovolných dvou částic. Řešení je možné hledat ve tvaru Slaterova determinantu, který popisuje systém neinteragujících částic

$$\Phi^{HF}(\{x_1 \dots x_N\}) = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \chi_1(x_1) & \dots & \chi_N(x_1) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \chi_1(x_N) & \dots & \chi_N(x_N) \end{vmatrix} \quad (2.18)$$

Přesné řešení Schrödingerovy rovnice (2.4) lze získat rozvojem do úplné báze sestavené ze Slaterových determinantů

$$|\psi\rangle = \sum_{n=1}^{\infty} C_n |\Phi_n\rangle. \quad (2.19)$$

Hartree-Fockova aproximace využívá jen jediného Slaterova determinantu.

Spinorbitaly vystupující ve vlnové funkci (2.17) jsou poměrně složité objekty. Proto je pro praktické výpočty nutné nejdříve příslušné vztahy upravit tak, že eliminujeme spinovou komponentu. Pak lze místo spinorbitalů používat prostorové *molekulové orbitaly*  $\psi_i(\vec{r})$ , které se obvykle tvoří rozvojem do konečné báze jednoelektronových funkcí, které nemusí být obecně ortogonální

$$\psi_i = \sum_{\mu} c_{i\mu} \phi_{\mu} \quad (2.20)$$

Jako bázi je výhodné zejména kvůli rychlé konvergenci používat *atomové orbitaly*  $\phi_{\mu}(\vec{r})$  lokalizované na jednotlivých atomech, tj. metoda MO-LCAO (molecular orbitals – linear combinations of atomic orbitals). Vlnová funkce si totiž v blízkosti jádra zachovává atomární charakter. Ovšem ani atomové orbitaly nepředstavují dostatečně jednoduchý objekt pro praktické použití. Obsahují radiální a úhlovou část

$$\phi(\vec{r}) = R_{nl}(\vec{r}) \cdot Y_{lm}(\vartheta, \varphi) \quad (2.21)$$

Atomové orbitaly získané řešením SR pro atom vodíku mají radiální části ve tvaru přidružených Laguerrových polynomů a úhlovou část tvoří kulové funkce (přidružené Legendrovy polynomy). Kulové funkce můžeme na rozdíl od atomu vodíku pro molekuly zvolit reálné. Tyto orbitaly mají správné chování pro  $r \rightarrow 0$  i pro  $r \rightarrow \infty$ , ale jsou pro praktické výpočty příliš složité. Pro aproximaci radiální části jsou široce používány funkce Slaterova typu (STO)

$$R_{nl}(\vec{r}) \sim r^{n-1} \exp(-\zeta r) \quad (2.22)$$

a Gaussovy funkce (GTO)

$$R_{nl}(\vec{r}) \sim N r^n \exp(-a r^2), \quad (2.23)$$

kde koeficienty  $\zeta$  a  $a$  jsou kladná reálná čísla a  $r$  je vzdálenost od jádra. Slaterovy funkce mají tvar velice podobný radiálním funkcím pro vodíku podobný atom a správným způsobem reprezentují jejich chování jak pro  $r \rightarrow 0$ , tak i pro  $r \rightarrow \infty$ . Naproti tomu Gaussovy funkce chování pro  $r \rightarrow 0$  ani pro  $r \rightarrow \infty$  nemají správné. Použití Gaussových funkcí je však výpočetně velice výhodné, neboť součinem dvou funkcí lokalizovaných na dvou různých centrech je opět Gaussova funkce. Tím se zvyšuje rychlost výpočtu potřebných integrálů, které tak jsou redukovány na jedno- a dvoucentrové. Často používaným přístupem je proto aproximace jedné funkce Slaterova typu pomocí lineární kombinace několika Gaussových funkcí. V této práci se vychází z báze 6-31G, ve které jsou vnitřní orbitaly reprezentovány kontrakcí šesti

Gaussových funkcí a každému valenčnímu orbitalu přísluší kontrakce tří Gaussových funkcí a jedné samotné Gaussovy funkce.

Ukazuje se, že báze složená pouze z obsazených atomových orbitalů je nedostačující a je nutné přidat další. Ve výpočtech se osvědčily tzv. polarizační a difúzní funkce. Polarizační funkce aproximují atomové orbitály s vyšším kvantovým číslem  $l$ , než je základní stav. V zápisu báze se často zapisují pomocí hvězdičky (\*), pokud jsou tyto polarizační funkce lokalizovány jen na těžkých atomech, a dvěma hvězdičkami (\*\*), pokud mají být lokalizovány i na atomech vodíku. Difúzní funkce umožňují lépe popsat slabě vázané elektrony ve větší vzdálenosti od jádra. Ve standardním popisu báze jsou značeny symbolem plus (+).

## 2.2.2 Hartree-Fockova metoda (HF)

V současné době je k řešení Schrödingerovy rovnice (2.4) k dispozici značný počet přibližných metod, z nichž většina je založena na Hartree-Fockově aproximaci (HF), což je svou podstatou jednoelektronová aproximace, v níž je působení ostatních elektronů na daný elektron nahrazeno efektivním polem.

Variačním principem je nalezen soubor spinorbitalů takových, že z nich vytvořený jediný Slaterův determinant je nejlepší možnou aproximací základního stavu  $N$ -elektronového systému. Minimalizací energie systému  $E^{HF} = \langle \Phi^{HF} | \hat{H} | \Phi^{HF} \rangle$  dostáváme sadu  $N$  navzájem provázaných jednoelektronových tzv. Hartree-Fockových rovnic

$$\hat{f}_a(i) \chi_a(x_i) = \varepsilon_a(i) \chi_a(x_i), \quad (2.24)$$

kde Fockův operátor  $\hat{f}_a(i)$  má tvar

$$\hat{f}_a(i) = -\frac{\hbar^2}{2m_e} \nabla_i^2 - \sum_A \frac{Z_A e^2}{r_{iA}} + v^{HF}(i) = \hat{h}(i) + v^{HF}(i), \quad (2.25)$$

Jednoelektronový operátor  $\hat{h}(i)$  zahrnuje kinetickou energii a přitažlivost elektronu k jádrům, efektivní potenciál  $v^{HF}$  představuje vystředovanou interakci  $a$ -tého elektronu s ostatními elektrony a implicitně závisí na spinorbitalech všech  $N - 1$  zbývajících elektronů. Díky tomu je Fockův operátor  $\hat{f}(i)$  nelokální a systém Hartree-Fockových rovnic (2.24) je nelineární. Explicitní tvar Hartree-Fockova

potenciálu  $\hat{v}^{HF}$  obsaženého v rovnici (2.25) vyplývá z antisymetrie vlnové funkce (2.18)

$$\hat{v}_a^{HF}(i) = \sum_b^{occ} (J_b(i) - K_b(i)) \quad (2.26)$$

V rovnici (2.26) je  $J_b$  coulombovský operátor, který popisuje lokální potenciál v místě  $x_i$  od elektronu ve spinorbitálu  $\chi_b$

$$J_b(i) \chi_a(i) = \left[ \int dx_j \chi_b^*(j) r_{ij}^{-1} \chi_b(j) \right] \chi_a(i) \quad (2.27)$$

a  $K_b$  je výměnný operátor, který představuje čistě kvantový jev, a je popsán rovnicí

$$K_b(i) \chi_a(i) = \left[ \int dx_j \chi_b^*(j) r_{ij}^{-1} \chi_a(j) \right] \chi_b(i), \quad (2.28)$$

Řešení získaného nelineárního, nelokálního, integrodiferenciálního systému rovnic (2.24), jejichž operátory závisí na vlnových funkcích, které se mají určit, je možné numericky použitím iterační SCF (self-consistent-field) procedury. V praxi obvykle do soustavy rovnic (2.24) dosadíme rozvoj molekulových orbitalů do atomových orbitalů

$$\hat{f}_a(i) \sum_v C_{va} \phi_v(i) = \varepsilon_a \sum_v C_{va} \phi_v(i) \quad (2.29)$$

a po úpravě získáme tzv. Roothanovy rovnice

$$\sum_v F_{\mu\nu} C_{va} = \varepsilon_a \sum_v S_{\mu\nu} C_{va}, \quad (2.30)$$

kde  $S$  je tzv. překryvová matice a  $F$  je Fockova matice. I tuto soustavu rovnic je nutné řešit iterativně.

V HF aproximaci není vzata do úvahy úplná korelace pohybu elektronů. Rozdíl energií mezi přesným řešením SR, což je nejnižší nerelativistická energie systému elektronů  $E_0$  dosažitelná pomocí Hamiltoniánu (2.2), a řešením SCF (nejnižší energie dosažitelná v rámci HF aproximace), se nazývá korelační energie

$$E_{corr} = E_0 - E_{HF \text{ lim}} \quad (2.31)$$

Systematickým zlepšováním byly vyvinuty metody založené na poruchové teorii MP2 a MP4, metodě konfigurační interakce CI a metodě spřažených klastrů CC a FCI, které se přesnému řešení SR přibližují více.

### 2.2.3 Teorie elektronové hustoty (DFT)

Základní myšlenkou DFT metody je nahrazení vlnové funkce elektronovou hustotou

$$y(x_1, y_1, z_1, \sigma_1, x_2, \dots, z_N, \sigma_N) \rightarrow \rho(x, y, z) \quad (2.32)$$

Zatímco vlnová funkce je složitá, komplexní a závislá na souřadnicích a spinech všech částic systému, funkce elektronové hustoty je matematicky jednodušší objekt: je reálná a závislá pouze na třech prostorových souřadnicích. Elektronová hustota navíc odpovídá měřitelné veličině. Udává množství elektronů v jednotkovém objemu

$$\rho(\vec{r}_1) = N \int \dots \int |\Phi^{el}(\vec{x}_1 \dots \vec{x}_N)|^2 d\sigma_1 d\vec{x}_2 \dots d\vec{x}_N \quad (2.33)$$

a splňuje podmínky

$$\int \rho(\vec{r}) d\vec{r} = N, \quad \rho(\vec{r}) \geq 0. \quad (2.34)$$

#### Hohenberg-Kohnův teorém

Pro popis systému elektronů ve vnějším poli používáme Hamiltonián ve tvaru

$$\hat{H} = \hat{T} + \hat{U} + \hat{V}, \quad (2.35)$$

kde  $\hat{T}$  je operátor kinetické energie,  $\hat{U}$  zahrnuje coulombovské interakce a  $\hat{V}$  je jednočásticový vnější potenciál, který kromě repulze elektronů a jader může zahrnovat i další jedoelektronové členy, a který je možné zapsat ve tvaru

$$\hat{V} = \int v(\vec{r}) \rho(\vec{r}) d\vec{r} \quad (2.36)$$

Hohenberg a Kohn (1964) ukázali, že u molekul s nedegenerovaným základním stavem je elektronová hustota  $\rho(\vec{r})$  v jednoznačném vztahu k vnějšímu potenciálu  $v(\vec{r})$ . Pokud funkce  $\rho(\vec{r})$  splňuje podmínky (2.34), pak jednoznačně určuje celkový Hamiltonián systému i všechny jím dané ostatní vlastnosti, především přesnou vlnovou funkci základního stavu a jí příslušnou celkovou energii.

Elektronovou hustotu základního stavu je možné nalézt variací energie podle funkce elektronové hustoty

$$\frac{\delta E[\rho]}{\delta \rho} = 0, \quad (2.37)$$

přičemž pro dané  $v(\vec{r})$  je definován funkcionál energie  $\hat{E}[\rho]$  jako

$$\hat{E}[\rho] = \int v(\vec{r})\rho(\vec{r})d\vec{r} + \hat{F}^{HK}[\rho], \quad (2.38)$$

kde  $\hat{F}^{HK}[\rho]$  představuje funkcionál nezávislejší na vnějším potenciálu  $v(\vec{r})$

$$\hat{F}^{HK}[\rho] = \langle \Phi[\rho] | \hat{T} + \hat{U} | \Phi[\rho] \rangle = T[\rho] + U[\rho] \quad (2.39)$$

Nalézt přesný tvar  $\hat{F}^{HK}[\rho]$  však nelze a v současné době existuje pouze několik aproximací.

### Kohn-Shamovy rovnice

Hohenberg-Kohnův funkcionál  $\hat{F}^{HK}[\rho]$  (2.39) je možné přepsat do tvaru

$$\hat{F}^{HK}[\rho(\vec{r})] = T_s[\rho(\vec{r})] + U[\rho(\vec{r})] + \hat{E}_{xc}[\rho(\vec{r})], \quad (2.40)$$

kde je celková kinetická energie  $T[\rho(\vec{r})]$  nahrazena kinetickou energií pro neinteragující elektrony bez vnějšího pole  $T_s[\rho(\vec{r})]$  a navíc zde vystupuje tzv. výměnná korelační energie  $\hat{E}_{xc}[\rho(\vec{r})]$ . V principu je možné najít funkcionál  $\hat{E}_{xc}[\rho(\vec{r})]$  takový, že energie získaná řešením Kohn-Shamových rovnic bude rovna Schrödingerově limitě. Nebyl však nalezen jednoduchý způsob, jak tento člen systematicky zlepšovat - to je stále úloha moderní DFT teorie.

Celková energie pro navzájem interagující elektrony ve vnějším poli je po dosazení (2.40) do rovnice (2.35) rovna

$$E[\rho(\vec{r})] = \int v(\vec{r})\rho(\vec{r})d\vec{r} + T_s[\rho(\vec{r})] + \frac{e^2}{2} \int \frac{\rho(\vec{r})\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\vec{r}d\vec{r}' + \hat{E}_{xc}[\rho(\vec{r})]. \quad (2.41)$$

Po provedení variace

$$\frac{\delta E[\rho(\vec{r})]}{\delta \rho(\vec{r})} = v(\vec{r}) + \frac{\delta T_s[\rho(\vec{r})]}{\delta \rho(\vec{r})} + e^2 \int \frac{\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\vec{r}' + \frac{\delta \hat{E}_{xc}[\rho(\vec{r})]}{\delta \rho(\vec{r})} \quad (2.42)$$

dostáváme z podmínky extrému (2.37) Kohn-Shamovy rovnice, které se řeší iterací vedoucí k selfkonzistenci. Je možné definovat lokální potenciál  $v_{xc}(\vec{r})$  zahrnující výměnné a korelační efekty (hovoříme pak o aproximaci lokální hustoty (LDA, local density approximation))

$$v_{xc}(\vec{r}) = \frac{\delta \hat{E}_{xc}[\rho(\vec{r})]}{\delta \rho(\vec{r})} \quad (2.43)$$

Efektivní jednočásticový potenciál je pak roven

$$v_{eff}(\vec{r}) = v(\vec{r}) + e^2 \int \frac{\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\vec{r}' + v_{xc}(\vec{r}) \quad (2.44)$$

a Schrödingerova rovnice bude mít tvar

$$\left[ \frac{-\hbar^2}{2m} \Delta + v_{eff}(\vec{r}) \right] \psi_j(\vec{r}) = \epsilon_j \psi_j(\vec{r}) \quad (2.45)$$

Potenciál  $v_{xc}(\vec{r})$  je možné aproximovat různými způsoby. Pro  $v_{xc}(\vec{r}) = 0$  přejdou uvedené vztahy na Hartreeho rovnice.

### DFT funkcionály

Čisté DFT funkcionály by měly být pouze funkcí hustoty (hovoříme o lokálních funkcionálech, nejjednodušší je LSDA = local spin density approximation), případně její derivace (nelokální funkcionály, např. BPW91 Becke, Perdew, Wang). Dále se můžeme setkat s tzv. hybridními funkcionály, jejichž součástí je HF výměnná energie. Zavedením parametrů je možné tyto funkcionály „doladit“. Velmi známý a výpočetně úspěšný je funkcionál B3LYP (Becke, Lee, Yang, Parr).

Metody založené na DFT jsou méně systematické než metody založené na HF aproximaci, ale zvláště pro rozlehlé systémy jsou výpočetně efektivnější díky tomu, že jejich náročnost roste pomaleji s počtem atomů (u energie  $\sim N^{2-3}$ ).

## 2.3 Základy teorie ROA

ROA sleduje vibrační stavy molekul prostřednictvím jejich interakce s viditelným zářením. Při kvantově-mechanickém popisu se vychází z toho, že při této interakci dopadající světelná vlna charakterizovaná vektorem intenzity elektrického pole

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \exp i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t), \quad (2.46)$$

kde  $\vec{E}_0$  je amplituda vlny,  $\vec{k}$  vlnový vektor,  $\vec{r}$  polohový vektor,  $\omega$  úhlová frekvence a  $t$  čas, indukuje v molekule elektrické a magnetické momenty, které oscilují, a do všech směrů je rozptylována sekundární vlna.

V případě, že je frekvence dopadajícího záření dostatečně vzdálená od frekvencí odpovídajících elektronové absorpci dané molekuly, lze užít pro popis Ramanova rozptylu tzv. nerezonanční aproximaci. V tomto přiblížení lze tenzory, které jsou zodpovědné za generaci ROA signálu, rozepsat následujícím způsobem: tenzor elektrické dipólové polarizovatelnosti

$$\alpha_{\alpha\beta} = \frac{2}{\hbar} \sum_{j \neq n} \left( \frac{\omega_{jn}}{\omega_{jn}^2 - \omega^2} \right) \text{Re}(\langle n | \hat{\mu}_\alpha | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\beta | n \rangle), \quad (2.47a)$$

tenzor magnetické dipólové-elektrické dipólové optické aktivity

$$G'_{\alpha\beta} = -\frac{2}{\hbar} \sum_{j \neq n} \left( \frac{\omega}{\omega_{jn}^2 - \omega^2} \right) \text{Im}(\langle n | \hat{\mu}_\alpha | j \rangle \langle j | \hat{m}_\beta | n \rangle), \quad (2.47b)$$

a tenzor elektrické dipólové-elektrické kvadrupólové polarizovatelnosti

$$A_{\alpha\beta\gamma} = \frac{2}{\hbar} \sum_{j \neq n} \left( \frac{\omega_{jn}}{\omega_{jn}^2 - \omega^2} \right) \text{Re}(\langle n | \hat{\mu}_\alpha | j \rangle \langle j | \hat{\theta}_{\beta\gamma} | n \rangle), \quad (2.47c)$$

kde  $\omega_{jn} = \omega_j - \omega_n$  je úhlová přechodová frekvence mezi počátečním elektronovým stavem molekuly  $j$  a konečným stavem  $n$ ,  $\omega$  je frekvence dopadajícího záření,

elektrický dipól  $\hat{\mu}_\alpha = \sum_k e_k r_{k\alpha}$ , magnetický dipól  $\hat{m}_\alpha = \frac{1}{2} \sum_k \frac{e_k}{m_k} \varepsilon_{\alpha\beta\gamma} r_{k\beta} p_{k\gamma}$  a

elektrický kvadrupól  $\hat{\theta}_\alpha = \frac{1}{2} \sum_k e_k (3r_{k\alpha} r_{k\beta} - r_k^2 \delta_{\alpha\beta})$ .



Tenzory polarizovatelnosti jsou obecně funkcí jaderných souřadnic. V Ramanových a ROA spektrech je zaznamenáno, jak se mění polarizovatelnost molekuly při jejích vibracích. Taylorův rozvoj podle normálních vibračních souřadnic např. pro tenzor přechodové (mezi stavy  $m_v$  a  $n_v$ ) elektrické dipólové polarizovatelnosti  $\alpha_{\alpha\beta}$  vede k

$$\begin{aligned} \langle m_v | \alpha_{\alpha\beta} | n_v \rangle &= (\alpha_{\alpha\beta})_0 \delta_{m_v n_v} + \sum_k \left( \frac{\partial \alpha_{\alpha\beta}}{\partial Q_k} \right)_{R_0} \langle m_v | Q_k | n_v \rangle + \\ &+ \sum_{k,l} \frac{1}{2} \left( \frac{\partial^2 \alpha_{\alpha\beta}}{\partial Q_k \partial Q_l} \right)_{R_0} \langle m_v | Q_k | n_v \rangle \langle m_v | Q_l | n_v \rangle + \dots \end{aligned} \quad (2.48)$$

kde  $R_0$  značí rovnovážnou konfiguraci jader,  $Q_k$  a  $Q_l$  jsou normální souřadnice vibrací o frekvencích  $\omega_k$  a  $\omega_l$ . Využívá se harmonická aproximace, při které přispívá pouze druhý člen rozvoje.

Pro izotropní soubor chirálních molekul je nutné provést ještě středování přes všechny orientace rozptylujících molekul a přejít tak od složek tenzorů k jejich izotropním a anizotropním invariantům

$$\alpha_i^2 = \frac{1}{9} \left( \frac{\partial \alpha_{\alpha\alpha}}{\partial Q_i} \right)_{X_0} \left( \frac{\partial \alpha_{\beta\beta}}{\partial Q_i} \right)_{X_0}, \quad (2.49a)$$

$$\beta(\alpha_i)^2 = \frac{1}{2} \left[ 3 \left( \frac{\partial \alpha_{\alpha\beta}}{\partial Q_i} \right)_{X_0} \left( \frac{\partial \alpha_{\alpha\beta}}{\partial Q_i} \right)_{X_0} - \left( \frac{\partial \alpha_{\alpha\alpha}}{\partial Q_i} \right)_{X_0} \left( \frac{\partial \alpha_{\beta\beta}}{\partial Q_i} \right)_{X_0} \right], \quad (2.49b)$$

$$\alpha G_i' = \frac{1}{9} \left( \frac{\partial \alpha_{\alpha\alpha}}{\partial Q_i} \right)_{X_0} \left( \frac{\partial G'_{\beta\beta}}{\partial Q_i} \right)_{X_0}, \quad (2.49c)$$

$$\beta(G_i')^2 = \frac{1}{2} \left[ 3 \left( \frac{\partial \alpha_{\alpha\beta}}{\partial Q_i} \right)_{X_0} \left( \frac{\partial G'_{\alpha\beta}}{\partial Q_i} \right)_{X_0} - \left( \frac{\partial \alpha_{\alpha\alpha}}{\partial Q_i} \right)_{X_0} \left( \frac{\partial G'_{\beta\beta}}{\partial Q_i} \right)_{X_0} \right], \quad (2.49d)$$

$$\beta(A_i)^2 = \frac{\omega_0}{2} \left[ \left( \frac{\partial \alpha_{\alpha\beta}}{\partial Q_i} \right)_{R_0} \left( \frac{\varepsilon_{\alpha\gamma\delta} \partial A_{\gamma,\delta\beta}}{\partial Q_i} \right)_{R_0} \right], \quad (2.49e)$$

Pomocí těchto invariantů je potom možné vyjádřit intenzitu Ramanova rozptylu ( $I^R + I^L$ ) a ROA ( $I^R - I^L$ ), Barron (2004) takto

$$I^R + I^L = 4K \left( D_1 \alpha_i^2 + D_2 \beta (\alpha_i)^2 \right) \quad (2.50a)$$

$$I^R - I^L = \frac{8K}{c} \left( D_3 \alpha G_i' + D_4 \beta (G_i')^2 + D_5 \beta (A_i)^2 \right), \quad (2.50b)$$

kde  $c$  je rychlost světla a  $K$  je konstanta. Koeficienty  $D_1$  až  $D_5$  se liší pro různá experimentální uspořádání ROA popsaná v kapitole 1.2.1 a jsou uvedeny v tabulce 2.1.

geometrie rozptylu	modulační schéma	$D_1$	$D_2$	$D_3$	$D_4$	$D_5$
0°	ICP <sub>u</sub>	45	7	90	2	-2
	SCP <sub>u</sub>	45	7	90	2	-2
	DCP <sub>I</sub>	45	1	90	2	-2
	DCP <sub>II</sub>	0	6	0	0	0
90°	ICP <sub>p</sub>	45/2	7/2	45/2	7/2	1/2
	ICP <sub>d</sub>	0	3	0	3	-1
	ICP*	45/3	10/3	45/3	10/3	0
	SCP <sub>p</sub>	45/2	7/2	45/2	7/2	1/2
	SCP <sub>d</sub>	0	3	0	3	-1
	SCP*	45/3	10/3	45/3	10/3	0
	DCP <sub>I</sub>	45/4	13/4	45/2	13/2	-1/2
DCP <sub>II</sub>	45/4	13/4	0	0	0	
180°	ICP <sub>u</sub>	45	7	0	12	4
	SCP <sub>u</sub>	45	7	0	12	4
	DCP <sub>I</sub>	0	6	0	12	4
	DCP <sub>II</sub>	45	1	0	0	0

**Tab. 2.1:** Hodnoty koeficientů  $D_1$  až  $D_5$  v rovnicích (2.50) popisujících Ramanovy a ROA intenzity. Indexy u typů modulace znamenají: u-nepolarizovaný, p-parallelní polarizace, d-kolmá polarizace, \*-polarizace pod magickým úhlem. Převzato z Kapitán (2006a).

## 2.4 Výpočet ROA spekter

Pro komplexní interpretaci změřených Ramanových a ROA spekter biomolekul je využíván pokročilý výpočetní aparát kvantové mechaniky včetně metod umožňujících zahrnout do výpočtů realistické modely rozpouštědla. Výpočet zahrnuje několik kroků – optimalizaci geometrie (výpočet rovnovážné konfigurace jader), výpočet silového pole a frekvencí vibrací (v harmonické aproximaci) a výpočet intenzit pásů v Ramanově i v ROA spektru.

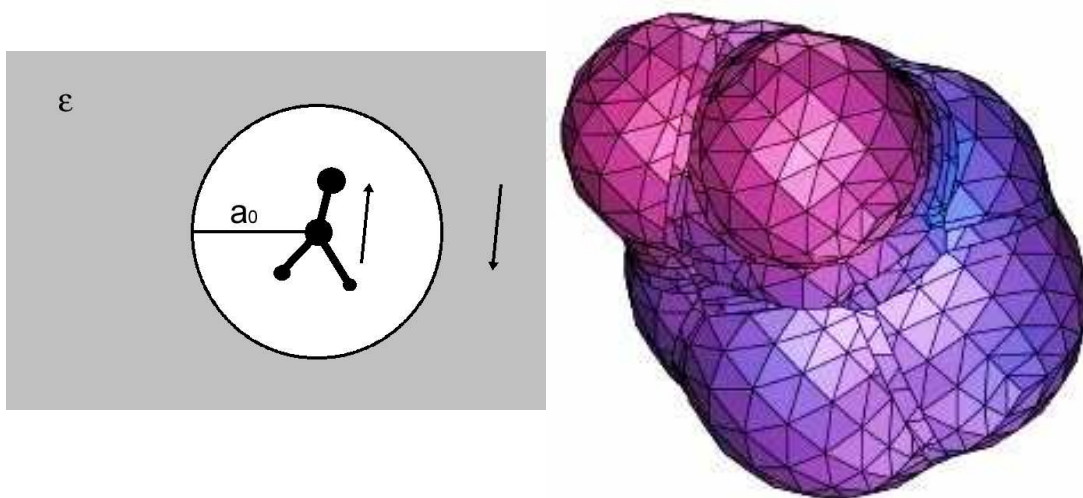
Ukazuje se, že v simulacích je nezbytné zohlednit i dynamické aspekty chování studovaných molekul v roztoku. Jen tak může být dosaženo výrazně lepší shody simulovaných Ramanových a ROA spekter s experimentálními daty, ale také mohou být odhaleny a vysvětleny spektrální projevy konformační flexibility. Pro větší molekuly je možné při simulování spekter využít metody založené na přenosu tenzorů molekulárních vlastností, Kapitán a kol. (2006d).

### 2.4.1 Modely rozpouštědla

Pro biologické molekuly, jejichž spektra zpravidla měříme ve vodném roztoku, je zahrnutí modelu rozpouštědla do kvantově chemických simulací zásadní. Vibrační spektra mohou být ovlivněna interakcí molekuly s molekulou téhož druhu i interakcemi s molekulami rozpouštědla. Například pro podvojně ionty nevedou výpočty ve vakuu k realistické rovnovážné konfiguraci. Rozpouštědlo je možné do výpočtu zahrnout buď explicitně, nebo implicitně.

Nevýhodou explicitního zahrnutí molekul vody do výpočtu je, že jednotlivé molekuly ovlivňují studovanou molekulu specificky, a tedy k realistickému popisu vlivu rozpouštědla by bylo nutné simulovat mnoho různých konfigurací vody. To je obtížné vzhledem k tomu, že výpočetní náročnost kvantově-chemických simulací roste velmi rychle s velikostí systému. Proto jsou více používány kontinuální modely rozpouštědla, kdy je rozpouštědlo zastoupeno kontinuálním polarizovatelným médiem bez jakékoliv mikroskopické struktury, které vyplňuje celý prostor vně dutiny vytvořené kolem molekuly.

Historicky nejstarším modelem rozpouštědla je *Onsagerův model* z roku 1936. Molekula je umístěna do sférické dutiny o zvoleném poloměru  $a_0$  (obr. 2.1) a rozpouštědlo je simulováno spojitým médiem, které je charakterizováno elektrickou permitivitou  $\varepsilon$  a nachází se vně dutiny. Dipólový moment molekuly indukuje dipólový moment v kontinuu a jeho elektrické pole pak zpětně interaguje s molekulou. Elektrostatický efekt rozpouštědla je reprezentován přičtením poruchového členu k Hamiltoniánu molekuly ve vakuu. Základním omezením Onsagerova modelu je, že pro molekuly s nulovým dipólovým momentem je poruchový člen nulový a nepopisuje tedy žádnou interakci s rozpouštědlem. Navíc není zohledněn obecně složitý tvar molekuly.



**Obr. 2.1:** Sféra u Onsagerova modelu a dutina vytvořená v COSMO modelu kolem molekuly podvojného iontu L-prolinu. Převzato z Kapitán (2006a).

Dokonalejší přístupy modelují realističtěji tvar dutiny, ve které se molekula nachází, podle molekulárního povrchu, Pomelli a kol. (1999). COSMO model (conductor-like screening model) vychází z toho, že vlastnosti rozpouštědla jsou podobné vlastnostem dokonalého vodiče. Vliv rozpouštědla je simulován pomocí stínících nábojů indukovaných na ploškách konečné velikosti okolo molekuly tvořících hranici kontinua. Tento stínící náboj se počítá numericky a iterativně tak, že se vhodně zvolený povrch dutiny rozdělí na velký počet malých plošek (segmentů). Poté se spočte náboj indukovaný na těchto segmentech a v celkovém Hamiltoniánu systému pak vystupují ještě členy zahrnující interakci segment-segment a molekula-segment, Barone a kol. (1998a).

V programu Gaussian 03 se dutina vytváří zpravidla tak, že se kolem každého těžkého atomu vytvoří sféra (znázorněno na obr. 2.1 pro L-prolin). Vodíkové atomy jsou umístěny dovnitř sféry náležející atomu, ke kterému jsou navázány, přičemž poloměr sféry se odpovídajícím způsobem zvětší, ale příkazem radii = uff (universal force field) je možné přidělit samostatnou sféru i atomům vodíku, což je výhodné z hlediska konvergence při optimalizaci. Povrch sfér je pak rozdělen na trojúhelníkové segmenty. Elektrická permitivita rozpouštědla a velikost dutiny vystupují jako parametry.

COSMO model je předchůdcem dnes široce využívaného CPCM modelu (conductor-like polarized continuum model, Cossi a kol. (2003)), který vznikl implementací COSMO modelu do PCM modelu (polarized continuum model, Barone a kol. (1998b)).

Implicitní modely rozpouštědla však zpravidla nejsou schopné popsat vliv silných interakcí mezi molekulou a rozpouštědlem, především vodíkových vazeb. V takovém případě je výhodné zkombinovat implicitní a explicitní přístup, tedy uzavřít do dielektrické dutiny klastr obsahující studovanou molekulu a několik molekul vody, Han a kol. (1998); Jalkanen a kol. (2006).

## 2.4.2 Optimalizace geometrie

Optimalizace geometrie molekuly byla od počátku v centru pozornosti kvantové chemie. Na začátku je nutné zvolit správnou konformaci molekuly nebo více konformerů, což pro mnoho systémů představuje poměrně obtížný úkol. Začíná se vlastně „výsledkem“ celého procesu měření a simulace spektra, tj. strukturou studovaného systému. Počáteční struktury mohou být odhadnuty pomocí jiných metod, např. rentgenostrukturní analýzy, i když struktura molekuly v roztoku nemusí být zcela totožná se strukturou v krystalu. Další možností je využít k prohledání konformačního prostoru molekulovou dynamiku, o které pojednává kapitola 2.5.

Geometrie molekuly se zoptimalizuje minimalizací energie. Energii v blízkosti minima můžeme zapsat pomocí Taylorova rozvoje

$$\begin{aligned}
 E(\{R\}) &= E(\{R^0\}) + \sum_j \frac{\partial E}{\partial R_j} \cdot (R_j - R_j^0) + \frac{1}{2} \sum_{j,k} \frac{\partial^2 E}{\partial R_j \partial R_k} \cdot (R_j - R_j^0)(R_k - R_k^0) \dots = \\
 &= E(R^0) + \sum_j G_j \cdot (R_j - R_j^0) + \frac{1}{2} \sum_{j,k} H_{jk} \cdot (R_j - R_j^0)(R_k - R_k^0) \dots
 \end{aligned}
 \tag{2.51}$$

kde  $G$  je gradient (derivace energie podle souřadnic), který musí být v minimu roven nule, a  $H$  je matice silového pole zvaná Hessián (matice druhých derivací energie, viz rovnice 2.10), která je ve skutečném minimu pozitivně definitní (tj. všechny její vlastní hodnoty musí být kladné). Výpočet Hessiánu je často zdlouhavý a jeho uložení v paměti počítače může způsobovat potíže, proto se zpravidla aproximuje přibližným Hessiánem, který je v průběhu výpočtu aktualizován. Pro optimalizaci molekul má význam gradient i Hessián. Jejich výpočet je v programu Gaussian 03 implementován pro DFT analyticky, což je obvykle přesnější a rychlejší než numerický výpočet. V každém kroku geometrické optimalizace nejprve proběhne SCF procedura, následuje výpočet derivací a podle nich je zvolen vektor posunutí všech jader v systému. Tento postup se opakuje, dokud předpokládaný pokles celkové energie není menší než zvolená mez. Výsledkem je geometrie lokálního energetického minima. Není nijak nezaručeno nalezení minima globálního.

V závislosti na použitém souřadném systému bylo vyvinuto více optimalizačních metod. Žádná z nich není univerzálně vhodná pro všechny molekulární struktury. Provádění optimalizace v kartézských souřadnicích většinou není příliš vhodné. Pro většinu systémů je nejvýhodnější (z hlediska rychlosti výpočtu) optimalizace v redundantních vnitřních souřadnicích. Tento přístup je vhodný zejména pro systémy vázané kovalentními vazbami, Pulay a Fogarasi (1992). Na použití těchto souřadnic je založena základní optimalizační procedura v programu Gaussian 03 využívající Bernyho algoritmus, Peng a kol. (1996). Zvláště pro slabě vázané skupiny molekuly však optimalizace při použití redundantních vnitřních souřadnic špatně konverguje kvůli numerickým nestabilitám způsobeným velkým počtem násobení matic při přechodu mezi kartézskými a redundantními souřadnicemi. Vhodným přístupem pro flexibilní a slabě vázané systémy je částečná optimalizace geometrie podle normálních vibračních módů, Bouř a Keiderling (2002). Základní metoda byla rozšířena o možnost fixovat různé geometrické parametry, jako jsou vzdálenosti, úhly nebo torzní úhly, Bouř (2005).

### 2.4.3 Výpočet silového pole a harmonických frekvencí

Výpočet silového pole FF (force field) nazývaného také Hessián (matice druhých derivací energie podle atomových souřadnic), které je popsáno při zavádění harmonické aproximace v sekci 2.1.3, se v programu Gaussian 03 provádí většinou analyticky. Frekvence vibrací jsou spočítány diagonalizací Hessiánu. Tento výpočet je nutné provádět na stejné úrovni jako optimalizaci (tedy použít stejný funkcionál, stejný bázevý set vlnových funkcí a totožný model rozpouštědla).

### 2.4.4 Výpočet intenzit Ramanových a ROA spekter

Intenzity Ramanových a ROA spekter jsou získávány pomocí rovnic uvedených v kapitole 2.3. Příslušné derivace podle souřadnice normálního vibračního módu vystupující v invariantech tenzorů (2.49) je možné získat za použití  $S$ -matice, která je známá z diagonalizace matice silového pole (def. 2.12). Např. pro tenzor přechodové elektrické dipólové polarizovatelnosti  $\alpha_{\alpha\beta}$

$$\left. \frac{\partial \alpha_{\alpha\beta}}{\partial Q_k} \right|_{R_0} = \sum_j \left( \frac{\partial \alpha_{\alpha\beta}}{\partial R_j} \right)_{R_0} \left( \frac{\partial R_j}{\partial Q_k} \right)_{R_0} = \sum_j \left( \frac{\partial \alpha_{\alpha\beta}}{\partial R_j} \right)_{R_0} S_{jk} \quad (2.52)$$

Je dokonce možné počítat silové pole (2.10), a tedy i normální souřadnice, na jiné úrovni, než se počítají derivace polarizovatelnosti a tenzorů optické aktivity vystupující v rovnicích 2.49, Deng a kol. (1996). To je využito v kapitole 4.4.2.2 pro cyklický hexapeptid, kde je kvalitnější silové pole získané při výpočtu Ramanových spekter využito k „vylepšení“ tenzorů optické aktivity, které jsou z časových důvodů spočítány na nižší úrovni. Ke zkombinování je použita flexibilní a numericky stabilní technika přenosu kartézských tenzorů, ve které jsou tenzory přenášeny jako vlastnosti individuálních atomů (kapitola 2.4.5).

Další aproximací využívanou při výpočtu ROA spekter velkých molekul je polarizační model, jehož použití na příkladu cyklického hexapeptidu je ukázáno v kapitole 4.4.2.1. Tento přístup vychází z tvaru derivací jednotlivých tenzorů podle souřadnice  $\varepsilon$  atomu  $\lambda$

$$\left( \frac{\partial}{\partial X_\varepsilon^\lambda} \right) \alpha_{\alpha\beta} (0) = \left( \frac{\partial}{\partial X_\varepsilon^\lambda} \right) \alpha_{\alpha\beta} (\lambda) \quad (2.53a)$$

$$\left(\frac{\partial}{\partial X_\varepsilon^\lambda}\right)G'_{\alpha\beta}(0) = \left(\frac{\partial}{\partial X_\varepsilon^\lambda}\right)G'_{\alpha\beta}(\lambda) - \frac{\omega}{2}\varepsilon_{\beta\gamma\delta}R_\gamma^\lambda\left(\frac{\partial}{\partial X_\varepsilon^\lambda}\right)\alpha_{\alpha\delta}(0) \quad (2.53b)$$

$$\begin{aligned} \left(\frac{\partial}{\partial X_\varepsilon^\lambda}\right)A_{\alpha,\beta\gamma}(0) = & \left(\frac{\partial}{\partial X_\varepsilon^\lambda}\right)A_{\alpha,\beta\gamma}(\lambda) + \frac{3}{2}\left[R_\beta^\lambda\left(\frac{\partial}{\partial X_\varepsilon^\lambda}\right)\alpha_{\alpha\gamma}(0) + \right. \\ & \left. + R_\gamma^\lambda\left(\frac{\partial}{\partial X_\varepsilon^\lambda}\right)\alpha_{\alpha\beta}(0)\right] - R_\delta^\lambda\left(\frac{\partial}{\partial X_\varepsilon^\lambda}\right)\alpha_{\alpha\delta}(0) \end{aligned} \quad (2.53c)$$

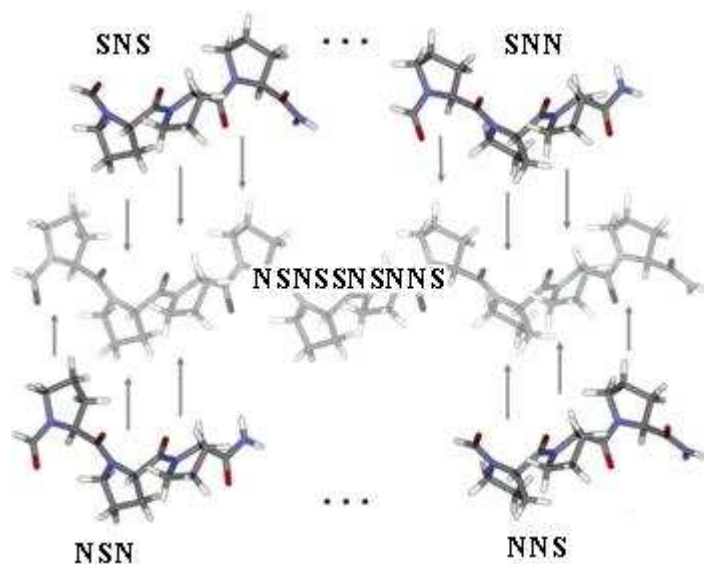
kde (0) značí laboratorní a (λ) distribuovaný počátek souřadnic (v jádře λ s polohovým vektorem  $\vec{R}_\lambda$ ). Při použití polarizačního modelu jsou zanedbány nelokální části derivací tenzorů  $G'$  a  $A$  (v bodě λ) a lokální části jsou ve společném počátku (0) spočítány pouze pomocí derivace tenzoru polarizovatelnosti  $\alpha$ , Bouř a kol. (1997a).

#### 2.4.5 Přenos tenzorů molekulárních vlastností

Výpočet realistických silových polí i výpočet tenzorů popisujících vlastnosti molekul (např. derivace tenzorů polarizovatelnosti a optické aktivity) *ab initio* může být pro větší biologické molekulární systémy za hranicí dnešních výpočetních možností.

Proto byla vyvinuta technika přenosu molekulárních vlastností, kterou je možné využít pro konstrukci silového pole velké molekuly jejím rozdělením na menší fragmenty (molekuly), které mohou být spočteny na lepší úrovni. Kartézské souřadnice velké molekuly mohou být získány např. z PDB databáze nebo z molekulové dynamiky (tento přístup je ukázán v kapitole 4.4.5). Klíčovým krokem k provedení přenosu je nalezení správného překryvu mezi fragmenty a velkou molekulou (celý postup je popsán v práci Bouř a kol. (1997b)). Tenzory je výhodné přenést na cílovou molekulu v kartézských souřadnicích. Tento přístup byl použit např. v práci Kapitána a kol. (2006d), kde byly z triprolinových fragmentů způsobem naznačeným na obr. 2.2 zkonstruovány různě dlouhé peptidy v konformaci PPII jako modely dlouhého řetězce poly(L-prolinu). Může se však stát, že některé interakce dlouhého dosahu nemusí být přenosem tenzorů dobře postihnuty.





**Obr. 2.2:** Schematické znázornění přenosu tenzorů z prolinového tripeptidu na decapeptid. převzato z Kapitán a kol. (2006d).

Jinou možností je nerozdělovat velkou molekulu na fragmenty, ale některé její vlastnosti, jejichž výpočet je časově velmi náročný (např. ROA intenzity) spočítat na nižší úrovni teorie pro celou molekulu a pak je zkombinovat se silovým polem spočteným na vyšší úrovni (kapitola 2.4.4). Metodu přenosu tenzorů je možné použít také pro přenos tenzorů vyšších derivací, např. pro anharmonické korekce, ale to dosud není v běžně používaných výpočetních programech implementováno.

#### 2.4.6 Nastavení pološířky pásů ve vypočtených spektrech

Výpočtem frekvencí a intenzit jsou získána pouze „čárová“ spektra, jak je ukázáno na konkrétním příkladu na obr. 4.11. Pro zobrazování simulovaných spekter používáme Lorentzovský profil čar, pro který je celková intenzita v každém bodě simulovaného spektra dána vztahem

$$S(\nu) = \sum_{i=1}^{3N-6} I_{RAM/ROA}^i \frac{1}{4 \left( \frac{\nu - \nu_i}{\sigma} \right)^2 + 1}, \quad (2.54)$$

kde  $\nu_i$  jsou vlnočty jednotlivých vibračních módů  $i$ ,  $\nu$  je vlnocet odpovídající excitační frekvenci,  $I_{RAM/ROA}^i$  příslušná intenzita  $i$ -tého pásu v Ramanově či ROA spektru a  $\sigma$  je pološířka pásů, kterou je nutné vhodně zvolit.

Výška pásu je dána vztahem

$$h = \frac{1}{9,184 \times 10^{-3}} \frac{I_{RAM/ROA}}{\sigma} \sqrt{\frac{2}{\pi^3}} \quad (2.55)$$

Plocha pod příslušným pásem zůstává vždy stejná, zvolíme-li tedy větší pološířku, pásy jsou nižší a naopak. Ve změřených spektrech není pološířka všech pásů stejná, vlivem interakcí peptidového řetězce s rozpouštědlem, zejména prostřednictvím vodíkových vazeb, dochází k nehomogennímu rozšíření spektrálních pásů, Bouř a Keiderling (2003). Obvykle pološířku v simulovaných spektrech volíme v rozmezí 5 až 10  $\text{cm}^{-1}$ .

Ve výpočtech je nutné uvažovat i dynamické aspekty a zahrnout více konformací. Pomocí faktoru

$$\exp\left(-\frac{\Delta E}{k_B T}\right) \quad (2.56)$$

se provádí Boltzmannovo středování příspěvků od jednotlivých konformerů, Pecul a Rizzo (2002). Jen tak je možné dosáhnout lepšího souhlasu simulovaných spekter s experimentem.

#### 2.4.7 Porovnání změřených a vypočtených spekter

V případě Ramanova rozptylu není možné experimentálně zjistit absolutní hodnoty intenzit. Podíl ROA a Ramanova spektra je bezrozměrný, ale vzhledem k tomu, že poměr signál/šum v experimentálním ROA spektru většinou není dostatečně vysoký, se běžně nepoužívá a pracuje se pouze s relativními intenzitami. Kritériem úspěšnosti výpočtu je pak shoda polohy pásů ve spektrech a jejich relativních intenzit s experimentálními daty, v případě ROA spekter ještě i znamének pásů. Na základě shody vypočtených spekter s experimentálními daty by mělo být v ideálním případě možné rozhodnout, které z konformací se ve studovaném vzorku vyskytují, případně určit i jejich procentuální zastoupení, Buděšinský a kol. (2008a).

Korelace experimentálních dat s teoretickými výpočty často zahrnuje přímé porovnávání frekvencí vibračních módů. Vyhodnocení spekter u větších molekul je komplikováno tím, že molekule s  $N$  atomy odpovídá  $3N-6$  vibračních módů a ve spektru dochází k překryvu pásů. U velkých molekul je tak vhodnější provést

porovnávání spektrálních profilů. Vzhledem k tomu, že vypočítané vibrační frekvence jsou zatíženy chybou, je někdy vhodné před tímto srovnáváním provést umělou korekci ("škálování" vypočtených spekter, ukázáno v kapitole 4.4.1.2).

Spektrální profily křivek není nutné srovnávat jen vizuálně. Je možné využít objektivnější přístup navržený v práci Buděšínského a kol. (2008b). Shoda vypočteného spektra  $S_i(\omega)$  a experimentální křivky  $S_e(\omega)$  je určena na základě sumy absolutních odchylek

$$\delta = \sum_j |\tilde{S}_i(\omega_j) - k\tilde{S}_e(a\omega_j + \Delta)| + a_k(a-1)^2 - a_\Delta\Delta^2 \quad (2.57)$$

kde  $\tilde{S}(\omega)$  je normalizovaná křivka ( $\int |\tilde{S}(\omega)| d\omega = 1$ ) a parametry  $k$ ,  $a$ , a  $\Delta$  jsou nastaveny pomocí nelineární iterativní minimalizace  $\delta$ . Přestože v ideálním případě by jejich hodnoty byly  $a = k = 1$  a  $\Delta = 0$ , je vhodné umožnit posun frekvence ( $a$ ,  $\Delta$ ) pro případ systematického posunu, který je u *ab initio* výpočtů častý. Parametr  $k$  umožňuje kompenzovat nepřesnosti v intenzitní škále a šum. Bariéry jsou typicky nastaveny na  $a_k = 1000$ ,  $a_a = 10$  a  $a_\Delta = 0,004$ . Interval frekvencí  $\omega$  je možné zvolit libovolně. Minimalizací  $\delta$  zjistíme, které z vypočtených spekter je nejpodobnější experimentálnímu spektru.

Experimentální spektrum je navíc možné rozložit do teoretických křivek  $m$  konformací podle vztahu

$$\tilde{S}_e = \sum_{i=1}^m b_i s_i \quad (2.58)$$

kde  $s_i = k\tilde{S}_i(a\omega_j + \Delta)$  a je splněna normalizační podmínka  $\sum_{i=1..m} b_i = 1$ . Koeficienty  $b_i$  jsou získány minimalizací

$$\Theta = \sum_j \left( \tilde{S}_e(\omega_j) - \sum_{i=1..m} b_i s_i(\omega_j) \right)^2 + \alpha \sum_{i=1..m} (b_i - 1/m)^2 \quad (2.59)$$

pomocí standardní metody Lagrangeových multiplikátorů. Vzhledem k tomu, že je nežádoucí, aby byly koeficienty  $b_i$  záporné, nastavuje se bariéra  $\alpha = 0,001$ .

## 2.5 Molekulární dynamika (MD)

Molekulárně dynamické simulace jsou založeny na aplikaci klasických Newtonových pohybových rovnic na systém  $N$  interagujících atomů

$$m_i \frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} = \vec{F}_i, i = 1 \dots N, \quad (2.60)$$

kde sílu  $\vec{F}_i$  působící na částici  $i$  je možné vypočítat z potenciální energie systému

$$\vec{F}_i = - \frac{\partial V(\vec{r}_1 \dots \vec{r}_N)}{\partial \vec{r}_i} \quad (2.61)$$

Uvedené rovnice představují pro  $N$  částic soustavu  $3N$  rovnic. Potenciální energie systému  $V$  je zavedena jako součet vazebných (intramolekulárních) a nevazebných (intermolekulárních) interakcí

$$V = V_{NEVAZ} + V_{VAZ} \quad (2.62)$$

V nevazebné části potenciální energie je obsažen coulombovský člen pro vyjádření elektrostatického působení a Lennard-Jonesův potenciál obsahující v sobě přitažlivý i repulzní člen pro popis van der Waalsových interakcí

$$V_{NEVAZ} = \sum_{i,j=1,i < j}^N \frac{1}{4\pi\epsilon} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} + \sum_{i,j=1,i < j}^N 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (2.63)$$

kde  $q_i$  jsou parciální náboje na atomech,  $\epsilon_{ij}$  a  $\sigma_{ij}$  konstanty silového pole a  $r_{ij}$  je vzdálenost mezi dvěma interagujícími atomy.

Vazebná část potenciální energie obsahuje členy, které popisují vazbu mezi atomy, vazebné úhly, torzní úhly a mimorovinné (*oop* – out of plane) souřadnice

$$V_{VAZ} = \sum_{\text{vazby}, i} k_i (d_i - d_{i0})^2 + \sum_{\text{úhly}, i} k_{\alpha i} (\alpha_i - \alpha_{i0})^2 + \sum_{\text{torzní úhly}, i} [A_{1i} \cos(\tau_i) + A_{2i} \cos(2\tau_i) + A_{3i} \cos(3\tau_i)] + \sum_{\text{oop}, i} k_{\text{oop}i} s_i^2 \quad (2.64)$$

Přes zdánlivou složitost obsahují rovnice (2.63) a (2.64) jen nutné minimum interakcí k tomu, abychom při výpočtech dostali rozumný výsledek. Uvedené rovnice obsahují celou řadu empirických parametrů. V minulosti byly publikovány stovky různých souborů těchto parametrů pro různé skupiny molekul, zpravidla

nazývaných "silová pole". Námi prováděné simulace používají silové pole Amber95 (Wang a kol. (2000)) v programu TINKER.

MD umožňuje zavedení teploty a tlaku do studovaného systému a tím nám dává možnost studovat dynamické děje. K nalezení globálního minima energie v závislosti na atomových souřadnicích slouží např. technika zvaná simulated annealing, kdy se systém "zahřeje" (zvýší se jeho kinetická energie) na vysokou teplotu a poté se "nekonečně" pomalu ochlazuje.

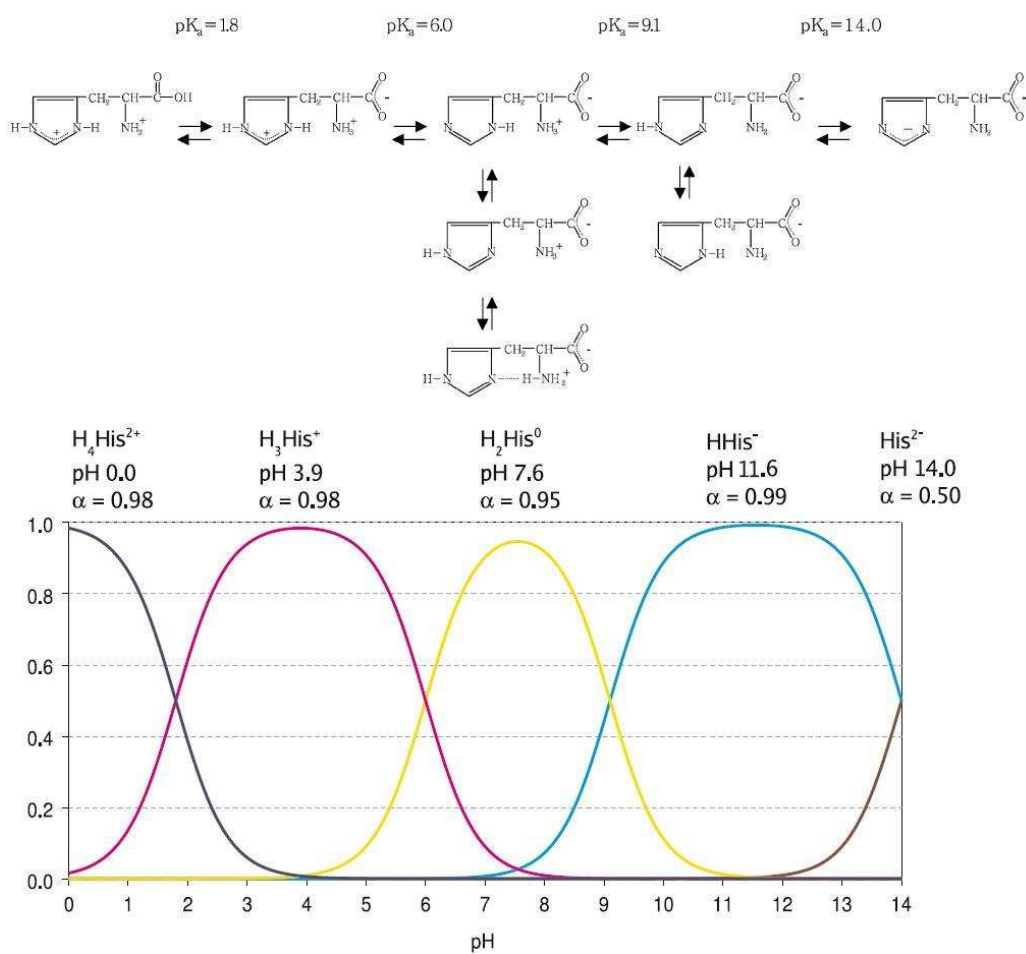
Při studiu velkých systémů, jako jsou biologické molekuly, je vhodné zavést periodické okrajové podmínky tak, že systém, který je možné výpočetně zvládnout, uzavřeme do centrálního boxu a obklopíme jej nekonečnou sadou identických boxů. Během simulace se atomy v replikovaných boxech pohybují shodně s atomy v centrální buňce. V takovém systému sice neuvažujeme nepropustné stěny, ale opustí-li atom svoji buňku, kopie tohoto atomu vstoupí do uvažované buňky ze sousední, takže počet atomů v boxu je zachován.

Takto je možné MD aplikovat na velké systémy obsahující tisíce atomů s explicitním zahrnutím molekul rozpouštědla. Jednou z aplikací molekulární dynamiky je prohledávání konformačního prostoru velkých molekul, u kterých kvůli velikosti systému není možné přímo použít *ab initio* metody. Výslednou geometrii získanou pomocí MD simulací lze také použít pro přenos tenzorů molekulárních vlastností z fragmentů získaných na *ab initio* úrovni, např. Kaminský a kol. (2009). MD simulace je možné také použít ke zkoumání dynamických vlastností molekul rozpouštědla v okolí studované molekuly. Lze tak např. vhodně vybrat nejbližší solvatační vrstvy kolem molekuly a ty pak použít jako počáteční geometrii pro *ab initio* simulace, Kapitán a kol. (2006c).

### 3. Histidin

Aminokyselina histidin v závislosti na pH poskytuje až čtyři možná vazebná místa: karboxylovou skupinu, aminoskupinu a dva různé atomy dusíku v imidazolovém kruhu (obr. 3.1). Právě díky imidazolovému kruhu je histidin velice vhodným ligandem při tvorbě koordinačních sloučenin s kovem (měď, železo a kobalt) a často hraje důležitou roli v metaloenzymech, jejichž činnost je založena na navázání kovu jako kofaktoru. Navázáním kovu dojde ke změně konformace a k aktivování enzymu.

Možnost studovat sbalování peptidu prostřednictvím navázání kovu na histidin, který je součástí peptidového řetězce, je zajímavá z experimentálního i výpočetního hlediska. Nejjednodušším systémem, u kterého by již mohla být pozorovatelná změna konformace, způsobená navázáním kovu, jsou dipeptidy histidinu s glycinem.



**Obr. 3.1:** Různé stavy protonace a tautomery L-histidinu společně s grafem vyjadřujícím jejich relativní zastoupení v závislosti na pH. Převzato z Mesu a kol. (2005) a Deplazes a kol. (2007).

Vzhledem k tomu, že histidin v závislosti na pH nabývá více možných protonačních stavů (obr. 3.1), jsme se rozhodli nejprve experimentálně studovat samostatný histidin, dále komplex histidinu s měďnatými ionty a dipeptidy histidinu s glycinem. Až následně jsme chtěli pro konkrétní proměřené protonační stavy přistoupit k výpočtům.

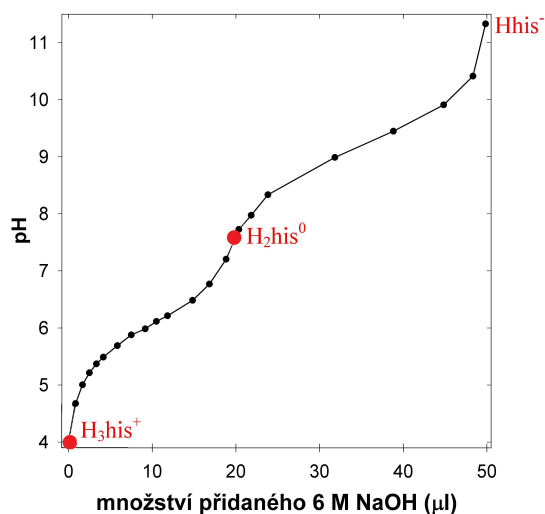
### 3.1 Ramanova a ROA spektra histidinu

Vzorek histidinu ve formě monochloridu monohydrátu byl zakoupen od firmy Sigma (katalogové číslo H 8125) o molární hmotnosti  $209,63 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Rozpustili jsme 53,2 mg vzorku v 1,01 ml deionizované vody na výslednou koncentraci 0,25M a vzorek přefiltrovali přes filtry Millipore s velikostí pórů 0,22  $\mu\text{m}$ .

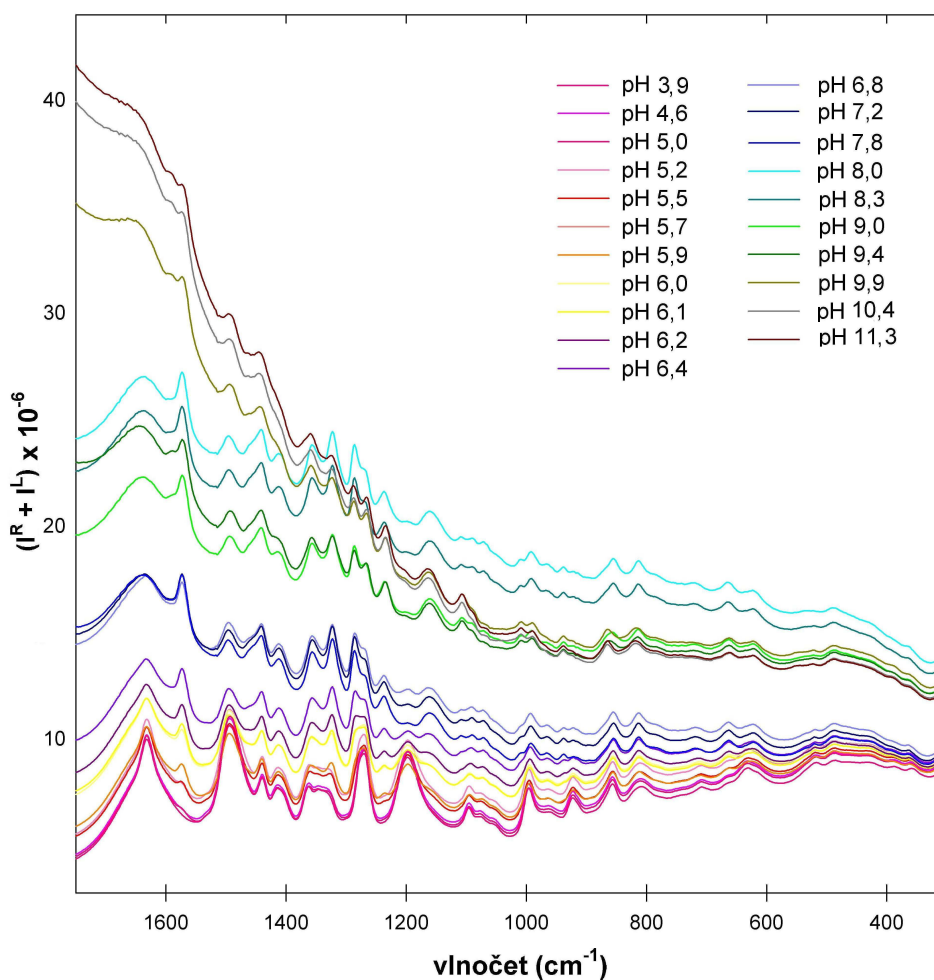
Pomocí pH metru s mikroelektrodou byla změřeno pH 3,9. Tato hodnota pH odpovídá převažujícímu zastoupení (98 %) formy  $\text{H}_3\text{his}^+$ . Připravený roztok byl proměřen na ROA aparatuře využívající excitační vlnovou délku 514,5 nm. Informace o měření jsou uvedeny v tab. 3.1. Poté bylo pH vzorku postupně zvyšováno přidáváním připravených roztoků 1M, 3M a 6M NaOH (Fluka, katalogové číslo 71687). Postupně docházelo k nárůstu pozadí, ale vzorek byl stále měřitelný. Titrační křivka je uvedena na obr. 3.2 a průběžně měřená Ramanova spektra na obr. 3.3. Při hodnotě pH 7,8 odpovídající dominantnímu zastoupení formy  $\text{H}_2\text{his}^0$  jsme proměřili ROA spektrum a po skončení tohoto měření jsme pokračovali v titraci. Během mnohonásobného přidávání NaOH došlo k postupnému nárůstu fluorescenčního pozadí, od hodnoty pH 9,9 byl nárůst tak velký, že se vzorek stal neměřitelným. Nepomohlo ani opětové přefiltrování vzorku.

Na obr. 3.4 jsou uvedena Ramanova spektra histidinu pro různá pH v rozmezí 3,9 až 11,3 po odečtu signálu vody a korekci pozadí. Tato spektra jsou ve vynikající shodě se spektry histidinu publikovanými v práci Mesu a kol. (2005), kde byla změřena Ramanova spektra histidinu pro rozmezí pH 0 až 14 (excitační vlnová délka 785 nm) a provedeno vibrační přiřazení pásů doplněné podrobným popisem chování jednotlivých pásů v závislosti na protonaci (obr. 3.5). V těchto spektrech nebyl na rozdíl od našich spekter proveden odečet vody, proto je pro  $\text{pH} > 8$  pozorovatelný pás vody, který je u nižších hodnot překryt ostrým pásem  $\sim 1631 \text{ cm}^{-1}$  odpovídajícím C=C a C=N valenčním vibracím. Kvůli snadnějšímu porovnávání námi změřených

spekter s publikovanými spektry jsou spektra na obr. 3.3 a 3.4 uvedena v obrácené vlnočtové škále, která v Ramanově spektroskopii není obvyklá, zatímco v IČ spektroskopii je běžně používána.

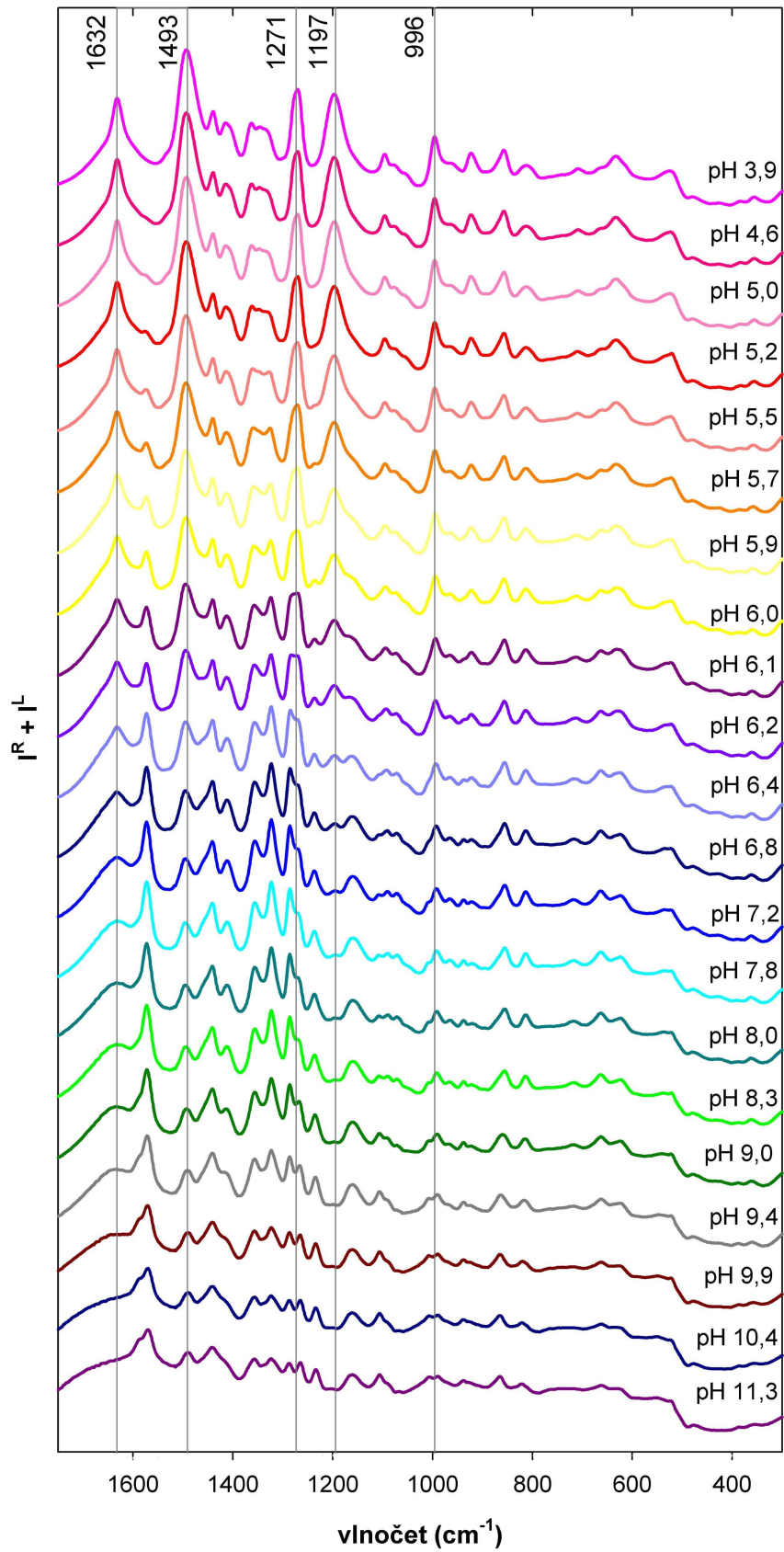


**Obr. 3.2:** Průběh titrace histidinu. Červeně vyznačeno převažující zastoupení protonačních stavů histidinu.

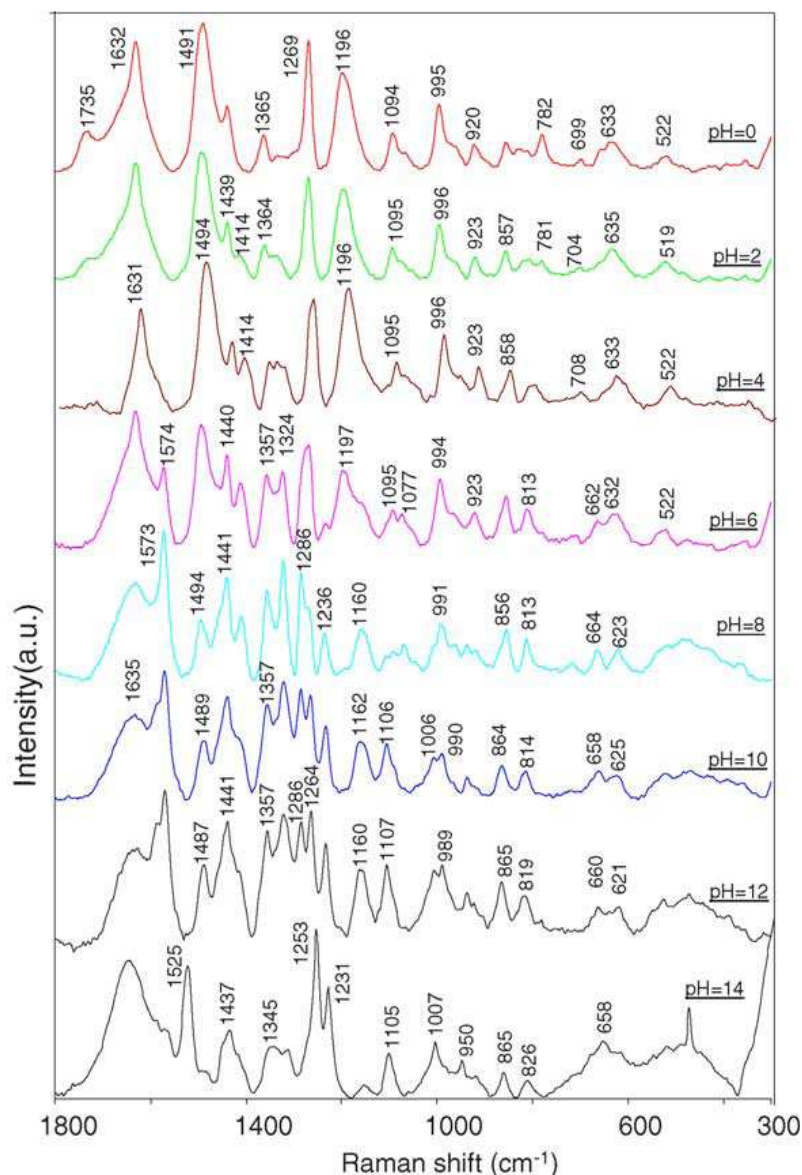


**Obr. 3.3:** Ramanova spektra změřená během titrace histidinu.





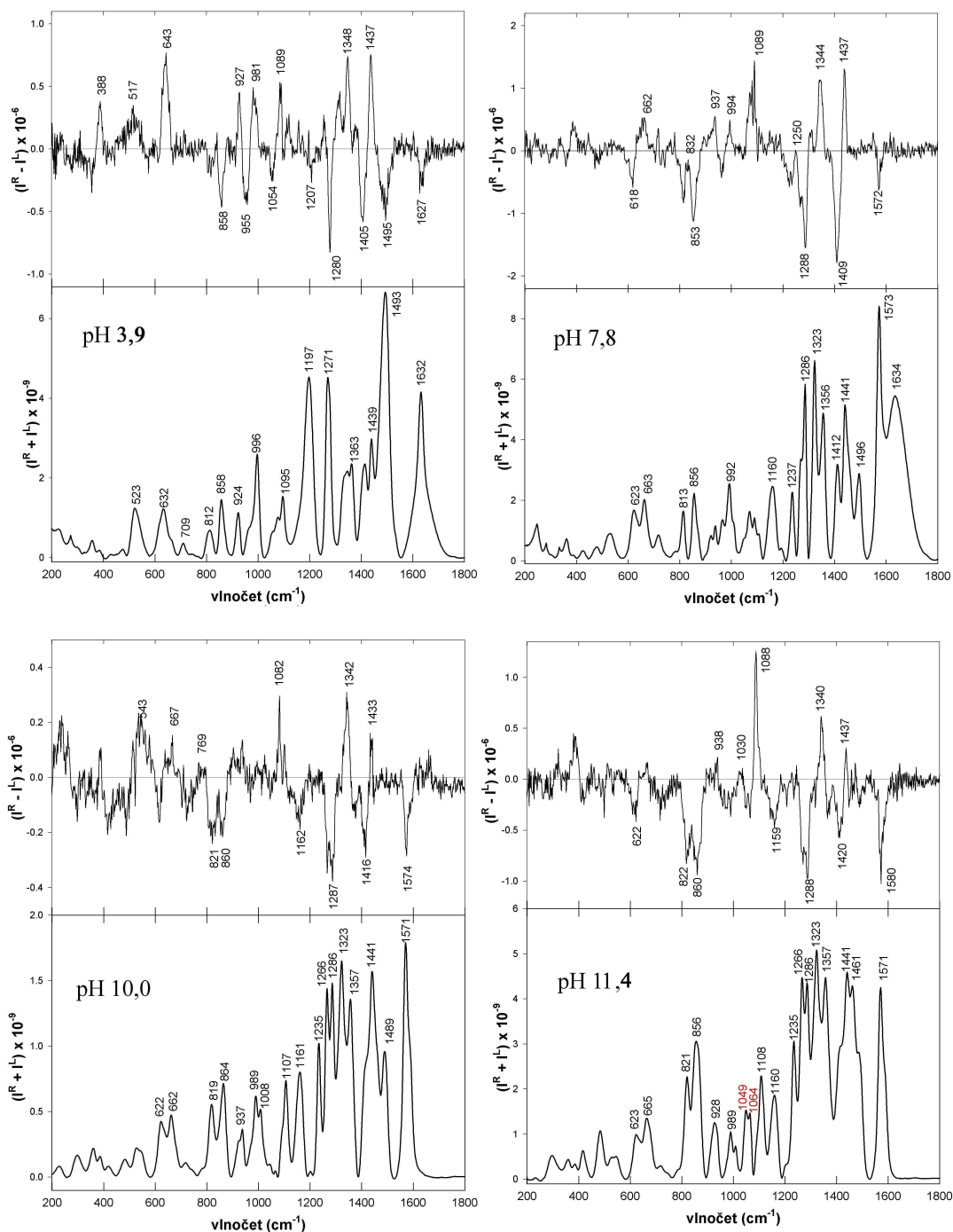
**Obr. 3.4:** Ramanova spektra změřená během titrace histidinu po odečtu vody a korekci pozadí.



**Obr. 3.5:** Ramanova spektra histidinu při různých hodnotách pH bez odečtu pozadí publikovaná v práci Mesu a kol. (2005).

Pro měření ROA spekter histidinu o vyšším pH byl připraven nový vzorek histidinu (Sigma, katalogové číslo H 7625, molární hmotnost  $155,16 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) nikoliv titrací, ale přímým rozpuštěním 21,8 mg histidinu v 0,5 ml 0,25M NaOH. Výsledná koncentrace histidinu byla 0,28M a hodnota pH 10,0. Bylo proměřeno ROA a Ramanovo spektrum vzorku. Vzhledem k tomu, že forma  $\text{HHis}^-$  převládá až okolo pH 11,6, byl poté přidáním NaOH připraven a proměřen vzorek s pH 11,4.

Poměr signál/šum ve změřených ROA spektrech se liší v závislosti na celkové době měření. Všechna změřená ROA a jim odpovídající Ramanova spektra jsou uvedena na obr. 3.6. Doby měření jednotlivých vzorků jsou shrnuty v tab. 3.1.



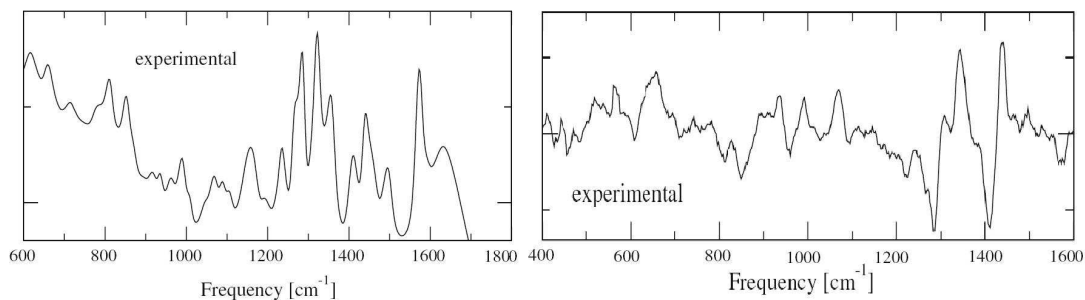
**Obr. 3.6:** Změřená ROA (po provedení Fourierovy filtrace a korekci nulové linie) a Ramanova (po odečtu signálu vody a korekci pozadí) spektra histidinu pro různé hodnoty pH. Celkové doby měření jsou uvedeny v tab. 3.1.

pH	Expozice	Počet akumulací	Počet bloků	Spektra
3,9	5 s	300	40	Raman + ROA
titrace z 3,9 na 7,8	5 s	20	1	pouze Raman
7,8	5 s	300	82	Raman + ROA
titrace ze 7,8 na 11,3	4 s	25	1	pouze Raman
10,0	5 s	300	20	Raman + ROA
11,4	5 s	300	54	Raman + ROA

**Tab. 3.1:** Histidin: hodnota pH, doba měření a zaznamenaná spektra.

Ramanova spektra na obr. 3.6 jsou ve velmi dobré shodě se spektry histidinu publikovanými v práci Mesu a kol. (2005), obr. 3.5. Pro pH = 11,4 se však v námi změřeném Ramanově spektru vzorku H 7625 objevily dva "nové" pásy  $\sim 1049$  a  $1064 \text{ cm}^{-1}$ , jejichž původ se nám nepodařilo zjistit. Tyto pásy se nevyskytují v Ramanově spektru publikovaném v Mesu a kol. (2005) ani v námi změřeném spektru vzorku H 8125.

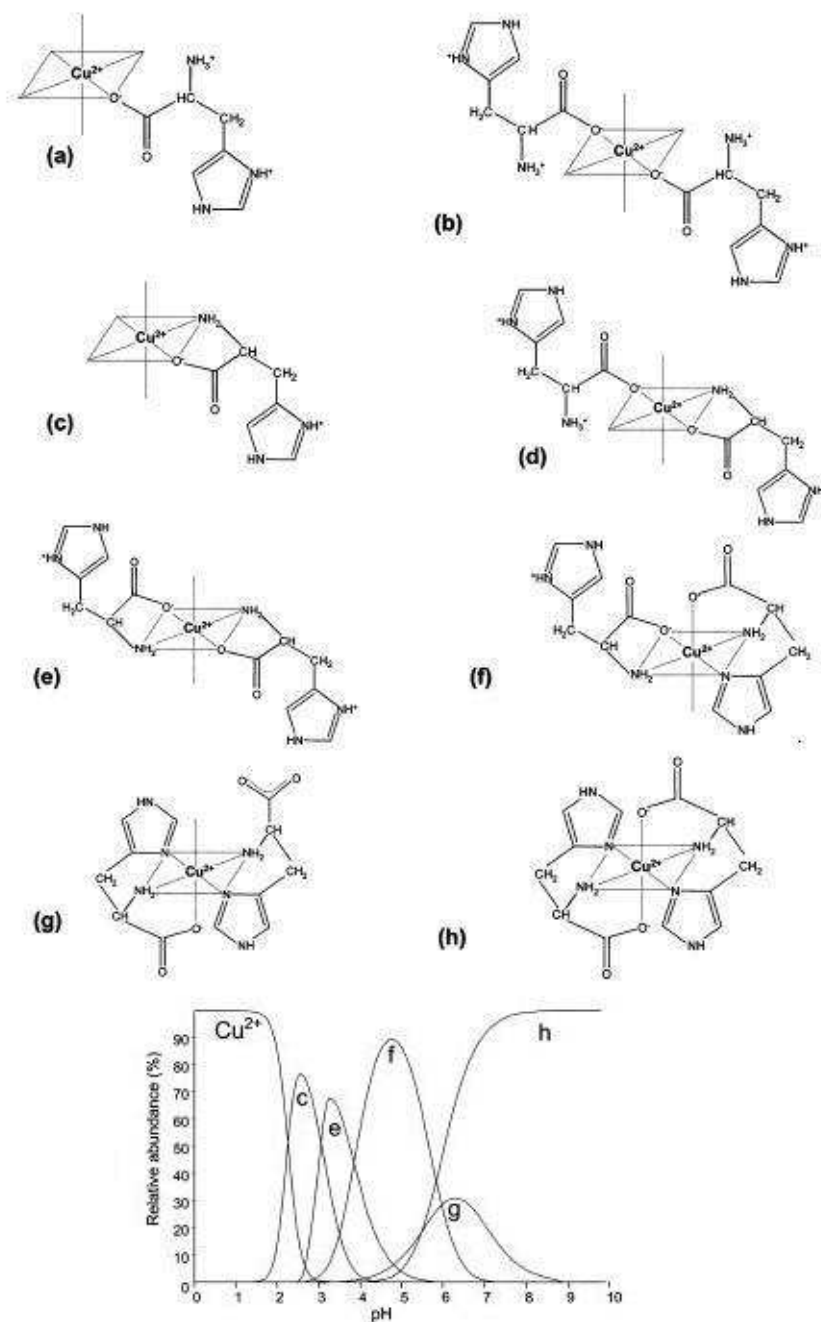
ROA spektrum bylo publikováno pouze pro hodnotu pH 7,6 v práci Deplazese a kol. (2007), kde bylo měření doplněno výpočty, ve kterých bylo testováno explicitního zahrnutí molekul vody do výpočtu. Spektrální profil námi změřeného ROA spektra při pH 7,8 tomuto spektru velmi dobře odpovídá.



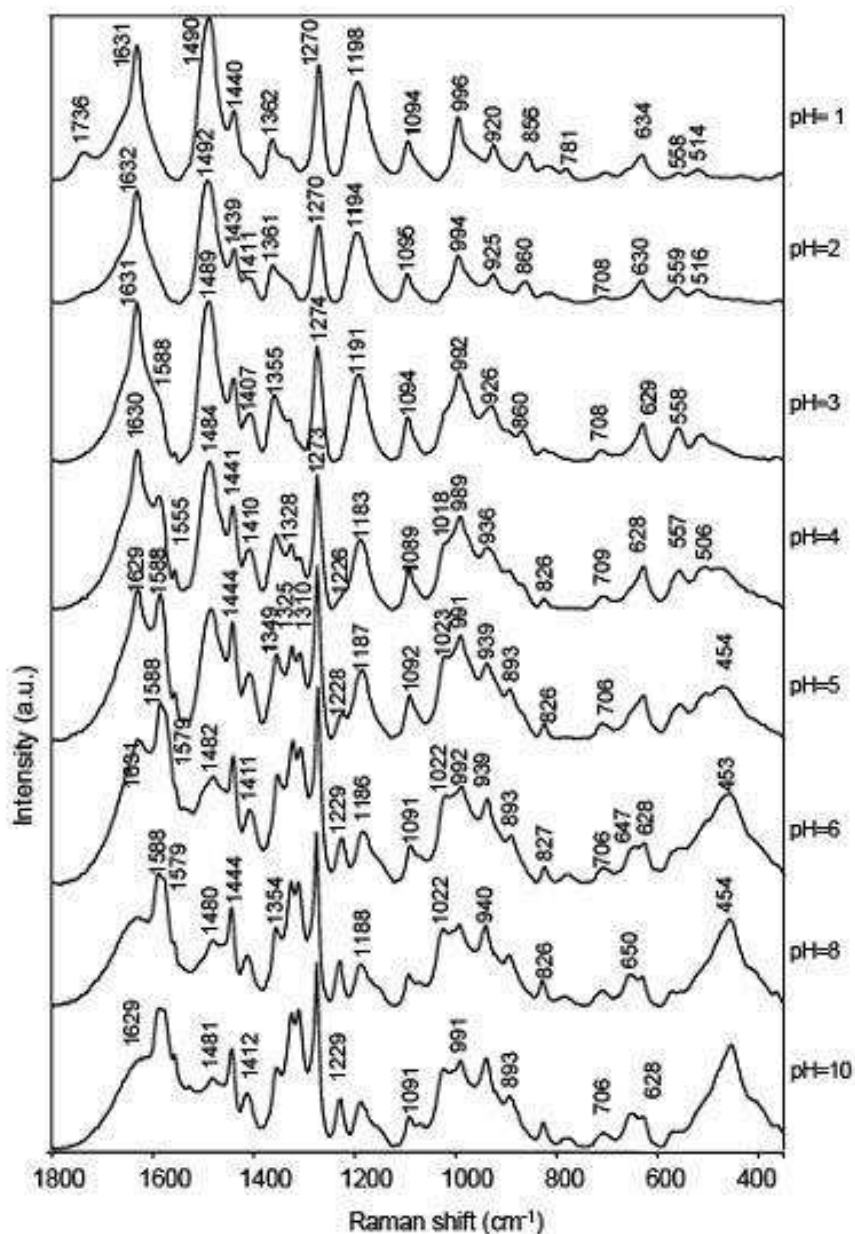
**Obr. 3.7:** Ramanovo a ROA spektrum histidinu při hodnotě pH 7,6 publikované v práci Deplazese a kol. (2007).

## 3.2 Histidin s kovem

V práci od Mesu a kol. (2006) byla provedena rozsáhlá studie komplexů histidinu s mědí (2:1). S využitím metod IČ, Ramanovy, UV/vis/NIR a hmotnostní spektroskopie byly navrženy možné struktury (obr. 3.8). Součástí práce jsou Ramanova spektra pro několik hodnot pH v rozmezí 1-10 (excitační vlnová délka 532 nm) ukázaná na obr. 3.9.



**Obr. 3.8:** Navržené struktury histidinu s mědí publikované v článku Mesu a kol. (2006). Spodní graf znázorňuje jejich relativní zastoupení v závislosti na pH.



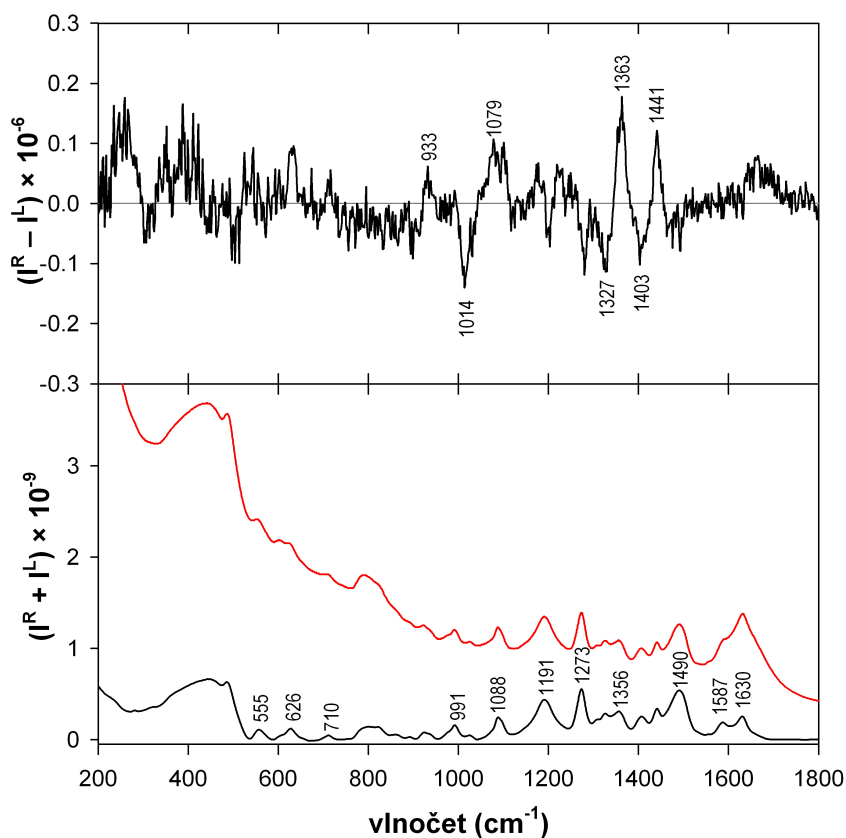
**Obr. 3.9:** Ramanova spektra komplexu histidinu s mědi (2:1) při různých hodnotách pH bez odečtu pozadí publikovaná v článku Mesu a kol. (2006).

My jsme se pokusili rozšířit experiment o měření ROA spekter. Vzorek histidinu (Sigma, katalogové číslo H 7625, molární hmotnost  $155,16 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) byl připraven rozpuštěním 45,8 mg vzorku v 1,02 ml deionizované vody na výslednou koncentraci 0,3M. Dále byl připraven 0,15M roztok chloridu měďnatého  $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Fluka, katalogové číslo 61174, molární hmotnost  $170,48 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Orientačně byla změřena Ramanova spektra obou vzorků, abychom se ujistili, že nemají fluorescenční pozadí. Smícháním 200  $\mu\text{l}$  vzorku histidinu a 200  $\mu\text{l}$  roztoku

chloridu měďnatého jsme získali vzorek, v němž bylo zastoupení histidinu a  $\text{Cu}^{2+}$  v poměru 2:1.

Získaný vzorek tmavě modré barvy o pH 3,4 byl přefiltrován přes filtry Millipore a měřen na ROA aparatuře po blocích obsahujících 300 akumulací po 5 s. Během měření došlo k nárůstu pozadí a postupné degradaci vzorku. V principu by však mělo být měření tohoto systému možné při využití chlazení vzorku během měření.

Na obr. 3.10 je ukázáno ROA a Ramanovo spektrum po 25 měřících blocích. ROA spektrum bylo upraveno odstraněním artefaktu od Lyotova depolarizátoru, Fourierovou filtrací a korekcí nulové linie. Změřené Ramanovo spektrum je nakresleno červeně, spektrum po odečtu signálu vody a korekci pozadí černě. Signál od rozpouštědla (přední stěny křemenné kyvety) se nám v Ramanově spektru nepodařilo odečíst úplně, v oblasti okolo  $400\text{ cm}^{-1}$  je stále patrný jeho zbytkový signál. Přesto je srovnáním s publikovanými spektry na obr. 3.9 při hodnotách pH 3 a 4 možné usoudit, že zbylá část našeho spektra je zaznamenána správně. A tedy i signály v ROA spektru v oblasti 800 až  $1600\text{ cm}^{-1}$  jsou reálné.



**Obr. 3.10:** Změřené ROA a Ramanovo spektrum komplexu histidinu s měďí (2:1) při pH 3,4.

### 3.3 Dipeptidy histidinu s glycinem

Poté jsme přešli k samotným dipeptidům His-Gly a Gly-His. Údaje o měřených vzorcích a podmínky měření jsou uvedeny v tab. 3.2.

Vzorek		Koncentrace	pH	Měření		
				Expozice	Počet akumulací	Počet bloků
Gly-His	Sigma G1627	1 M	7,5	4 s	225	70
His-Gly	Bachem G-2305	1 M	7,6	5 s	300	23

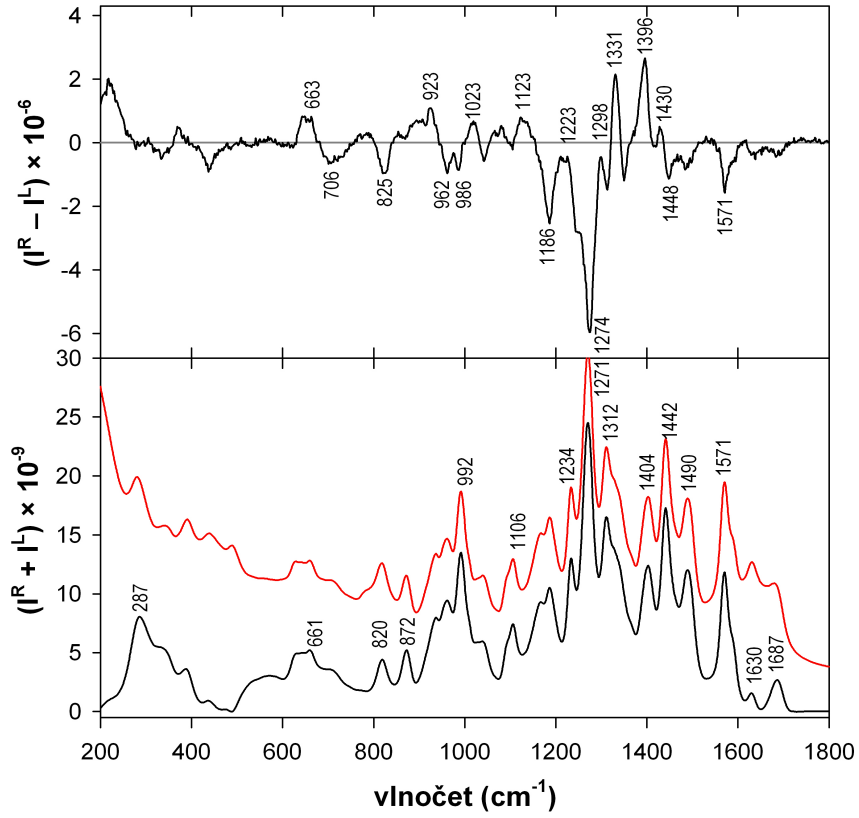
**Tab. 3.2:** Použité vzorky a podmínky měření dipeptidů složených z histidinu a glycinu.

Dipeptid Gly-His byl změřen ještě v době, kdy jsme neměli k dispozici mikroelektrodu pro měření pH. Tento vzorek vykazoval pouze lehce zvedlé pozadí a byl stabilní. Jeho ROA a Ramanovo spektrum je uvedeno na obr. 3.11. Později (po zakoupení mikroelektrody) byla orientačně změřena hodnota pH 7,5.

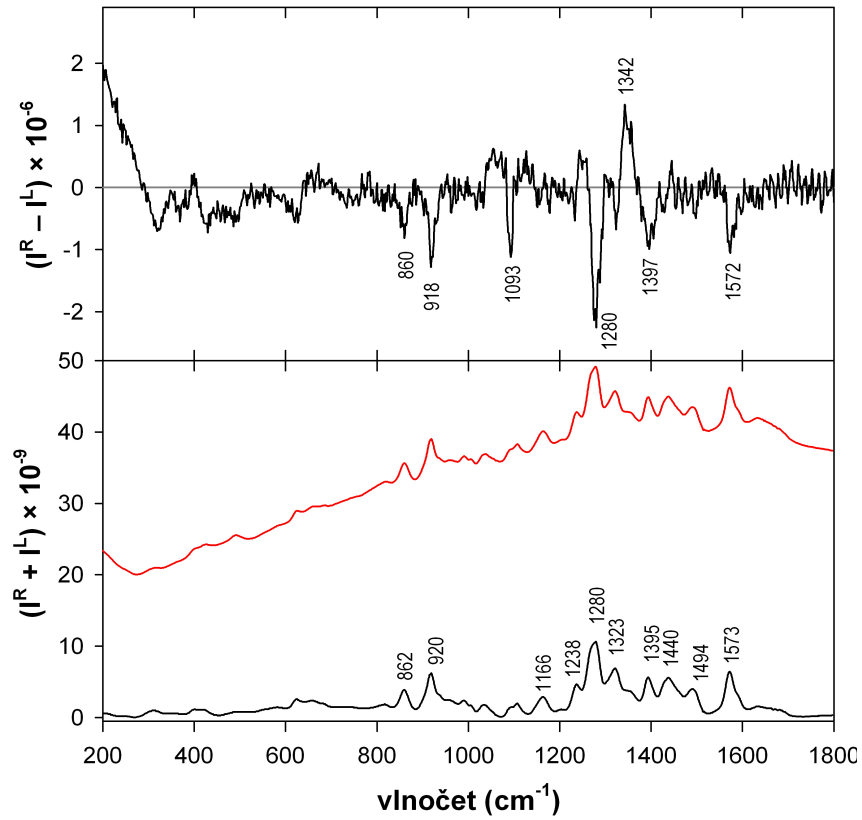
Jako experimentálně mnohem náročnější se jeví dipeptid His-Gly. Vzorek od firmy Sigma (katalogové číslo H9000) měl vysoké fluorescenční pozadí, proto byl ponechán přes noc v laserovém svazku k vybělení fluorescence. K poklesu pozadí nedošlo, naopak vzorek zežloutl a nebylo možné jej už proměřit. U vzorku od firmy Bachem během prvních 5 bloků měření pozadí stoupalo, vzorek byl umístěn na 1 den do lednice a poté, když pozadí kleslo, byl měřen za současného chlazení na 10°C. Výsledky měření jsou na obr. 3.12.

ROA spektra Gly-His a His-Gly jsou si v některých místech podobná (pásky ~ 1571, 1123 a 1274  $\text{cm}^{-1}$ ). V jiných oblastech (1396, 860-920  $\text{cm}^{-1}$ ) jsou v ROA signálu pásky opačného znaménka.





Obr. 3.11: Změřené ROA a Ramanovo spektrum roztoku Gly-His při pH 7,5.



Obr. 3.12: Změřené ROA a Ramanovo spektrum roztoku His-Gly při pH 7,6.

### 3.4 Shrnutí výsledků

Byla provedena pilotní měření pro histidin, jeho komplex s mědí a dipeptidy s glycinem. Ramanova spektra samotného histidinu při různých hodnotách pH velmi dobře odpovídají spektrům publikovaným v práci Mesu a kol. (2005). ROA spektrum při pH 7,8 dobře odpovídá spektru publikovanému v práci Deplazese a kol. (2007). Ukázali jsme, že ROA spektrum vzorku obsahujícího komplex histidinu s měďnatými kationty tmavě modré barvy je s excitací 514 nm měřitelné, ačkoli měření barevných vzorků je často mimořádně obtížné. Změřené Ramanovo spektrum při hodnotě pH 3,4 dobře odpovídá spektrům publikovaným v práci Mesu a kol. (2006) i přesto, že odečtení signálu rozpouštědla je problematické. Komerční vzorek dipeptidu His-Gly vykazoval poměrně vysoké fluorescenční pozadí a při měření při pokojové teplotě byl nestabilní. Vzorek Gly-His je experimentálně mnohem vhodnější. Při chlazení na 10°C by mělo být možné měření komplexu Gly-His s mědí. Tématice se chceme dále věnovat během řešení dizertační práce, ve které bude měření doplněno výpočty a přejdeme ke složitějším modelovým systémům.

## 4. Cyklický hexapeptid c-(Phe-D-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp)

### 4.1 Modelový systém pro studium $\beta$ -otoček

Spektrální charakterizace otoček, zejména  $\beta$ -otoček, které mění směr peptidového řetězce tvorbou vodíkové vazby mezi skupinou C=O peptidové vazby  $i$ -tého zbytku a N-H peptidové vazby  $(i+3)$  zbytku, čímž se protein stává kompaktnějším, patří v konformační analýze globulárních proteinů k oblastem, které jsou dlouhodobě studovány, Vass a kol. (2003); Kim a kol. (2008).

Otočky jsou nerepetitivní struktury, ale jejich příspěvek do výsledného spektra nelze zanedbat. Jednou z metod, které jsou vhodné ke studiu lokálních struktur, jako jsou právě vlásenky,  $\beta$ -otočky, smyčky a krátké úseky šroubovic, je Ramanova optická aktivita. Vibrační spektra jsou totiž citlivá na krátkodosahové interakce.

Vytvoření stabilních experimentálních modelů pro studium smyček je nelehkým úkolem. V případě, že je otočka částí lineárního peptidu, vstupují do hry značné lokální fluktuace, které ji narušují, Ramirez-Alvarado a kol. (1999). Otočka bude stabilnější, vytvoří-li se vlásenka, která má však tu nevýhodu, že obsahuje hodně reziduí, které nejsou součástí otočky, ale přispívají ke spektrálnímu překryvu a příspěvek od otočky je pak ve spektru těžko rozlišitelný.

Další možností, jak modelovat smyčky, jsou malé cyklické peptidy, ve kterých je vytvoření smyčky vynuceno zbytkem peptidu nebo vytvořením můstku. Záleží přitom na počtu a sekvenci aminokyselin v řetězci. Cyklické pentapeptidy mají tendenci vytvářet  $\gamma$  a  $\beta$ -smyčky, signály od nich jsou pak ve spektrech pomíchané, tudíž obtížně rozlišitelné, Chatterjee a kol. (2006). Je známo, že cyklické hexapeptidy mohou vytvářet více symetrické struktury obsahující jeden vodíkový můstek a dvě  $\beta$ -otočky nebo smyčky, které mohou, ale nemusí, vytvářet další příčné vodíkové můstky, Gierasch a kol. (1981). V případě větších cyklopeptidů je již těžké oddělit spektrální odezvu příslušející hledané smyčce od signálů mnoha dalších reziduí majících odlišnou konformaci, Hilario a kol. (2002).

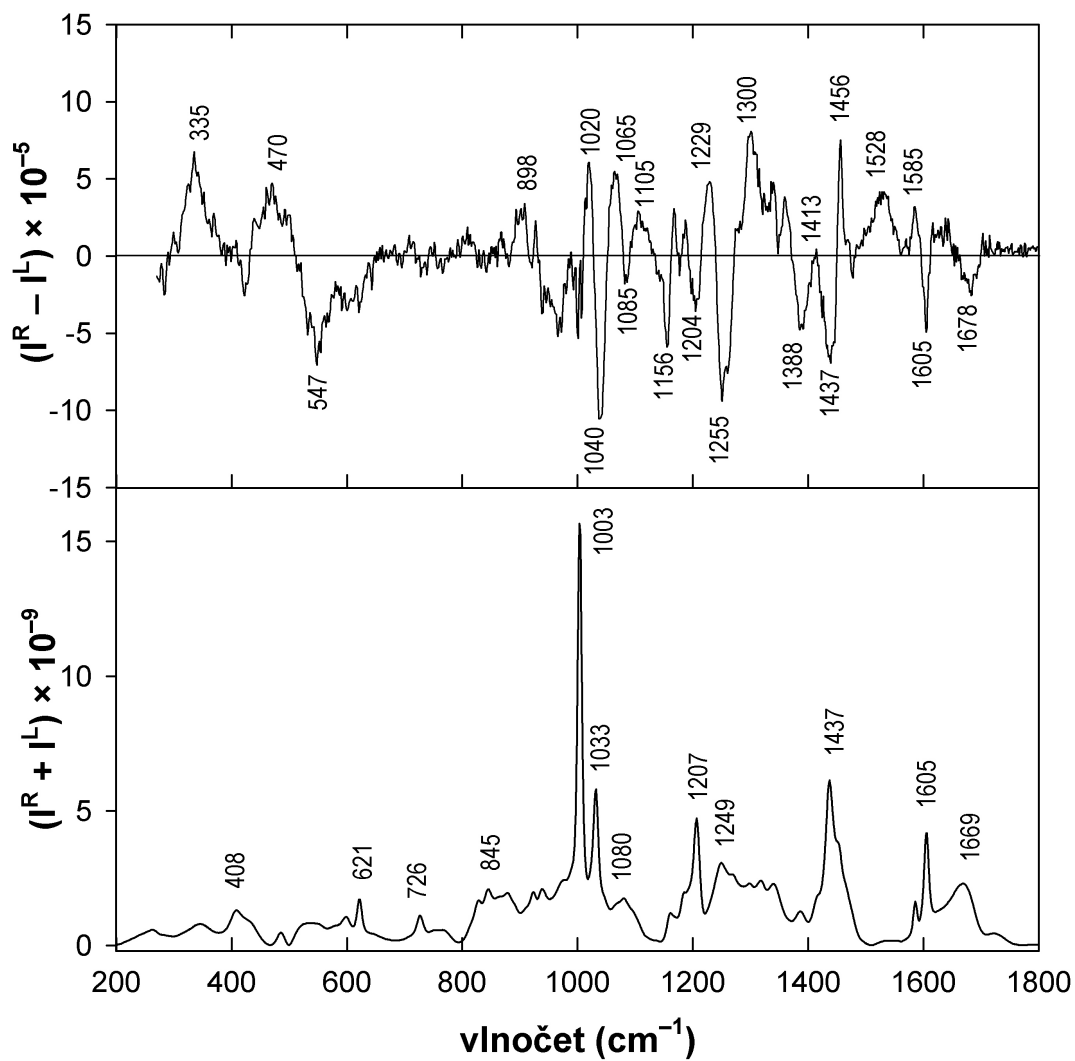
V této práci vycházíme z práce Bouře a kol. (2008), kde byl jako modelový systém vybrán cyklický hexapeptid cyclo-(Phe-D-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp). Podle předchozích NMR měření (Muller a kol. (1993)) by měl tento cyklický hexapeptid vytvářet stabilní  $\beta$ -otočku typu II' (definice viz sekce 1.1.2). Konformační flexibilita tohoto peptidu je omezena tím, že se jedná o cyklickou molekulu. Jeho struktura a flexibilita byla odhadnuta na základě molekulární dynamiky a pro několik náhodně vybraných konformací byla pomocí DFT simulována IČ a VCD spektra. DFT simulace byly provedeny i pro jiné sekvence aminokyselin se stejnou geometrií peptidové páteře – nejdříve pouze s šesti glyciny, poté byly ponechány dva glyciny a jeden prolin, zatímco fenylalanin, arginin a kyselina asparagová byly nahrazeny alaninem. V případě IČ a VCD spektroskopie je nejdůležitější konformace peptidové páteře a těmito substitucemi byl zredukován vliv postranních řetězců.

V této práci aplikujeme na stejný modelový systém další metody vibrační spektroskopie: Ramanovu a ROA spektroskopii. Zejména Ramanova spektra jsou velmi citlivá ke konformaci postranních řetězců aminokyselin.

## 4.2 Experimentální část

Vzorek cyklického hexapeptidu byl syntetizován R. P. Hammerem na Louisiana State University a na pražské ROA aparatuře byl proměřen již v roce 2005 Mgr. Josefem Kapitánem, Ph.D. K dispozici bylo pouze 4,4 mg vzorku, který byl rozpuštěn v 80  $\mu$ l deionizované vody. Výkon laseru na vzorku byl nastaven na 434 mW, excitační vlnová délka byla 514,5 nm. Měření bylo rozděleno do 71 měřících bloků obsahujících 180 akumulací po 5 s, celková doba měření tedy byla 35,5 h. pH vzorku nebylo změřeno. Pravděpodobná hodnota pH je  $\sim$ 1.

Naměřená data byla zpracována doc. RNDr. Vladimírem Baumrukem, DrSc., výsledná spektra jsou uvedena po provedení odečtu signálu vody, korekci pozadí a v případě ROA spekter i Fourierovy filtrace (obr. 4.1). ROA spektra jsou náchylná ke vzniku polarizačních artefaktů projevujících se především pro silně polarizované pásy. V našem případě je nejnáchylnější pás dýchací vibrace Phe  $\sim$  1003  $\text{cm}^{-1}$ . Právě v této oblasti je ve změřeném ROA spektru na obr. 4.1 vidět kmitání a nelze s jistotou rozhodnout, zda je v tomto místě slabý záporný ROA pás nebo ne.

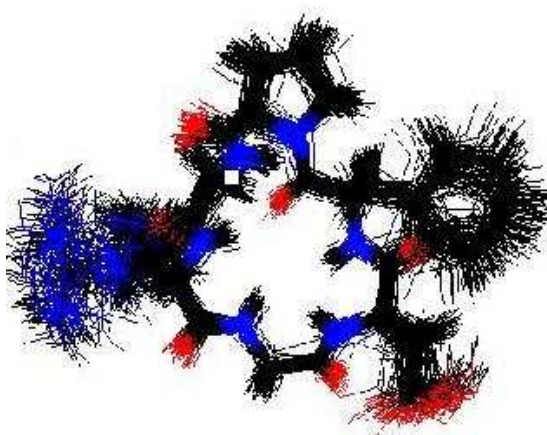


**Obr. 4.1:** Experimentální ROA a Ramanovo spektrum vodného roztoku c-(Phe-D-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp).

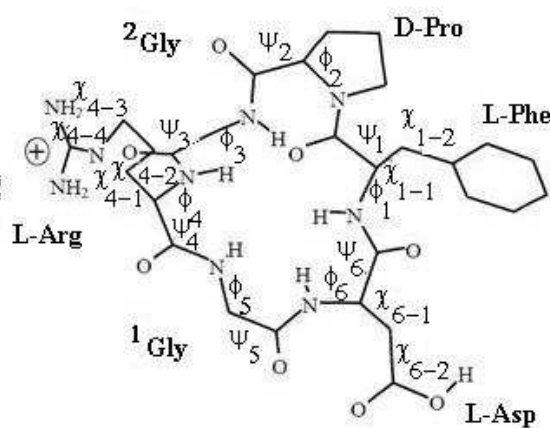
### 4.3 Molekulární dynamika (MD)

K prohledání konformačního prostoru cyklického hexapeptidu byla v práci Bouře a kol. (2008) použita molekulární dynamika v programech Amber a Tinker. MD simulace byly prováděny ve vodě a v trifluorethanolu (rozpuštědlo běžně používané v IČ spektroskopii), s protonací i bez protonace karboxylové skupiny kyseliny asparagové. Tím bylo možné zhruba odhadnout, jaká je flexibilita cyklického hexapeptidu. Postranní řetězce jsou velmi flexibilní, zatímco konformace peptidové páteře je poměrně stabilní (obr. 4.2). Při MD probíhající za běžných podmínek (teplota 300 K, tlak 1 atm) se v peptidové páteři cyklického hexapeptidu vyskytovala pouze velmi krátká struktura antiparalelního  $\beta$ -listu obsahující fenylyalanin a arginin a smyčka D-Pro<sup>2</sup>Gly podobající se  $\beta$ -otočce typu I',  $\beta$ -otočka blízká typu II' se chvilkově objevila až po simulovaném zahřátí na vysokou teplotu nebo při velmi dlouhých MD simulacích. Další smyčka obsahovala <sup>1</sup>Gly a Asp, hodnoty příslušných torzních úhlů jsou však poněkud vzdáleny ideálním hodnotám pro  $\beta$ -smyčku.

Na obr. 4.3 jsou definovány torzní úhly v peptidové páteři a v postranních řetězcích cyklického hexapeptidu včetně číslování. Toto značení odpovídá standardnímu značení úhlů určujících sekundární strukturu peptidů, které je popsáno v kapitole 1.1.2 a které používáme i v této práci.



**Obr. 4.2:** Překryv 100 konformací vygenerovaných při krátké MD simulaci.



**Obr. 4.3:** Definice torzních úhlů v c-(Phe-D-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp).

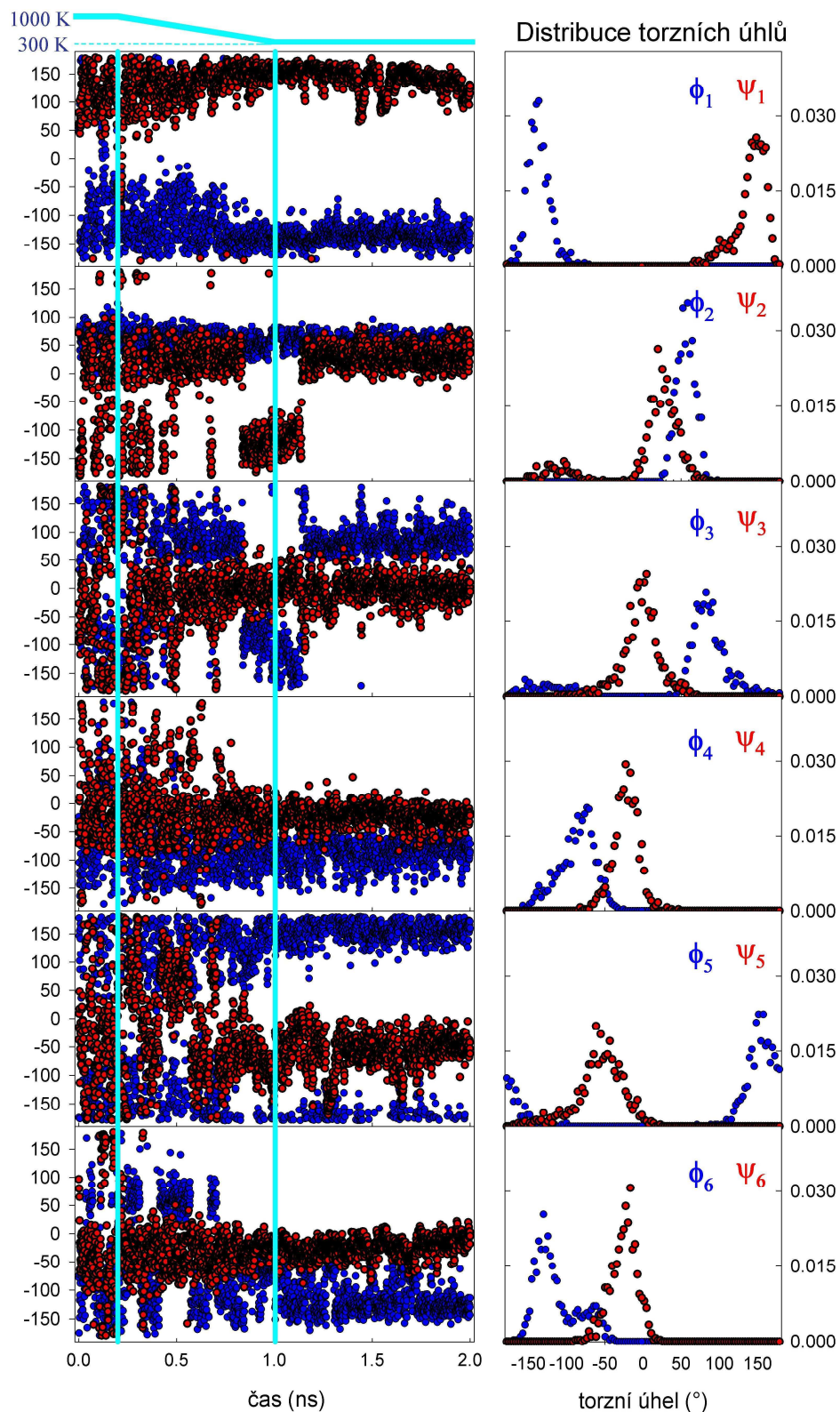
### 4.3.1 Torzní úhly v peptidové páteři

Původní MD simulace byly částečně reprodukovány. V programovém balíku Tinker byl s využitím silového pole Amber95 zadán pořadí aminokyselin a požadavkem, že se má jednat o cyklus, vytvořen počáteční model cyklického hexapeptidu – zvolena byla jeho protonovaná forma obsahující 85 atomů. L-Pro bylo nutné nahradit D-Pro. Poté byla struktura zoptimalizována a ponořena do boxu o rozměrech 30 x 30 x 30 Å s 2370 molekulami vody a znovu zoptimalizována. Byly zavedeny periodické okrajové podmínky. S takto vytvořenou strukturou proběhl MD výpočet dvěma způsoby:

1. Celý systém byl nejdříve po dobu 0,2 ns zahříván na 1000 K, během této doby se ustanovovala rovnováha. Poté byl systém během 0,8 ns pomalu ochlazován lineárním chladícím protokolem na teplotu 300 K a při teplotě 300 K proběhla 1 ns molekulární dynamika (simulated annealing). Tím byl umožněn případný přechod systému do jiného minima.

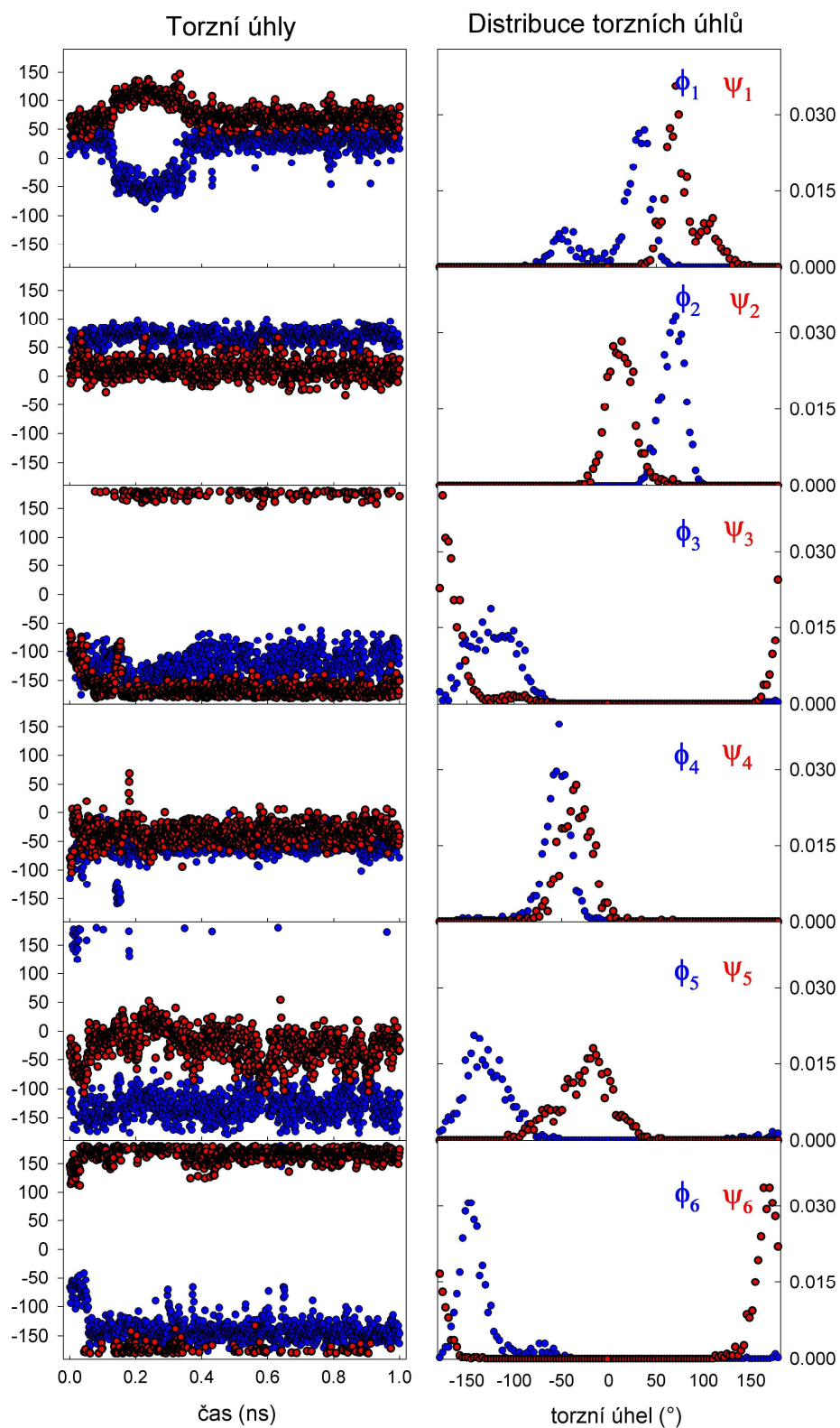
Průběh hodnot torzních úhlů peptidové páteře cyklického hexapeptidu během těchto 2 ns je zaznamenán na obr. 4.4 vlevo, kde jsou jednotlivé popsání děje (1000 K, přechod mezi 1000 a 300 K, 300 K) odděleny svislou modrozelenou úsečkou. Na obr. 4.4 vpravo je doplněna distribuce torzních úhlů, ty jsou ale uvedeny pouze pro 1 ns dynamiku probíhající při konstantní teplotě 300 K.

2. Systém se přímo z počáteční vytvořené konformace nechal vyvíjet po dobu 1 ns při konstantní teplotě 300 K, 600 K a 1000 K. Použili jsme statistický soubor  $NpT$ , který odpovídá experimentálním podmínkám. Po celou dobu simulace byl zachován konstantní počet částic  $N$ . Konstantní tlak  $p$  a teplota  $T$  byly udržovány pomocí Berendsenova algoritmu s časovou konstantou 1,0 ps. Časový krok simulace jsme zvolili 1 fs. Průběh molekulové dynamiky charakterizovaný hodnotami torzních úhlů v peptidové páteři cyklického hexapeptidu a jejich distribucí je zaznamenán na obr. 4.5 (pro 300 K), 4.6 (pro 600 K) a 4.7 (pro 1000 K).

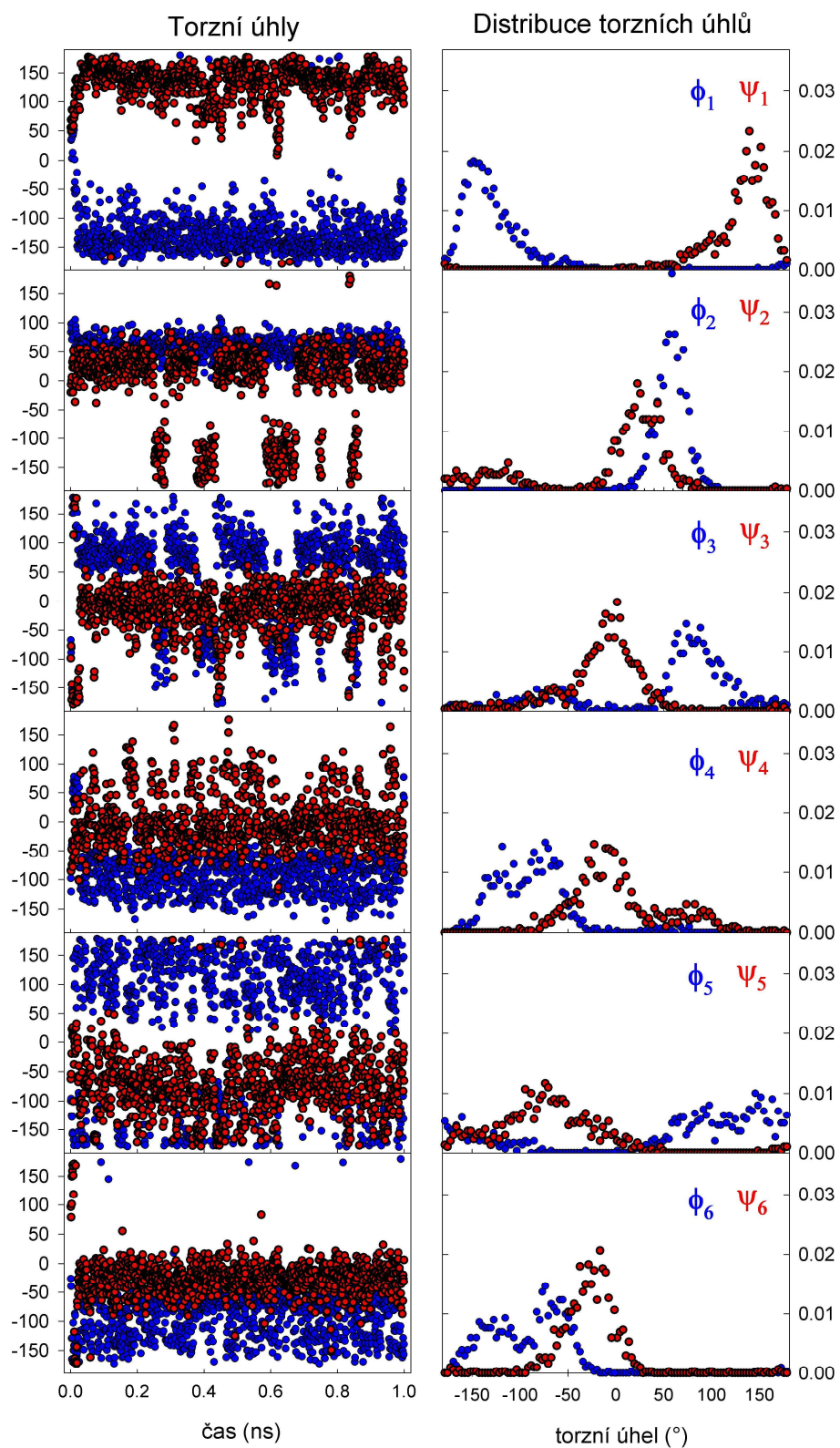


**Obr. 4.4:** Vlevo průběh hodnot torzních úhlů peptidové páteře cyklického hexapeptidu během simulovaného zahřívání (svislou modrozelenou úsečkou odděleny děje popsané v textu: 1000 K, přechod mezi 1000 a 300 K, 300 K). Vpravo je doplněna distribuce torzních úhlů týkajících se pouze 1 ns dynamiky probíhající při teplotě 300 K.

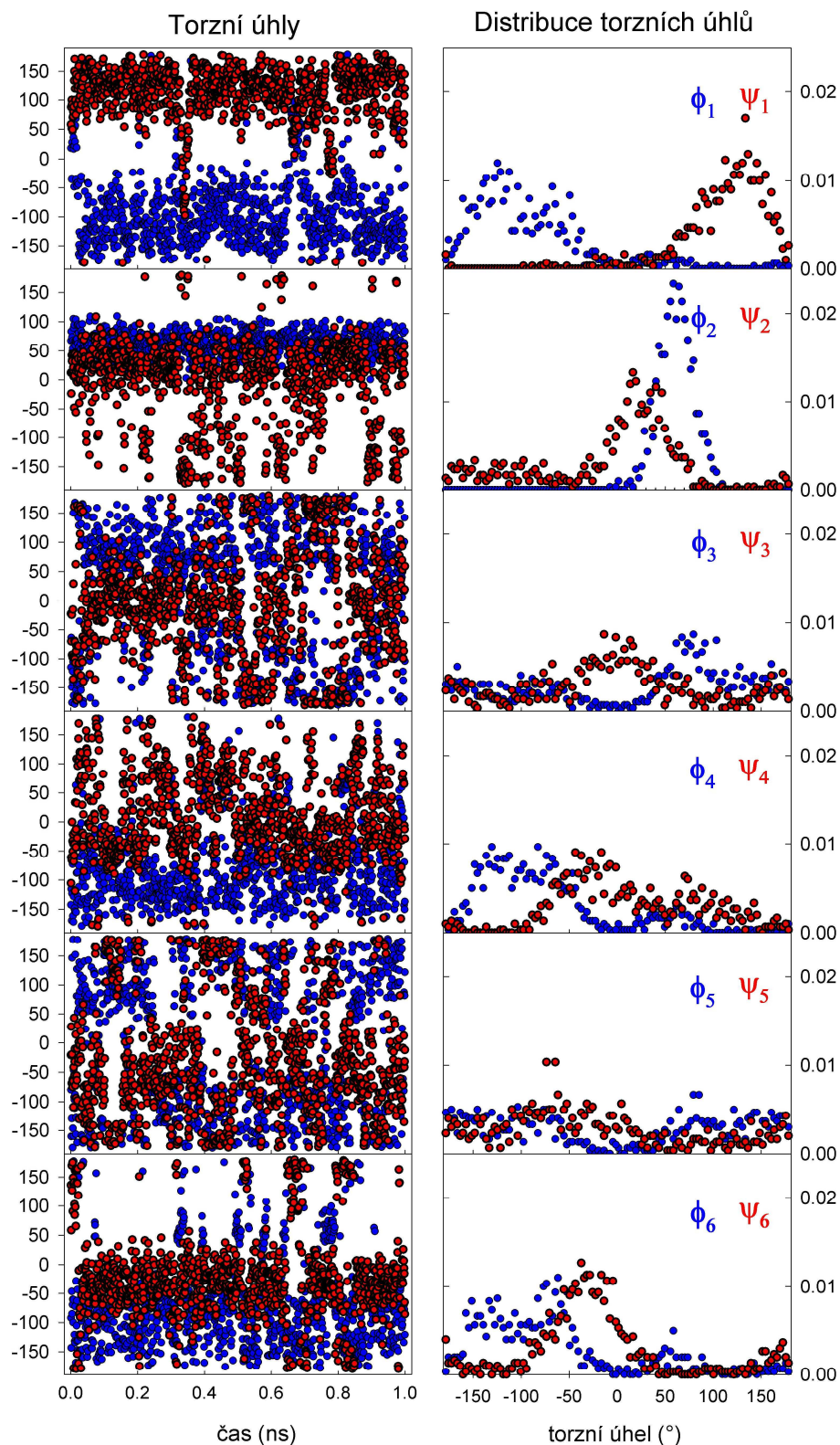




**Obr. 4.5:** Vlevo průběh hodnot torzňích úhlů peptidové páteře cycklického hexapeptidu během molekulární dynamiky probíhající při teplotě 300 K. Vpravo je doplněna distribuce těchto torzňích úhlů.



**Obr. 4.6:** Vlevo průběh hodnot torzňních úhlů peptidové páteře cyckického hexapeptidu během molekulární dynamiky při teplotě 600 K. Vpravo je doplněna distribuce těchto torzňních úhlů.



**Obr. 4.7:** Vlevo průběh hodnot torzňích úhlů peptidové páteře cyklického hexapeptidu během molekulární dynamiky při teplotě 1000 K. Vpravo je doplněna distribuce těchto torzňích úhlů.

Hodnoty torzních úhlů shrnuté v tab. 4.1 a 4.2 je možné srovnat pro různé MD (viz obr. 4.4 - 4.7). Pro porovnávání hodnot úhlů je vhodnější vycházet z distribucí než z průměrů, které např. nejsou schopny postihnout případ dvou preferovaných konformací. Z hlediska ustavení rovnováhy v systému je důležitá volba délky simulace. Mnohem vhodnější delší simulace (14 ns při 450 K) byly provedeny v práci Bouře a kol. (2008). My jsme z časových důvodů provedli pouze 1 ns simulace.

MD výpočet	Phe		D-Pro		Gly2	
	$\phi_1$ (°)	$\psi_1$ (°)	$\phi_2$ (°)	$\psi_2$ (°)	$\phi_3$ (°)	$\psi_3$ (°)
P.Bouř a kol., 2008, 1 ns molekulová dynamika při 300 K po simulovaném zahřátí na 1000 K						
Průměr	-141	157	62	16	-74	20
Preferovaný úhel	-70 až -150	125	80	10 a -130	-120	-160 a 0
1 ns molekulová dynamika při 300 K po simulovaném zahřátí na 1000 K						
Průměr	-137	141	56	8	58	-3
$\delta$	15	22	12	51	77	24
Preferovaný úhel	-140	150	55	30 a -115	80 a -120	0
1 ns molekulová dynamika při 300 K						
Průměr	14	78	67	13	-120	-99
$\delta$	34	20	12	15	33	131
Preferovaný úhel	35 a -40	70 a 110	70	5	-160 až -100	-170
1 ns molekulová dynamika při 600 K						
Průměr	-125	130	58	-8	51	-16
$\delta$	46	37	16	70	78	43
Preferovaný úhel	-140	145	60	30 a -120	85 a -80	0
1 ns molekulová dynamika při 1000 K						
Průměr	-92	112	61	-7	24	-3
$\delta$	60	47	18	72	107	88
Preferovaný úhel	-160 až -40	125	60	30 a -130	40 až 120	-40 až 40

**Tab. 4.1:** Torzní úhly  $\phi_1$  až  $\phi_3$  a  $\psi_1$  až  $\psi_3$ , jejich průměry společně se směrodatnými odchylkami  $\delta$  a preferované úhly určené z distribucí pro jednotlivé děje simulované při MD výpočtech.

MD výpočet	Arg		Gly1		Asp	
	$\psi_4$ (°)	$\phi_4$ (°)	$\psi_5$ (°)	$\psi_5$ (°)	$\phi_6$ (°)	$\psi_6$ (°)
P.Bouř a kol., 2008, 1 ns molekulová dynamika při 300 K po simulovaném zahřátí na 1000 K						
Průměr	-134	10	168	-56	-136	-21
Preferovaný úhel	-100 až -130	-40 až 130	110 a -140	-170 až 30	-100 a -130	-20 a 170
1 ns molekulová dynamika při 300 K po simulovaném zahřátí na 1000 K						
Průměr	-87	-22	89	-56	-113	-25
$\delta$	24	16	127	31	28	17
Preferovaný úhel	-90	-20	130 až -20	-50	-130 a -70	-20
1 ns molekulová dynamika při 300 K						
Průměr	-56	-35	-121	-26	-137	103
$\delta$	18	17	52	28	33	130
Preferovaný úhel	-50	-35	-150 až -110	-50 až 10	-145	170
1 ns molekulová dynamika při 600 K						
Průměr	-90	3	55	-72	-92	-27
$\delta$	37	48	115	55	42	33
Preferovaný úhel	-140 až -40	-30 až 110	60 až -130	-140 až -50	-150 až -40	-20
1 ns molekulová dynamika při 1000 K						
Průměr	-77	12	-2	-27	-71	-21
$\delta$	68	70	119	96	75	71
Preferovaný úhel	-150 až -40	-80 až 150	50 až -50	-100 až 30	-160 až -50	-80 až 20

**Tab. 4.2:** Torzní úhly  $\phi_4$  až  $\phi_6$  a  $\psi_4$  až  $\psi_6$ , jejich průměry společně se směrodatnými odchylkami  $\delta$  a preferované úhly určené z distribucí pro jednotlivé děje simulované při MD výpočtech.

Výsledné MD trajektorie jsou ovlivněny výchozí geometrií a výpočetním postupem. Pro všechny nové výpočty byla výchozí geometrie totožná, zatímco v práci Bouře a kol. (2008) mohla být jiná, což může být příčinou odlišných výsledků získaných během simulovaného zahřátí.

Hodnoty úhlů  $\phi_2$ ,  $\psi_2$ ,  $\phi_3$  a  $\psi_3$  jsou při provedených MD simulacích velmi blízké hodnotám, které charakterizují  $\beta$ -otočky ( $\beta$ -otočka typu I':  $\phi_2 = 60^\circ$ ,  $\psi_2 = 30^\circ$ ,  $\phi_3 = 90^\circ$ ,  $\psi_3 = 0^\circ$  je zrcadlovým obrazem  $\beta$ -otočky typu I, neboť místo L-prolinu je v řetězci D-prolin, a  $\beta$ -otočka typu II':  $\phi_2 = 60^\circ$ ,  $\psi_2 = -120^\circ$ ,  $\phi_3 = -90^\circ$ ,  $\psi_3 = 0^\circ$ ). Jako nejméně spolehlivá se jeví MD při 300 K, u které je hodnota úhlu  $\psi_3$  velmi vzdálená od  $0^\circ$ . V případě, že výchozí geometrie obsahuje smyčku D-Pro<sup>2</sup>Gly podobající se  $\beta$ -otočce typu I', cyklus hexapeptidu způsobí, že přechod do jiného minima

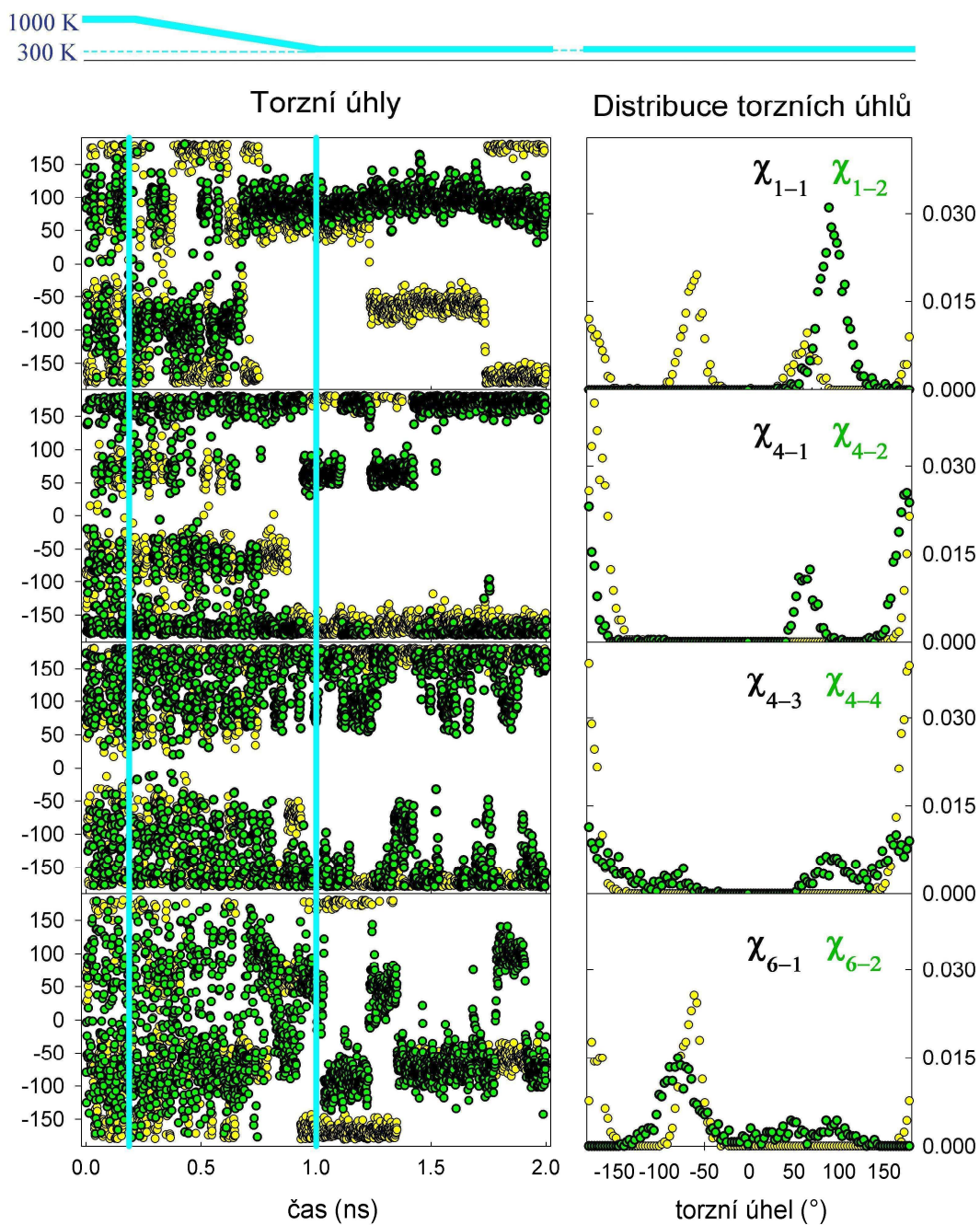
( $\beta$ -otočky typu II') je možný pouze při zahřátí na vysokou teplotu, což se potvrdilo. Ve všech 1 ns MD simulacích kromě MD při 300 K jsou pozorovatelné občasné přechody mezi  $\beta$ -otočkami (viditelné změny úhlů  $\psi_2$  a  $\phi_3$ ).

V práci Bouře a kol. (2008) je popsána další smyčka obsahující  $^1\text{Gly}$  a  $\text{Asp}$ , která během simulace vykazovala dvě preferované hodnoty torzních úhlů, ovšem poněkud vzdálené ideálním hodnotám pro  $\beta$ -smyčku. Tato dvě maxima se během našich výpočtů za žádných simulovaných podmínek neukázala, distribuce úhlů  $\phi_5$  a  $\psi_5$  je zejména za vyšší teploty velmi široká.

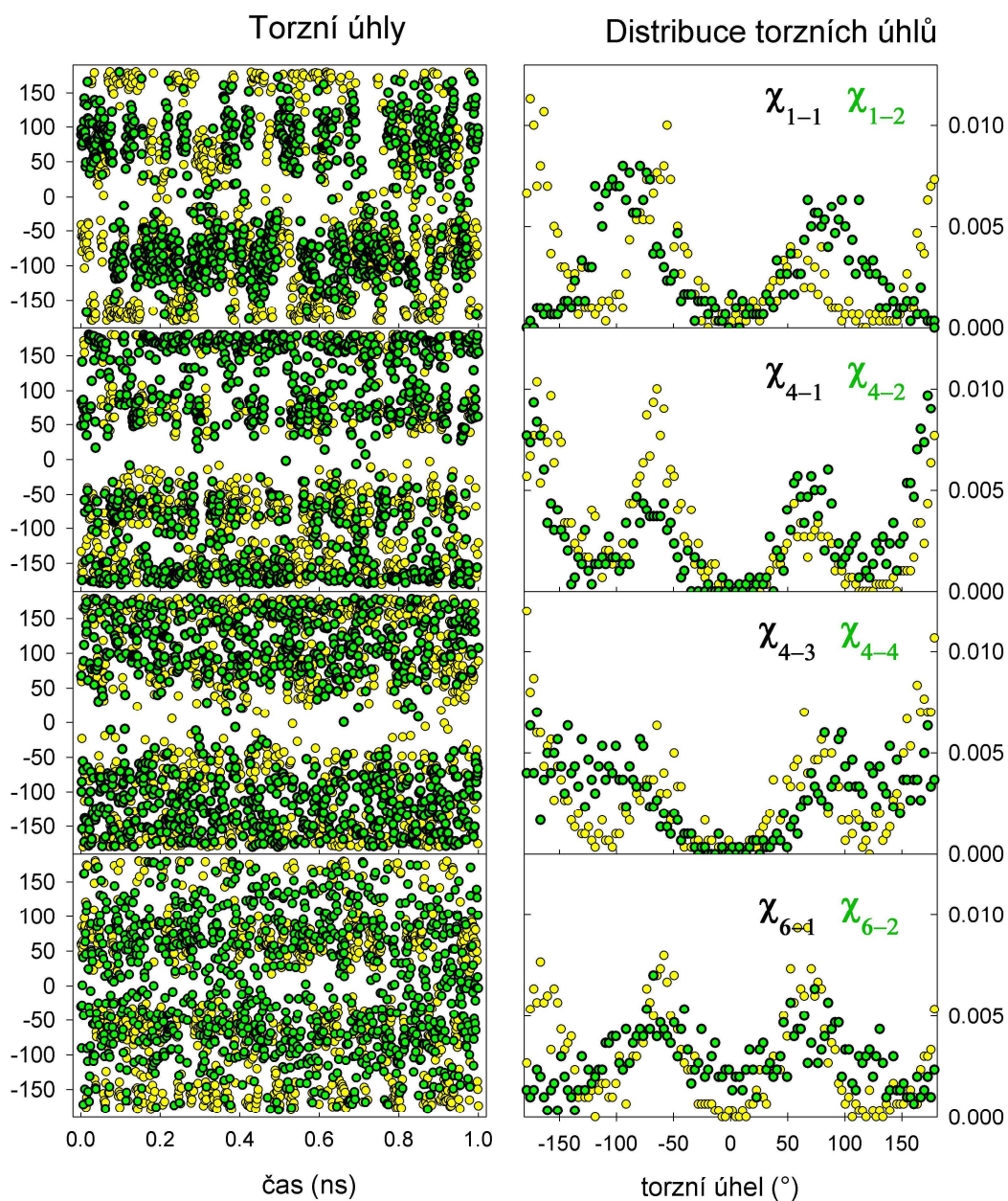
Další dvě rezidua,  $\text{Phe}$  a  $\text{Arg}$ , by měla tvořit krátkou strukturu antiparalelního  $\beta$ -listu, který je charakterizován hodnotami torzních úhlů  $\phi = -139^\circ$  a  $\psi = 135^\circ$ . V případě  $\text{Phe}$  hodnoty těchto úhlů s výjimkou MD při 300 K odpovídají, u  $\text{Arg}$  je shoda poněkud horší; hodnoty úhlů jsou blízké antiparalelnímu  $\beta$ -listu pouze při MD při 1000 K a v práci Bouř a kol. (2008), kde však mají hodně širokou distribuci. Obecně tedy současné simulace potvrdily předchozí předpovědi ohledně chování úhlů v peptidové páteři, i když v žádném případě se nepovedlo z časových důvodů dosáhnout ustáleného rozložení konformerů.

### 4.3.2 Torzní úhly v postranních řetězcích

Pro spektra Ramanova rozptylu jsou na rozdíl od IČ a VCD důležité i postranní řetězce aminokyselin, proto byly také analyzovány. Ukazuje se, že ROA spektra jsou sice citlivá zejména na konformaci peptidové páteře, ale vliv konformace postranních řetězců je také pozorovatelný. Torzní úhly v postranních řetězcích jsou mnohem flexibilnější než úhly v peptidové páteři, jejich distribuce často vykazují více preferovaných úhlů, jak je ukázáno na obr. 4.8, který zachycuje MD po simulovaném zahřátí na 1000 K a následném ochlazení na 300 K probíhající za stejných podmínek jako na obr. 4.4. Chování torzních úhlů v postranních řetězcích při 1000 K je znázorněno na obr. 4.9.



**Obr. 4.8:** Vlevo průběh hodnot torzňí úhlů v postranních řetězcích cyklického hexapeptidu během simulovaného zahřívání (svislou modrozelenou úsečkou odděleny děje popsané v textu: teplota 1000 K, přechod mezi 1000 a 300 K, 300 K). Vpravo je doplněna distribuce torzňí úhlů týkající se pouze 1 ns dynamiky probíhající při teplotě 300 K. Definice torzňí úhlů viz obr. 4.3.



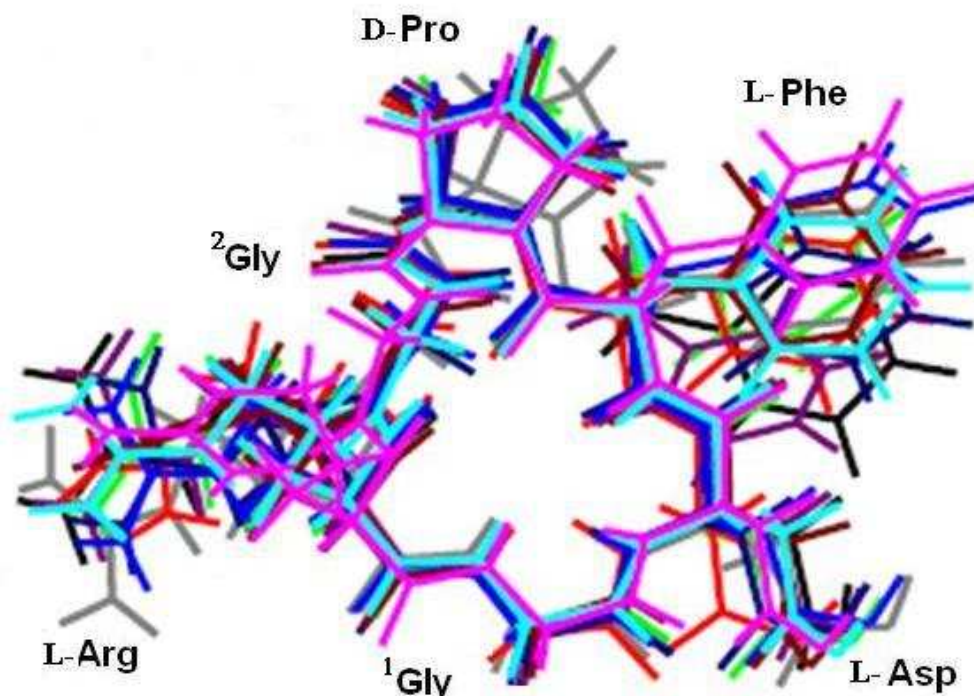
**Obr. 4.9:** Vlevo průběh hodnot torzňích úhlů v postranních řetězcích cyklického hexapeptidu během MD při teplotě 1000 K. Vpravo je doplněna distribuce těchto torzňích úhlů. Definice torzňích úhlů viz obr. 4.3.



#### 4.4 DFT výpočty pro deset konformací vybraných z MD

Pro další výpočty jsme převzali deset geometrií cyklického hexapeptidu (po optimalizaci) z práce P. Bouře a kol. (2008), pro něž byla již pomocí DFT simulována IČ a VCD spektra. Tyto konformace byly náhodně vybrány z 1 ns MD při 300 K po simulovaném zahřátí na 1000 K provedeném v programu Tinker; dále jsou značeny jako A-1 až A-10.

Všechny tyto struktury obsahují smyčku D-Pro-<sup>2</sup>Gly blízkou  $\beta$ -otočce typu I' a poněkud deformovanou smyčku <sup>1</sup>Gly-Asp. Překryv struktur je uveden na obr. 3.10. Byla provedena částečná optimalizace pomocí normálních vibračních módů s potlačením módů s frekvencí nižší než 300 cm<sup>-1</sup>. Pouze vyšším módům, které jsou pro spektra důležité, byla umožněna relaxace. Dopad takové optimalizace na konformaci získanou z MD je minimální, jak je ukázáno v Bouř a Keiderling (2002). Výsledné torzní úhly v peptidové páteři pro jednotlivé konformace jsou uvedeny v tabulce 4.3.



**Obr. 4.10:** Cyklický hexapeptid (Phe-D-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp) – překryv 10 konformací použitých pro výpočet. Převzato Bouř. a kol. (2008).

	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6	A-7	A-8	A-9	A-10
$\phi_1$ (°)	-126	-148	-143	-139	-133	-141	-146	-144	-143	-146
$\psi_1$ (°)	165	132	163	156	170	156	160	160	153	169
$\phi_2$ (°)	57	63	56	52	74	47	46	65	62	73
$\psi_2$ (°)	25	28	19	23	15	12	30	11	9	16
$\phi_3$ (°)	59	60	66	70	69	92	39	66	92	78
$\psi_3$ (°)	13	39	39	35	16	18	60	33	37	14
$\phi_4$ (°)	-124	-153	-145	-145	-138	-141	-143	-138	-168	-143
$\psi_4$ (°)	9	20	13	7	3	20	26	10	3	-10
$\phi_5$ (°)	178	173	160	-170	164	161	171	168	-179	-177
$\psi_5$ (°)	-71	-73	-61	-58	-23	-51	-27	-67	-76	-47
$\phi_6$ (°)	-132	-151	-127	-132	-153	-143	-146	-126	-132	-130
$\psi_6$ (°)	-27	6	-32	-22	-44	-15	-29	-28	-15	-35

**Tab. 4.3:** Hodnoty torzních úhlů v peptidové páteři cyklického hexapeptidu c-(Phe-D-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp) pro 10 konformací použitých pro výpočet. Převzato z Bouř a kol. (2008).

#### 4.4.1 Ramanova spektra

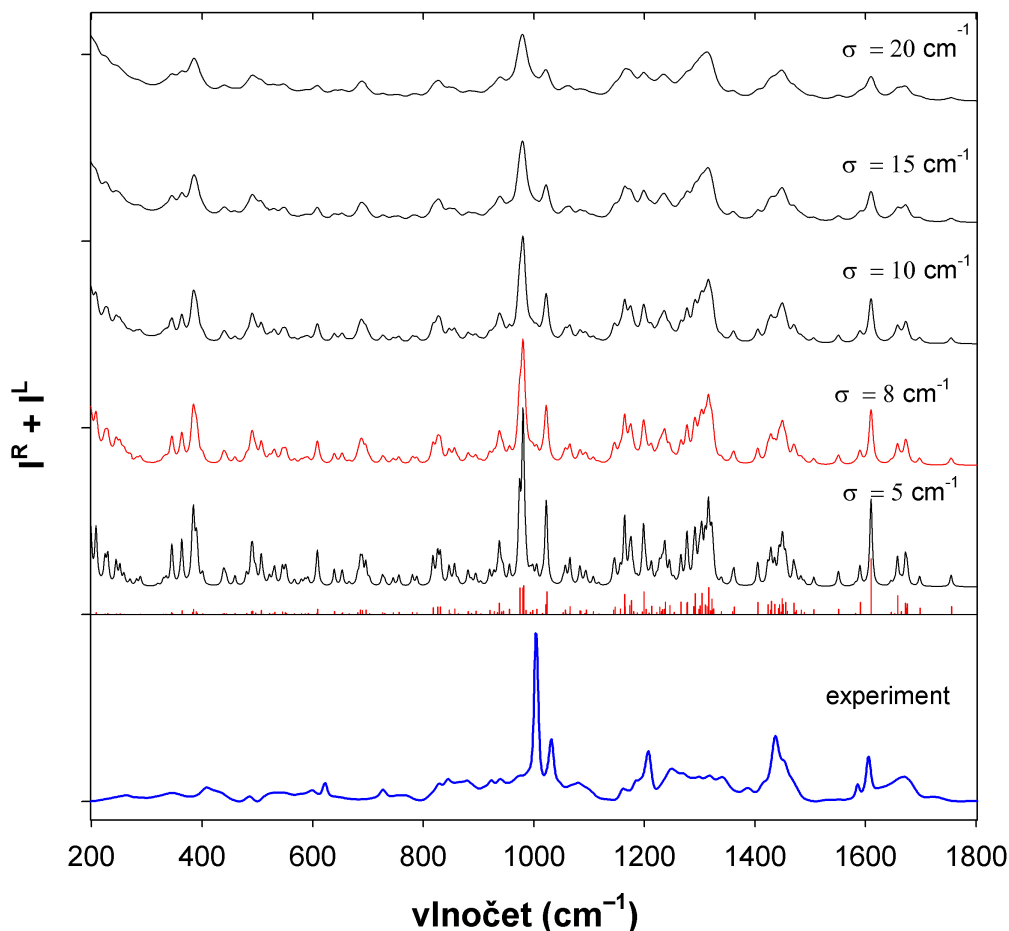
V práci Bouře a kol. (2008) byly pro výpočet IČ a VCD spekter otestovány úrovně výpočtu B3LYP/6-31G\*\*, BPW91/6-31G\*\* a BPW91/6-311++G\*\* s použitím CPCM modelu rozpouštědla. Jako nejvýhodnější byla vybrána úroveň BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O), kterou budeme nadále používat. Pro výpočet Ramanových a ROA spekter by bylo vhodnější použít větší bazový set obsahující také difúzní funkce, ale kvůli časové náročnosti výpočtů to bylo vyloučeno.

##### 4.4.1.1 Nastavení pološířky pásů v simulovaných spektrech

Na obr. 4.11 je znázorněna závislost spektrálního profilu vypočtených Ramanových spekter na zvolené pološířce pro jednu vybranou konformaci cyklického hexapeptidu (A-4). Čárové spektrum znázorněné červeně bylo získáno výpočtem a jednotlivé pásy byly nafitovány Lorentzovými křivkami o různých pološířkách, jak je popsáno v sekci 2.4.6. Zvolíme-li malou pološířku, získáme spektrum s mnoha úzkými, dobře rozlišitelnými pásy. Můžeme tak získat větší rozlišení, než jakého jsme schopni dosáhnout experimentálně. Naproti tomu při nastavení větší pološířky dochází ke splývání pásů. S ohledem na požadavek, aby

naměřené pásy hlavně v Ramanových spektrech zůstaly i ve vypočtených spektrech dostatečně úzké, jsme podle obr. 4.11 zvolili pološířku pásů na  $8 \text{ cm}^{-1}$ . Tato pološířka je použita i pro generaci simulovaných ROA spekter.

V experimentu není možné změřit absolutní hodnotu intenzity, pro lepší vizuální srovnání proto vynásobíme vypočtené intenzity spekter vhodným faktorem (na obr. 4.10 můžeme požadovat, aby byla výška nejvýraznějšího pásu (dýchací vibrace Phe  $\sim 1003 \text{ cm}^{-1}$ ) pro dále používanou pološířku  $8 \text{ cm}^{-1}$  stejná jako v experimentu. Můžeme si povšimnout, že v závislosti na pološířce se liší poměr intenzit dýchací vibrace Phe  $\sim 1003 \text{ cm}^{-1}$  a přidružené vibrace  $\sim 1033 \text{ cm}^{-1}$ , proto nebude možné poměr těchto dvou pásů využít při dalším zpracování jako charakteristický znak podobnosti nebo odlišnosti vypočtených spekter od experimentu.

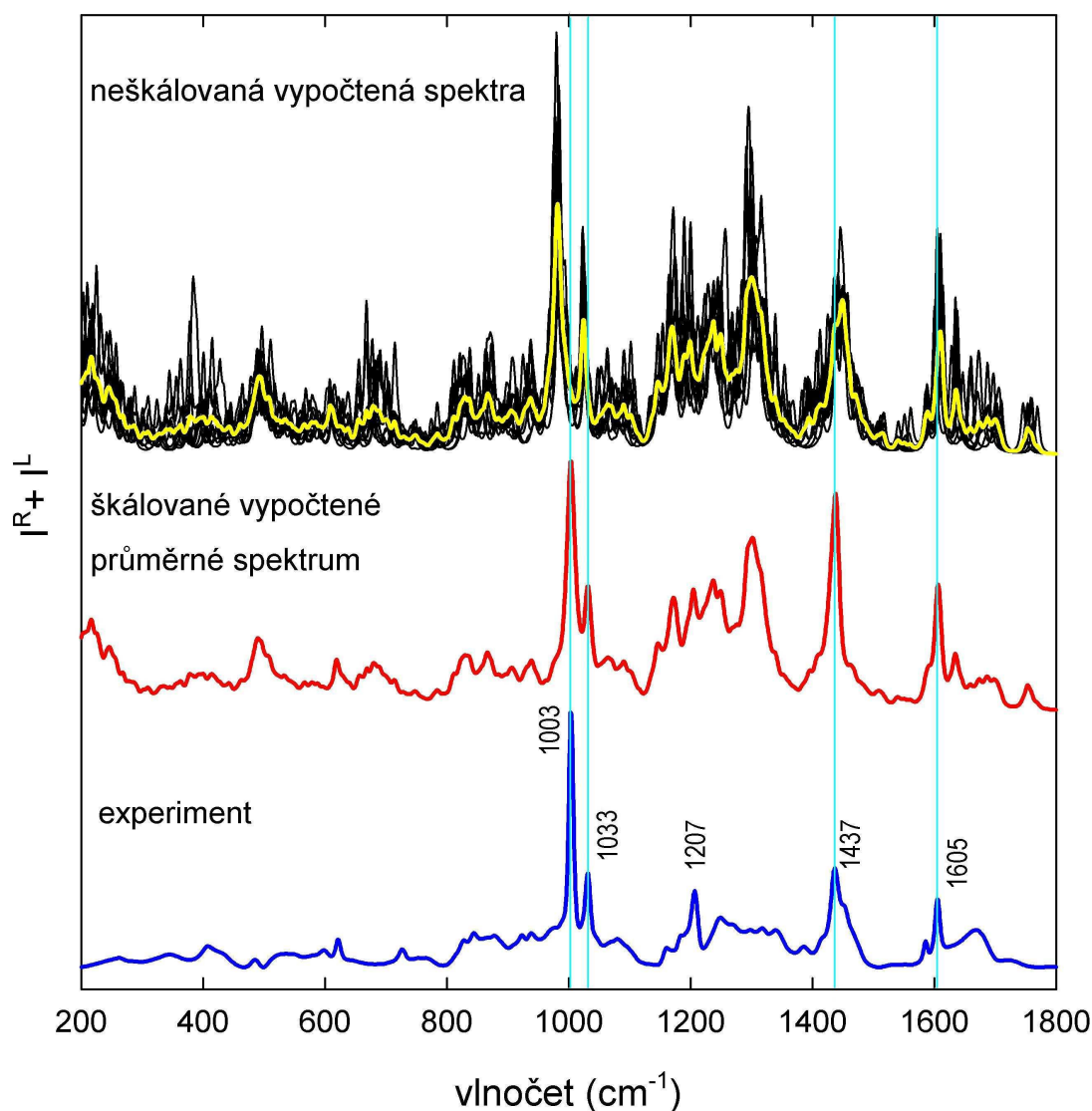


**Obr. 4.11:** Srovnání spektrálního profilu změřeného Ramanova spektra cyklického hexapeptidu (dole, modře) se spektry konformace A-4 vypočtenými na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O) s rozdílnou pološířkou spektrálních pásů aplikovanou na vypočtené čárové spektrum (dole, červeně). Červeně je vyznačeno spektrum s pološířkou  $8 \text{ cm}^{-1}$ , která je dále používána.

#### 4.4.1.2 "Škálování" vibračních frekvencí

Na obr. 4.12 je možné si povšimnout, že spočtené a změřené polohy pásů, které jsou jednoznačně přiřaditelné, se poněkud liší. Podobně tomu bylo u spekter všech deseti konformací. Vypočítané vibrační frekvence jsou zatíženy chybou, která souvisí s kvalitou zvolené metody. Aby bylo možné přistoupit ke srovnávání vypočtených spekter s experimentem, je nutné provést korekci. Nejjednodušším způsobem by bylo vynásobení všech frekvencí jedním škálovacím faktorem. My jsme se rozhodli použít selektivní posun některých pásů (bez změny pořadí vibračních módů) tak, aby měly stejný vlnčet v experimentálním spektru a ve spektru získaném jako průměr Ramanových spekter 10 počítaných konformací. V experimentálním Ramanově spektru cyklického hexapeptidu se totiž vyskytuje několik velmi úzkých pásů, které jsou nezávislé na konkrétní konformaci molekuly, což je vidět i z toho, že u všech konformací jsou na stejném místě a podobně intenzivní. Na obr. 4.12 je naznačeno modrozelenými přímkami provedené "přeškálování" polohy těchto úzkých pásů odpovídajících si v experimentu a ve výpočtu. U pásu  $\sim 1437 \text{ cm}^{-1}$  (tato i další uváděné hodnoty jsou experimentální) je vidět, že při selektivním posunu tohoto pásu došlo k natolik velkému přiblížení k sousednímu pásu, že při dané pološírce splynuly v jediný, intenzivnější pás.

Oblast amidu I ( $1630\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$ ) s C=O valenčními vibracemi je vystižena poměrně dobře včetně úzkého pásu  $\sim 1605 \text{ cm}^{-1}$  a velmi širokého pásu  $\sim 1688 \text{ cm}^{-1}$ . Intenzita dalšího úzkého pásu  $\sim 1437 \text{ cm}^{-1}$  zahrnujícího zejména  $\text{CH}_2$  nůžkové vibrace (Pro) je oproti experimentu přeceněna. Rovněž v rozšířené oblasti amidu III ( $1250$  až  $1350 \text{ cm}^{-1}$ ) vychází při výpočtech znatelně vyšší intenzity pásů, než pozorujeme v experimentu. Poměr dýchací vibrace Phe  $\sim 1003 \text{ cm}^{-1}$  a přidružené vibrace Phe  $\sim 1033 \text{ cm}^{-1}$  je v dobré shodě s experimentem. V oblasti torzních vibrací pod  $800 \text{ cm}^{-1}$  vychází experimentálně nižší intenzity, což je možné přisoudit silné závislosti vibračních frekvencí těchto módů na konformaci. Zahrnutím ještě většího počtu konformací by díky konformačnímu středování mělo dojít k dalšímu snížení intenzity pásů v této oblasti. Už při uvažování 10 konformací z MD je však vidět, že velká část pásů v Ramanově spektru cyklického hexapeptidu je na konformaci citlivá a po zprůměrování jsou tyto pásy nižší a rozšířené.



**Obr. 4.12:** Ramanova spektra cyklického hexapeptidu. Nahoře černě 10 "neškálovaných" spekter vypočtených na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O), žlutě jejich průměr, uprostřed červeně jejich průměr s provedeným "škálováním" a dole modře změřené spektrum.

#### 4.4.1.3 Srovnání vypočtených Ramanových spekter s experimentem

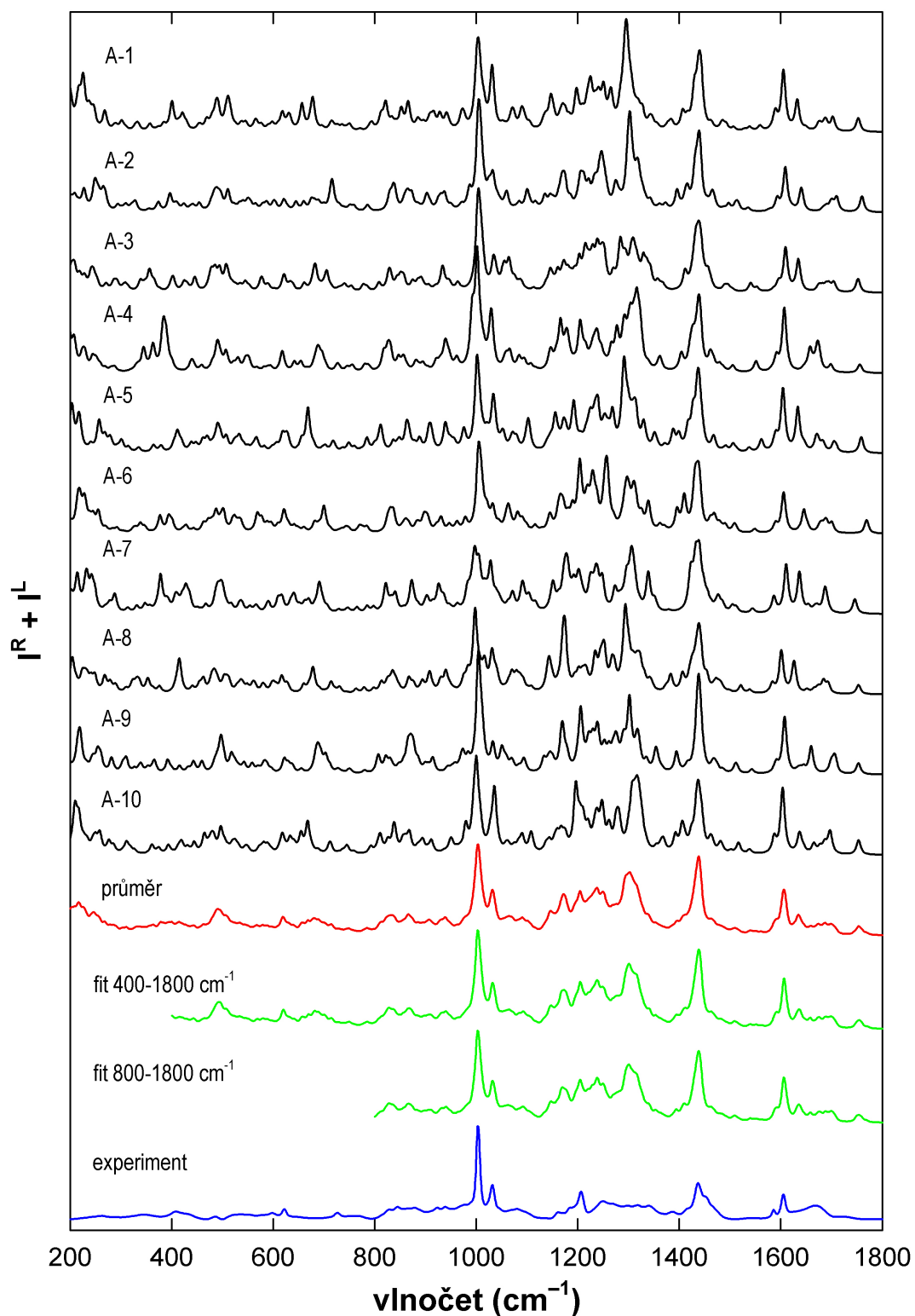
Cyklický hexapeptid obsahující 85 atomů je příliš velkým systémem na to, abychom prováděli srovnávání vypočtených a změřených spekter přímým porovnáváním 249 vibračních módů. Dochází totiž k silnému překryvu pásů.

Porovnání proto bylo provedeno na základě spektrálních profilů, jak je popsáno v kapitole 2.4.7. Tuto metodiku jsme aplikovali na 10 vypočtených a "oškálovaných" Ramanových spekter. Pro srovnání je možné zvolit, jak široká

oblast spektra bude využita. Vzhledem k tomu, že většina výrazných pásů v experimentálním spektru se vyskytuje v oblasti 800-1800  $\text{cm}^{-1}$ , jsme zvolili tento interval, a navíc ještě rozšířený interval 400-1800  $\text{cm}^{-1}$ . V tab. 4.4 jsou uvedeny získané hodnoty  $\delta$  odchylek (rovnice 2.57), které určují, jak moc se dané vypočtené spektrum liší od spektra experimentálního, a koeficienty  $b_i$  rozvoje normalizovaného experimentálního spektra do 10 vypočtených spekter převedené na procenta, pomocí kterých vznikne fit co nejbližší experimentálnímu spektru (rovnice 2.58). Na obr. 4.13 jsou výsledky znázorněny graficky. Ukázána jsou i Ramanova spektra jednotlivých konformerů, abychom si mohli udělat názornou představu o tom, jak se navzájem liší i jak moc blízká jsou experimentu. Konformace A-4 a A-9 postihují hlavní rysy experimentálního Ramanova spektra nejlépe, ale rozšíření mnoha pásů lze popsat jen přítomností více konformerů. V závislosti na tom, jak velkou část spektra uvažujeme, se získané výsledky liší jen málo. Při použití dvou různých intervalů vlnočtů se rozvojové koeficienty pro všech 10 spekter pohybují těsně okolo 10 %. Nafitovaná spektra tedy jsou velmi podobná spektru získanému jako průměr 10 konformací.

Konformace	Interval 400-1800 $\text{cm}^{-1}$		Interval 800-1800 $\text{cm}^{-1}$	
	$\delta$	$b_i$ (%)	$\delta$	$b_i$ (%)
A-1	0,505	7,6	0,459	7,1
A-2	0,510	10,0	0,481	8,8
A-3	0,517	10,8	0,473	11,4
A-4	0,495	13,3	0,449	14,0
A-5	0,505	9,4	0,465	9,0
A-6	0,530	9,2	0,499	8,9
A-7	0,510	9,3	0,456	9,9
A-8	0,491	6,9	0,452	6,0
A-9	0,510	12,4	0,458	13,5
A-10	0,506	11,1	0,454	11,4

**Tab. 4.4:** Statistické porovnání vypočtených Ramanových spekter pro 10 konformací cyklického hexapeptidu A-1až A-10 na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM( $\text{H}_2\text{O}$ ) s experimentálním spektrem pro intervaly (400-1800)  $\text{cm}^{-1}$  a (800-1800)  $\text{cm}^{-1}$ . Odchylka  $\delta$  určuje, jak moc se dané vypočtené spektrum liší od spektra experimentálního (dvě nejnižší hodnoty jsou vyznačeny modře), koeficienty  $b_i$  rozvoje normalizovaného experimentálního spektra do 10 vypočtených spekter jsou převedeny na procenta (dvě nejvyšší hodnoty vyznačeny červeně).



**Obr. 4.13:** Odshora černě 10 "škálovaných" Ramanových spekter vypočtených na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O) pro konformace A-1 až A-10 cyklického hexapeptidu, červeně jejich průměr, zeleně naitovaná spektra ze statistického srovnání pro různé intervaly, dole modře experiment.

## 4.4.2 ROA spektra

Výpočet ROA spekter je komplikovaný proces. Díky rozvoji počítačů i výpočetních postupů je možné počítat systémy se stále větším počtem atomů. V Gaussianu verze G03RevD.02 jsou derivace tenzorů optické aktivity implementovány na HF i DFT úrovni. Přesto je náš cyklický hexapeptid na hranici dnešních možností. Do spektra navíc přispívá velké množství konformerů s podobnou energií, což v případě ROA spekter způsobuje nejen rozšíření spektrálních pásů, ale může dojít i k jejich vyrušení. ROA spektra jsou tedy v jistém smyslu na konformační flexibilitu molekul mnohem citlivější než Ramanova spektra, Kapitán a kol. (2006b).

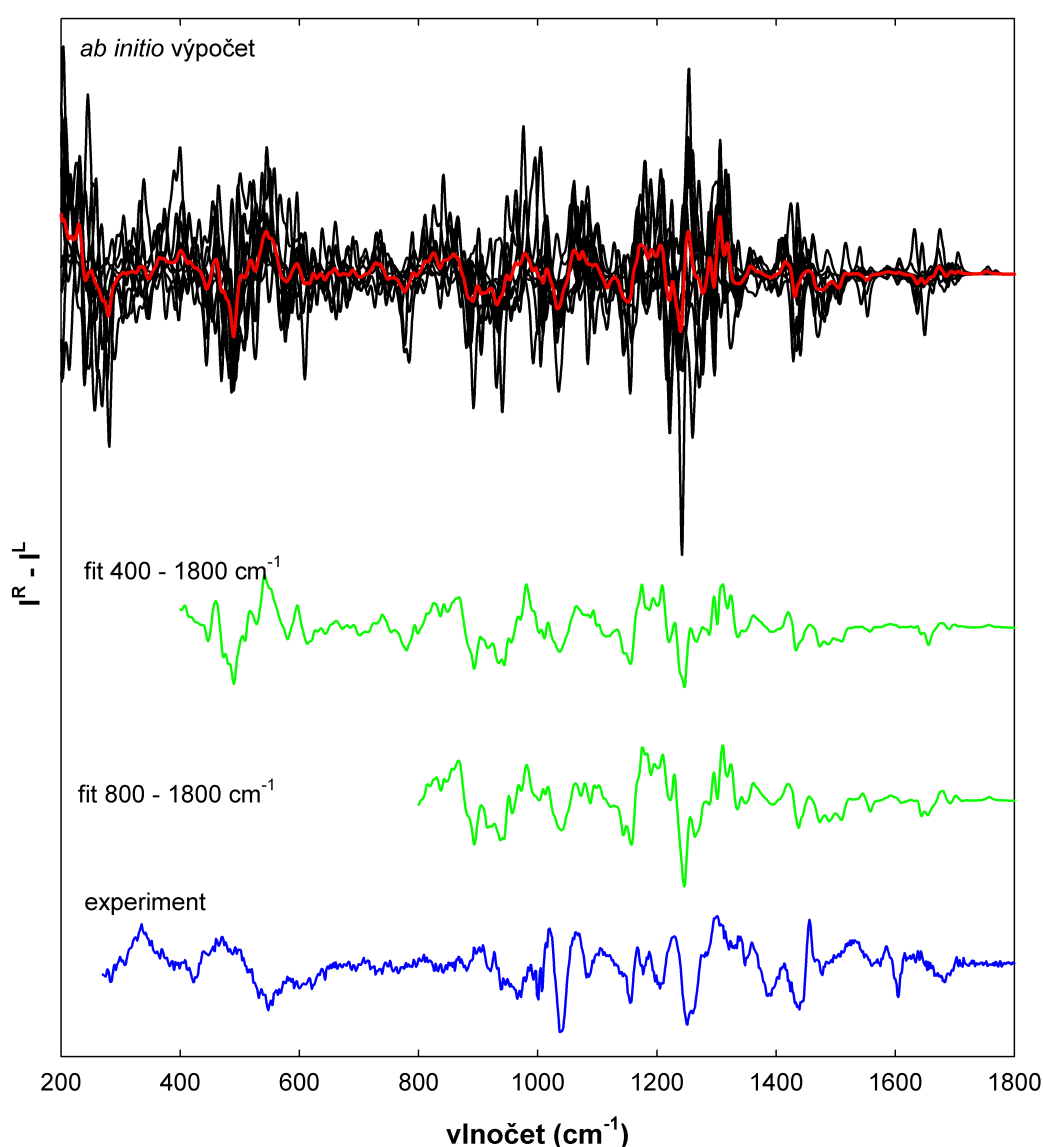
Výpočet Ramanových intenzit na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O) trval okolo 5 dnů. Výpočet ROA intenzit je časově mnohem náročnější - odhadovaná doba výpočtu na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O) je 894 dní (2 procesory AMD64, 4GB RAM), s použitím menší báze 6-31G by byla 149 dní. Použili jsme proto jiné možné přístupy využívající dalších aproximací.

### 4.4.2.1 Výpočet ROA spekter s použitím polarizačního modelu

Možností, jak využít již spočtených Ramanových spekter k získání přibližných ROA spekter, je polarizační model, který je popsán v kapitole 2.4.4. Při jeho použití zanedbáme nelokální části derivací tenzorů optické aktivity a lokální části spočítáme pomocí derivace tenzoru polarizovatelnosti  $\hat{\alpha}$  již známého z výpočtu Ramanových spekter na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O). Polarizační model sice poskytuje obvykle dobré výsledky za zlomek výpočetního času, ale pro některé pásy nemusí být úplně spolehlivý, Bouř a kol. (1997a). K "oškálování" ROA spekter byly použity frekvence vibrací získané při "škálování" Ramanových spekter. ROA spektra jsou uvedena na obr. 4.14. Při průměrování ROA spekter dochází ke zřetelnému rozšíření ROA pásů a v některých místech až k vyrušení ROA signálu, jak je zřejmé z průměrného spektra, jehož intenzita je přibližně třikrát menší ve srovnání s intenzitou spekter jednotlivých konformerů. Zejména v oblasti 950 až 1450 cm<sup>-1</sup> je možné nalézt určitou podobnost s experimentálním spektrem, většina pásů odpovídá a ve většině případů souhlasí i znaménko. ROA spektra jsme



statisticky zpracovali stejně jako Ramanova spektra, výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.5. Bohužel horší poměr signál/šum v ROA spektru může výsledky poněkud zkreslit. Rozvojové koeficienty pro vypočtená spektra jsou více vzdáleny od 10%, jako tomu bylo u Ramanových spekter, nejlepší se pohybují okolo 20%. Při použití dvou různých intervalů vlnočtů se rozvojové koeficienty poměrně liší, což je dáno tím, že zejména v oblasti nižších vlnočtů se vypočtená spektra značně odchyľují od spektra experimentálního. V případě ROA spekter se ukazuje jako nutné zahrnutí mnohem většího počtu konformerů, což ovšem nebylo v rozumném výpočetním čase realizovatelné.



**Obr. 4.14** : ROA spektra cyklického hexapeptidu pro konformace A-1 až A-10 spočtená pomocí polarizačního modelu (úroveň BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O)). Nahoře černě 10 vypočtených "škálovaných" spekter, červeně jejich průměr, zeleně naitovaná spektra ze statistického srovnání pro různé intervaly a dole modře experiment.

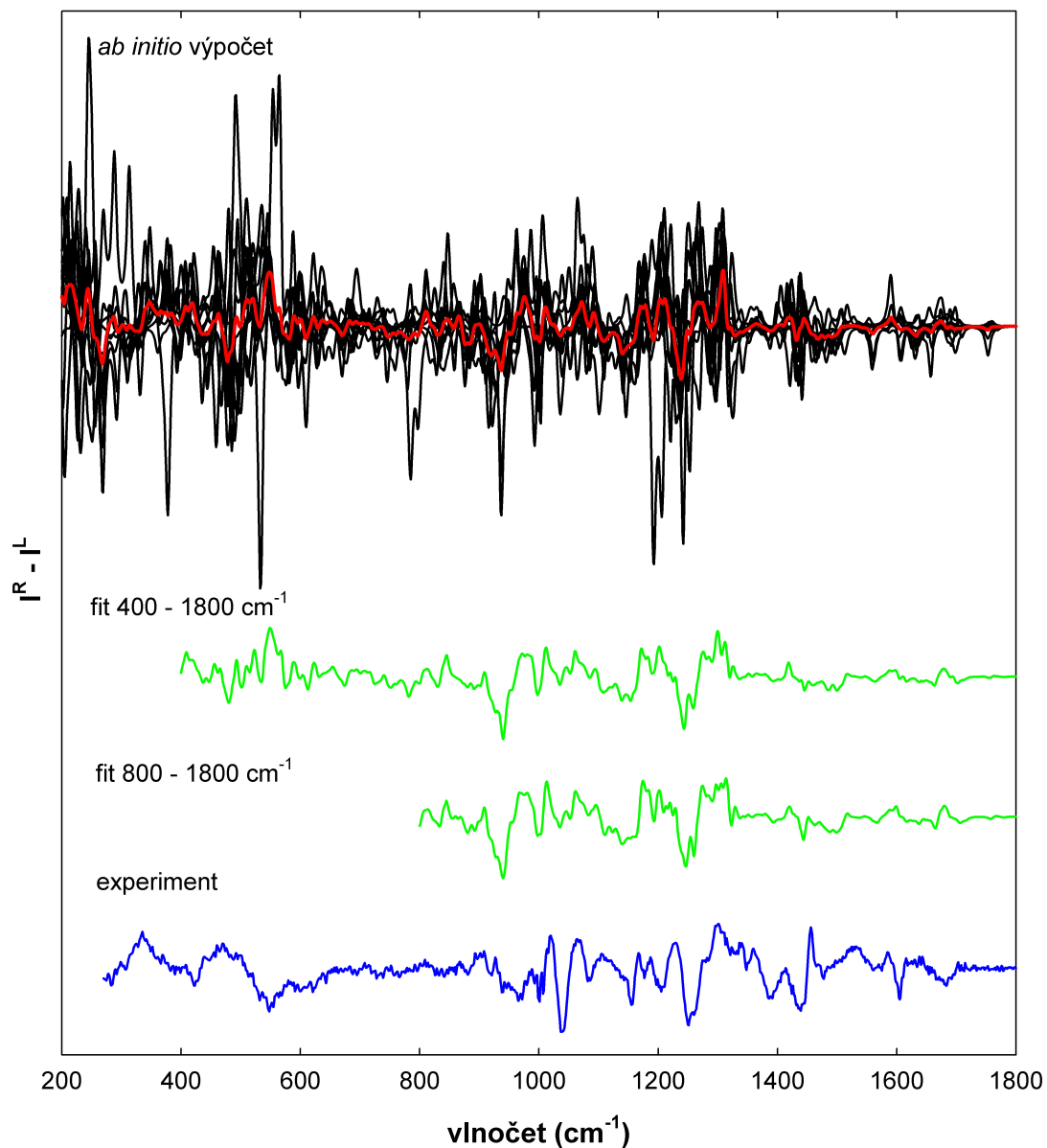
Konformace	Interval 400-1800 cm <sup>-1</sup>		Interval 800-1800 cm <sup>-1</sup>	
	$\delta$	$b_i$ (%)	$\delta$	$b_i$ (%)
A-1	1,457	2,4	1,430	-1,9
A-2	1,367	20,9	1,349	14,0
A-3	1,447	5,9	1,394	6,8
A-4	1,398	8,1	1,288	19,4
A-5	1,573	4,0	1,512	2,4
A-6	1,364	12,6	1,262	21,4
A-7	1,495	11,5	1,427	5,5
A-8	1,553	9,1	1,526	2,2
A-9	1,409	17,2	1,389	18,0
A-10	1,404	8,1	1,338	12,3

**Tab. 4.5 :** Statistické porovnání ROA spekter vypočítaných s použitím polarizačního modelu (úroveň BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O)) pro 10 konformací cyklického hexapeptidu A-1 až A-10 se změřeným spektrem. Odchylka  $\delta$  (dvě nejnižší hodnoty vyznačeny modře) a koeficienty rozkladu  $b_i$  převedené na procenta (dvě nejvyšší hodnoty vyznačeny červeně).

#### 4.4.2.2 Výpočet ROA intenzit na nižší úrovni

Ukazuje se, že realistická ROA spektra je možné získat také zkombinováním dílčích výpočtů provedených na rozdílných úrovních. Kvalitnější silové pole získané z výpočtu Ramanových spekter na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O) je tak možné využít pro vylepšení tenzorů optické aktivity vypočtených z časových důvodů pouze na úrovni HF/6-31G/CPCM(H<sub>2</sub>O), Ruud a kol. (2002). I tento výpočet trval 75 dní. Použita byla technika přenosu kartézských tenzorů, v níž jsou tenzory přenášeny jako vlastnosti jednotlivých atomů, která je flexibilní a numericky stabilní, Bouř a kol. (1997b).

Deset ROA spekter získaných výpočtem bylo zpracováno stejně jako v předchozím případě. Uvedena jsou na obr. 4.15 společně s nafitovanými spektry, koeficienty zastoupení jednotlivých spekter v nafitovaném spektru jsou uvedeny v tab. 4.6. Zejména v oblasti spektra 1100-1400 cm<sup>-1</sup> lze nalézt rysy podobné experimentálnímu spektru. Většina pásů je reprodukována se správným znaménkem, přestože relativní intenzity úplně neodpovídají, což ale může být způsobeno nižší kvalitou výpočtu intenzit.



**Obr. 4.15:** ROA spektra cyklického hexapeptidu získaná kombinací silového pole spočteného na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O) a tenzorů optické aktivity vypočtených na úrovni HF/6-31G/CPCM(H<sub>2</sub>O). Nahoře černě 10 vypočtených "škálovaných" spekter pro konformace A1-A10, červeně jejich průměr, zeleně nafitovaná spektra ze statistického srovnání pro různé intervaly a dole modře experimentální spektrum.

Konformace	Interval 400-1800 cm <sup>-1</sup>		Interval 800-1800 cm <sup>-1</sup>	
	$\delta$	$b_i$ (%)	$\delta$	$b_i$ (%)
A-1	1,393	5,2	1,353	1,3
A-2	1,407	15,5	1,408	10,2
A-3	1,473	12,4	1,454	13,4
A-4	1,451	11,1	1,344	13,4
A-5	1,476	4,8	1,425	9,4
A-6	1,436	15,9	1,407	18,4
A-7	1,532	15,6	1,495	13,6
A-8	1,510	-3,2	1,456	3,1
A-9	1,410	15,9	1,364	12,4
A-10	1,468	6,7	1,422	4,9

**Tab. 4.6:** Statistické porovnání ROA spekter pro 10 konformací cyklického hexapeptidu A-1 až A10 vypočtených kombinací silového pole spočteného na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O) a tenzorů optické aktivity vypočtených na úrovni HF/6-31G/CPCM(H<sub>2</sub>O) se změřeným spektrem. Odchylka  $\delta$  (dvě nejnižší hodnoty vyznačeny modře) a koeficienty rozkladu  $b_i$  v procentech (dvě nejvyšší hodnoty vyznačeny červeně).

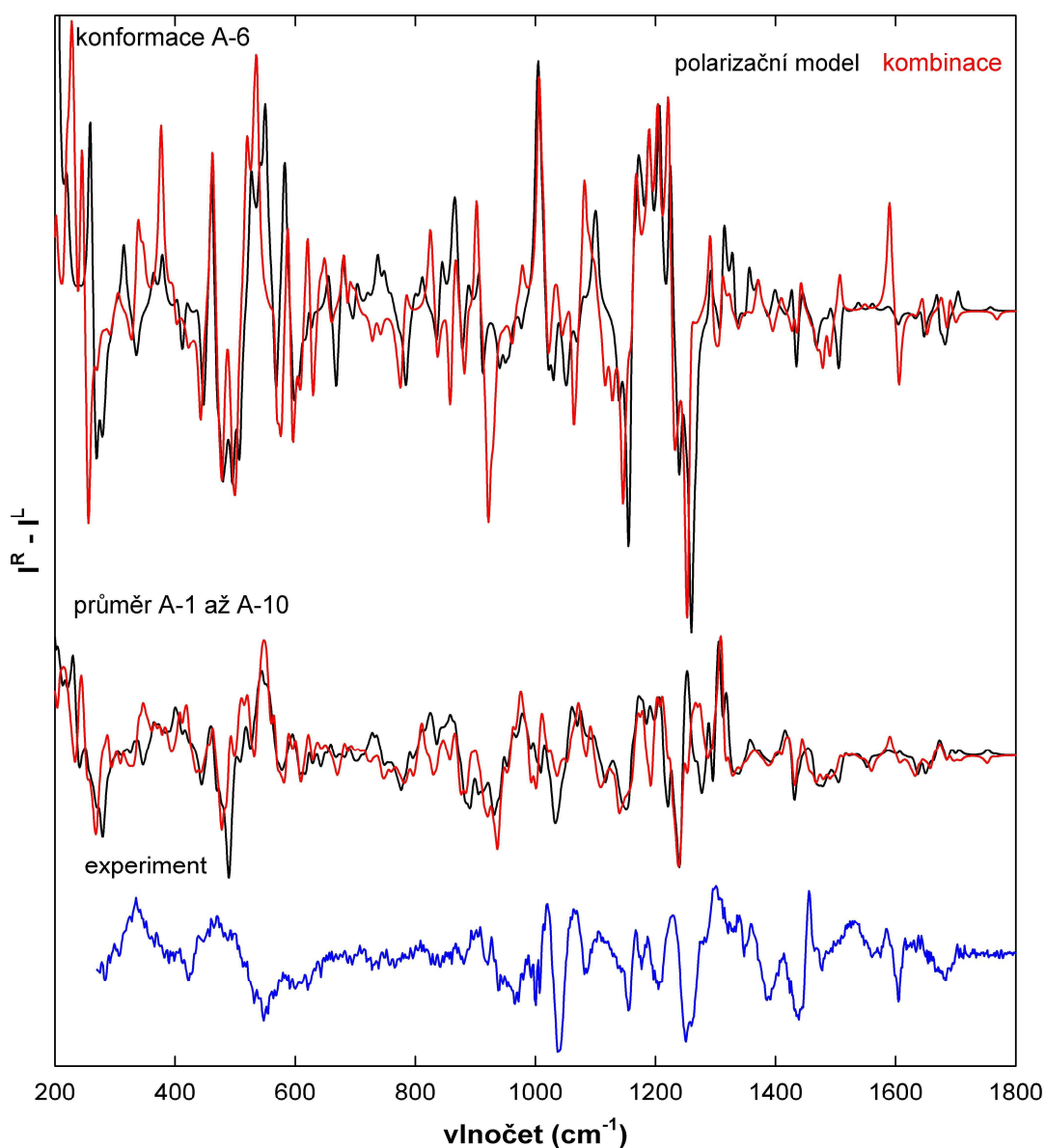
#### 4.4.2.3 Srovnání ROA spekter

Na obr. 4.16 je uvedeno srovnání ROA spekter vypočtených s použitím dvou uvedených aproximací. V polarizačním modelu jsou zcela zanedbány nelokální části derivací tenzorů optické aktivity, zatímco při kombinaci silového pole spočteného na vyšší úrovni s tenzory optické aktivity spočtenými na nižší úrovni tyto části zastoupeny jsou. Přesto se ukazuje, že polarizační model poskytuje při podstatně menší časové náročnosti velmi podobné výsledky. V oblasti spektra 950-1100 cm<sup>-1</sup> má dokonce ROA spektrum nabitované ze spekter spočítaných polarizačním modelem blíže k experimentálnímu spektru, než při výpočtu ROA intenzit na nižší úrovni.

Pro stanovení odchylky  $\delta$  je určující pouze spektrum dané konformace A-1 až A-10 a experimentální spektrum. Porovnáním údajů uvedených v tab. 4.5 a 4.6 zjistíme, že se tyto odchylky vzájemně liší obvykle do 5%. ROA spektra vypočtená pomocí dvou aproximací jsou si tedy velmi podobná.

Naproti tomu koeficienty rozkladu  $b_i$  experimentálního spektra do 10 subspekter se liší výrazně více, což je dáno silnou vzájemnou závislostí spekter. V tab. 4.5 a 4.6 se dokonce dvakrát vyskytl záporný koeficient  $b_i$ , přestože byla

nastavena dost vysoká bariéra  $\alpha = 0,001$  (viz vztah 2.59). Využitím koeficientů rozkladu bylo naitováno spektrum nejvíce podobné experimentálnímu spektru.



**Obr. 4.16:** Srovnání experimentálního, vypočtených a "škálovaných" ROA spekter cyklického hexapeptidu jedné z konformací (A-6) a průměru 10 konformací A-1 až A-10 vypočtených s použitím dvou aproximací (spektra jsou znázorněna ve stejném měřítku). Černě spektra spočtená polarizačním modelem na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O), červeně spektra získaná kombinací silového pole spočteného na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O) a tenzorů optické aktivity na úrovni HF/6-31G/CPCM(H<sub>2</sub>O).

#### 4.4.3 Srovnání fitování Ramanových a ROA spekter

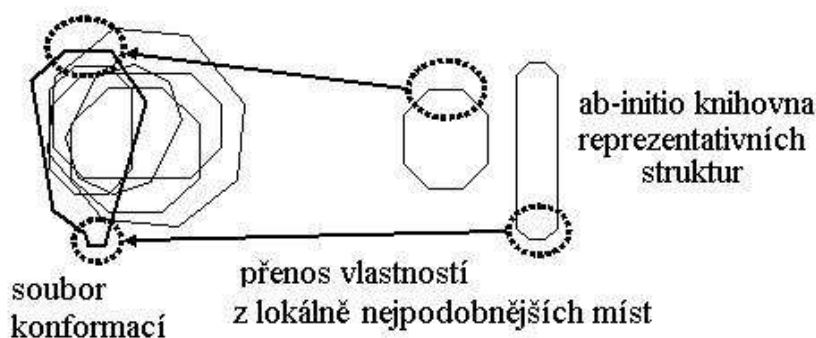
V případě tak velké molekuly, jako je cyklický hexapeptid, se metoda určování podobnosti ROA i Ramanova spektra na základě překryvu změřeného a simulovaného spektra místo přímého porovnávání vibračních módů ukazuje jako velice vhodná. Tímto způsobem je navíc možné ze spekter více konformerů získat nafitované spektrum, které je maximálně podobné spektru experimentálnímu. Zároveň tak získáme koeficienty rozkladu, které určují zastoupení konformací použitých k fitování.

Zatímco nafitované Ramanovo spektrum se pro oba použité intervaly vlnočtů  $400\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$  a  $800\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$  prakticky shoduje s průměrným spektrem, v případě ROA spekter přispělo fitování k lepší shodě s experimentem. Do určité míry je to způsobeno tím, že zatímco Ramanova spektra všech konformací jsou si dosti podobná, ROA spektra se díky tomu, že pásy mohou nabývat kladného i záporného znaménka, liší více. Bohužel roli hraje i horší poměr signál/šum ve změřeném ROA spektru a možná artificiální oblast okolo  $1000\text{ cm}^{-1}$ , což může výsledky poněkud zkreslit.

V případě Ramanových spekter vychází odchylka  $\delta$  a koeficient rozkladu  $b_i$  nejlépe pro konformaci A-4, u spekter ROA experimentálnímu spektru nejlépe odpovídá spektrum konformace A-6. Cyklický hexapeptid je flexibilní molekula, proto nemůže být jediná konformace dostačující k získání Ramanova i ROA spektra blízkého experimentu.

## 4.5 Výpočet pro tisíc konformací z MD

Pro lepší shodu vypočtených spekter s experimentem je nutné uvažovat mnohem více než deset konformerů. Bohužel náročnost *ab initio* výpočtů, zejména výpočtu ROA spekter, i s provedenými aproximacemi (viz kapitola 4.4) je natolik velká, že to není reálné. Možností, jak zkonstruovat spektra pro větší počet konformací, je přenos tenzorů molekulárních vlastností atom po atomu z 10 již spočítaných konformací na další konformace na základě lokální podobnosti okolí (základní myšlenka v Bouř a kol., 1997b, aplikace v Kaminský a kol., 2009). Tento přístup je schematicky znázorněn na obr. 4.17. Chceme-li porovnávat takto získané průměrné Ramanovo a ROA spektrum s experimentálními spektry, je nutné použít "škálovaná" silová pole.



**Obr. 4.17:** Přenos lokálních (atomových) tenzorů. Na základě lokální podobnosti jsou přenášeny vlastnosti z knihovny reprezentativních struktur na mnohem větší soubor geometrií.

Tenzory byly přeneseny z 10 fragmentů spočítaných *ab initio* (viz kapitola 4.4.3.2) na 1000 konformací vygenerovaných během 1 ns MD při 300 K po simulovaném zahřátí na 1000 K a ochlazení zpět na 300 K. Odpovídající průběh torzních úhlů v peptidové páteři cyklického hexapeptidu je zachycen na obr. 4.4 a torzních úhlů v postranních řetězcích na obr. 4.8. Na obr. 4.18 jsou srovnána průměrná ROA a Ramanova spektra získaná pro těchto 1000 konformací s průměrným spektrem 10 konformací získanými *ab initio* a s experimentálním spektrem. Pološířka vygenerovaných spekter byla nastavena na  $8 \text{ cm}^{-1}$ .

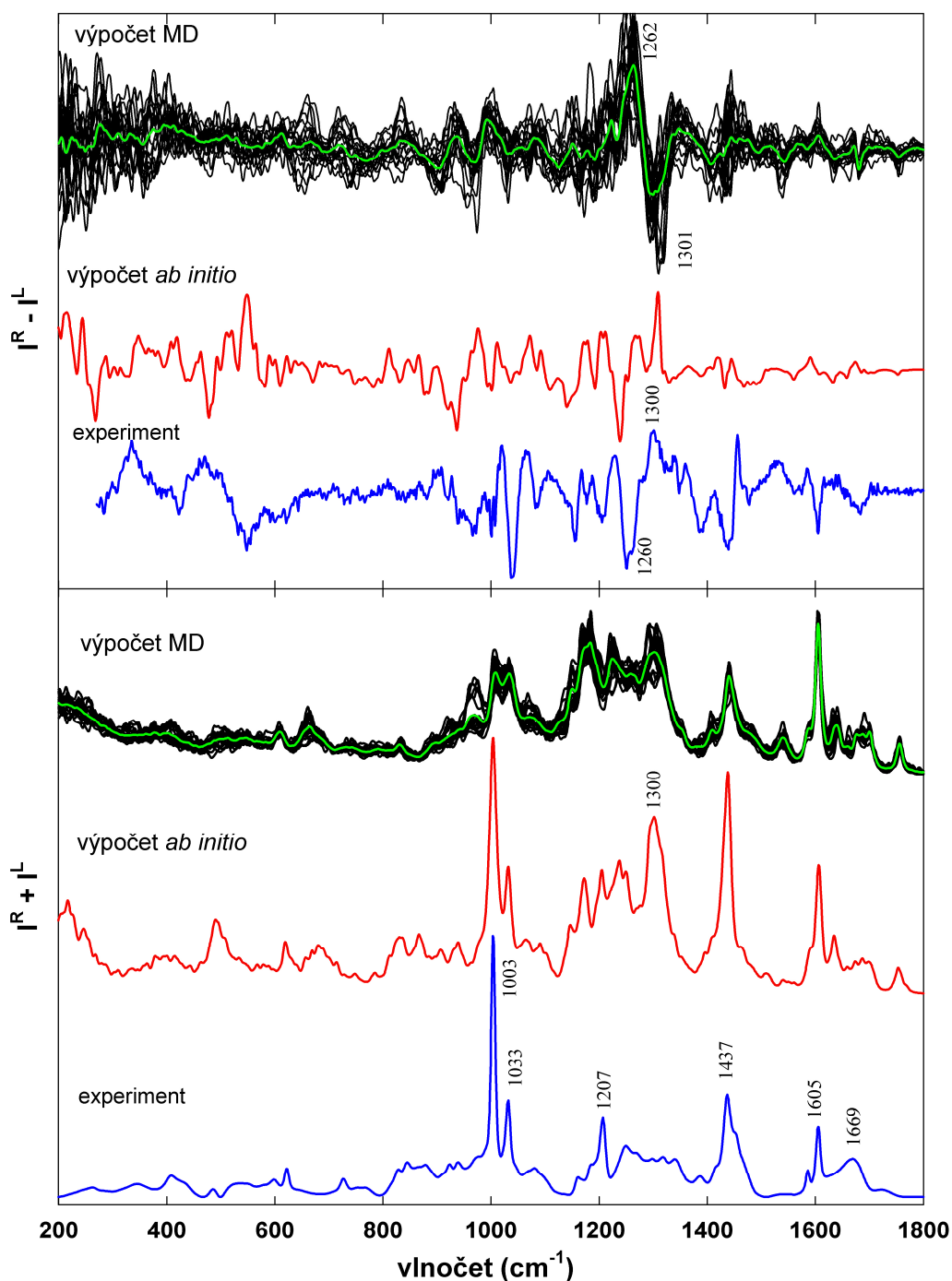
Nejvýraznější pásy v experimentálním Ramanově spektru: dýchací vibrace fenylalaninu  $\sim 1003 \text{ cm}^{-1}$  a přidružená vibrace fenylalaninu  $\sim 1033 \text{ cm}^{-1}$ , která je spojena s vibrací D-prolinu - jsou ve spektrech z MD znatelně rozšířené a mnohem

nižší než v experimentu. Navíc pás  $\sim 1003 \text{ cm}^{-1}$  se posunul na hodnotu  $\sim 1008 \text{ cm}^{-1}$ . Naproti tomu pás  $\sim 1605 \text{ cm}^{-1}$  odpovídající také vibracím fenylyalaninu zůstává úzký a je podstatně vyšší, než by odpovídalo experimentu. Lépe než v průměrném spektru 10 konformací je v MD vystižen samostatný pás  $\sim 1437 \text{ cm}^{-1}$ , který je v experimentálním spektru méně intenzivní. Intenzita pásů Ramanova spektra je ve výpočtech zejména v oblasti  $1200\text{-}1350 \text{ cm}^{-1}$  přeceněna, což je vyvoláno tím, že k tomuto jevu došlo již pro 10 výchozích konformací A-1 až A-10 uvedených na obr. 4.12. V okolí  $950 \text{ cm}^{-1}$  se na rozdíl od průměrného spektra 10 konformací nově objevuje intenzivní pás, který neodpovídá experimentu. To může být způsobeno tím, že v 10 konformacích spočítaných *ab initio* se některé hodnoty úhlů, které se vyskytly během MD, neobjevují. Např. úhel  $\psi_2$  nabývá v první 0,3 ns MD hodnoty okolo  $-115^\circ$ , zatímco pro všech 10 výchozích konformací je hodnota  $\psi_2 \sim 20^\circ$  (srovnej obr. 4.4 a tab. 4.3).

Průměrné ROA spektrum z MD se od průměru výchozích konformací liší mnohem více, než je tomu v případě Ramanových spekter. Patrný je téměř nulový signál v celé oblasti  $200\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$ . Na obr. 4.18, kde je přes sebe zakresleno 20 ROA spekter z MD, z nichž každé je již průměrem 50 vypočtených konformací, se objevují pásy opačného znaménka, které se ve výsledném spektru prakticky vyruší. V průměrném ROA spektru z MD je dominantní kladný pás  $\sim 1262 \text{ cm}^{-1}$  a záporný pás  $\sim 1301 \text{ cm}^{-1}$ . Bohužel v experimentálním spektru je tomu naopak, pozorujeme v něm záporný pás  $\sim 1260 \text{ cm}^{-1}$  a kladný pás  $\sim 1300 \text{ cm}^{-1}$ . Tento spektrální rys je alespoň částečně vystižen v průměrném spektru 10 konformací.

Použitý přístup přenosu tenzorů molekulárních vlastností z lokálně podobných míst na 1000 konformací vygenerovaných během MD nevedl v případě cyklického hexapeptidu k uspokoujícímu výsledku. Simulované ROA spektrum nevykazuje rysy podobné experimentálnímu spektru a shoda Ramanova spektra se spektrem experimentálním je ve srovnání s průměrem 10 reprezentativních struktur, které byly spočteny *ab initio*, horší. V některých oblastech vlnočtů ( $< 800 \text{ cm}^{-1}$ ) však mají MD spektra nižší intenzitu, která lépe odpovídá experimentálnímu spektru. Obecně se ale zdá, že molekula je méně flexibilní, než předpovídá silové pole Amber95. Je také možné, že molekula flexibilní je, ale relativní MD energie jednotlivých konformerů nejsou správné. Samotný přenos tenzorů také může generovat chyby, zejména v případě, kdy se MD a *ab initio* struktury výrazně liší.





**Obr. 4.18:** Dole Ramanova, nahoře ROA spektra cyklického hexapeptidu. Modře experiment, červeně "škálovaný" průměr 10 konformací A-1 až A-10 vypočtených kombinací silového pole spočteného na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O) a tenzorů optické aktivity na úrovni HF/6-31G/CPCM(H<sub>2</sub>O). Černě 20 Ramanových a ROA spekter, z nichž každé je již průměrem 50 vypočtených konformací vygenerovaných pomocí přenosu tenzorů z lokálně podobných míst během molekulové dynamiky s použitím knihovny 10 reprezentativních struktur a zeleně průměr všech 1000 konformací.

## 5. Modelový fragment Phe-D-Pro

Dále jsme se zaměřili na menší část cyklického hexapeptidu, pro kterou je výpočet Ramanových a zejména ROA spekter možný na lepší úrovni. Ramanovu spektru dominují pásy fenylalaninu - zejména jeho dýchací vibrace  $\sim 1003 \text{ cm}^{-1}$  a přidružená dýchací vibrace  $\sim 1033 \text{ cm}^{-1}$ . Fenylalanin je ve výpočtech doplněn D-prolinem, který s ním v řetězci cyklického hexapeptidu sousedí. Prolin byl již studován samostatně, Kapitán a kol. (2006c), i v dipeptidech s glycinem a alaninem, Buděšínský a kol. (2008b). Prolin jako jediná přirozená aminokyselina obsahuje sekundární amid a umožňuje vznik přibližně stejně stabilních konformací *cis* ( $\omega = 0^\circ$ ) a *trans* ( $\omega = 180^\circ$ ) peptidové vazby (viz obr. 1.2).

Jiná zajímavá sekvence D-Pro-Gly, u které je známa náchylnost ke tvorbě smyčky, již byla studována v Buděšínský a kol. (2008a).

### 5.1 Výpočetní část

#### 5.1.1 Výpočet ROA spekter pro vybrané konformace

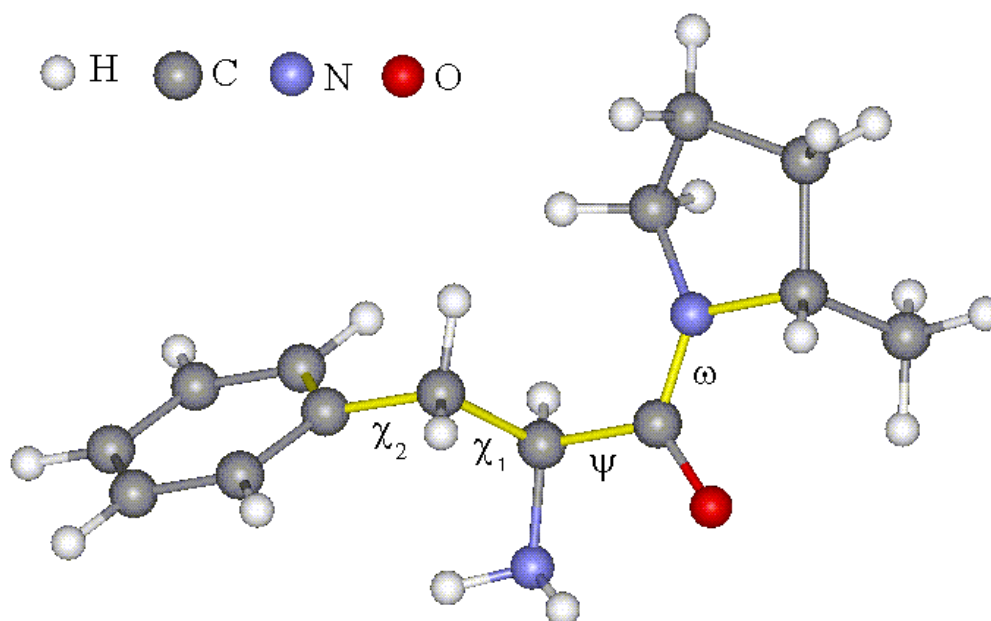
Pro první výpočty (když jsme ještě nevěděli, že bude možné vzorek dipeptidu zakoupit a změřit) jsme použili modifikovaný Phe-D-Pro obsahující na svých koncích aminoskupinu  $\text{NH}_2$  a místo karboxylové skupiny methylovou skupinu  $\text{CH}_3$ , která lépe simuluje zbytek cyklického hexapeptidu. Vzhledem ke značné flexibilitě molekuly dipeptidu nelze provést výpočty pro všechny možné konformace. Proto byly vybrány 4 torzní úhly, jejichž byly hodnoty nastaveny a během optimalizace zafixovány, zatímco všechny ostatní souřadnice byly optimalizovány. Značení úhlů, které odpovídá standardnímu značení úhlů v peptidovém řetězci popsanému v kapitole 1.1.2, je uvedeno na obr. 5.1. Hodnoty úhlů byly nastaveny takto:

$$\omega = 0^\circ \text{ a } 180^\circ,$$

$$\psi = -60^\circ, 60^\circ \text{ a } 180^\circ,$$

$$\chi_1 = -60^\circ, 60^\circ \text{ a } 180^\circ,$$

$$\chi_2 = -60^\circ, 60^\circ \text{ a } 180^\circ.$$



**Obr. 5.1:** Modifikovaný fragment Phe-D-Pro používaný pro výpočty se zvýrazněnými torzními úhly. Hodnoty torzních úhlů pro všechny vygenerované konformace jsou uvedeny v tab. 5.1.

Celkem jsme pro 4 vybrané torzní úhly získali 54 možných kombinací. Byly vytvořeny 2 sady lišící se zkrabčením prolinového kruhu (viz obr. 1.12), čímž se počet uvažovaných konformací Phe-D-Pro zvýšil na 108. Podle prací Kapitána a kol. (2006c) a (2006d), je zastoupení dvou základních konformací prolinu S a N v roztoku jako podvojného iontu i v polyprolinovém řetězci přibližně stejné. V dipeptidech, jak ukazuje např. práce Buděšínský a kol. (2008b), však nemusí být obě konformace prolinu zastoupeny rovnoměrně.

Pro modelování rozpouštědla jsme použili model CPCM implementovaný v Gaussianu. Pro lepší konvergenci geometrie byla použita volba radii = uff, při které je dutina vytvořena tak, že atomy vodíku mají svoji vlastní sféru (viz kapitola 2.4.1). V tab. 5.1 jsou vypsány hodnoty 4 fixovaných torzních úhlů všech konformací společně s hodnotami relativních energií po optimalizaci. Relativní energie jsou vztaheny k minimální energii -730,21403963 hartree, která byla dosažena pro konformaci S19, a přepočítány na kcal/mol (1 hartree = 627,51 kcal/mol). Při určité kombinaci torzních úhlů vznikla nereálná geometrie, což se např. projevilo tím, že optimalizace nezkonvergovala; příslušné konformace jsou v tab. 5.1 označeny hvězdičkou (\*). V některých případech však bylo alespoň možné vybrat dostatečně realistickou konformaci s malou energií (uvedena v tab. 5.1) a dostatečně nízkým gradientem.

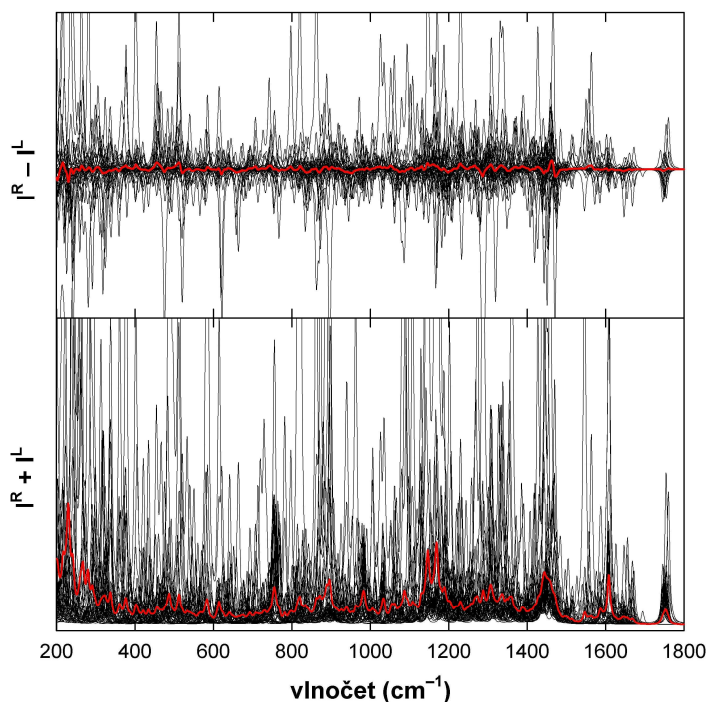
	Torzní úhly				ΔE (kcal/mol)		
	ω (°)	ψ (°)	χ <sub>1</sub> (°)	χ <sub>2</sub> (°)	Sada S	Sada N	Průměr S a N
<b>1</b>	<b>180</b>	<b>-60</b>	<b>180</b>	<b>-60</b>	<b>1,4 *</b>	<b>2,8</b>	<b>2,1*</b>
<b>2</b>	<b>180</b>	<b>-60</b>	<b>180</b>	<b>60</b>	<b>3,6 *</b>	<b>4,7</b>	<b>4,2*</b>
<b>3</b>	<b>180</b>	<b>-60</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>3,0</b>	<b>4,5</b>	<b>3,8</b>
<b>4</b>	<b>180</b>	<b>-60</b>	<b>-60</b>	<b>-60</b>	<b>2,8</b>	<b>4,3</b>	<b>3,6</b>
<b>5</b>	<b>180</b>	<b>-60</b>	<b>-60</b>	<b>60</b>	<b>3,1</b>	<b>4,6</b>	<b>3,9</b>
<b>6</b>	<b>180</b>	<b>-60</b>	<b>-60</b>	<b>180</b>	<b>2,7</b>	<b>4,5</b>	<b>3,6</b>
7	180	-60	60	-60	11,9	28	20,0
8	180	-60	60	60	9,7*	10,1	9,9
9	180	-60	60	180	37,9	34,8	36,4
<b>10</b>	<b>180</b>	<b>60</b>	<b>180</b>	<b>-60</b>	<b>3,9</b>	<b>4,0</b>	<b>4,0</b>
11	180	60	180	60	5,6 *	5,6 *	5,6*
12	180	60	180	180	6,6	5,1	5,9
13	180	60	-60	-60	*	10,7	*
14	180	60	-60	60	12,4	12,6	12,5
15	180	60	-60	180	*	21,8	*
16	180	60	60	-60	5,2	5,5	5,4
<b>17</b>	<b>180</b>	<b>60</b>	<b>60</b>	<b>60</b>	<b>4,2</b>	<b>4,3</b>	<b>4,3</b>
18	180	60	60	180	5,5	5,2	5,4
<b>19</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>-60</b>	<b>0,0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>
<b>20</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>60</b>	<b>1,7</b>	<b>1,6</b>	<b>1,7</b>
<b>21</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>3,2</b>	<b>3,3</b>	<b>3,3</b>
<b>22</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>-60</b>	<b>-60</b>	<b>3,8 *</b>	<b>5,1 *</b>	<b>4,5*</b>
23	180	180	-60	60	5,9	5,8	5,9
<b>24</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>-60</b>	<b>180</b>	<b>5,0</b>	<b>4,8</b>	<b>4,9</b>
25	180	180	60	-60	4,3	4,6	4,5
<b>26</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>60</b>	<b>60</b>	<b>1,3</b>	<b>1,4</b>	<b>1,4</b>
<b>27</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>60</b>	<b>180</b>	<b>3,0</b>	<b>3,2</b>	<b>3,1</b>
<b>28</b>	<b>0</b>	<b>-60</b>	<b>180</b>	<b>-60</b>	<b>2,9</b>	<b>2,9</b>	<b>2,9</b>
29	0	-60	180	60	6,2	6,2	6,2
30	0	-60	180	180	*	6,3 *	*
31	0	-60	-60	-60	7,1	7,1 *	7,1*
<b>32</b>	<b>0</b>	<b>-60</b>	<b>-60</b>	<b>60</b>	<b>3,6</b>	<b>5,2</b>	<b>4,4</b>
<b>33</b>	<b>0</b>	<b>-60</b>	<b>-60</b>	<b>180</b>	<b>3,9</b>	<b>5,5</b>	<b>4,7</b>
34	0	-60	60	-60	*	*	*
35	0	-60	60	60	79,9	*	*
36	0	-60	60	180	*	*	*
37	0	60	180	-60	6,2	7,8	7,0
38	0	60	180	60	8,1	*	*
39	0	60	180	180	10,0 *	10,4	10,2*
40	0	60	-60	-60	13,9	16,0	15,0
41	0	60	-60	60	*	*	*
42	0	60	-60	180	53,7	*	*
43	0	60	60	-60	6,8	*	*
44	0	60	60	60	5,9	7,6	6,8
45	0	60	60	180	6,7	*	*
<b>46</b>	<b>0</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>-60</b>	<b>0,7</b>	<b>1,9</b>	<b>1,3</b>
<b>47</b>	<b>0</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>60</b>	<b>2,6</b>	<b>3,5</b>	<b>3,1</b>

	Torzní úhly				$\Delta E$ (kcal/mol)		
	$\omega$ ( $^\circ$ )	$\psi$ ( $^\circ$ )	$\chi_1$ ( $^\circ$ )	$\chi_2$ ( $^\circ$ )	Sada S	Sada N	Průměr S a N
<b>48</b>	<b>0</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>4,1</b>	<b>5,1</b>	<b>4,6</b>
<b>49</b>	<b>0</b>	<b>180</b>	<b>-60</b>	<b>-60</b>	<b>4,4</b>	<b>5,3</b>	<b>4,9</b>
50	0	180	-60	60	6,5	7,5	7,0
51	0	180	-60	180	5,6	6,5	6,1
52	0	180	60	-60	*	6,5	*
<b>53</b>	<b>0</b>	<b>180</b>	<b>60</b>	<b>60</b>	<b>2,2</b>	<b>3,3</b>	<b>2,8</b>
<b>54</b>	<b>0</b>	<b>180</b>	<b>60</b>	<b>180</b>	<b>3,8</b>	<b>4,9</b>	<b>4,4</b>

\* optimalizace zcela nezkonvergovala

**Tab. 5.1:** Hodnoty 4 fixovaných torzních úhlů a relativních energií po optimalizaci (úroveň BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O) + volba radii = uff) pro 108 konformací modifikovaného Phe-D-Pro. Výsledky jsou rozděleny na dvě sady lišící se zkrabčením prolinového kruhu (S, N). Absolutní energie nejlepší konformace S19 (vyznačené červeně) je -730,21403963 hartree. Tučně jsou zvýrazněny energeticky nejvýhodnější konformace použité dále pro výpočet ROA a Ramanových spekter.

Po optimalizaci bylo vybráno 25 dvojic energeticky nejvýhodnějších konformací (s prolinem v S a N konformaci). Jako horní hranice byla uvažována relativní energie 5 kcal/mol, v tab. 5.1 jsou příslušné konformace vyznačeny tučně. Pro tyto konformace byla spočítána ROA spektra na stejné úrovni, jako proběhla optimalizace (BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O) + volba radii = uff). Příslušná spektra jsou na obr. 5.2. Ve velké části spekter se objevuje jeden nebo více výrazně intenzivnějších pásů. Extrémní hodnoty přičítáme chybě výpočtu (numerická nestabilita programu Gaussian). Tato spektra proto nebylo možné dále zpracovat.



**Obr. 5.2:** ROA a Ramanova spektra 50 vybraných konformací fragmentu Phe-D-Pro vypočtená na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O) + radii = uff. Červeně je vyznačeno průměrné spektrum.

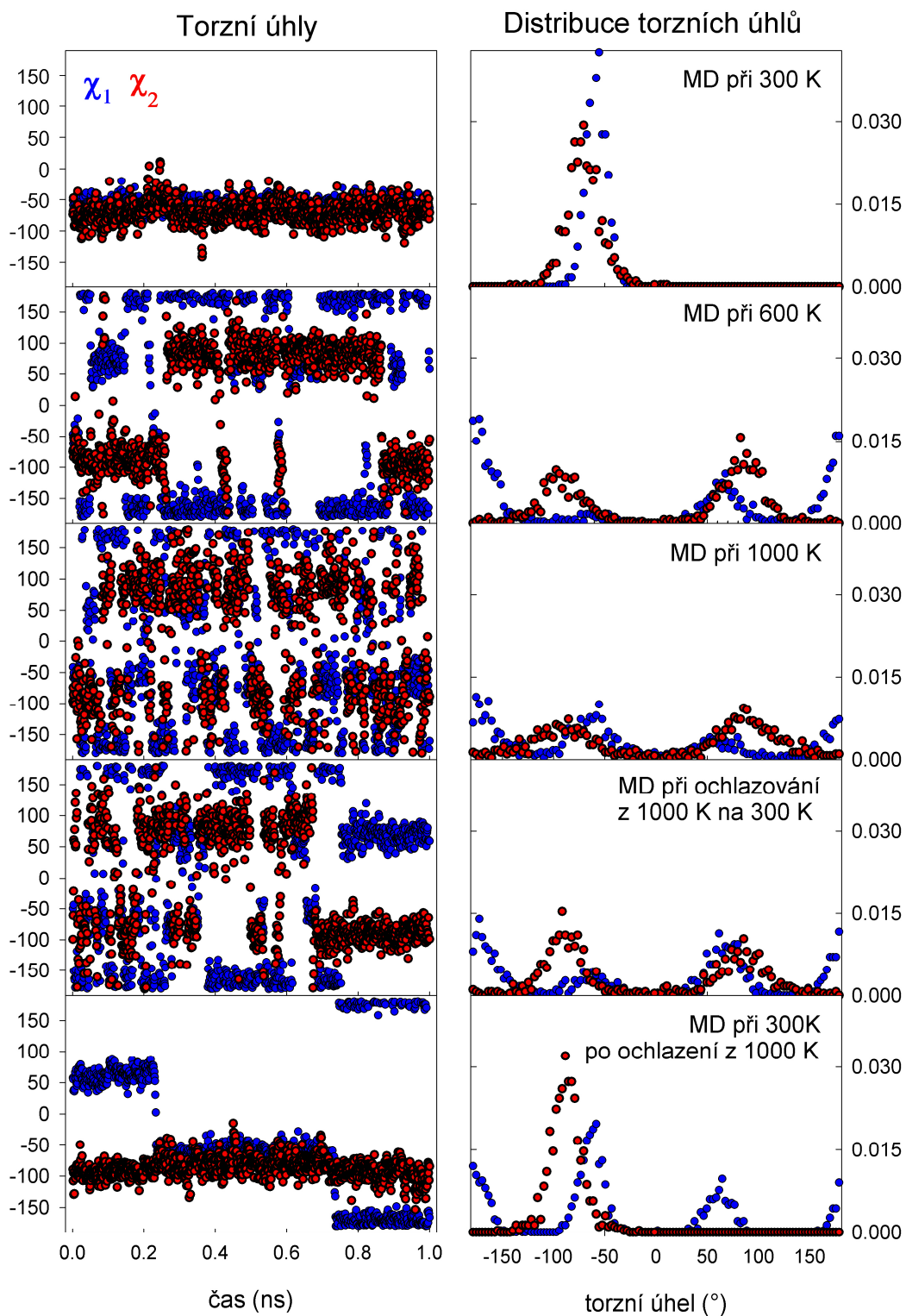
### 5.1.1.1 Redukce počtu konformací

Při zpracovávání vývoje hodnot torzních úhlů v postranních řetězcích cyklického hexapeptidu (kapitola 4.3) jsme zjistili, že zatímco pro úhel  $\chi_1$  v postranním řetězci fenylaninu je jeho zafixování při optimalizaci na hodnotách  $-60^\circ$ ,  $60^\circ$  a  $180^\circ$  v pořádku, pro úhel  $\chi_2$  původně použitá standardní volba  $-60^\circ$ ,  $60^\circ$ ,  $180^\circ$  není nejvhodnější. Vývoj tohoto torzního úhlu pro provedené MD cyklického hexapeptidu je graficky znázorněn na obr. 5.3 a preferované hodnoty jsou shrnuty v tab. 5.2. Výsledky MD provedené při 300 K, neukazující na preferenci několika hodnot úhlu  $\chi_1$ , nejsou úplně spolehlivé, jak bylo ukázáno v kapitole 4.3. Všechny ostatní MD trajektorie předpovídají hodnoty  $\chi_1 = -60^\circ$ ,  $60^\circ$  a  $180^\circ (\pm 5^\circ)$  a  $\chi_2 = \pm 90^\circ (\pm 5^\circ)$ .

MD trajektorie	Preferovaná hodnota torzního úhlu		
	$\chi_1(^\circ)$		$\chi_2(^\circ)$
1 ns molekulová dynamika při 300 K	-60	-	108
1 ns molekulová dynamika při 600 K	-60	64 184	90 a -95
1 ns molekulová dynamika při 1000 K	-63	60 185	90 a -90
1 ns molekulová dynamika při ochlazování z 300 K na 1000 K	-60	70 185	90 a -95
1 ns molekulová dynamika při 300 K po simulovaném zahřátí na 1000 K	-63	65 180	90

**Tab. 5.2:** Hodnoty úhlů  $\chi_1$  a  $\chi_2$ , které byly preferovány při různých MD trajektoriích celého cyklického hexapeptidu.

Pro ověření, že torzní úhly  $\chi_1$  a  $\chi_2$  v postranním řetězci fenylaninu se v modifikovaném fragmentu Phe-D-Pro chovají stejně jako v celém cyklickém hexapeptidu, byly vybrány tři konformace s nejmenší energií (S19, S20 a S21) lišící se hodnotou úhlu  $\chi_2$ . K této trojici konformací byla přidána konformace s úhlem  $\chi_2 = 90^\circ$  dále značená jako S90 a pro tuto čtveřici byla provedena optimalizace i bez zafixování torzních úhlů. Výsledné hodnoty torzních úhlů jsou shrnuty v tab. 5.3. Při nezafixování torzních úhlů došlo k relaxaci úhlu  $\chi_2$  na hodnotu blízkou  $90^\circ$  nebo  $-90^\circ$ . Úhel  $\chi_2$  by tedy měl být správně nastaven na  $90^\circ$  (vzhledem k symetrii šestičlenného kruhu fenylalaninu je možné dále uvažovat pouze kladnou hodnotu), čímž se počet uvažovaných konformací zredukuje ze 108 na 36.



**Obr. 5.3:** Průběh hodnot torzňí úhlů v postranním řetězci fenylalaninu  $\chi_1$  (modře) a  $\chi_2$  (červeně) a jejich distribuce při různých MD trajektoriích celého cyklického hexapeptidu.

Torzní úhly po optimalizaci pro konformace	S volbou radii = uff				
	$\omega$ (°)	$\psi$ (°)	$\chi_1$ (°)	$\chi_2$ (°)	$\Delta E$ (kcal/mol)
fixované úhly	180	180	180	-60	1,76
S19 bez fixace	179	-156	176	-87	0,06
fixované úhly	180	180	180	60	3,39
<b>S20 bez fixace</b>	<b>180</b>	<b>-156</b>	<b>176</b>	<b>92</b>	<b>0,00</b>
fixované úhly	180	180	180	180	4,89
S21 bez fixace	-180	-154	177	94	0,07
fixované úhly	180	180	180	90	1,26
S90 bez fixace	-180	-158	176	-86	0,09

**Tab. 5.3:** Hodnoty torzních úhlů  $\omega$ ,  $\psi$ ,  $\chi_1$ , a  $\chi_2$  a energie po optimalizaci na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O) + radii = uff s jejich fixováním a bez fixování pro vybranou čtveřici konformací modifikovaného fragmentu Phe-D-Pro. Relativní energie jsou vztaženy k minimální energii dosažené pro červeně vyznačenou konformaci S20 bez zafixování torzních úhlů (-730,21676018 hartree).

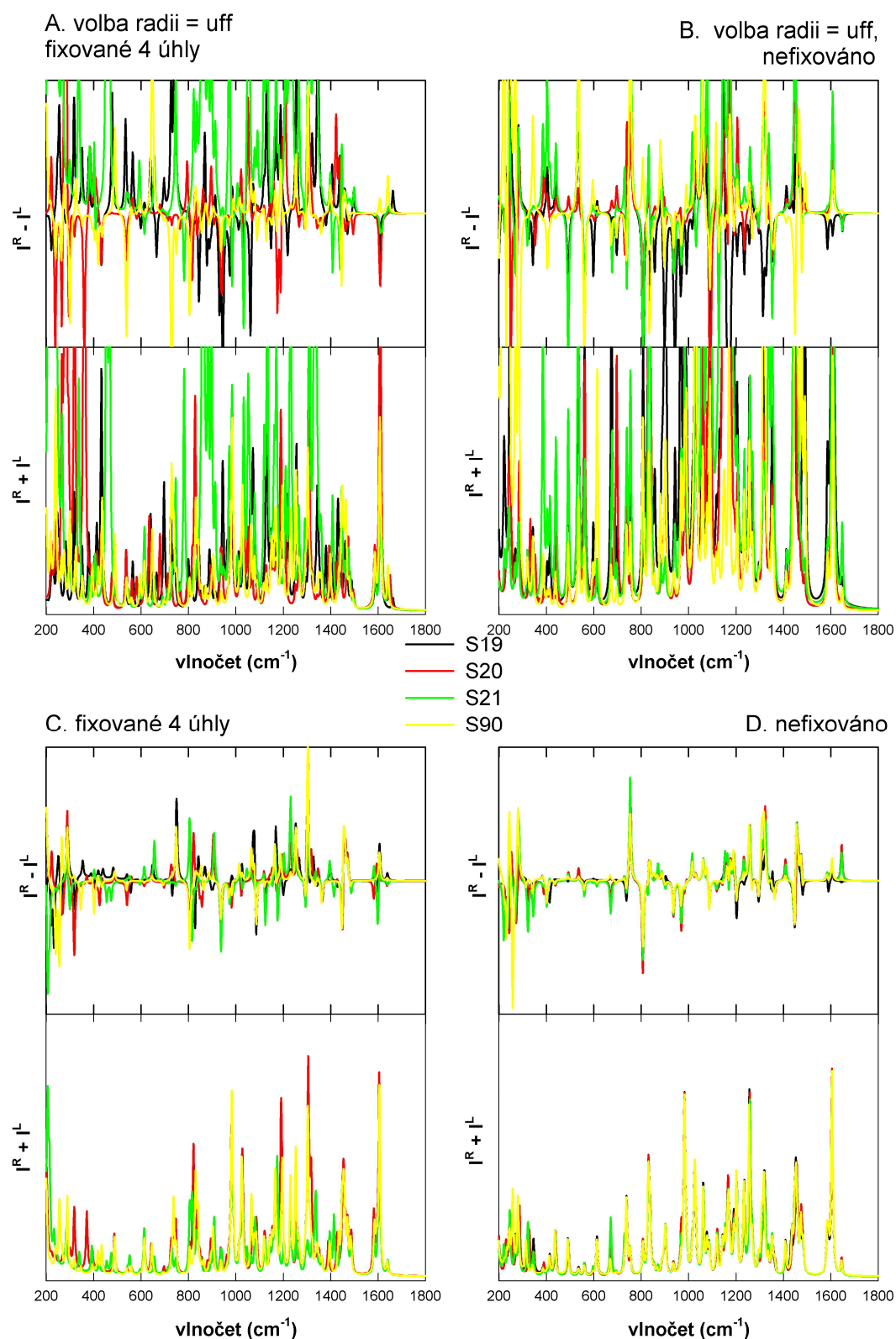
### 5.1.1.2 Numerické nestability v programu Gaussian

Pro čtyři konformace uvedené v tabulce 5.3 jsou na obr. 5.4 znázorněna spektra získaná při výpočtu ROA spekter na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O) + radii = uff. Tentýž výpočet byl pro stejné čtyři výchozí konformace s fixovanými torzními úhly i bez fixace proveden bez zadání volby radii = uff. Hodnoty torzních úhlů po optimalizaci jsou shrnuty v tab. 5.4 a spektra vypočtená na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O) jsou znázorněna také na obr. 5.4.

Torzní úhly po optimalizaci pro konformace	$\omega$ (°)	$\psi$ (°)	$\chi_1$ (°)	$\chi_2$ (°)	$\Delta E$ (kcal/mol)
fixované úhly	180	180	180	-60	1.42
S19 bez fixace	179	-160	177	-86	0.03
fixované úhly	180	180	180	60	3.19
<b>S20 bez fixace</b>	<b>180</b>	<b>-159</b>	<b>177</b>	<b>93</b>	<b>0.00</b>
fixované úhly	180	180	180	180	4.92
S21 bez fixace	179	-159	177	95	0.02
fixované úhly	180	180	180	90	0.98
S90 bez fixace	180	-160	177	-85	0.07

**Tab. 5.4:** Hodnoty torzních úhlů  $\omega$ ,  $\psi$ ,  $\chi_1$ , a  $\chi_2$  a energie po optimalizaci BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O) s jejich fixováním a bez fixování pro vybranou čtveřici konformací modifikovaného fragmentu Phe-D-Pro. Relativní energie jsou vztaženy k minimální energii dosažené pro červeně vyznačenou konformaci S20 bez zafixování torzních úhlů (-730,22048143 hartree).





**Obr. 5.4:** ROA ( $I^R - I^L$ ) a Ramanova ( $I^R + I^L$ ) spektra pro čtyři konformace modifikovaného fragmentu Phe-D-Pro lišící se před optimalizací úhlem  $\chi_2$ . Srovnání spekter získaných při výpočtu ROA spekter na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM( $\text{H}_2\text{O}$ ) s fixováním (A a C) a bez fixování torzních úhlů (B a D), s volbou radii = uff (A a B) a bez ní (C a D).

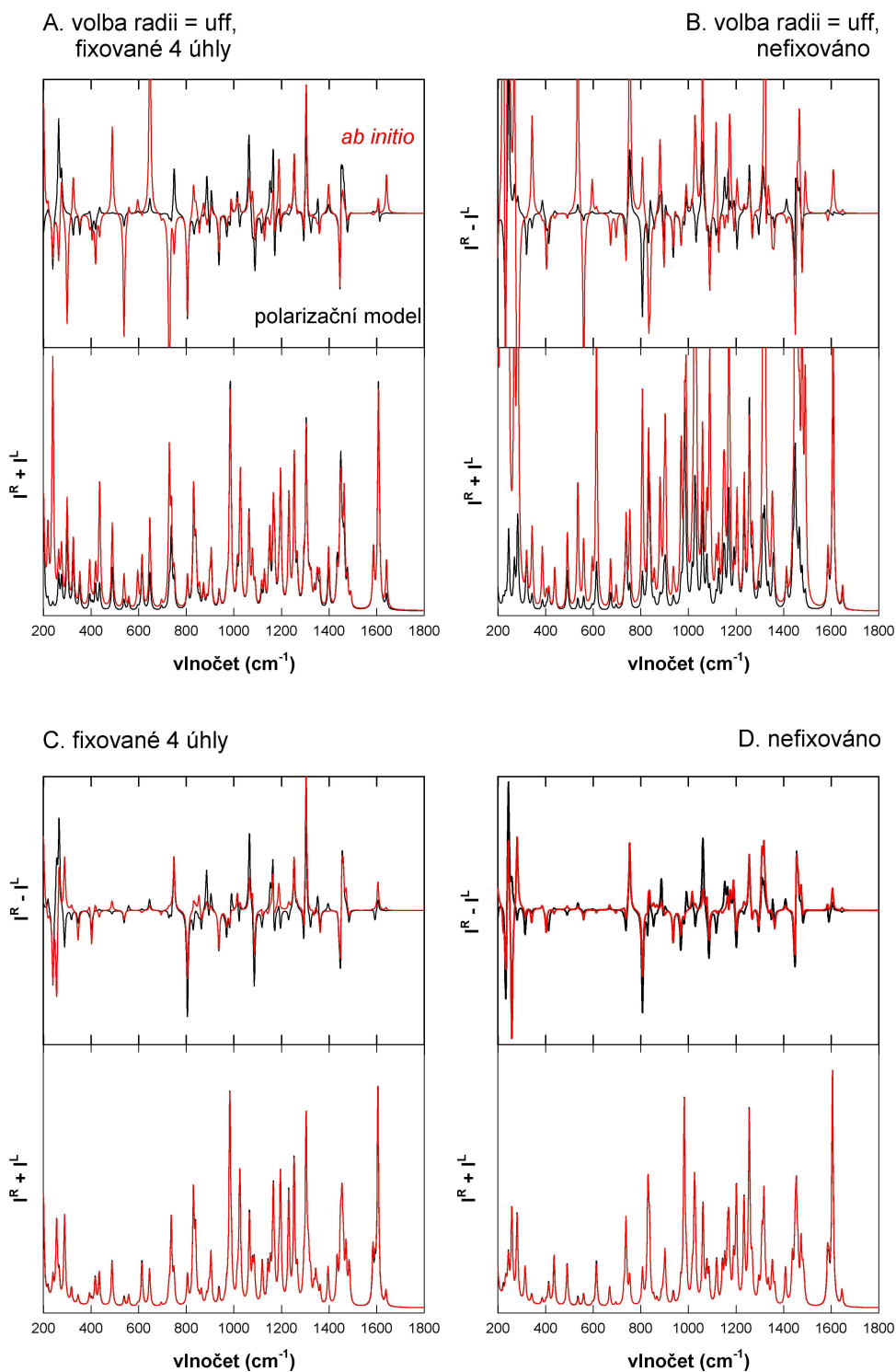
Absolutní hodnoty energie spočítané při výpočtu s volbou a bez volby radii = uff nejsou vzájemně porovnatelné. Je však v pořádku, že pořadí konformací podle relativních energií je v obou případech shodné (tab. 5.3 a 5.4). Srovnáním spekter na obr. 5.4, která by měla být zvláště pro nefixované torzní úhly v podstatě stejná pro všechny čtyři konformace (jejich geometrie je prakticky totožná), docházíme k závěru, že v programu Gaussian zřejmě dochází při výpočtu ROA spekter k numerickým nestabilitám, je-li zadána volba radii = uff.

### 5.1.1.3 Polarizační model

Dále jsme pro energeticky nejvýhodnější konformaci S90 porovnali ROA spektra vypočtená *ab initio* se spektry získanými v polarizačním modelu z Ramanových polarizovatelností. Bylo také provedeno srovnání Ramanových a ROA spekter pro různé způsoby výpočtu – s fixováním a bez fixování torzních úhlů, s volbou radii = uff i bez ní. Výsledná spektra jsou znázorněna na obr. 5.5.

ROA spektra vypočtená *ab initio* a polarizačním modelem z Ramanových polarizovatelností jsou si v případě, že nebyla zadána volba radii = uff, velmi blízká, zatímco pro volbu radii = uff se tato spektra liší - v ROA spektrech spočtených *ab initio* se objevuje několik výrazně intenzivnějších pásů. Podobně je tomu i pro Ramanova spektra.

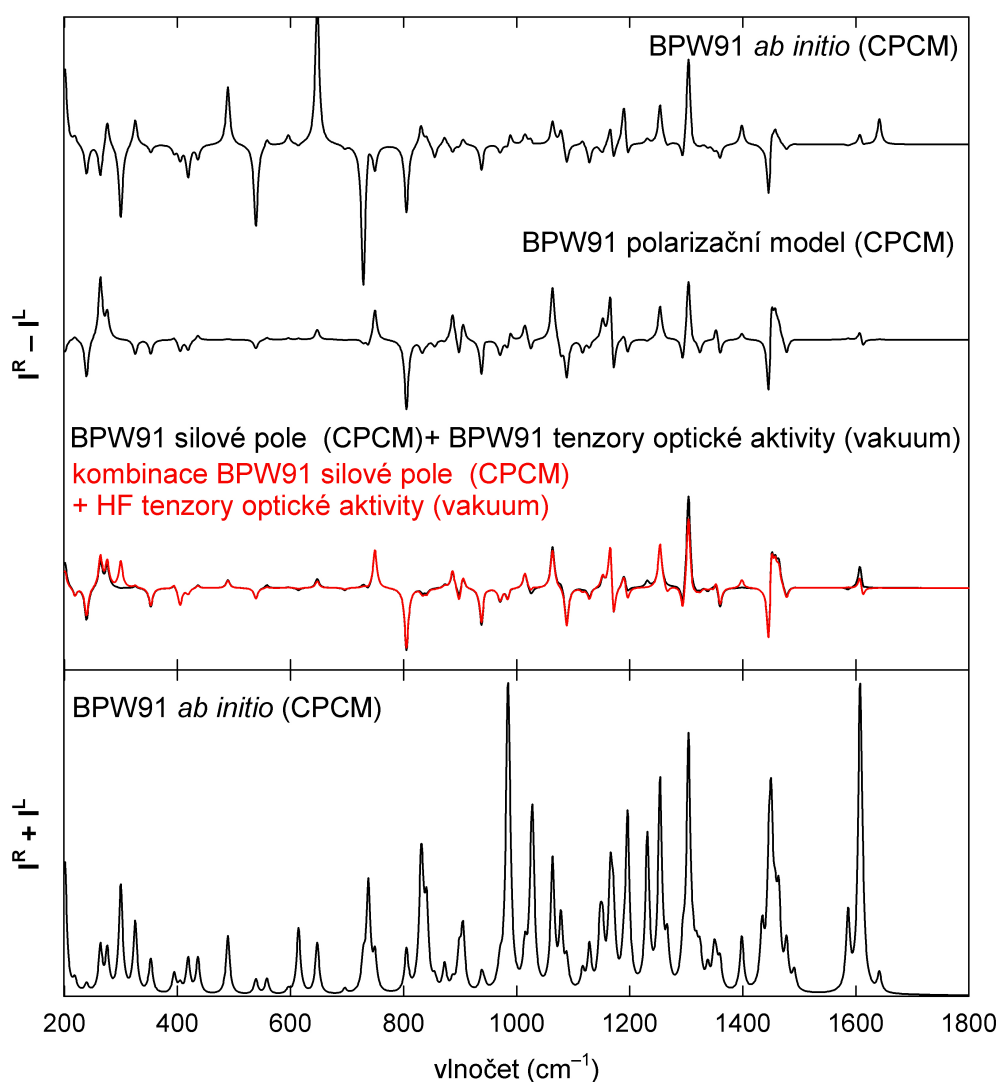
Je tedy možné učinit závěr, že za objevení výrazně intenzivnějších pásů při *ab initio* výpočtu ROA spekter (viz obr. 5.4), je zodpovědná volba radii = uff, pro kterou není výpočet v programu Gaussian stabilní.



**Obr. 5.5:** ROA ( $I^R-I^L$ ) a Ramanova ( $I^R+I^L$ ) spektra modifikovaného fragmentu Phe-D-Pro, pro konformaci s nejnižší energií (S90) spočtená na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O). Srovnání spekter získaných *ab initio* a polarizačním modelem s fixovanými (A a C) a nefixovými torzními úhly (B a D), s volbou radii = uff (A a B) a bez ní (C a D).

### 5.1.1.4 Kombinovaný výpočet ROA spekter

V případě, že chceme kvůli lepší konvergenci zachovat optimalizaci s volbou radii = uff, kterou však nelze použít pro ROA, je možné zkombinovat molekulární tenzory. Silová pole získaná při výpočtu Ramanových spekter na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O) + volba radii = uff zkombinujeme s ROA tenzory spočítanými ve vakuu. Výpočet ROA není nutné provádět na úrovni BPW91/6-31G\*\*, ale postačuje úroveň HF/6-31G dávající podle obr. 5.6 prakticky stejný výsledek.



**Obr. 5.6:** Dole Ramanovo spektrum spočtené na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O) + volba radii = uff, pro konformaci modifikovaného fragmentu Phe-D-Pro s nejnižší energií S90 se 4 fixovanými torzními úhly. Nahoře ROA spektra získaná *ab initio* a polarizačním modelem na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O) + volba radii = uff a spektra získaná kombinací silového pole BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O) + volba radii = uff s tenzory optické aktivity spočítanými na úrovni BPW91/6-31G\*\* a HF/6-31G.

Na základě těchto zjištění (nevhodné fixování úhlu  $\chi_2$ , nestabilita programu Gaussian) jsme provedli výpočet ROA spekter pro 36 nově vytvořených konformací modifikovaného fragmentu Phe-D-Pro. Jsou opět rozděleny na dvě sady lišící se zkrabacím prolinového kruhu, značené jako S' a N' (čárkovány kvůli odlišení od 108 konformací uvedených v kapitole 5.1.1). Hodnota úhlu  $\chi_2$  byla nastavena na 90°; během optimalizace nebyl tento úhel fixován. Hodnoty úhlů  $\omega$ ,  $\psi$  a  $\chi_1$  byly nastaveny jako v kapitole 5.2.1. Úhly  $\omega$  a  $\chi_1$  byly fixovány, zatímco úhel  $\psi$  jsme nefixovali, protože energie při zafixovaném úhlu jsou příliš vysoké. V tab. 5.5 jsou uvedeny hodnoty torzních úhlů všech konformací společně s hodnotami relativních energií po optimalizaci.

	Torzní úhly před optimalizací			Po optimalizaci				
				$\psi_{opt}$ (°)		$\Delta E$ (kcal/mol)		
	$\omega$ (°)	$\psi$ (°)	$\chi_1$ (°)	Sada S'	Sada N'	Sada S'	Sada N'	Průměr
<b>1</b>	<b>180</b>	<b>-60</b>	<b>180</b>	<b>-97</b>	<b>-96</b>	<b>0,0</b>	<b>0,3*</b>	<b>0,2*</b>
<b>2</b>	<b>180</b>	<b>-60</b>	<b>-60</b>	<b>-87</b>	<b>-90</b>	<b>1,7 *</b>	<b>2,1</b>	<b>1,9*</b>
<b>3</b>	<b>180</b>	<b>-60</b>	<b>60</b>	<b>-116</b>	<b>-114</b>	<b>0,7</b>	<b>1,1</b>	<b>0,9</b>
4	180	60	180	81	58	4,6	5,8	5,2
5	180	60	-60	104	105	6,0	6,8	6,4
6	180	60	60	77	61	5,0	6,0	5,5
<b>7</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>-157</b>	<b>-171</b>	<b>0,5</b>	<b>1,3</b>	<b>0,9</b>
8	180	180	-60	-158	169	4,4	5,0	4,7
<b>9</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>60</b>	<b>-117</b>	<b>-159</b>	<b>0,8</b>	<b>3,8 *</b>	<b>2,3</b>
<b>10</b>	<b>0</b>	<b>-60</b>	<b>180</b>	<b>-116</b>	<b>-113</b>	<b>0,6</b>	<b>0,7 *</b>	<b>0,7*</b>
<b>11</b>	<b>0</b>	<b>-60</b>	<b>-60</b>	<b>-103</b>	<b>-104</b>	<b>3,1</b>	<b>3,1 *</b>	<b>3,1*</b>
12	0	-60	60	-65	-62	*	*	*
13	0	60	180	85	84	5,6	7,1	6,4
14	0	60	-60	103	105	6,8	8,6	7,7
15	0	60	60	80	81	6,1	7,8	7,0
<b>16</b>	<b>0</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>-147</b>	<b>-129</b>	<b>0,8</b>	<b>1,6</b>	<b>1,2</b>
17	0	180	-60	-150	174	4,7 *	6,4	5,6*
<b>18</b>	<b>0</b>	<b>180</b>	<b>60</b>	<b>-135</b>	<b>-134</b>	<b>1,4 *</b>	<b>2,3</b>	<b>1,9*</b>

\* optimalizace nezkonvergovala

**Tab. 5.5:** Výchozí a konečné hodnoty 3 torzních úhlů a relativních energií při optimalizaci (úroveň BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O) + volba radii = uff) modifikovaného fragmentu Phe-D-Pro. Výsledky jsou rozděleny na dvě sady lišící se zkrabacím prolinového kruhu (S', N'), úhly  $\omega$  a  $\chi_1$  byly fixovány. Absolutní energie nejlepší konformace S'1 (vyznačené červeně) je -730,21733957 hartree. Tučně jsou zvýrazněny energeticky nejvýhodnější konformace použité dále pro výpočet ROA a Ramanových spekter.

### 5.1.2 Zpracování ROA spekter

Na základě relativních energií uvedených v tab. 5.5 bylo stanoveno Boltzmannovo rozdělení ( $T = 300 \text{ K}$ , viz kapitola 2.4.6) 18 konformerů, pro které byl proveden ROA výpočet (v tab. 5.5 vyznačeny tučně). Váhy konformerů jsou uvedeny v tab. 5.6. Na obr. 5.7 a 5.8 jsou Ramanova a ROA spektra: "neškálované" průměrné spektrum, na základě kterého bylo podle polohy nejvýraznějších úzkých pásů provedeno "škálování", a vážené spektrum, ve kterém jsou jednotlivá spočtená spektra zastoupena podle Boltzmannova rozdělení. Přidána jsou spektra energeticky nejvýhodnější konformace S'1.

Nemáme k dispozici experimentální spektrum odpovídající modifikovanému fragmentu Phe-D-Pro, na základě kterého by bylo možné provést přímé srovnání. Na obr. 5.7 a 5.8 je ale vidět, že spektra se v mnohém podobají experimentálním spektrům cyklického hexapeptidu (Phe-D-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp).

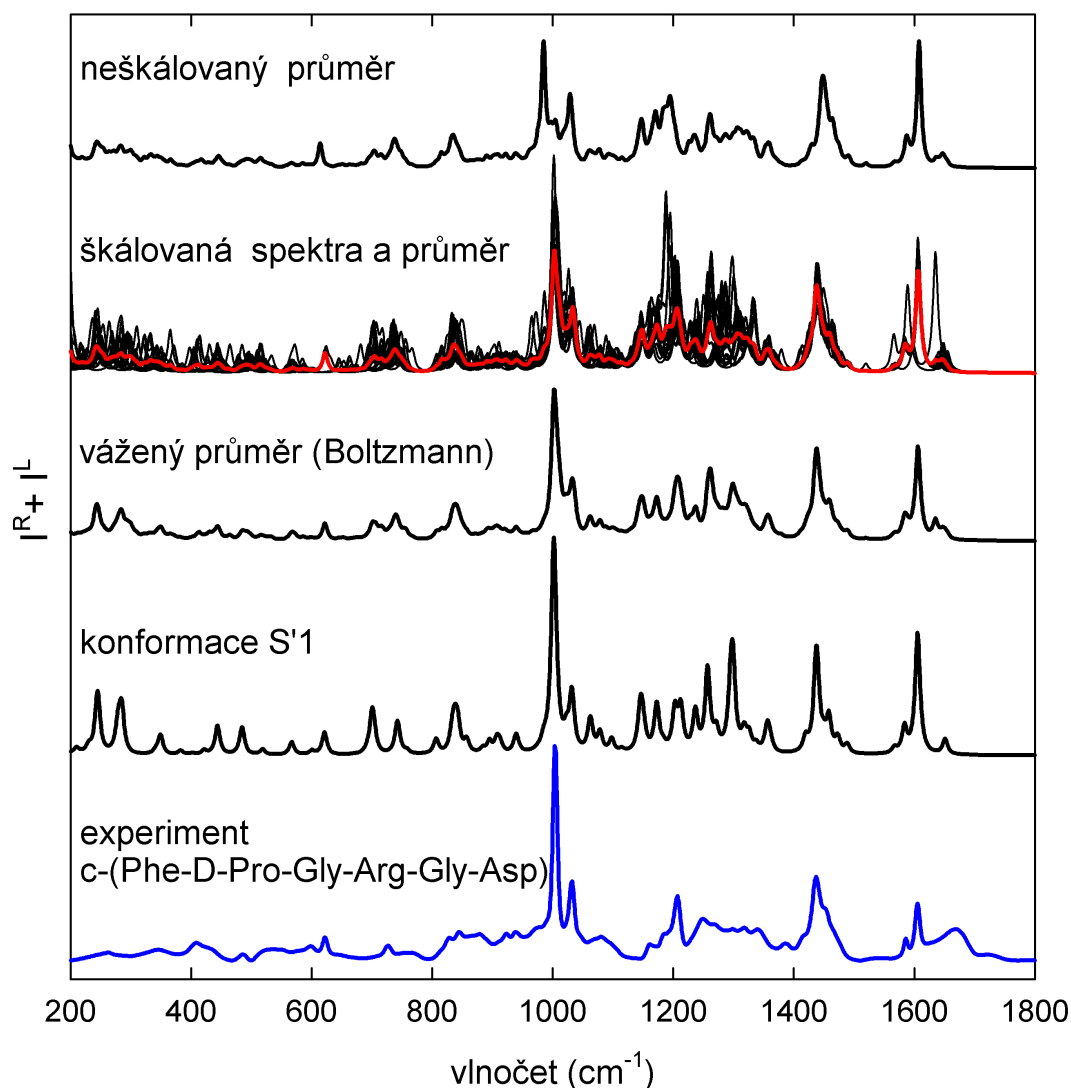
	Boltzmannova populace konformerů při 300K (%)	
	sada S'	sada N'
1	24	15*
2	1*	1
3	8	4
7	11	3
9	6	0
10	9	8*
11	0	0*
16	6	2
18	2*	1

\* optimalizace zcela nezkonvergovala

**Tab. 5.6:** Vypočítané (BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O) + volba radií = uff) relativní populace 18 konformací modifikovaného fragmentu Phe-D-Pro.

V Ramanově spektru na obr. 5.8 jsou úzké pásy  $\sim 1437 \text{ cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub> nůžkové vibrace) a  $\sim 1605 \text{ cm}^{-1}$  (C=O valenční vibrace) vystiženy poměrně dobře včetně rozšířeného pásu nad  $1605 \text{ cm}^{-1}$ . Pásy odpovídající dýchací vibraci fenylalaninu (valenční C=C vibrace,  $\sim 1003 \text{ cm}^{-1}$  a  $\sim 1033 \text{ cm}^{-1}$ ) ve vypočtených spektrech dominují. Oblast amidu III ( $1250$  až  $1350 \text{ cm}^{-1}$ ) a oblast torzních vibrací pod

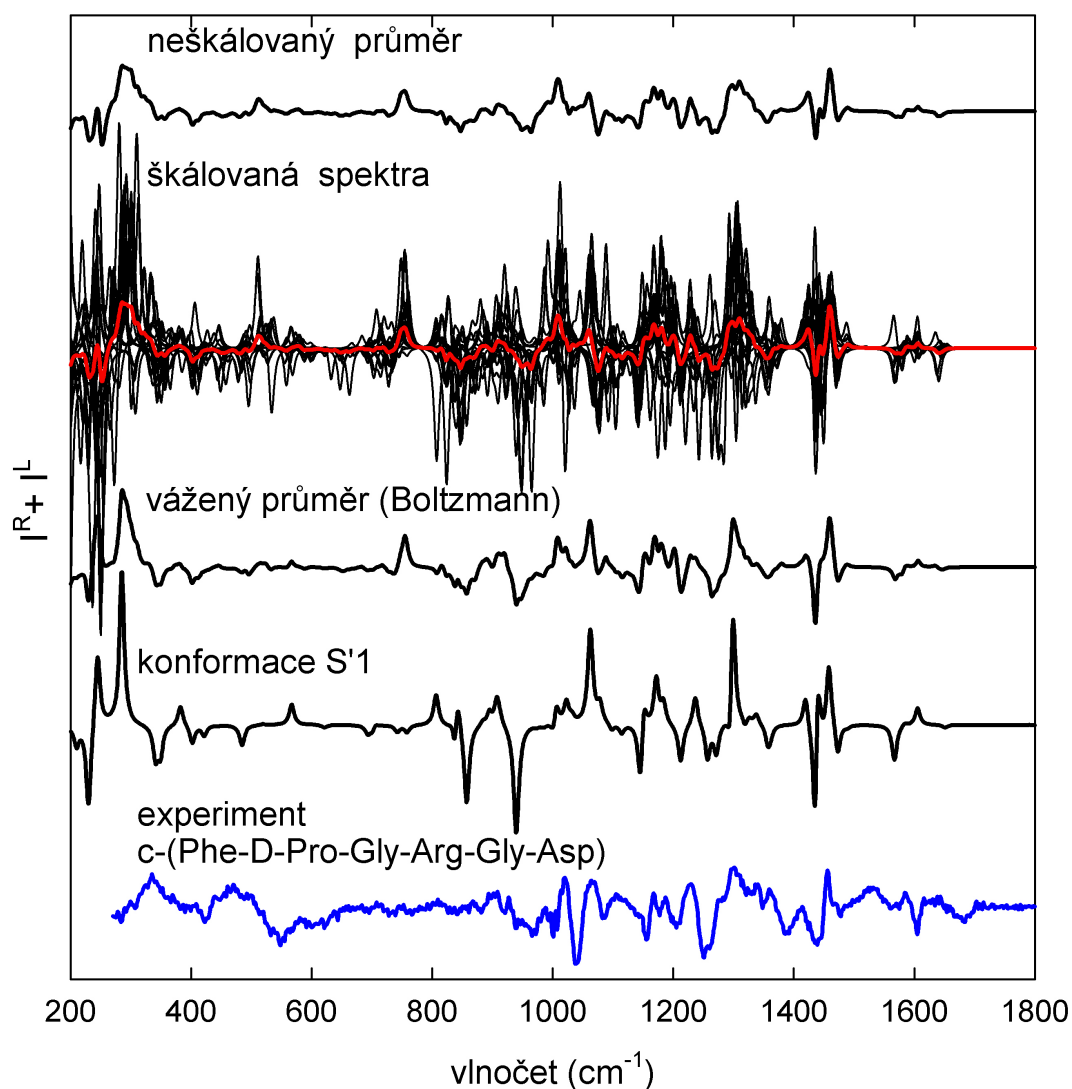
800  $\text{cm}^{-1}$  je mnohem lépe vystihnuta konformačním středováním, při kterém dochází ke snížení signálu. Modifikovaný fragment Phe-D-Pro má tedy Ramanovo spektrum velmi blízké spektru celého cyklického hexapeptidu, přestože ten obsahuje i další aminokyseliny.



**Obr. 5.7:** Ramanova spektra modifikovaného fragmentu Phe-D-Pro. Nahoře průměr spočtených 18 "neškálovaných" spekter (silové pole spočteno na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O), tenzory optické aktivity na úrovni HF/6-31G), černě jsou znázorněna jednotlivá spektra s provedeným "škálováním" a červeně jejich průměr. Dále je uveden vážený průměr, spektrum energeticky nejvýhodnější konformace S'1, a experimentální spektrum cyklického hexapeptidu Phe-D-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp.

Zatímco Ramanovo spektrum získané jako aritmetický průměr spočtených 18 spekter se od váženého průměru příliš neliší, v ROA spektrech (obr. 5.8) je patrný větší rozdíl. Pásky ROA mohou nabývat kladného i záporného znaménka a i jednotlivá spočtená spektra se od sebe více liší. Tato citlivost ROA signálu je při

studiu konformací velkou výhodou. Shoda vypočtených ROA spekter se spektrem celého cyklického hexapeptidu je horší než v případě Ramanových spekter. Bohužel nejsme schopni říct, které z pásů mají původ ve vibracích dalších aminokyselin cyklického hexapeptidu. Přímé porovnání tak není možné.

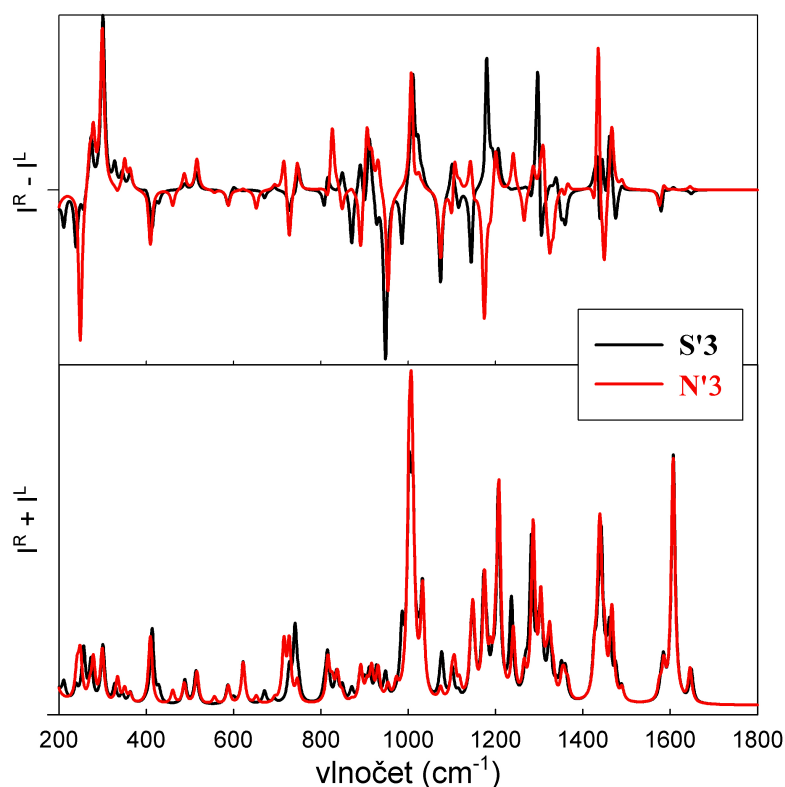


**Obr. 5.8:** ROA spektra modifikovaného fragmentu Phe-D-Pro. Nahoře průměr spočtených 18 "neškálovaných" spekter (silové pole vypočteno na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O), tenzory optické aktivity na úrovni HF/6-31G), černě jsou znázorněna jednotlivá spektra s provedeným škálováním a červeně jejich průměr. Dále je uveden vážený průměr, spektrum nejlepší konformace S'1, a experimentální spektrum cyklického hexapeptidu Phe-D-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp.

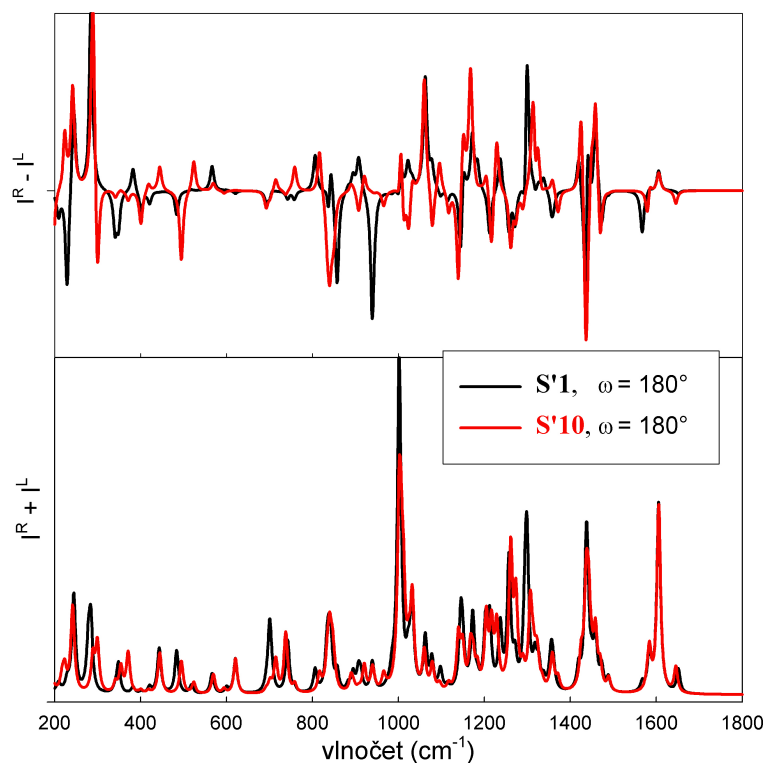


Na obr. 5.9 až 5.11 jsou uvedeny příklady spekter konformací lišících se zkrabčením prolinového kruhu (obr. 5.9), úhlem  $\omega$  (obr. 5.10) a úhlem  $\chi_1$  (obr. 5.11). Jako příklady byly vybrány konformace, pro něž optimalizace plně došla (s výjimkou konformace S'2). Podle údajů uvedených v tab. 5.5 je energeticky preferována *trans* konformace peptidové vazby před *cis* formou a zkrabčení prolinového kruhu typu S před typem N. Bez možnosti srovnat vypočtená spektra s experimentem to však nemůžeme potvrdit.

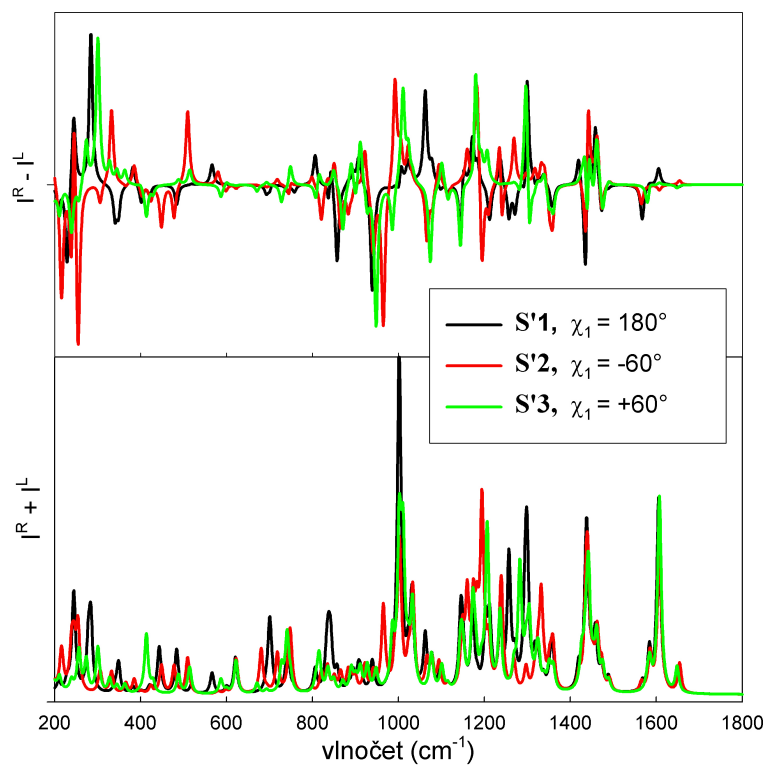
Pro všechny vypočtené srovnávané konformace lišící se jedním parametrem (obr. 5.9 až 5.11) jsou Ramanova spektra velmi blízká, zatímco ROA spektra jsou na změny parametrů mnohem citlivější. V ROA spektrech se vyskytují pásy opačných znamének, na základě kterých by bylo v podstatě možné podle experimentálního spektra určit, které konformace jsou preferované. Detailně určit z experimentálních spekter všechny souřadnice, např. *cis* nebo *trans* formu peptidové vazby, však pravděpodobně není v našich současných možnostech.



**Obr. 5.9:** ROA a Ramanova spektra (silové pole na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O), tenzory optické aktivity na úrovni HF/6-31G) pro jednu z devíti dvojic konformací modifikovaného fragmentu Phe-D-Pro lišící se zkrabčením prolinového kruhu (sada S' a N'). Viz tab. 5.5.



**Obr. 5.10:** ROA a Ramanova spektra (silové pole na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O), tenzory optické aktivity na úrovni HF/6-31G) pro jednu z osmi dvojic konformací modifikovaného fragmentu Phe-D-Pro lišící se konformací peptidové vazby (úhel  $\omega = 0^\circ$  a  $180^\circ$ ). Viz tab. 5.5.



**Obr. 5.11:** ROA a Ramanova spektra (silové pole na úrovni BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O), tenzory optické aktivity na úrovni HF/6-31G) pro trojici konformací modifikovaného fragmentu Phe-D-Pro lišící se úhlem  $\chi_1$  ( $180^\circ$ ,  $-60^\circ$  a  $60^\circ$ ). Viz tab. 5.5.

## 5.2 Experimentální část

Vzorek modifikovaného fragmentu Phe-D-Pro obsahující místo karboxylové skupiny methylovou skupinu, není komerčně dostupný. Od firmy Bachem byl zakoupen vzorek označený jako H-Phe-D-Pro-OH.HCl (katalogové číslo G-3355) o molární hmotnosti  $298,77 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Rozpuštěním v deionizované vodě jsme získali vzorek o koncentraci 1M, který byl přefiltrován přes mikrofiltry Millipore s velikostí pórů  $0,22 \mu\text{m}$ . Po umístění do ROA aparatury využívající vlnovou délku excitačního záření  $514,5 \text{ nm}$  (kontinuální argonový laser Coherent Innova 305) měl vzorek natolik vysoké fluorescenční pozadí, že nebylo možné jej proměřit.

Část vzorku byla přečištěna na ÚOCHB AV ČR, v.v.i. pomocí HPLC. Pro měření spekter bylo  $66,3 \text{ mg}$  vzorku rozpuštěno v  $220 \mu\text{l}$  deionizované vody na výslednou koncentraci 1M a  $\text{pH} = 1,1$ . Připravený roztok byl přefiltrován. I tento vzorek vykazoval fluorescenční pozadí, ale už znatelně nižší než před přečištěním.

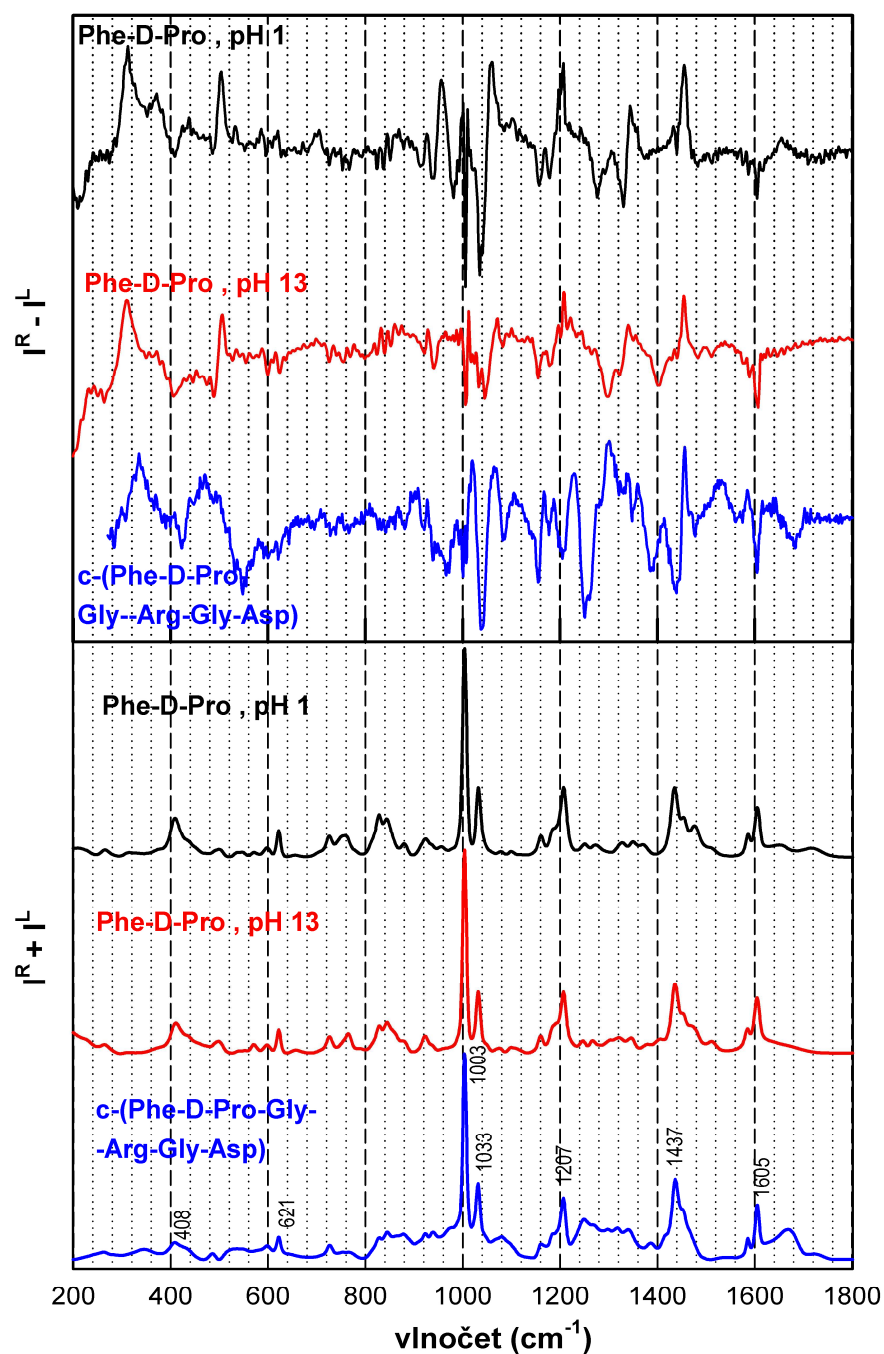
Vzorek byl ponechán v laserovém svazku po dobu 20 hodin, poté již byla fluorescence dostatečně vybělena a mohlo být získáno ROA spektrum. Pro měření byla použita fluorescenční křemenná kyveta od firmy Hellma  $5\times 5 \text{ mm}$  typu 111-QS. Výkon laseru na vzorku byl nastaven na  $535 \text{ mW}$ . Šířka vstupní štěrbinu spektrografu byla  $50 \mu\text{m}$ , což pro použitou excitační délku  $514,5 \text{ nm}$  odpovídá spektrální šířce přibližně  $6,5 \text{ cm}^{-1}$ . Měření bylo rozděleno do 18 měřících bloků obsahujících 750 akumulací po 2 s, celková doba měření tedy byla 15 h.

Postupným přidáním celkem  $29 \mu\text{l}$  6M NaOH do vzorku bylo zvýšeno jeho pH na hodnotu 13. Po 18 h vystavení laserovému svazku proběhlo měření o délce 24 h 10 min rozdělené do 58 měřících bloků po 500 akumulacích délky 1,5 s.

Naměřená data byla dále zpracována – byl proveden odečet signálu vody, korekce pozadí a v případě ROA spekter i Fourierova filtrace. U ROA spektra se v oblasti dýchací vibrace Phe  $\sim 1003 \text{ cm}^{-1}$  zřejmě vyskytuje polarizační artefakt. Výsledná ROA a Ramanova spektra Phe-D-Pro při pH 1 a 13 jsou zobrazena na obr. 5.12, kde jsou pro srovnání uvedena i spektra cyklického hexapeptidu c-(Phe-D-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp). Ramanova spektra Phe-D-Pro při obou hodnotách pH jsou hodně blízká spektru celého cyklopeptidu, což ukazuje na dominanci pásů fenylalaninu a D-prolinu. Experimentálních vlnůčty nejvýznamnějších pásů jsou

srovnány v tabulce 5.7, červeně jsou zvýrazněny nejintenzivnější pásy vyskytující se ve všech třech spektrech.

Experimenty tedy potvrzují, že signál fragmentu Phe-D-Pro je v různých systémech poměrně konzervativní a vybraný modelový fragment dobře reprezentuje spektra postranních řetězců prolinu a fenylalaninu. V budoucnu bychom tak mohli pomocí ROA sledovat konformaci postranních řetězců cyklopeptidu, eventuálně i dalších peptidů.



**Obr. 5.12:** Srovnání ROA a Ramanových spekter Phe-D-Pro při pH 1 (doba expozice 15h) a 13(doba expozice 24h) s c-(Phe-D-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp), doba expozice 35,5h.

Experimentální vlnočty (cm <sup>-1</sup> )			Experimentální vlnočty (cm <sup>-1</sup> )		
Phe-D-Pro pH 1	Phe-D-Pro pH 13	c-(Phe-D-Pro-Gly- Arg-Gly-Asp)	Phe-D-Pro pH 1	Phe-D-Pro pH 13	c-(Phe-D-Pro-Gly- Arg-Gly-Asp)
1717	-	1722	957	-	938
1652	-	1669	925	923	923
<b>1606</b>	<b>1606</b>	<b>1605</b>	880	878	878
1588	1586	1586	-	-	865
-	-	1553	845	846	844
1510	1512	-	829	830	829
1477	1471	-	-	787	-
1455	1453	1451	-	766	766
<b>1436</b>	<b>1438</b>	<b>1437</b>	759	-	753
-	1407	1417	726	728	726
1371	1381	1386	656	659	-
1351	1347	1340	<b>623</b>	<b>623</b>	<b>621</b>
1328	1322	1318	599	599	598
-	1305	1298	573	571	580
1275	1268	1268	548	553	536
1251	1248	1249	538	540	486
<b>1208</b>	<b>1208</b>	<b>1207</b>	500	500	-
1187	1193	1185	<b>410</b>	<b>412</b>	<b>408</b>
1162	1162	1161	-	-	347
1101	1101		317	314	-
1080	1078	1080	267	265	263
<b>1033</b>	<b>1033</b>	<b>1033</b>	210	-	-
<b>1004</b>	<b>1005</b>	<b>1003</b>			

**Tab. 5.7:** Srovnání experimentálních vlnočtů nejvýraznějších vibračních módů pro dipeptid Phe-D-Pro při pH 1 a 13 a cyklický hexapeptid c-(Phe-D-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp). Červeně jsou zvýrazněny nejintenzivnější pásy, které se vyskytují ve všech třech spektrech.

## Závěr

Ramanova optická aktivita představuje unikátní techniku ke studiu struktury biomolekul v roztoku. Ramanova a ROA spektra jsou výrazným způsobem ovlivněna konformační flexibilitou molekul. Započtení příspěvku od mnoha různých konformací přítomných v roztoku v rovnováze je tedy při provádění výpočtů obvykle nevyhnutelné. Jen tak může být dosaženo výrazně lepší shody simulovaných Ramanových a ROA spekter s experimentálními daty, která tak mohou být lépe interpretována. Zejména pro větší molekuly však neexistuje spolehlivý způsob pro prohledání konformačního prostoru a nalezení nejstabilnějších konformací.

Jednou z možností je využití molekulární dynamiky. To je v této práci ukázáno na příkladu cyklického hexapeptidu, jehož flexibilita je do určité míry omezená cyklem. Na základě molekulární dynamiky byly určeny možné geometrie a pro deset konformací náhodně vybraných z MD byla simulována Ramanova a ROA spektra. S ohledem na velikost molekuly byly tenzory optické aktivity vypočteny na nižší úrovni teorie (HF/6-31G/CPCM(H<sub>2</sub>O)) a zkombinovány se silovým polem, které mohlo být získáno na vyšší úrovni (BPW91/6-31G\*\*/CPCM(H<sub>2</sub>O)). Jinou aproximací využitou k výpočtu ROA intenzit představuje polarizační model. V případě Ramanových spekter bylo dosaženo velmi dobré shody s experimentem již při zprůměrování spekter deseti konformerů spočítaných *ab initio*. ROA spektra jsou mnohem citlivější k dynamickým aspektům struktury molekul, v důsledku molekulární flexibility může dojít dokonce k vyrušení některých pásů a intenzita průměrného spektra je výrazně slabší ve srovnání se spektry jednotlivých konformerů. Experimentální ROA spektrum bylo rozloženo do spektrálních profilů deseti vypočtených spekter. Je žádoucí, aby v budoucnu bylo do výpočtu zahrnuto více konformerů.

S omezenou přesností je možné použít již spočtená spektra a pomocí metody založené na přenosu tenzorů molekulárních vlastností simulovat spektra dalších konformací získaných např. z molekulové dynamiky. Tento postup se však v případě cyklického hexapeptidu neosvědčil pravděpodobně z toho důvodu, že některé geometrie získané z MD se výrazně lišily od geometrií obsažených v knihovně reprezentativních struktur, která by měla být vytvářena systematicky a být mnohem obsáhlejší.

Techniku přenosu molekulárních vlastností je možné využít pro konstrukci silového pole velké molekuly i při jejím rozdělení na menší fragmenty (např. jednotlivé aminokyseliny), které mohou být spočteny na lepší úrovni. Tento postup zatím nebyl kvůli mnoha obtížím aplikován. Není zajištěno, že konformace jednotlivých samostatných aminokyselin by odpovídala jejich konformaci v cyklické molekule. Navíc by nebyly postiženy interakce mezi jednotlivými fragmenty.

V Ramanově spektru cyklického hexapeptidu dominují pásy odpovídající fragmentu Phe-D-Pro, který byl počítán samostatně. Jeho konformační prostor byl prohledán tak, že pro tři zvolené torzní úhly byly nastaveny jejich dvě až tři standardní hodnoty a po zohlednění dvou preferovaných konformací prolinu bylo *ab initio* propočítáno 36 možných konformací. Během výpočtů se ukázalo, že v programu Gaussian není pro výpočet ROA spekter dobře implementován CPCM model. Byla nalezena konformace s nejnižší energií, jejíž Ramanovo spektrum dobře postihuje hlavní rysy spektra celého cyklického hexapeptidu. K vysvětlení poklesu intenzity v některých oblastech je však nutné zahrnout do výpočtu více konformerů, jak ukazuje Boltzmannovo středování. Nebylo možné provést přímé porovnání ROA spekter se změřenými ROA spektry kladně a záporně nabitě formy Phe-D-Pro, neboť karboxylová skupina byla ve výpočtech nahrazena methylovou skupinou, která lépe zastoupila zbytek cyklického hexapeptidu.

Příkladem jiného problému souvisejícího se sbalováním peptidů je dipeptid histidinu s glycinem, který představuje nejmenší možný systém, u něhož by mohla být „pozorovatelná“ změna konformace vyvolaná navázáním kovu (např. měď). Vzhledem k tomu, že histidin v závislosti na pH nabývá více protonačních stavů, které je nutné propočítat zvlášť, jsme v této práci začali experimentálním studiem. Nejprve jsme proměřili ROA spektra samotného histidinu při různých hodnotách pH. Spektrum při pH 7,8 dobře odpovídá již publikovanému spektru. Ukázali jsme, že spektrum vzorku obsahujícího komplex histidinu s měďnatými kationty tmavě modré barvy je s excitací 514 nm měřitelné, ačkoli měření barevných vzorků je často mimořádně obtížné. Komerční vzorek pro nás nejvíce zajímavého dipeptidu His-Gly vykazoval poměrně vysoké fluorescenční pozadí a při měření při pokojové teplotě byl nestabilní. Vzorek Gly-His je experimentálně mnohem vhodnější. Při chlazení na 10°C by mělo být možné měření komplexu Gly-His s mědí. Tématice se chceme dále věnovat během řešení dizertační práce, kdy bude měření doplněno výpočty a přejdeme ke složitějším modelovým systémům, např. částem molekuly prionu.

## Seznam použité literatury

Atkins P. W., Barron L. D. (1969): Rayleigh scattering of polarized photons by molecules. *Mol. Phys.* **16**, 453-466.

Barone V., Cossi M. (1998a): Quantum calculation of molecular energies and energy gradients in solution by a conductor solvent model. *J. Phys. Chem. A* **102**, 1995-2001.

Barone V., Cossi M., Tomasi J. (1998b): Geometry optimization of molecular structures in solution by the polarizable continuum model. *J. Comput. Chem.* **19**, 404-417.

Barron L. D., Boggard M. P., Buckingham A.D. (1973): Differential Raman-scattering of right and left circularly polarized-light by asymmetric molecules. *Nature* **241**, 113-114.

Barron L. D., Gargaro A. R., Hecht L., Polavarapu P. L. (1991): Experimental and Ab Initio Theoretical Vibrational Raman Optical-Activity of Alanine. *Spectrochim. Acta A* **47**, 1001-1016.

Barron L. D., Gargaro A. R., Hecht L., Polavarapu P. L. (1992): Vibrational Raman Optical Activity of Alanine as a Function of pH. *Spectrochim. Acta A* **48**, 261-263.

Barron L. D., Hecht L., Bell, A. F., Wilson, G. (1996): Recent developments in Raman optical activity of biopolymers. *Appl. Spectrosc.* **50**, 619-629.

Barron L. D., Hecht L., Blanch E. W., Bell A. F.(2000): Solution structure and dynamics of biomolecules from Raman optical activity. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **73**,1-49.

Barron L. D., Blanch E. W., Hecht L. (2002): Unfolded proteins studied by Raman optical activity. *Adv. Protein Chem.* **62**, 51-90.

Barron L. D., Hecht L., McColl I.H., Blanch E.W. (2004): Raman optical activity comes of age. *Mol. Phys.* **102**, 731-744.

Barron L. D. (2004): *Molecular Light Scattering and Optical Activity*. Cambridge University Press, Cambridge.

Barron L. D., Zhu F., Hecht L. (2006): Raman optical activity: an incisive probe of chirality and of biomolecular structure and behaviour. *Vib. Spectrosc.* **42**, 15-24.

Barth A., Zscherp C. (2002): What vibrations tell us about proteins? *Quart. Rev. Biophys.* **35**, 369-430.

Blanch E. W., Hecht L., Day L. A., Pederson D. M., Barron L. D. (2001): Tryptophan absolute stereochemistry in viral coat proteins from Raman optical activity. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 4863-4864.



Blanch E. W., McColl I. H., Hecht L., Nielsen K., Barron L. D. (2004): Structural characterization of proteins and viruses using Raman optical activity. *Vib. Spec.* **35**, 87-92.

Bouř P., Baumruk V., Hanzlíková J. (1997a): Measurement and calculation of the Raman optical activity of alpha-pinene and trans-pinane. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **62**, 1384-1395.

Bouř P., Sopková J., Bednárová L., Maloň P., Keiderling T. A. (1997b): Transfer of Molecular Property Tensors in Cartesian Coordinates: A New Algorithm for Simulation of Vibrational Spectra. *J. Comput. Chem.* **18**, 646-659.

Bouř P., Kapitán J., Baumruk V. (2001): Simulation of the Raman optical activity of L-alanyl-L-alanine. *J. Phys. Chem. A* **105**, 6362-6368.

Bouř P., Keiderling T. A. (2002): Partial optimization of molecular geometry in normal coordinates and use as a tool for simulation of vibrational spectra, *J. Chem. Phys.* **117**, 4126-4132.

Bouř P., Keiderling T. A. (2003): Empirical modeling of the peptide amide I band IR intensity in water solution. *J. Chem. Phys.* **119**, 11253-11262.

Bouř P. (2005): Convergence Properties of the Normal Mode Optimization and its Combination with Molecular Geometry Constraints. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **70**, 1315-1340.

Bouř P., Kim J., Kapitán J., Hammer R. P., Huang R., Wu L., Keiderling T. A. (2008): Vibrational Circular Dichroism and IR Spectral Analysis as a Test of Theoretical Conformational Modeling for a Cyclic Hexapeptide. *Chirality* **20**, 1104-1119.

Branden C., Tooze J. (1991): *Introduction to protein structure*. Garland Publishing, New York – London.

Buděšínský, M., Daněček P.; Bednárová L., Kapitán J., Baumruk V., Bouř P. (2008a): Comparison of Quantitative Conformer Analyses by Nuclear Magnetic Resonance and Raman Optical Activity Spectra for Model Dipeptides. *J. Phys. Chem. A* **112**, 8633-8640.

Buděšínský M., Šebestík J.; Bednárová L., Baumruk V., Šafařík M., Bouř P. (2008b): Conformational properties of the Pro-Gly motif in the D-Ala-L-Pro-Gly-D-Ala model peptide explored by a statistical analysis of the NMR, Raman, and Raman optical activity spectra. *J. Org. Chem.* **73**, 1481-1489.

Cossi M., Rega N., Scalmani G., Barone V. (2003): Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. *J. Comput. Chem.* **24**, 669-681.

Deng Z., Polavarapu P. L., Ford J. S., Hecht L., Barron L. D., Ewig C. S. Jalkanen K. (1996): Solution-phase conformations of N-acetyl-N'-methyl-L-alanineamide from vibrational Raman optical activity. *J. Phys. Chem.* **100**, 2025-2034.

Deplazes E., van Bronswijk W., Zhu F., Barron L. D., Ma S., Nafie L. A., Jalkanen K. J. (2007): A combined theoretical and experimental study of the structure and vibrational absorption, vibrational circular dichroism, Raman and Raman optical activity spectra of the L-histidine zwitterion. *Theor. Chem. Account* **119**, 155–176.

Gargaro A. R., Barron L. D., Hecht L. (1993): Vibrational Raman Optical-Activity of Simple Amino-Acids. *J. Raman Spectrosc.* **24**, 91-96.

Gierasch L. M., Deber C.M., Madison V., Niu C.H., Blout E.R. (1981): Conformations of (X-L-Pro-Y)<sub>2</sub> cyclic hexapeptides. Preferred beta-turn conformers and implications for beta turns in proteins. *Biochemistry* **20**, 4730–4738.

Han W.G. , Jalkanen K.J. , Elstner M., Suhai S. (1998): Theoretical study of aqueous N-acetyl-L-alanine N'-methylamide: Structures and Raman, VCD, and ROA spectra. *J. Phys. Chem. B* **102**, 2587-2602.

Hecht L., Barron L. D., Gargaro A. R., Wen Z. Q., Hug W. (1992): Raman Optical Activity Instrument for Biochemical Studies. *J. Raman Spectrosc.* **23**, 401-411.

Hilario J., Kubelka J., Syud F.A., Gellman S.H., Keiderling T.A. (2002): Spectroscopic characterization of selected  $\beta$ -sheet hairpin models. *Biospectroscopy* **67**, 233–236.

Hohenberg P., Kohn W. (1964): Inhomogeneous electron gas. *Phys. Rev. B* **136**, 864-871.

Hug W., Hangartner G. (1999): A novel high-throughput Raman spectrometer for polarization difference measurements. *J. Raman Spectrosc.* **30**, 841-852.

Chalmers J. M., Griffith P. R. (2002): *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. Wiley, Chichester.

Chatterjee J., Mierke D., Kessler H. (2006): N-methylated cyclic pentaalanine peptides as template structures. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 15164–15172.

Jacob C. R., Luber S., Reiher M. (2008): Calculated Raman Optical Activity Signatures of Tryptophan Side Chains. *Chem. Phys. Chem.* **9**, 2177-2180.

Jalkanen K. J., Nieminen R. M., Frimand K., Bohr J., Bohr H., Wade R. C., Tajkhorshid E., Suhai S. (2001): A comparison of aqueous solvent models used in the calculation of the Raman and ROA spectra of L-alanine. *Chem. Phys.* **265**, 125-151.

Jalkanen K. J., Nieminen R. M., Knapp-Mohammady M., Suhai S. (2003): Vibrational analysis of various isotopomers of L-alanyl-L-alanine in aqueous

solution: Vibrational absorption, vibrational circular dichroism, Raman, and Raman optical activity spectra. *Int. J. Quantum Chem.* **92**, 239-259.

Jalkanen K. J., Elstner M., Suhai S. (2004): Amino acids and small peptides as building blocks for proteins: comparative theoretical and spectroscopic studies. *J. Mol. Struct.-Theochem* **675**, 61-77.

Jalkanen K. J., Jurgensen V. W., Claussen A., Rahmin A., Jensen G. M., Wade R. C., Nardi F., Jung C., Degtyarenko I. M., Nieminen R. M., Herrmann F., Knapp-Mohammady M., Niehaus T. A., Frimand K., Suhai S. (2006): Use of vibrational spectroscopy to study protein and DNA structure, hydration, and binding of biomolecules: A combined theoretical and experimental approach. *Int. J. Quantum Chem.* **106**, 1160-1198.

Kaminský J., Kapitán J., Baumruk V., Bednářová L., Bouř P. (2009): Interpretation of Raman and Raman Optical Activity Spectra of a Flexible Sugar Derivative, the Gluconic Acid Anion. *J. Phys. Chem. A* **113**, 3594-3601.

Kapitán J. (2006a): Teoretický a experimentální rozvoj Ramanovy optické aktivity jako metody studia biomolekul ve vodném prostředí. *Dizertační práce*, MFF UK.

Kapitán J., Baumruk V., Kopecký V., Jr., Bouř P. (2006b): Conformational flexibility of L-alanine Zwitterion determines shapes of Raman and Raman optical activity spectral bands. *J. Phys. Chem. A* **110**, 4689-4696.

Kapitán J., Baumruk V., Kopecký V., Jr., Pohl R., Bouř P. (2006c): Proline Zwitterion Dynamics in Solution, Glass, and Crystalline State. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 13451-13462.

Kapitán J., Baumruk V., Bouř P. (2006d): Demonstration of the Ring Conformation in Polyproline by the Raman Optical Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 2438-2443.

Karle I., Gopi H. N., Balaram P. (2002): Infinite pleated beta-sheet formed by the beta-hairpin Boc-beta-Phe-beta-Phe-D-Pro-Gly-beta-Phe-beta-Phe-OMe. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 5160-5164.

Keiderling T. A. (2000): Peptide and protein conformational studies with vibrational circular dichroism and related spectroscopies. In: Berova N., Nakanishi K., Woody R. W.: Circular dichroism: principles and applications, 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 621-666.

Kim J., Kapitán J., Lakhani A., Bouř P., Keiderling T. A. (2008): Tight  $\beta$ -turns in peptides. DFT-based study of infrared absorption and vibrational circular dichroism for various conformers including solvent effects. *Theor. Chem. Acc.* **119**, 81-97.

Kohn W., Sham L. J. (1965): Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Physical Review* **140**, 1133-1138.

Mahalakshmi R., Raghothama S., Balaran P. (2006): NMR analysis of aromatic interactions in designed peptide beta-hairpins. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 1125-1138.

Mesu J. G., Visser T., Soulimani F., Weckhuysen B. M. (2005): Infrared and Raman spectroscopic study of pH-induced structural changes of L-histidine in aqueous environment. *Vib. Spec.* **39**, 114-125.

Mesu J. G., Visser T., Soulimani F., van Faassen E. E., Peinder P., Beale A. M., Weckhuysen B. M. (2006): New insights into the coordination chemistry and molecular structure of copper(II) histidine complexes in aqueous solutions. *Inorg. Chem.* **45**, 1960-1971.

Muller G., Gurrath M., Kurz M., Kessler H. (1993): BetaVI turns in peptides and proteins: a model peptide mimicry. *Protein Struct.* **15**, 235-251.

Nafie L. A. (1996): Vibrational Optical Activity. *Appl. Spectrosc.* **50**, A14-A26.

Onsager L.: Electric Moments of Molecules in Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **58**, 1486-1493.

Pecul M., Rizzo A. (2002): Linear Response Coupled Cluster Calculation of Raman Scattering Cross Section. *J. Chem. Phys.* **116** (4), 1259-1268.

Peng C. Y., Ayala P. Y., Schlegel H. B., Frisch M. J. (1996): Using redundant internal coordinates to optimize equilibrium geometries and transition states. *J. Comput. Chem.* **17**, 49-56.

Pomelli C. S., Tomasi J., Cossi M., Barone V. (1999): Effective generation of molecular cavities in polarizable continuum model by DefPol procedure. *J. Comput. Chem.* **20**, 1693-1701.

Pulay P., Fogarasi G. (1992): Geometry Optimization in Redundant Internal Coordinates. *J. Chem. Phys.* **96**, 2856-2860.

Ramachandran G. N., Ramakrishnan C., Sasisekharan V. (1962): Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* **7**, 95-99.

Raman C. V. (1928): A new radiation, *Ind. J. Phys.* **2**, 387.

Ramirez-Alvarado M., Kortemme T., Blanco F. J., Serrano L. (1999): Beta-hairpin and beta-sheet formation in designed linear peptides. *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 93-103.

Ruud K., Helgaker T., Bouř P. (2002): Gauge-origin independent density-functional theory calculations of vibrational Raman optical activity. *J. Phys. Chem. A* **106**, 7448-7455.

Shi Z. S., Woody R. W., Kallenbach N. R. (2002): Is polyproline II a major backbone conformation in unfolded proteins? *Adv. Protein Chem.* **62**, 163-240.

Schlegel H. B.(1995): Geometry Optimization on Potential Energy Surfaces. In: Yarkony D. R.: *Modern Electronic Structure Theory*, Yarkony, World Scientific, Singapore, 459-500.

Skála L. (1994): *Kvantová teorie molekul*. Karolinum, Praha.

Stapley B. J., Creamer T. P. (1999): A survey of left-handed polyproline II helices. *Protein Sci.* **8**, 587-595.

Syud F. A., Stanger H. E., Mortell H. S., Espinosa J. F., Fisk J. D., Fry C. G., Gellman S. H. (2003): Interstrand side chain-side chain interactions in a designed beta-hairpin: Significance of both lateral and diagonal pairings. *J. Mol. Biol.* **326**, 553-568.

Szabo A., Ostlund N. S. (1996): *Modern Quantum Chemistry*. McGraw-Hill.

Vass E., Hollosi M., Besson F., Buchet R. (2003): Vibrational spectroscopic detection of beta- and gamma-turns in synthetic and natural peptides and proteins. *Chem. Rev.* **103**, 1917–1954.

Voet D., Voetová J. G. (1995): *Biochemie*. Victoria Publishing, Praha.

Wang J. M., Cieplak P., Kollman P. A.(2000): How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J. Comput. Chem.* **21**, 1049-1074.

Yao J., Dyson H. J., Wright P. E. (1994): Three-dimensional structure of a type VI turn in a linear peptide in water solution - evidence for stacking of aromatic rings as a major stabilizing factor. *J. Mol. Biol.* **243**, 754-766.

Yu G. S., Che D. P., Freedman T. B., Nafie L. A. (1995): Raman Optical-Activity of Simple Alanyl Peptides - Backscattering In-Phase Dual Circular-Polarization Measurements in Aqueous-Solution. *Biospectroscopy* **1**, 113-123.