

Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE



Bc. Markéta Kubáňová

Využití Ramanovy optické aktivity při studiu konformace strukturně významných skupin v peptidech a proteinech

Fyzikální ústav UK

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

Konzultanti: RNDr. Vladimír Kopecký Jr., Ph.D.,

Ing. Petr Maloň, CSc., Ústav organické chemie a biochemie AV ČR

Studijní program: Biofyzika a chemická fyzika

2009

Chtěla bych v první řadě poděkovat doc. RNDr. Vladimíru Baumrukovi, DrSc. za jeho trpělivost a obětavost při vedení mé diplomové práce a za veškerý čas a úsilí, které věnoval tomu, aby tato práce mohla vzniknout. Dále bych ráda poděkovala Ing. Petru Maloňovi, CSc. a RNDr. Lucii Bednárové, CSc. za odborné konzultace a za cenné rady a připomínky, které mi velmi ochotně poskytovali.

RNDr. Kopeckému Jr., Ph.D. děkuji za úsilí, které vynaložil na sestavování ROA aparatury, a za pomoc při zpracování dat. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Tomáši Krausovi, Ph.D. za syntézu a poskytnutí vzorků cyklodextrinů s disulfidovými můstky. Prof. RNDr. Marii Urbanové, CSc. děkuji za laskavé poskytnutí VCD a FTIR spekter. Kolektivu Oddělení fyziky biomolekul FÚUK bych ráda poděkovala za velmi příjemné pracovní prostředí. Svým rodičům děkuji za podporu při studiu a Tomáši Pazderkovi za to, že mi byl v průběhu psaní práce oporou.

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

V Praze dne 7. 5. 2009

Markéta Kubáňová

Obsah

1	Úvod.....	5
2	Teoretický úvod.....	7
2.1	<i>Využití metod vibrační spektroskopie při studiu proteinů.....</i>	7
2.1.1	Metody vibrační spektroskopie.....	7
2.1.2	Optická aktivita.....	9
2.2	<i>Ramanova optická aktivita.....</i>	10
2.2.1	Ramanova optická aktivita aminokyselin, peptidů a proteinů.....	13
3	Experimentální uspořádání, příprava vzorků a zpracování dat.....	25
3.1	<i>ROA experiment.....</i>	25
3.1.1	ROA spektrometr.....	26
3.1.2	Záznam a zpracování experimentálních dat.....	29
3.1.3	Zpracování spekter.....	30
3.1.4	Příprava měření.....	34
3.2	<i>Měření elektronového cirkulárního dichroismu.....</i>	34
4	Výsledky a diskuze.....	36
4.1	<i>Rozvoj experimentu.....</i>	36
4.1.1	Měření ROA poly(glutamové kyseliny).....	36
4.1.2	Rozšíření měření do oblasti valenčních vodíkových vibrací.....	38
4.2	<i>Charakteristické znaky konformace polyprolin II v polypeptidu poly(Pro-Gly-Pro) 43</i>	
4.3	<i>Studium disulfidových můstků pomocí ROA.....</i>	45
4.3.1	Cyklodextriny přemostěné S-S můstky.....	45
4.3.2	Oxytocin.....	51
4.3.3	ROA hinge peptidu s navázanou antigenní sekvencí.....	53
5	Závěr.....	58
	Seznam použité literatury.....	60

Název práce: Využití Ramanovy optické aktivity při studiu konformace strukturně významných skupin v peptidech a proteinech

Autor: Bc. Markéta Kubáňová

Katedra (ústav): Fyzikální ústav UK

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

e-mail vedoucího: baumruk@karlov.mff.cuni.cz

Abstrakt: Ramanova optická aktivita (ROA) je moderní spektroskopická metoda, kterou lze s úspěchem aplikovat na celou řadu chirálních vzorků, od malých organických molekul až po komplexní biomolekulární systémy. K důležitým aplikacím ROA patří studium struktury peptidů a proteinů v roztoku. Cílem diplomové práce bylo nalézt a ověřit vztah mezi trojrozměrnou strukturou a Ramanovou optickou aktivitou disulfidové a amidové skupiny v peptidech. V ROA spektrech poly(Pro-Gly-Pro), oxytocinu a hinge peptidu s navázanou antigenní sekvencí byly nalezeny charakteristické znaky konformace polyprolin II (levotočivého 3_1 -helixu). U modelových cyclodextrinových struktur přemostěných disulfidovými můstky byl v ROA spektrech pozorován signál v oblasti S-S a C-S valenčních vibrací. V ROA spektru oxytocinu (peptid s jedním S-S můstkem) byl nalezen pozitivní ROA signál v oblasti S-S valenčních vibrací, který je podle teoretických výpočtů na modelových disulfidech indikátorem kladného dihedrálního úhlu C_β -S-S- C_β . Tento výsledek je ve shodě s krystalovou strukturou. Zabývali jsme se také rozšířením měření ROA spekter do oblasti valenčních vodíkových vibrací (2500 - 3200 cm^{-1}).

Klíčová slova: Ramanova optická aktivita, konformace polyprolin II, disulfidové můstky.

Title: Raman optical activity and conformation of structurally important groups in peptides and proteins

Author: Bc. Markéta Kubáňová

Department: Institute of Physics of the Charles University

Supervisor: Doc. RNDr. Vladimír Baumruk, DrSc.

Supervisor's e-mail address: baumruk@karlov.mff.cuni.cz

Abstract: Raman optical activity (ROA) represents a modern spectroscopic technique that can be applied to a wide range of chiral molecules starting from small organic molecules up to complex biomolecular systems. Among other things ROA provides information about solution structure of peptides and proteins. The aim of the thesis was to determine the relationship between three-dimensional structure and Raman optical activity of disulphide and amide groups in peptides. Characteristic band patterns of the polyproline II conformation (left-handed 3_1 -helix) were found in the ROA spectra of poly(Pro-Gly-Pro), oxytocin and hinge peptide linked to the antigen sequence. ROA signal in the S-S and C-S stretching region was observed in ROA spectra of model cyclodextrin compounds connected with disulphide bonds. Positive ROA band in the S-S stretching region was found in the ROA spectrum of oxytocin (the peptide with one S-S bridge). According to the theoretical studies of model disulphides, positive ROA signal in this region indicates positive dihedral angle C_β -S-S- C_β . This result is in agreement with the crystal structure. We have also worked on extension of ROA measurements to the hydrogen stretching region (2500 - 3200 cm^{-1}).

Keywords: Raman optical activity, polyproline II conformation, disulphide bonds.

1 Úvod

Ramanova optická aktivita (ROA) je moderní spektroskopická metoda, kterou lze s úspěchem aplikovat na celou řadu chirálních vzorků, od malých organických molekul až po komplexní biomolekulární systémy (Barron a kol., 2004a). ROA spojuje stereochemickou citlivost optické aktivity s citlivostí vibrační spektroskopie k chemické struktuře molekul a díky tomu může poskytnout nové informace o struktuře i dynamice studovaných systémů, doplňující informace získané pomocí jiných spektroskopických technik. Velkou výhodou metody je možnost studovat biomolekuly v jejich přirozeném prostředí – ve vodných roztocích.

K důležitým aplikacím ROA patří studium struktury peptidů a proteinů. Vzhledem k tomu, že nejintenzivnější ROA signál je spojen s vibracemi nejrigidnějších a chirálních částí celé struktury, dominují ROA spektrům peptidů a proteinů především pásy odražející vibrace hlavního peptidového řetězce (Barron a kol., 2000). V ROA spektrech je tak možné nalézt informace o konformaci hlavního řetězce (jeho geometrie určuje typ sekundární struktury); díky krátkodosahovosti interakcí, které jsou odpovědné za vznik ROA signálu, lze navíc pomocí ROA studovat i lokální struktury (např. β -smyčky).

Hlavní cíle diplomové práce lze shrnout do následujících bodů: 1. prostudovat určenou literaturu a zpracovat rešerši postihující současný stav rozvoje Ramanovy optické aktivity aminokyselin, peptidů a proteinů; 2. zvládnout měření na ROA spektrometru, přípravu vzorků a zpracování experimentálních dat; 3. proměřit ROA spektra vybraného souboru modelových látek a navrhnout jejich strukturní interpretaci; 4. ověřit získané výsledky na vybraném peptidu nebo malém proteinu.

V práci jsme se zaměřili na studium dvou konformačně významných skupin peptidů a proteinů – levotočivého poly-L-prolinového helixu (PPII) a disulfidových můstků. V případě studia PPII konformace jsme se (v návaznosti na práce Kapitána a kol., 2006d,e) zabývali peptidy bohatými na prolin, neboť peptidové sekvence složené převážně z prolinových reziduí nebyly dosud (na rozdíl od peptidových sekvencí neprolinových reziduí) pomocí ROA řádně prozkoumány. Studium disulfidových můstků patří mezi dosud neprozkoumané oblasti v ROA spektroskopii.

Disulfidové můstky jsou významné strukturní prvky peptidů a proteinů (funkce stabilizace struktury, spojování peptidových řetězců), které se díky chiralitě S–S vazby jeví jako vhodný objekt pro chiroptické studie (chiroptické metody mohou rozlišit smysl torze S–S skupiny). Zatímco využitelnost chiroptických metod elektronového a vibračního cirkulárního dichroismu (ECD a VCD) je v případě studia disulfidových můstků omezená, ROA technika se jeví jako velmi perspektivní (výhodou je především dostupnost spektrální oblasti, ve které se nacházejí důležité vibrace disulfidových můstků, měřitelnost ve vodném prostředí a především předpoklad, že právě ROA dokáže jednoznačně rozlišit smysl torze S–S skupiny). V této práci jsme se pokusili na modelových systémech (cyklodextrinové struktury přemostěné disulfidovými můstky) ověřit, zda je signál příslušející S–S vibracím v ROA spektrech vůbec detegovatelný. Získané výsledky jsme pak ověřili na modelovém peptidu o známé struktuře (hormon oxytocin).

Práce je rozdělena do pěti kapitol. V první kapitole jsou shrnuty cíle a motivace diplomové práce. Teoretický úvod, zahrnující rešerši postihující současný stav rozvoje Ramanovy optické aktivity aminokyselin, peptidů a proteinů, je součástí druhé kapitoly. ROA experiment, zpracování experimentálních dat a příprava vzorků jsou popsány ve třetí kapitole. Čtvrtá kapitola, ve které jsou uvedeny a diskutovány experimentální výsledky, je rozdělena na část zabývající se rozvojem experimentu (ověření spolehlivosti aparatury při měření biopolymerních vzorků a rozšíření měření do oblasti valenčních vodíkových vibrací) a na část věnující se studiu PPII konformace a disulfidových můstků. Dosažené výsledky jsou shrnuty v páté kapitole.

2 Teoretický úvod

2.1 Využití metod vibrační spektroskopie při studiu proteinů

Stanovení struktury a funkce proteinů patří mezi základní úlohy současné biochemie a molekulární biologie. Mezi základní techniky strukturní biologie, které mohou poskytovat detailní informace o struktuře biomolekul s atomovým rozlišením, patří rentgenová krystalografie a nukleární magnetická rezonance. Tyto metody však mají v případě studia biomolekul i některá omezení. Rentgenovou strukturní analýzu je možné aplikovat pouze na proteiny, které se podařilo krystalizovat. Získání kvalitních monokrystalických vzorků však může být problematické (např. u membránových proteinů) a není zaručeno, že krystalická struktura přesně odpovídá struktuře molekuly v roztoku. Pomocí rentgenové difrakce navíc není možné jednoznačně určit např. pozice vodíkových atomů, systémy vodíkových vazeb, van der Waalsovy nebo mezimolekulární elektrostatické interakce. Nukleární magnetická rezonance sice umožňuje studovat struktury v roztocích, je ale do značné míry limitována velikostí zkoumaných molekul (obvykle se omezuje na biopolymery menší než cca 50 kDa) (Siebert a kol., 2007).

Vhodnou alternativu představují metody vibrační spektroskopie. Mezi hlavní přínosy vibrační spektroskopie patří citlivost ke strukturním detailům, nedestruktivnost a možnost studovat molekuly ve vodných roztocích. Vibrační spektroskopie navíc není omezena velikostí studovaných systémů a lze ji aplikovat jak na malé molekuly, tak na komplexní biomolekulární systémy.

2.1.1 Metody vibrační spektroskopie

Vibrační spektroskopie je tvořena dvěma komplementárními metodami – infračervenou (IČ) a Ramanovou spektroskopií. Princip infračervené spektroskopie spočívá v absorpci infračerveného záření při průchodu vzorkem, při které dochází k přechodům mezi vibračními energetickými hladinami molekuly. V dnešní době se

IČ spektroskopie hojně využívá, měřicí aparatury jsou komerčně dostupné a snadno obsluhovatelné. Je to nedestruktivní technika a lze ji aplikovat jak na roztoky, tak na látky pevné (krystaly, prášky, skla) nebo polotuhé (gely, emulze) (Prosser a kol., 1989). Hlavní nevýhodou metody v případě měření ve vodných roztocích je silná absorpce vody v infračervené oblasti; odečet signálu vody je obtížný a může vést k chybám při určování struktury na základě analýzy spekter.

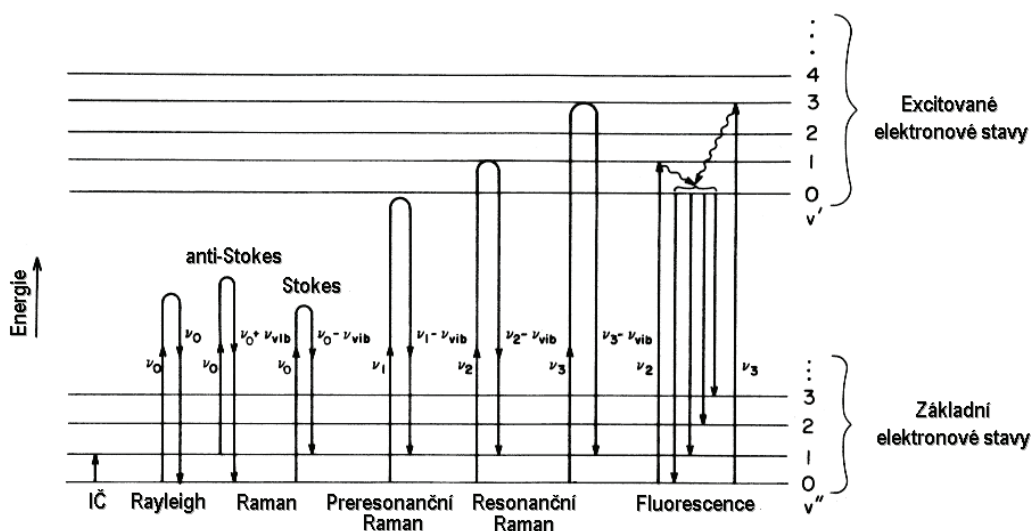
Ramanova spektroskopie je technika založená na Ramanově rozptylu. Podstatou Ramanova rozptylu je zářivý přechod mezi dvěma stacionárními stavy (1 a 2) molekuly, způsobený interakcí s elektromagnetickým zářením o frekvenci

$$\nu_0 \gg \frac{E_2 - E_1}{h}, \quad (2.1)$$

kde E_1 a E_2 jsou energie stacionárních stavů 1 a 2 ($E_2 > E_1$) a h Planckova konstanta (1 a 2 jsou zpravidla vibrační hladiny základního elektronového stavu). Ramanův rozptyl je dvoufotonový proces, při kterém dochází k anihilaci dopadajícího fotonu o energii $h\nu_0$; současně vzniká rozptýlený foton o energii

$$h\nu_R = h\nu_0 \mp (E_2 - E_1), \quad (2.2)$$

kde znaménko $-$ odpovídá přechodu $1 \rightarrow 2$ (Stokesův rozptyl) a znaménko $+$ přechodu $2 \rightarrow 1$ (anti-Stokesův rozptyl). Ramanův rozptyl je tedy neelastický – energie rozptýleného záření je odlišná od energie dopadajícího záření a její úbytek nebo naopak nárůst odpovídá přechodům mezi vibračními stavy molekuly. Schéma přechodů mezi energetickými hladinami pro infračervenou absorpci a Ramanův rozptyl (ve srovnání s pružným Rayleighovým rozptylem a fluorescencí) je znázorněno na obr. 2.1.



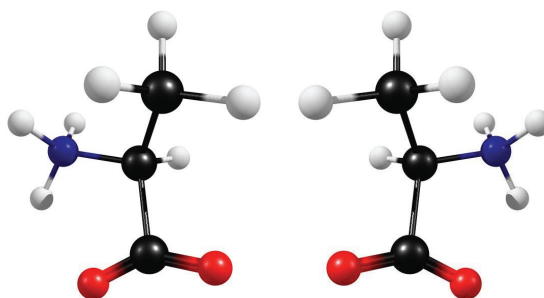
Obr. 2.1: Schéma přechodů mezi energetickými hladinami pro infračervenou absorpci, Rayleighův rozptyl, Ramanův rozptyl a fluorescenci.

Zatímco intenzita absorpčního přechodu v infračerveném spektru odpovídá změně dipólového momentu molekuly při pohybu jader v daném normálním vibračním módu, v případě Ramanových spekter souvisí intenzita Ramanových přechodů se změnou polarizovatelnosti v daném vibračním módu. Pro molekuly se středem symetrie tedy platí, že u žádného normálního vibračního módu není současně povolen přechod v absorpčním i nerezonančním Ramanově spektru (tzv. alternativní zákaz).

Mezi hlavní nevýhody Ramanova rozptylu patří slabá intenzita signálu (neelasticky je rozptýlen přibližně jen jeden foton z milionu). Je proto nutné používat relativně vysoké koncentrace vzorků (typicky $> 10^{-2}$ M). Naopak velkou výhodou oproti IČ spektroskopii je slabý signál vody v Ramanově spektru.

2.1.2 Optická aktivita

Informaci, kterou poskytují konvenční techniky vibrační spektroskopie, lze podstatně rozšířit využitím chiroptických (enantiomerně selektivních) metod. Ty lze aplikovat na chirální molekuly (tj. molekuly, které nejsou identické se svými zrcadlovými obrazy). Molekuly téže látky, které jsou vzájemně se nepřekrývajícími zrcadlovými obrazy, se nazývají enantiomery (viz obr. 2.2). Fyzikálně a chemicky jsou rozlišitelné pouze chirálně selektivními metodami, například interakcí s kruhově polarizovaným zářením.



Obr. 2.2: Dva enantiomery nejjednodušší chirální aminokyseliny – alaninu (vlevo L-forma, vpravo D-forma)

Chiralita je charakteristická pro většinu biologicky významných molekul. Chiralitu nukleových kyselin vytvářejí cukerné složky (D-deoxyribóza nebo D-ribóza), v peptidech a proteinech zajišťují chiralitu L-aminokyseliny (kromě nejjednodušší aminokyseliny – glycinu, který není chirální).

Fyzikálně významnou vlastností chirálních molekul je optická aktivita – tj. schopnost stáčet rovinu polarizovaného světla. Enantiomery rozlišujeme podle toho, zda stáčejí rovinu lineárně polarizovaného světla z pohledu pozorovatele ve směru nebo proti směru hodinových ručiček. Pravotočivost (ve směru hodinových ručiček) vyjadřuje znaménko +, levotočivost (proti směru hodinových ručiček) znaménko –.

Chiroptické metody (metody optické aktivity, OA) využívají rozdílu v odezvě chirálních molekul na pravo- a levotočivě kruhově polarizované záření. Patří mezi ně např. elektronový cirkulární dichroismus (ECD), optická rotační disperze (ORD), cirkulárně polarizovaná luminiscence či metody vibrační optické aktivity (VOA). VOA tvoří dvě komplementární metody – vibrační cirkulární dichroismus (VCD), měřící rozdíl v absorpci levo- a pravotočivě kruhově polarizovaného záření v infračervené oblasti, a Ramanova optická aktivita (ROA), měřící rozdíl v intenzitě Ramanova rozptylu pravo- a levotočivě kruhově polarizovaného záření. Hlavním přínosem metod VOA je vysoká citlivost k třírozměrné struktuře i ke konformačním detailům studovaných molekul.

2.2 Ramanova optická aktivita

Podstata rozptylového mechanismu zodpovědného za ROA byla objevena na konci 60. let 20. století Atkinsem a Barronem (1969). Na základě obecné teorie polarizačních vlastností Rayleighova a Ramanova rozptylu bylo odvozeno, že v záření rozptýleném na chirálních molekulách je obsažena slabá složka s kruhovou polarizací a že intenzita rozptýleného záření je nepatrně rozdílná pro pravo- a levotočivě kruhově polarizované dopadající záření. Právě tento objev vedl ke vzniku metody ROA, spočívající v měření rozdílné odezvy chirálních molekul na pravotočivě a levotočivě kruhově polarizované záření.

Barron a Buckingham (1971) zavedli v teorii ROA bezrozměrnou veličinu – diferenční cirkulární intenzitu Δ (CID, circular intensity difference), definovanou jako poměr ROA a Ramanova signálu vztahem:

$$\Delta = \frac{I^R - I^L}{I^R + I^L}, \quad (2.1)$$

kteřou lze stanovit experimentálně ze změřených intenzit I^R a I^L rozptylu pro pravo- a levotočivě kruhově polarizované budící záření. Veličina Δ nabývá velmi malých hodnot, maximálně v řádu 10^{-3} .

Při popisu ROA je třeba vyjít za rámec běžné dipólové aproximace a do výpočtů zahrnout kromě indukovaného elektrického dipólu (který je dostačující pro popis Ramanova rozptylu) také indukovaný magnetický dipól a elektrický kvadrupól. Veličinu Δ lze pro různé geometrie rozptylu odvodit v semiklasickém přiblížení, vyjádříme-li vektory elektrického dipólového, magnetického dipólového a elektrického kvadrupólového momentu indukované dopadající světelnou vlnou a přímo spočítáme rozdíl cirkulárních intenzit $I^R - I^L$ a jejich součet $I^R + I^L$. V obecných výrazech pro ROA tak kromě tenzoru elektrické dipól – dipólové polarizovatelnosti ($\alpha_{\alpha\beta}$) vystupují tenzory elektrické dipólové – magnetické dipólové polarizovatelnosti ($G'_{\alpha\beta}$) a elektrické dipólové – elektrické kvadrupólové polarizovatelnosti ($A_{\alpha\beta\gamma}$). U izotropních vzorků se provádí středování přes všechny možné orientace molekul a od složek tenzorů se přechází k jejich invariantům. Zatímco pro Ramanův rozptyl jsou invarianty pouze tři (izotropní α , anizotropní $\beta(\alpha)^2$ a antisymetrický δ^2 invariant tenzoru polarizovatelnosti $\alpha_{\alpha\beta}$), ROA invariantů je celkem deset. V nerezonanční aproximaci (energie budícího záření podstatně menší než energie elektronových absorpčních přechodů) však zůstává nenulových pouze pět z nich (2 pro Ramanův rozptyl a 3 pro ROA) – izotropní invarianty α , G' :

$$\alpha = \frac{1}{3} \alpha_{\alpha\alpha}, \quad G' = \frac{1}{3} G'_{\alpha\alpha} \quad (2.2)$$

a anizotropní invarianty $\beta(\alpha)^2$, $\beta(G')^2$, $\beta(A)^2$:

$$\beta(\alpha)^2 = \frac{1}{2} (3\alpha_{\alpha\beta}\alpha_{\alpha\beta} - \alpha_{\alpha\alpha}\alpha_{\beta\beta}), \quad (2.3)$$

$$\beta(G')^2 = \frac{1}{2} (3\alpha_{\alpha\beta}G'_{\alpha\beta} - \alpha_{\alpha\alpha}G'_{\beta\beta}), \quad (2.4)$$

$$\beta(A)^2 = \frac{1}{2} \omega \alpha_{\alpha\beta} \varepsilon_{\alpha\gamma\delta} A_{\gamma\delta\beta}. \quad (2.5)$$

V případě experimentu využívajícího geometrie přímého, resp. zpětného rozptylu (úhel mezi směrem dopadajícího a rozptýleného záření 0° , resp. 180°) a ICP (incident circular polarization) modulačního schématu (dopadající záření je kruhově polarizované) lze veličinu Δ vyjádřit pomocí invariantů tenzorů rozptylu ve tvaru (Barron, 2004b):

$$\Delta(0^\circ) = \frac{4[45\alpha G' + \beta(G')^2 - \beta(A)^2]}{c[45\alpha^2 + 7\beta(\alpha)^2]}, \quad (2.6a)$$

$$\Delta(180^\circ) = \frac{24[\beta(G')^2 + \frac{1}{3}\beta(A)^2]}{c[45\alpha^2 + 7\beta(\alpha)^2]}. \quad (2.6b)$$

ROA jako metoda vibrační optické aktivity poskytuje mnohem detailnější stereochemickou informaci než běžně používaná chiroptická technika elektronového cirkulárního dichroismu (ECD), studující elektronové přechody (vibrační spektrum je „bohatší“ na jednotlivé pásy, neboť každá nelineární molekula o N atomech má $3N - 6$ normálních vibračních módů). Zatímco ECD popisuje molekulu spíše jako celek, ve spektrech ROA jsou obsaženy informace o konformačních detailech molekulární struktury. Každému pásu vibračního Ramanova spektra může příslušet pás v ROA spektru, přičemž znaménko a velikost ROA pásu vypovídají o stereochemii (včetně absolutní chiralidy) té části molekulárního skeletu, která se účastní odpovídající normální vibrace (Barron a kol., 2004a).

Metodu ROA lze s úspěchem použít tam, kde selhává komplementární metoda vibrační optické aktivity – VCD. Zatímco VCD se obvykle měří v oblasti od 800 cm^{-1} výše (spektrální omezení je dáno materiálem optických elementů) a v případě vodných roztoků až od $\sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ (pro měření ve vodných roztocích se používají obvykle CaF_2 kyvety s oblastí propustnosti $\sim 1250\text{--}50000 \text{ cm}^{-1}$), ROA běžně umožňuje měřit vibrační spektra již od 100 cm^{-1} . Na rozdíl od VCD lze navíc pomocí ROA díky slabému signálu vody v měřené oblasti studovat biomolekuly v jejich přirozeném prostředí – ve vodném roztoku.

Metoda ROA je velmi citlivá k dynamice molekulárních struktur. Vzhledem k tomu, že časová škála události Ramanova rozptylu (10^{-14} s) je mnohem kratší než kterékoliv konformační změny v molekule, představuje ROA spektrum superpozici příspěvků od všech konformací, které jsou ve vzorku přítomny. Pokud při konformačních změnách, kterými procházejí flexibilní části molekuly, vznikají struktury s „opačnou“ chiralitou, jejich příspěvky se v ROA spektru vyruší (na rozdíl od Ramanova spektra, ve kterém se tyto příspěvky sčítají). Nejintenzivnější ROA signál tedy pochází od nejrigidnějších částí molekuly (Barron a kol., 2000).

Přestože je Ramanova optická aktivita unikátní metoda s velkým aplikačním potenciálem, nejedná se dosud o běžně používanou techniku. Metoda je náročná jak

teoreticky, tak experimentálně, a systematicky ji používá a rozvíjí pouze několik málo laboratoří na světě.

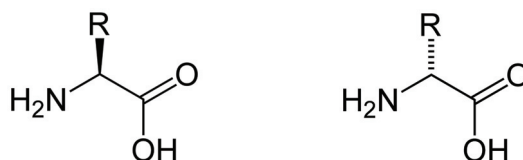
Mezi základní aplikace ROA spektroskopie patří určování absolutní konfigurace opticky aktivních molekul v roztoku (Haesler a kol., 2007), měření enantiomerního přebytku (definovaného jako přebytečné množství jednoho enantiomeru nad druhým, vztažené k celkovému množství obou enantiomerů ve vzorku), (Hecht a kol., 1995) a studium struktury biomolekul v roztoku (Barron, 2004a). Nevýhodou a určitým omezením je však požadavek na vysoké koncentrace vzorků.

2.2.1 Ramanova optická aktivita aminokyselin, peptidů a proteinů

Aminokyseliny

Proteiny v biologických systémech jsou až na několik výjimek sestaveny z 20 (resp. 21) druhů α -aminokyselin (tzv. biogenní aminokyseliny). Vzhledem k hodnotám disociačních konstant karboxylové skupiny ($pK_1 \sim 2,2$) a aminoskupiny ($pK_2 \sim 9-9,8$) se aminokyseliny za fyziologických podmínek ($pH \sim 7$) vyskytují obvykle ve formě podvojných iontů (tzv. amfiontů), nesoucích jak kladný (NH_3^+), tak záporný (COO^-) náboj.

Obecná struktura biogenních α -aminokyselin je znázorněna na obr. 2.3. Pro popis stereoizomerie aminokyselin je důležitý atom uhlíku C_α , který tvoří chirální centrum u všech základních aminokyselin (kromě nejjednoduššího glycinu, který má na atom C_α navázány dva atomy vodíku). U většiny organismů mají chirální aminokyseliny v proteinech L-konfiguraci, D-aminokyseliny se v přírodě vyskytují jen velmi zřídka (např. v bakteriálních peptidech nebo proteinech).



Obr. 2.3: Obecná struktura biogenních aminokyselin (vlevo L-forma, vpravo D-forma)

Díky komplexnosti ROA techniky je pro pochopení složitějších celků, jako jsou peptidy a proteiny, nutné začít od jednoduše interpretovatelných systémů;

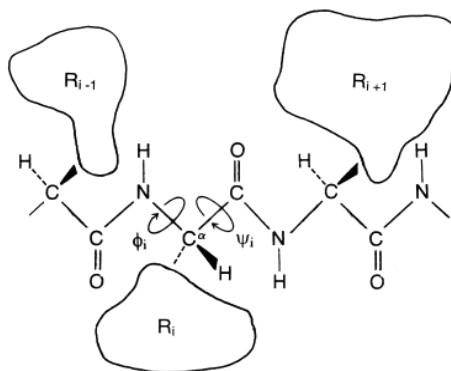
vhodný modelový objekt představují právě aminokyseliny. Aminokyseliny tvoří základní stavební jednotky peptidů a proteinů a jejich pořadí v peptidovém řetězci do značné míry určuje sekundární a terciární strukturu proteinu v roztoku. ROA studie aminokyselin jsou pro výzkum struktury a konformace peptidů a proteinů důležité, uvážíme-li, že při vzniku ROA signálu se uplatňují především krátkodosahové interakce (Gargaro a kol., 1993). Aminokyselinám se pro jejich biologický význam a také díky relativní jednoduchosti molekul věnuje řada experimentálních i teoretických prací.

Vhodný model pro ROA studie představuje nejjednodušší chirální aminokyselina, L-alanin. ROA spektra L-alaninu v rozsahu vlnočtů cca 600–1600 cm^{-1} lze nalézt například v pracích Barrona a kol. (1991, 1992) či Yu a kol. (1995); v práci Kapitána a kol. (2006b) je měřená spektrální oblast rozšířena až do 100 cm^{-1} . Teoretickými studii L-alaninu v závislosti na použitém modelu rozpouštědla se zabývá například Jalkanen a kol. (2001), vliv konformační flexibility L-alaninu na ROA spektra je diskutován v práci Kapitána a kol. (2006b).

Kromě publikací týkajících se alaninu lze nalézt práce věnující se například L-serinu, L-cysteinu, L-valinu, L-threoninu a L-isoleucinu (Gargaro a kol., 1993), L-histidinu (Deplazes a kol., 2008) nebo L-prolinu (Kapitán a kol., 2006c).

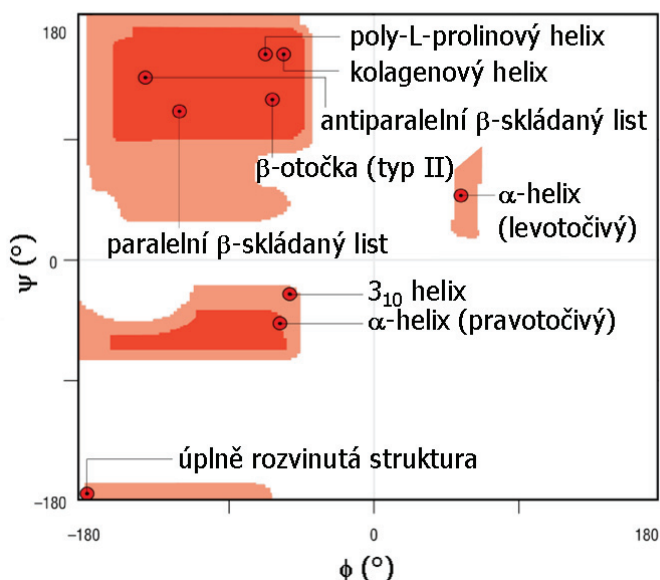
Peptidy a proteiny

Peptidy a proteiny vznikají spojováním aminokyselin do řetězců. Amidová vazba CO–NH mezi dvěma aminokyselinovými zbytky vzniká reakcí karboxylové skupiny a aminoskupiny dvou sousedních aminokyselin (za současného odštěpení vody). Jedná se o specifickou vazbu, která má v důsledku svého rezonančního charakteru (ze zhruba 40% charakter dvojné vazby) rigidní, víceméně planární strukturu. Až na několik výjimek zaujímá *trans* konformaci (torzní úhel O=C–N–H = 180°). Konformace *trans* je energeticky stabilnější než *cis* ($\omega = 0^\circ$) kvůli sterickému bránění. Konformace *cis* je stabilní pouze u prolinu. Schéma úseku peptidového řetězce znázorňuje obr. 2.4.



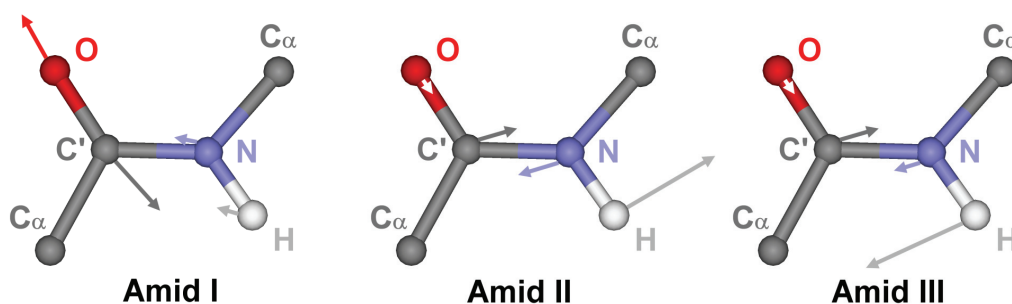
Obr. 2.4: Schéma úseku peptidového řetězce. ϕ_i a ψ_i jsou torzní úhly kolem vyznačených vazeb a R_i postranní řetězce aminokyselinových reziduí (převzato z Barron a kol., 2000).

Prostorové uspořádání hlavního řetězce (typ sekundární struktury) určuje konformace torzního úhlu ϕ (úhel rotace kolem vazby $N-C_\alpha$) vůči ψ (úhel rotace kolem $C_\alpha-C'$). Úhly ϕ a ψ nemohou v důsledku sterického bránění mezi hlavním a postranními řetězci nabývat libovolných hodnot (výjimkou je pouze glycin, jehož postranní řetězec obsahuje jediný atom vodíku; glycin tak tvoří nejflexibilnější bod řetězce a úhly ϕ a ψ mohou nabývat i hodnot, které jsou pro jiné aminokyseliny zakázané). Energetickou mapu dovolených a zakázaných oblastí v závislosti na velikosti úhlů ϕ a ψ graficky znázorňuje Ramachandranův diagram (viz obr. 2.5).



Obr. 2.5: Ramachandranův diagram, znázorňující stericky dovolené a zakázané oblasti v konformačním prostoru proteinů (s výjimkou glycinu). Červeně jsou vyznačeny dovolené oblasti, tmavě červeně energetická minima (nejpravděpodobnější oblasti) a bíle zakázané oblasti. Přepracováno z Petsko a Ringe (2004).

ROA spektrum peptidů a proteinů obvykle dominují pásy spjaté s vibracemi hlavního peptidového řetězce, neboť právě ten představuje nejrigidnější a chirální část celé struktury. Mezi základní vibrační módy amidové vazby patří vibrace označované jako amid I, II a III (viz obr. 2.6).



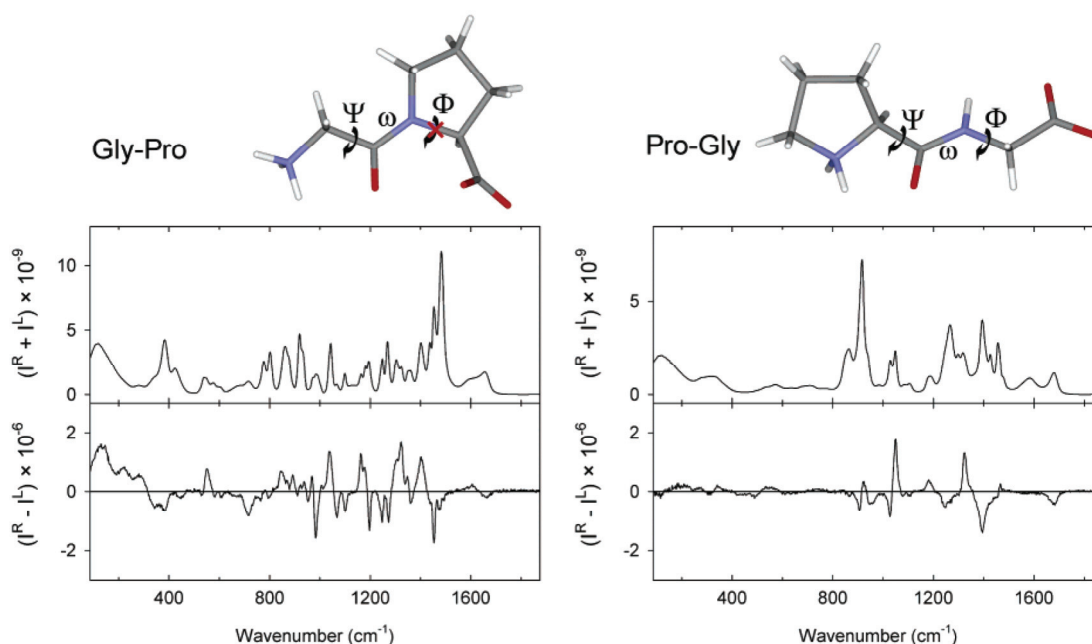
Obr. 2.6: Základní vibrační módy amidové vazby (převzato z Kapitán, 2006a).

Pro hlavní peptidový řetězec jsou charakteristické následující spektrální oblasti: oblast valenčních vibrací vazeb C α -C', C α -C β a C α -N (cca 870–1150 cm $^{-1}$), oblast amidu III (cca 1230–1310 cm $^{-1}$), daná kombinací rovinné N-H deformační vibrace a C α -N valenční vibrace, a oblast amidu I (cca 1630–1700 cm $^{-1}$), pocházející hlavně od valenčních vibrací karbonylu (C'=O). Pásky příslušející vibračnímu módu amidu II (C α -N valenční a rovinné N-H deformační vibrace) nejsou v nerezonančních Ramanových spektrech běžně pozorovatelné (neboť jsou velmi slabé a zpravidla překryté pásy od aromatických aminokyselin). Oblast amidu III se (vzhledem k nezanedbatelnému vlivu interakce mezi N-H a C α -H deformační vibrací) často rozšiřuje až ke 1340 cm $^{-1}$ (tzv. rozšířená oblast amidu III). Právě rozšířená oblast amidu III je pro ROA studie obzvláště významná, neboť ROA signál příslušející kombinovaným N-H a C α -H deformačním vibracím nejvíce vypovídá o geometrii hlavního řetězce (Barron a kol., 2000).

Signál pocházející od vibrací postranních řetězců, který je často v Ramanových spektrech dominantní, je obvykle v ROA spektrech velmi slabý; přesto i v ROA spektrech je možné nalézt pásy příslušející postranním řetězcům – např. ROA pás tryptofanu ~ 1550 cm $^{-1}$ (Blanch a kol., 2001).

Pro ROA spektroskopii představují vhodné modelové systémy v první řadě krátké oligopeptidové řetězce, u kterých je možné porovnávat experimentální data s teoretickými výpočty. V literatuře lze nalézt řadu experimentálních i teoretických

prací, které se zabývají ROA studii dipeptidů, jako je L-alanyl-L-alanin (např. Bouř a kol., 2001, Jalkanen a kol., 2004) a další. Zajímavou skupinu tvoří peptidy obsahující rezidua prolinu, který má konformační omezení. Vliv flexibility modelových dipeptidů obsahujících prolinové reziduum (rigidní H-Ala-Pro-OH vs. flexibilní H-Pro-Ala-OH a rigidní H-Gly-Pro-OH vs. flexibilní H-Pro-Gly-OH – viz obr. 2.7) na ROA spektra je zkoumán v publikaci Kapitána a kol. (2006b).



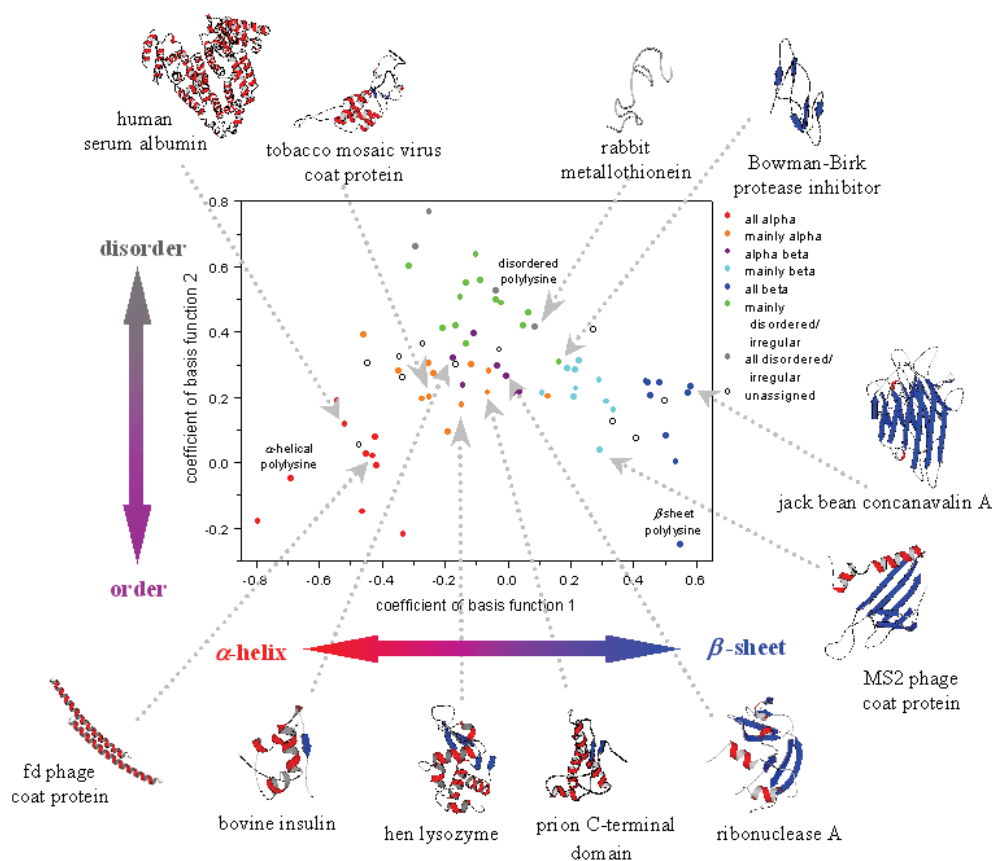
Obr. 2.7: Srovnání Ramanova a ROA spektra rigidního dipeptidu H-Gly-Pro-OH a flexibilního dipeptidu H-Pro-Gly-OH. Rigidita struktury H-Gly-Pro-OH je dána omezením rotace kolem vazby N-C_α (torzní úhel Φ) pětičlenným kruhem prolinu. U flexibilního dipeptidu jsou pásy v Ramanově i ROA spektru rozšířené, ROA spektrum je navíc díky vyrušení signálu od různých konformerů „jednodušší“ než spektrum rigidního dipeptidu. Převzato z Kapitána a kol., 2006b.

Důležité modelové systémy, které se používají pro spektroskopickou identifikaci základních typů sekundární struktury v proteinech, představují některé polypeptidy, především poly(L-lysin) a poly(L-glutamová kyselina). Pro tyto molekuly je charakteristická dobře definovaná změna sekundární struktury v závislosti na teplotě a pH. Poly(L-Lys) v zásaditém a poly(L-Glu) v kyselém prostředí zaujímají díky neutrálním postranním řetězcům α-helikální strukturu (stabilizovanou intramolekulárními vodíkovými můstky), která je definovaná torzními úhly $\varphi \sim -55^\circ$ a $\psi \sim -50^\circ$ (počet reziduí na otáčku $\sim 3,6$, výška závitů $\sim 0,54$ nm). V opačném případě – poly(L-Lys) v kyselém a neutrálním prostředí a poly(L-Glu) v neutrálním a zásaditém prostředí – zaujímají tyto polypeptidy díky nabitým postranním řetězcům, které se navzájem odpuzují, strukturu levotočivého poly-L-

prolinového helixu (PPII), charakterizovanou torzními úhly $\varphi \sim -75^\circ$ a $\psi \sim +150^\circ$ (na jednu otočku připadají 3 rezidua, výška závitů $\sim 0,94$ nm). PPII helix je považován za důležitý strukturní prvek tzv. neuspořádané („random coil“) struktury (viz např. Krimm a Mark, 1968, Tiffany a Krimm, 1968, Dukor a Keiderling, 1991). Vedle neuspořádaných polypeptidů obsahuje alespoň jeden krátký segment PPII helixu také většina proteinů ve vodných roztocích (nejčastěji je součástí delších smyček, které spojují segmenty sekundární struktury; Adzhubei a Sternberg, 1993). Na rozdíl od běžných typů sekundárních struktur (α -helix nebo β -skládaný list) není PPII helix stabilizován intramolekulárními vodíkovými vazbami, ale interakcí hlavního řetězce s molekulami rozpouštědla (vody) a postranními řetězci (Creamer a Campbell, 2002).

ROA spektra poly(L-Lys) a poly(L-Glu) při kyselém a zásaditém pH lze nalézt např. v práci Barrona a kol. (2000), studiem přechodu z α -helikální do neuspořádané struktury pomocí ROA se zabývá práce Ashton a kol. (2007). Byla rovněž publikována ROA spektra poly(L-Lys) v konformaci β -skládaného listu, které lze dosáhnout při vysokém pH a teplotně indukovaným přechodem (McColl a kol., 2003). Polypeptidem poly(L-prolin), který je vedle poly(L-Glu) a poly(L-Lys) typickým představitelem PPII konformace, se zabývá ROA studie Kapitána a kol. (2006d).

Metodu ROA lze s úspěchem aplikovat i na studium proteinů. V případě ROA spekter takto složitých biomolekul sice zatím není možné provádět detailní teoretické výpočty, cenné strukturní informace lze ale získat z experimentálních ROA dat. Pásky v ROA spektrech proteinů dávají informaci o prvcích regulární sekundární struktury (α -helixu, β -skládaném listu a dalších) a díky ROA signálu smyček spojujících regulární struktury mohou navíc poskytnout informace o terciární struktuře (Barron a kol., 2004a). Interpretace ROA spekter proteinů se může provádět buď empiricky (např. na základě porovnávání ROA spekter proteinů o známé struktuře s ROA spektry polypeptidů v modelových konformacích) nebo s využitím statistických metod (např. analýzy hlavní komponenty – PCA, viz obr. 2.8), které umožňují rozlišit různé strukturní typy proteinů z charakteristických rysů v ROA spektrech.



Obr. 2.8: Závislost dvou nejvýznamnějších koeficientů z analýzy hlavní komponenty pro soubor 75 ROA spekter polypeptidů a proteinů. Koeficient 1 popisuje přechod od α -helikálních struktur ke strukturám s převažujícím obsahem β -skládaného listu, koeficient 2 znázorňuje přechod od neuspořádaných struktur k uspořádaným strukturám. Převzato z Blanch a kol. (2004).

ROA spektra proteinů s různým zastoupením základních typů sekundárních struktur jsou znázorněna na obr 2.9 (Zhu a kol., 2005). Typickým představitelem proteinů s vysokým podílem α -helixu je albumin z lidského séra (obr. 2.9A, podle PDB – Protein Data Bank: 69,2% α -helix, 0,0% β -skládaný list). V ROA spektrech tohoto proteinu lze nalézt podobné spektrální rysy jako u poly(L-Lys) v α -helikální konformaci (Zhu a kol., 2005). Za charakteristické znaky α -helixu v ROA spektrech je považován např. dublet v oblasti amidu I (negativní pás $\sim 1638\text{ cm}^{-1}$ a pozitivní pás $\sim 1662\text{ cm}^{-1}$), pozitivní pás v rozšířené oblasti amidu III $\sim 1345\text{ cm}^{-1}$ (v případě hydratované formy α -helixu) nebo $\sim 1310\text{ cm}^{-1}$ (v případě nehydratovaného α -helixu, Barron, 2000) a dále pozitivní pásy v oblasti $\sim 870\text{--}950\text{ cm}^{-1}$ (Barron, 2002).

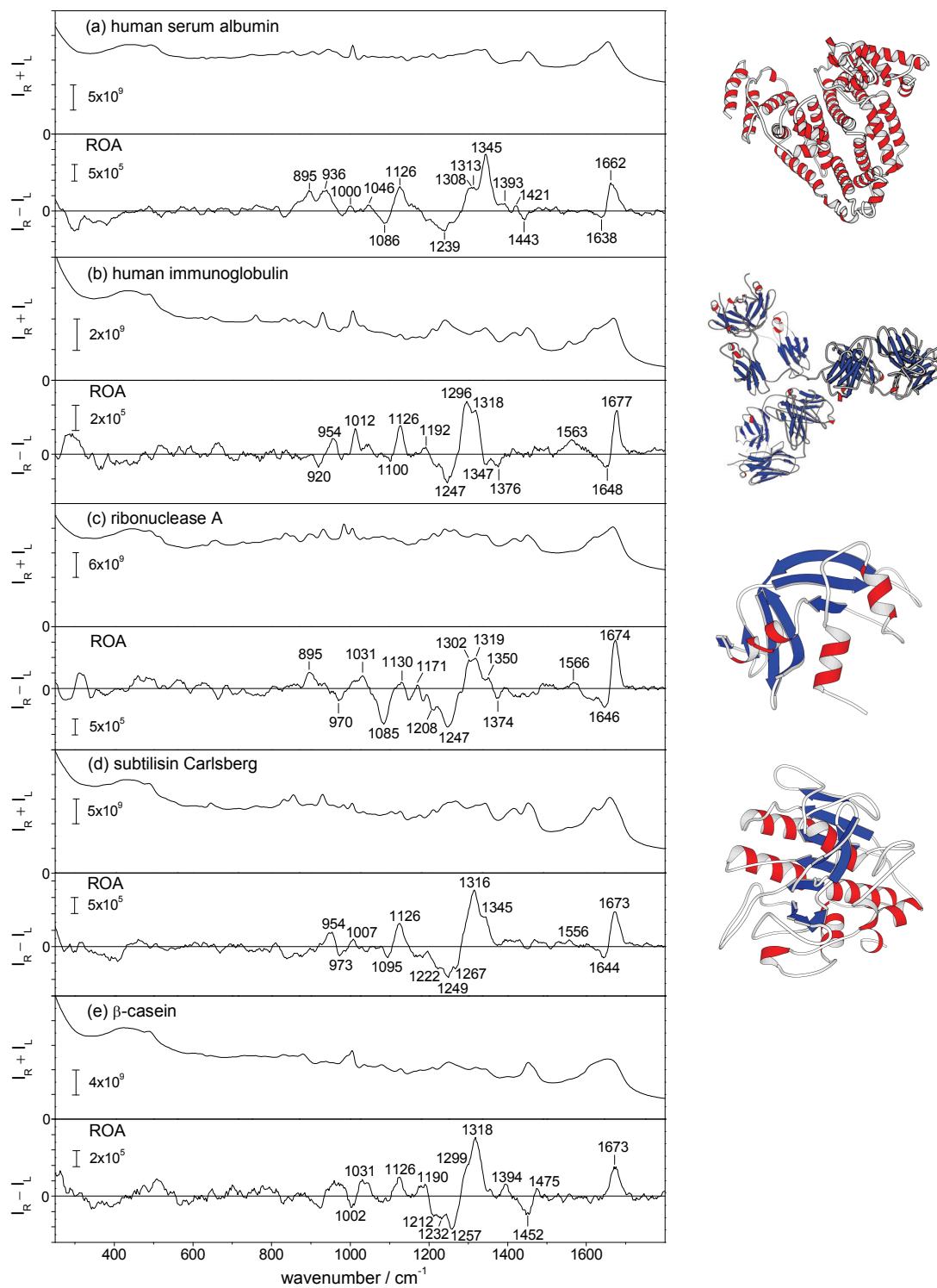
Lidský imunoglobulin G je zástupcem proteinů s vysokým obsahem β -skládaného listu (viz obr. 2.9B, podle PDB 43,0% β -skládaný list a 3,0% α -helix). Jeho ROA spektra mají podobné spektrální rysy jako spektra poly(L-Lys) v konformaci β -skládaného listu. Pozorované rozdíly (zejména v oblasti amidu I a

amidu III) jsou důsledkem ideální uspořádanosti modelového polypeptidu ve srovnání se studovaným proteinem (McColl a kol., 2003). Pro strukturu β -skládaného listu je typický dublet v oblasti amidu I, který lze snadno rozlišit od dubletu charakteristického pro α -helix, protože je posunut o $\sim 10 \text{ cm}^{-1}$ směrem k vyšším vlnočtům (negativní pás $\sim 1648 \text{ cm}^{-1}$ a pozitivní pás $\sim 1677 \text{ cm}^{-1}$). Ostrý negativní pás v oblasti $\sim 1247 \text{ cm}^{-1}$ odpovídá pravděpodobně β -struktúře v hydrofobním prostředí, hydratované formě pravděpodobně přísluší negativní pás $\sim 1220 \text{ cm}^{-1}$, který lze nalézt např. u poly(L-Lys), (McColl a kol., 2003).

V ROA spektrech $\alpha + \beta$ proteinu hovězí ribonukleázy A (obr. 2.9C, podle PDB 17,7% α -helix, 34,7% β -skládaný list) a α/β proteinu subtilisinu Carlsberg (obr. 2.9D, podle PDB 29,6% α -helix, 17,2% β -skládaný list) lze nalézt pásy charakteristické pro strukturu α -helixu i β -skládaného listu.

Hovězí β -kasein (obr. 2.9E) je zástupcem proteinu s tzv. neuspořádanou (random coil) strukturou. ROA spektrum je podobné spektru poly(L-Lys) v PPII konformaci (to je ve shodě s předpokladem, že neuspořádanou strukturu tvoří převážně krátké segmenty PPII helixu). Pro PPII konformaci je charakteristický pozitivní pás v oblasti rozšířeného amidu III $\sim 1318 \text{ cm}^{-1}$ (v případě struktur obsahujících neprolinová rezidua) a slabý pozitivní pás v oblasti amidu I $\sim 1673 \text{ cm}^{-1}$ (McColl a kol., 2003). U PPII struktur bohatých na prolin je pozitivní pás v oblasti amidu I posunut k nižším vlnočtům $\sim 1630 \text{ cm}^{-1}$ (Kapitán a kol., 2006d).

Jak již bylo uvedeno, v ROA spektrech lze pozorovat i signál pocházející od smyček – díky tomu je možné získat informace o strukturních motivech nebo dokonce o sbalení (folding) proteinu. β -smyčkám lze přiřadit pozitivní pás $\sim 1296 \text{ cm}^{-1}$ a negativní pásy $\sim 1347 \text{ cm}^{-1}$ a $\sim 1376 \text{ cm}^{-1}$. Právě signál příslušející β -smyčkám umožňuje rozlišit $\alpha+\beta$ a α/β strukturu (McColl a kol., 2003; β -smyčky obvykle spojují antiparalelní β -skládané listy a jsou tedy zastoupeny převážně v β a $\alpha+\beta$ proteinech).

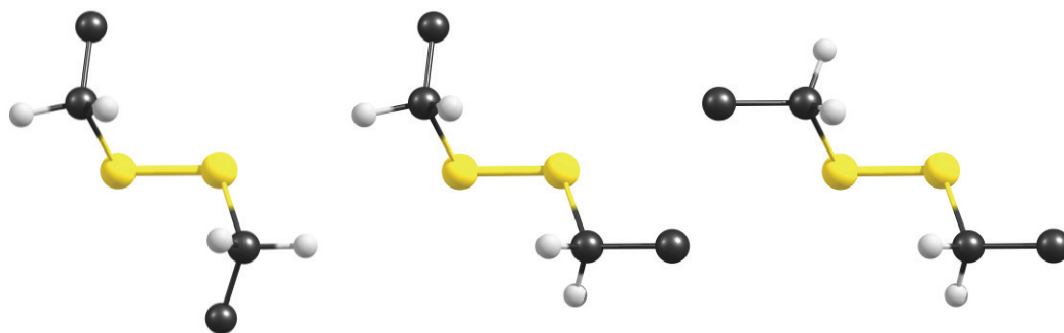


Obr. 2.9: Ramanova a ROA spektra albuminu z lidského séra (A), lidského imunoglobulinu G (B), hovězí ribonukleázy A (C), subtilisinu Carlsberg (D), a hovězího β -kaseinu (E). Převzato z práce Zhu a kol., 2005.

Disulfidové můstky

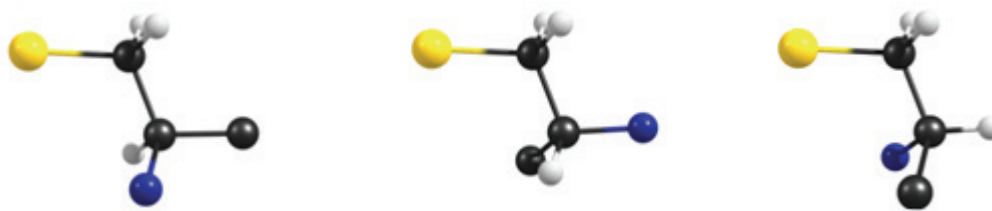
Strukturně významným prvkem peptidů a proteinů jsou disulfidové (S–S) můstky, které vznikají oxidací SH skupin dvou prostorově blízkých cysteinových reziduí. Úlohou S–S můstků je především stabilizace trojrozměrné struktury. V některých proteinech spojují S–S můstky rozdílné peptidové řetězce (např. insulin), mohou však stabilizovat i jediný polypeptidový řetězec (funkce ochrany před degradací molekuly).

Přestože hodnota dihedrálního úhlu $C_{\beta}\text{--S--S--}C_{\beta}$ (χ_{S-S}) je obvykle přibližně $+90^{\circ}$ nebo -90° (energeticky nejvýhodnější konformace), není struktura S–S můstku rigidní. Konformační flexibilitu zajišťuje rotace kolem $C_{\beta}\text{--S}$ vazeb (dihedrál ní úhel $C_{\alpha}\text{--}C_{\beta}\text{--S--S}$). Při dihedrálním úhlu $\chi_{S-S} \sim 90^{\circ}$ může fragment $C_{\alpha}\text{--}C_{\beta}\text{--S--S--}C_{\beta}\text{--}C_{\alpha}$ zaujímat tři základní konformace, označené jako GGG, GGT, TGT (viz obr. 2.10). Počáteční a koncové symboly G, resp. T určují, v jaké pozici je atom C_{α} vůči vzdálenějšímu atomu S (*gauche*, resp. *trans*), prostřední G standardně označuje konformaci dihedrálního úhlu χ_{S-S} jako *gauche* (přesto, že se jeho velikost blíží 90°). Energeticky nejvýhodnější je konformace GGG (nejnižší vypočítaná volná energie), nejméně výhodná je naopak konformace TGT.



Obr. 2.10: Tři základní konformace fragmentu $C_{\alpha}\text{--}C_{\beta}H_2\text{--S--S--}C_{\beta}H_2\text{--}C_{\alpha}$ při centrálním dihedrálním úhlu $\sim 90^{\circ}$. Vlevo GGG, uprostřed GGT a vpravo TGT konformace.

Fragment $S\text{--}C_{\beta}\text{--}C_{\alpha}\text{--}C'$ může (v případě cystinu i cysteinu) zaujímat tři základní konformace, obvykle označované jako P_C , P_N a P_H (viz obr. 2.11; indexy určují, zda je v pozici *trans* vůči bližšímu atomu S atom C, N nebo H) (Havel, 1996).



Obř. 2.11: Tři základní konformace fragmentu $S-C_{\beta}H_2-C_{\alpha}HN-C$ vzniklé rotací kolem vazby $C_{\beta}-C_{\alpha}$. Vlevo P_C , uprostřed P_N a vpravo P_H konformace.

V Ramanových spektrech je signál příslušející C–S a S–S vibracím často intenzivní a dobře identifikovatelný. Pás valenční vibrace S–S se nachází v oblasti $490-550\text{ cm}^{-1}$, pás valenční vibrace C–S lze nalézt mezi $600-760\text{ cm}^{-1}$. Na základě polohy Ramanova pásu v oblasti S–S valenčních vibrací lze rozlišit různé konformace S–S můstku: konformaci GGG odpovídá vlnčet $\sim 510\text{ cm}^{-1}$, konformaci GGT přísluší vlnčet $\sim 525\text{ cm}^{-1}$, konformaci TGT vlnčet $\sim 540\text{ cm}^{-1}$. Frekvence valenčních C–S vibrací závisí na konformaci fragmentu S–C $_{\beta}$ –C $_{\alpha}$ –C, ale nezávisí na tom, zda je na atom síry navázána další síra (v případě cystinu), vodík (v cysteinu) nebo uhlík (v methioninu). Konformacím P_C a P_N odpovídá vlnčet C–S valenční vibrace v oblasti $700-745\text{ cm}^{-1}$ (v případě konformace P_N je vlnčet obvykle nižší než u P_C konformace), P_H konformaci obvykle přísluší signál v oblasti $630-670\text{ cm}^{-1}$ (Havel, 1996).

Vzhledem k chiralitě disulfidové vazby je vhodné použít pro studium S–S můstků chiroptické metody, které mohou (na rozdíl od klasických spektroskopických technik) poskytnout informace o smyslu torze C–S–S–C skupiny. Nejrozšířenější chiroptická technika, elektronový cirkulární dichroismus (ECD), má v případě studia disulfidových můstků jen omezenou využitelnost. Ve spektrech ECD je signál odpovídající disulfidovému chromoforu detegovatelný v blízké UV oblasti (mezi $200-350\text{ nm}$). V peptidech a proteinech je však jeho studium velmi obtížné, neboť v oblasti pod $\sim 280\text{ nm}$ dochází k překryvu s pásy amidů ($\sim 190-250\text{ nm}$), které představují majoritní chromofor proteinů, a aromatických chromoforů ($\sim 250-290\text{ nm}$) – jsou-li v sekvenci proteinu přítomny (signál aromatických chromoforů je však možné odlišit na základě tvaru a polohy pásů). Vzhledem k tomu, že relativní koncentrace S–S skupin vůči amidům je v peptidech a proteinech velmi nízká, je signál disulfidů málo intenzivní a v místech, kde dochází k překryvu s pásy amidů, není téměř detegovatelný. Dalším nepříznivým jevem je vykompenzování nejdélnějších CD pásů opačných znamének při dihedralním úhlu $\chi_{S-S} \pm 90^\circ$.

Vhodnou alternativu ECD mohou představovat metody vibrační optické aktivity (VOA). Ze dvou metod vibrační optické aktivity (VCD a ROA) se jako perspektivnější jeví ROA technika. Spektrální oblast, ve které se nacházejí význačné vibrace S–S a C–S vazby (pod 800 cm^{-1}) je totiž pro ROA (na rozdíl od VCD) poměrně dobře dostupná. Modelové *ab initio* výpočty pro jednoduché molekuly (H_2S_2 , CH_3SSCH_3) ukázaly, že S–S valenční vibrace umožňují jednoznačně určit smysl torze disulfidového můstku (Bednářová a kol., submitted) a lze předpokládat, že i v případě složitějších struktur mohou spektra ROA podávat o konformaci S–S můstků užitečné informace. Pomocí *ab initio* výpočtů byla ve studii Bednářové a kol. simulována také ROA spektra modelové molekuly $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{S}_2$. Výsledek studie ukazuje, že různým konformacím disulfidového můstku odpovídá rozdílný ROA signál v oblasti S–S valenčních vibrací a znaménko ROA pásu se mění v závislosti na tom, zda je dihedralní úhel $\chi_{\text{S-S}}$ kladný (pozitivní ROA signál) nebo záporný (negativní ROA signál).

V literatuře lze v současnosti najít jen několik experimentálních prací, které se zabývají studiem disulfidových můstků pomocí ROA. Zhu a kol. v práci z roku 2005 zmiňují slabý, ale reprodukovatelný signál v oblasti S–S valenčních vibrací ($500 - 550\text{ cm}^{-1}$), který přiřazují S–S můstkům. Nízká intenzita signálu může být podle nich způsobena geometrickým uspořádáním experimentu (geometrie zpětného rozptylu), při kterém v ROA (viz vztah 2.6b) dominuje anizotropní rozptyl, zatímco ROA signál disulfidů je generován především rozptylem izotropním. Pokud by tato úvaha byla správná, bylo by podle autorů možné dosáhnout lepších výsledků s použitím geometrie přímého rozptylu, kterému dominuje izotropní rozptyl (viz vztah 2.6a).

Rozbor ROA spekter několika modelových struktur obsahujících S–S můstky lze nalézt v pracích Kapitána a kol. (2005 a 2006e), zabývajících se ROA studií tzv. hinge peptidu (centrální části lidského imunoglobulinu IgG1). Na základě porovnání spekter (paralelního dimeru pentapeptidu Boc-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-NHCH₃ se dvěma S–S můstky, paralelního dimeru oktapeptidu H-Thr-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-OH se dvěma S–S můstky a jeho methioninového analogu – monomeru bez S–S můstků a tetrapeptidu (H-Gly-Cys-OH)₂ s jedním S–S můstkem) byl přiřazen pozitivní ROA signál s maximem v 655 cm^{-1} C–S valenční vibraci. ROA signál, který by odpovídal S–S valenční vibraci, však nebyl zatím jednoznačně identifikován.

3 Experimentální uspořádání, příprava vzorků a zpracování dat

3.1 ROA experiment

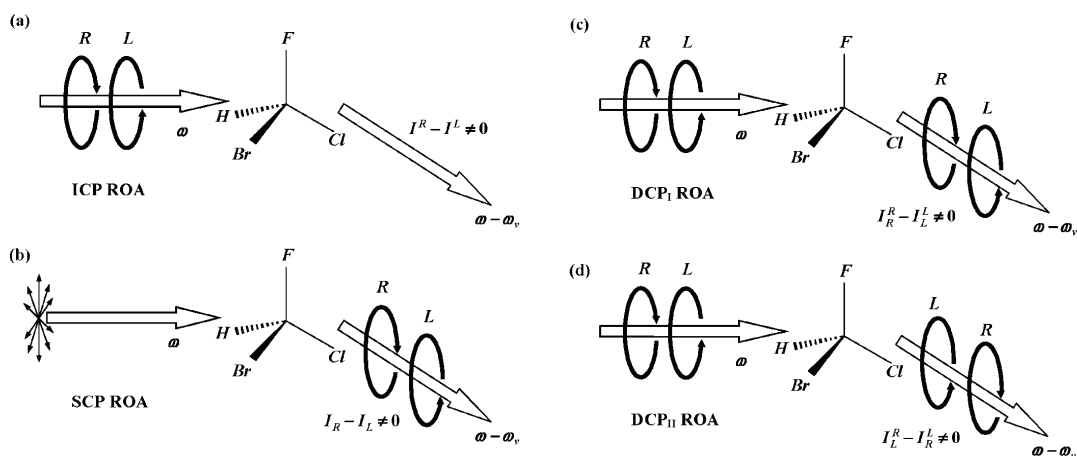
Realizace ROA experimentu je vzhledem k nízkým intenzitám ROA signálu a také díky náchylnosti experimentu ke vzniku artefaktů spojena s poměrně velkými technickými obtížemi. Přestože první ROA spektra byla publikována Barronem, Bogaardem a Buckinghamem už v roce 1973 (měření dvou enantiomerů 1-fenylethylaminu a 1-fenyletanolu v rozsahu vlnočtů $300\text{--}400\text{ cm}^{-1}$), k podstatnému rozvoji metody došlo až o téměř dvacet let později, především díky nahrazení skenovacích Ramanových spektrometrů s jednonálovou detekcí spektrometry s mnohonálovými CCD detektory (výrazné zkrácení doby měření, zvýšení poměru signál/šum). První komerční ROA spektrometr (*ChiralRAMAN*TM, BioTools, Inc.) byl uveden na trh v roce 2002 (<http://www.btools.com>).

Vzhledem k tomu, že je ROA, stejně jako VCD, spojena s přechody molekuly mezi dvojicí vibračních stavů, mohou být ROA spektra přímo srovnávána se spektry VCD, měřenými ve stejné spektrální oblasti. ROA je však dvoufotonový proces a díky tomu je metoda oproti VCD mnohem komplexnější, a to jak teoreticky, tak experimentálně (Nafie, 1995). K ROA experimentu je proto možné přistupovat různými způsoby – lze použít různé geometrie rozptylu i různá modulační schémata (lišící se podle způsobu měření diferenčního signálu).

Geometrie rozptylu je určena úhlem mezi směrem dopadajícího a rozptýleného záření. Ten může obecně nabývat hodnot v rozmezí $0\text{--}180^\circ$. V současnosti je nejpoužívanější geometrie zpětného rozptylu (úhel 180°), neboť v této geometrii je poměr ROA signálu k Ramanovu signálu maximální. Používá se ale i rozptyl pravoúhlý (úhel 90°) a přímý (úhel 0°).

Pro měření ROA lze použít jedno ze čtyř základních modulačních schémat (viz obr. 3.1). Metoda ICP (incident circular polarization) ROA spočívá v modulaci polarizace budícího záření, v případě SCP (scattered circular polarization) ROA je

budící záření buď lineárně polarizované, nebo nepolarizované a deteguje se rozdíl intenzit kruhově polarizovaných komponent v rozptýleném záření. Metody DCP_I, resp. DCP_{II} (dual circular polarization) ROA jsou kombinací ICP a SCP ROA (moduluje se polarizace budícího záření a detegují se kruhově polarizované složky v rozptýleném záření se shodným, resp. opačným smyslem kruhové polarizace).

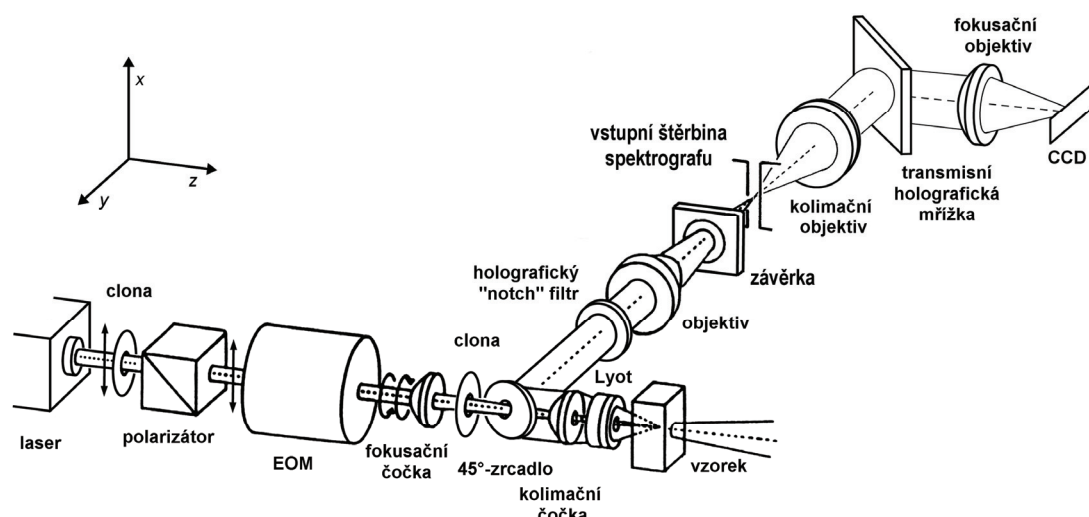


Obr. 3.1: Čtyři základní modulační schémata používaná pro měření ROA. Horní indexy R a L označují podle používané konvence pravotočivou a levotočivou kruhovou polarizaci dopadajícího záření, dolní indexy polarizaci rozptýleného záření.

ICP schéma využívá ROA spektrometr vybudovaný na Fyzikálním ústavu UK (Hanzlíková a kol., 1999), SCP modulaci používá komerční spektrometr firmy BioTools. Hlavní výhoda ROA spektrometru využívajícího SCP modulační schéma spočívá v možnosti zaznamenávat pravo- a levotočivě kruhově polarizovanou složku v rozptýleném záření současně. Tím je eliminovaná složka šumu označovaná jako „flicker noise“, která vzniká v důsledku nežádoucích fluktuací, např. výkonu laseru, hustoty vzorku nebo pohybu prachových částic ve vzorku.

3.1.1 ROA spektrometr

Pro měření byl použit ROA spektrometr vybudovaný na Fyzikálním ústavu MFF UK (Hanzlíková a kol., 1999, Kapitán, 2006a), který používá geometrii zpětného rozptylu a ICP modulační schéma. Jeho schéma je znázorněno na obr. 3.2.



Obr. 3.2: Schéma ROA spektrometru (geometrie zpětného rozptylu, ICP modulační schéma).

Zdrojem budícího záření je argonový iontový laser (Coherent Innova 305) s excitační linií 514,5 nm. Tato excitační vlnová délka představuje kompromis mezi intenzitou rozptylu (podle Rayleighova zákona vzrůstá s klesající vlnovou délkou zpravidla úměrně $1/\lambda^4$) a fluorescencí z nečistot ve vzorku (klesá s rostoucí vlnovou délkou), (Barron a kol., 2004a). Lineární polarizaci laserového svazku vylepšuje Glan-Taylorův polarizátor, umístěný za výstupem laseru. K modulaci lineárně polarizovaného záření slouží elektrooptický modulátor (EOM) (Leysop EM 565), který v závislosti na polaritě přiloženého čtvrtvlnového napětí generuje střídavě pravo- a levotočivě kruhově polarizované záření. EOM je podélná Pockelsova cela, obsahující krystal dideuterofosforečnanu draselného (KD*P). Krystal je umístěn v teplotně stabilizovaném pouzdře (udržujícím konstantní teplotu $28 \pm 0,1$ °C), které zamezuje dvojlomným posuvům, vyvolaným teplotními změnami.

Svazek modulovaného záření je fokusován do vzorku pomocí plosko-vypuklé křemenné čočky ($f = 150$ mm, průměr 25 mm). Kyveta se vzorkem je umístěna v mechanickém držáku s mikrometrickými XYZ posuvy. Pro měření se používají komerční křemenné kyvety Hellma s vnitřními rozměry 5×5 mm (111.057-QS) a 10×10 mm (111-QS). Minimální objem vzorku je přibližně 120 μ l, při měření jsme obvykle pracovali s objemy cca 200 μ l.

Rozptýlené záření je sbíráno ve zpětném směru, depolarizováno Lyotovým depolarizátorem (Leysop), který brání vzniku polarizačních artefaktů na 45°-zrcadle, a kolimováno dvojevypuklou křemennou čočkou ($f = 25$ mm, průměr 25 mm, zaclonění na $f/1.2$). Svazek je dále pomocí rovinného zrcadla, natočeného o 45° vůči

směru dopadajícího paprsku, odkloněn o 90° vůči původnímu směru. Vzhledem k použité geometrii zpětného rozptylu jsou ve středu Lyotova depolarizátoru, kolimační čočky a 45° -zrcadla vyvrtány otvory (průměr 2,5 mm), umožňující průchod svazku budícího záření.

Odkloněný svazek rozptýleného záření je veden přes holografický SuperNotch-Plus filtr o průměru 2'' (Kaiser Optical Systems, $OD > 6,0$, šířka spektrální hrany $< 150 \text{ cm}^{-1}$), který potlačuje elastický Rayleighův rozptyl, a dále fokusován fotografickým objektivem AF Nikkor 50 mm f/1,4D (Nikon) na vstupní štěrbinu vysoce světelného jednomřížkového spektrografu HoloSpec f/1,4 (Kaiser Optical Systems). Šířku vstupní štěrbiny spektrografu nelze nastavovat, ale štěrbinu je možné vyměnit (obvykle se používá štěrbinu šířky 50 μm); výška štěrbiny je pokaždé 8 mm. Před vstupní štěrbinou je ještě umístěna elektronická závěrka, která je ovládána přímo z kontrolní jednotky CCD detektoru.

Za vstupní štěrbinou spektrografu je svazek záření nejprve kolimován fotografickým objektivem Nikkor 85 mm f/1.4 (Nikon), poté je difraktován na nepohyblivé, ale vyměnitelné transmisní holografické mřížce (HSG-514.5-LF nebo HSG-532-LF) a nakonec fokusován dalším fotografickým objektivem Nikkor 85 mm f/1.4 (Nikon) na zpětně osvětlovaný CCD (back-illuminated charge-coupled device) detektor (LN-CCD-1340/100-EB/1, Roper Scientific, kvantový výtěžek až 80%). Maticce CCD detektoru obsahuje 1340 \times 100 pixelů na ploše 26,8 \times 2,0 mm. Detektor je chlazen kapalným dusíkem na pracovní teplotu -120°C . Mřížka HSG-514.5-LF má disperzi 2,6 $\text{cm}^{-1}/\text{pixel}$ (3,0 nm/mm) a při excitaci 514,5 nm tak pokrývá spektrální oblast cca -200 až 2400 cm^{-1} . Výměnou této mřížky za mřížku HSG-532-LF s disperzí 2,4 $\text{cm}^{-1}/\text{pixel}$ (2,7 nm/mm) lze při stejné excitaci (514,5 nm) dosáhnout změny spektrální oblasti na přibližně 570 až 3060 cm^{-1} .

Experiment je řízen pomocí PC. K ovládání experimentu slouží program WinSpec/32 (ovládání CCD detektoru) a řídicí program vytvořený v jazyku Visual Basic 6.0 s použitím WinX/32 Macro Record Option (Roper Scientific), (Kapitán, 2006a). Řídicí program ovládá přepínání napětí přikládaného na EOM, umožňuje ukládání naměřených dat a obsahuje řadu funkcí užitečných při ladění aparatury, vlastním měření i zpracování dat. Program obsahuje grafické rozhraní pro OS Windows.

3.1.2 Záznam a zpracování experimentálních dat

V průběhu měření jsou řídicím programem střídavě načítána spektra odpovídající pravo- a levotočivě kruhově polarizovanému budícímu záření. Po každém takovém kroku se ukládá součtové spektrum (odpovídající Ramanovu signálu) a rozdílové spektrum (vlastní spektrum ROA).

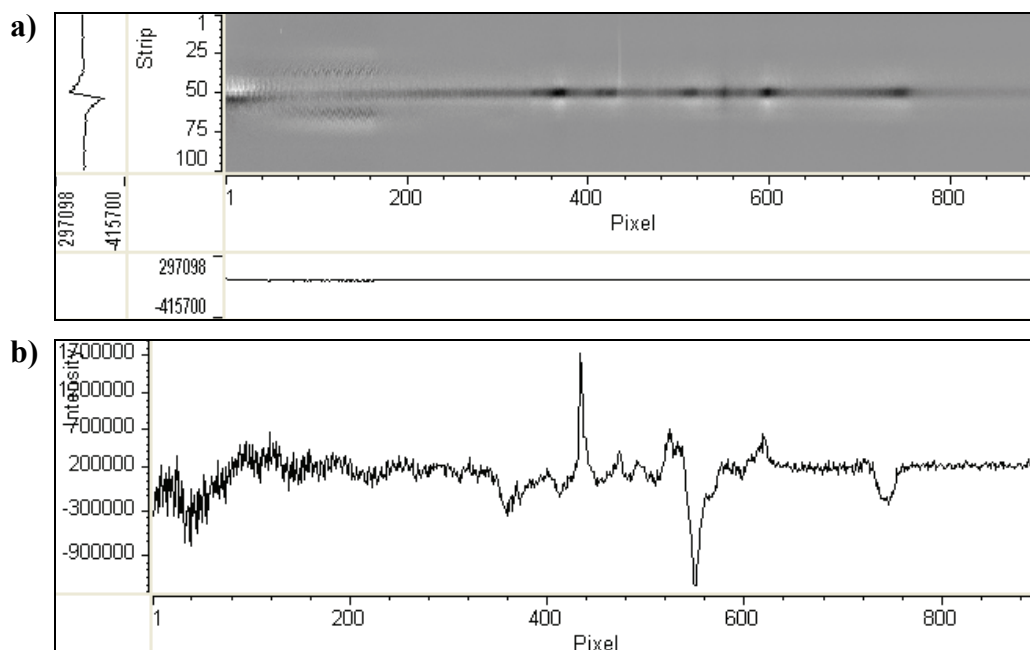
Datové soubory jsou ukládány v obrazovém módu (pracuje se s hodnotami intenzit jednotlivých pixelů detektoru). Soubory v obrazovém módu obsahují komplexnější informaci než konvenční jednodimenzionální spektra (spektrální mód), kdy jsou zaznamenávány intenzity v závislosti na pořadovém čísle pixelu na disperzní ose. Obrazový mód umožňuje ve spektrech odhalovat a odstraňovat artefakty. Je také standardně používán při nastavování aparatury.

Po každém cyklu, při kterém se změní smysl kruhové polarizace budícího záření, získáme dvě datová pole, obsahující součet intenzit $I^R + I^L$ (CIS) a rozdíl intenzit $I^R - I^L$ (CID), (I^R , resp. I^L značí intenzity rozptýleného záření při pravo-, resp. levotočivě kruhově polarizovaném budícím záření). Měření je programem ukončeno tehdy, když je dosaženo zadaného počtu měřících cyklů.

Při dlouhých měřeních jsou data ukládána do bloků, aby se zabránilo znehodnocení experimentu v případě poruchy aparatury, nestability vzorku nebo výpadku proudu (měření jednoho bloku trvá typicky 60 až 90 minut). Výsledná součtová a rozdílová spektra se získají sečtením všech měřících bloků pomocí procedury APPEND. Jednodimenzionální spektra se z dvojdimenzionálních spekter vytvoří sečtením všech (nebo vybraných) řádků detektoru (procedura BINNING). Příklady záznamů spekter v obrazovém a spektrálním módu jsou uvedeny na obr. 3.3a a 3.3b.

Změřená spektra jsou udávána v relativní vlnočtové škále Ramanových posunů. Ke kalibraci se standardně používá spektrum neonové výbojky, protože ve studované oblasti poskytuje dostatek dobře rozlišitelných úzkých spektrálních čar. Proces kalibrace se provádí procedurou CALIBRATE a spočívá v aproximaci vztahu mezi pořadovým číslem pixelu a relativním vlnočtem polynomem třetího (resp. čtvrtého) stupně. Vstupní data programu tvoří spektrum neonové výbojky (ve spektrálním módu), excitační vlnová délka, typ mřížky a stupeň polynomu, kterým bude vztah aproximován. Program vypočítá koeficienty polynomu a tím umožní přepočet na vlnočtovou škálu (v jednotkách cm^{-1}). Zkalibrovaná data však nejsou

ekvidistantní (disperze vyjádřená v cm^{-1}/mm není konstantní, ale mění se od jednoho okraje detektoru k druhému), proto kalibrační procedura umožňuje provést i linearizaci (přepočet spektra na vlnočtovou škálu s ekvidistantním krokem, obvykle 1 cm^{-1}). Zkalibrovaná data jsou uložena do souborů ve formátu ASCII. Soubory obsahují vždy dva datové sloupce – první sloupec představuje vlnočty a druhý příslušné hodnoty intenzit.



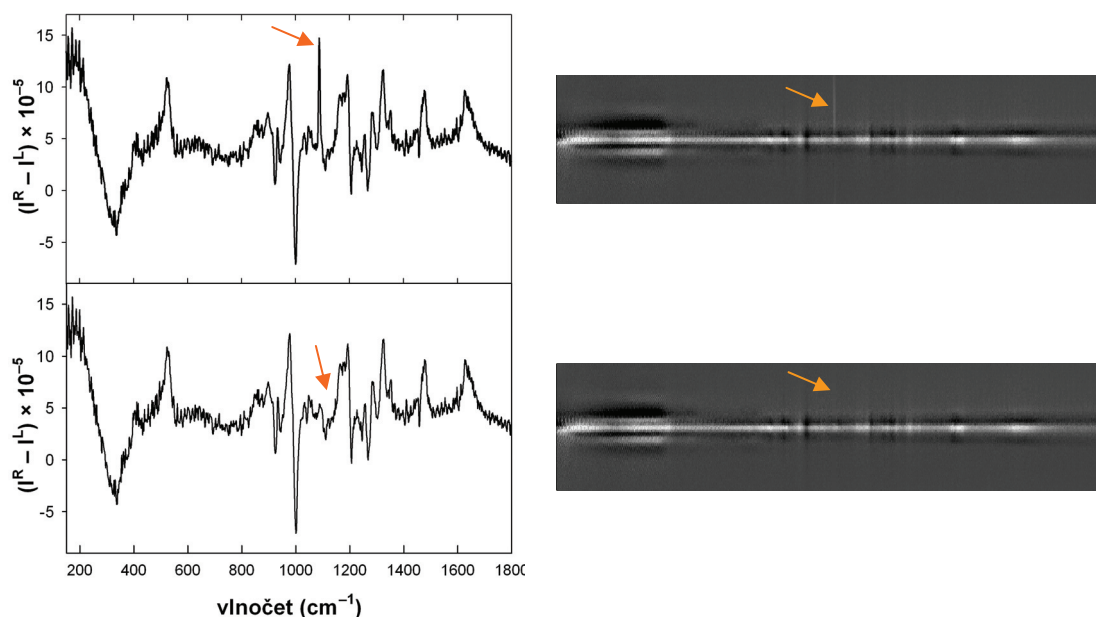
Obr. 3.3: Záznam CID spektra poly(D-glutamové kyseliny) a) v obrazovém módu, b) ve spektrálním módu.

3.1.3 Zpracování spekter

Spektra jsou obvykle zpracovávána standardizovaným postupem s využitím procedur, které jsou součástí programu řídicího ROA experiment (viz Kapitán, 2006a), a programů WinSpec/32 a GRAMS/AI.

Z ROA spekter je nejprve nutné odstranit parazitní signál, který nepochází od vzorku. V ROA spektrech změřených na naší aparatuře je často patrný poměrně intenzivní, ale úzký pás v oblasti $\sim 1088 \text{ cm}^{-1}$, který pochází od Lyotova depolarizátoru. Tento artefakt lze odstranit pomocí procedury CLEAN FIELD, která je součástí řídicího programu ROA experimentu. Procedura umožňuje v obrazovém módu nahradit falešný signál průměrnou hodnotou vybraného signálu okolí.

Aplikace procedury CLEAN FIELD na ROA spektrum vzorku poly(Pro-Gly-Pro) je znázorněna na obr. 3.4.

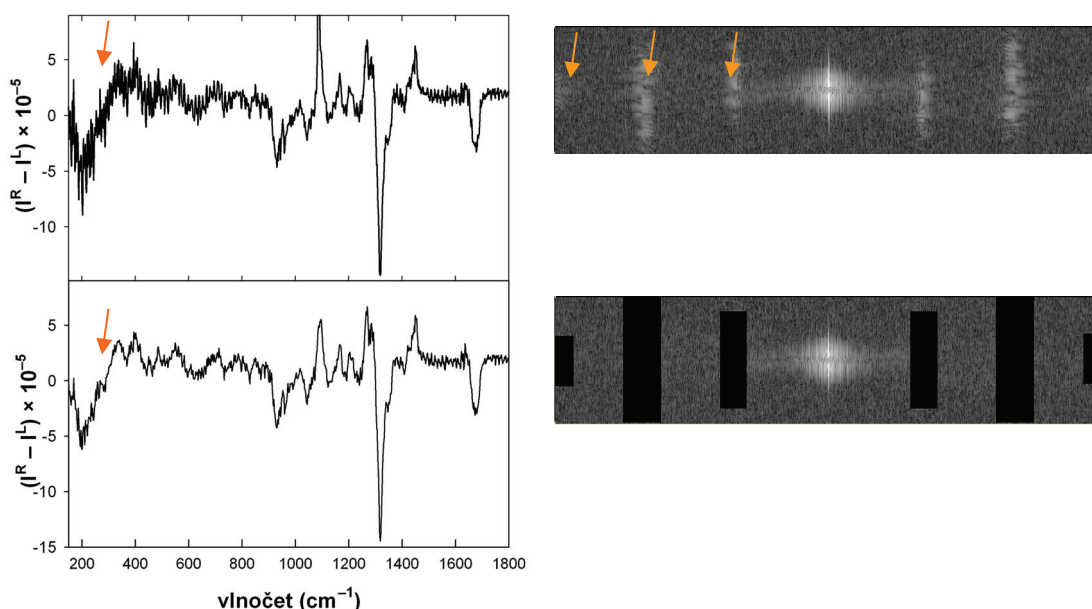


Obr. 3.4: Aplikace procedury CLEAN FIELD na CID spektrum vzorku poly(Pro-Gly-Pro). Nahoře: CID spektrum v obrazovém (vpravo) a spektrálním módu (vlevo), obsahující falešný signál od Lyotova depolarizátoru. Dole: CID spektrum po aplikaci procedury CLEAN FIELD. Oblast falešného signálu je na obrázku označena šipkou.

Mezi důležité procedury patří dále Fourierova filtrace, která se používá k eliminaci periodických artefaktů vznikajících na přední stěně kyvety a k potlačení šumu v ROA spektrech. Procedura spočívá v aplikaci vybraného typu filtru na Fourierův obraz CID spektra (v obrazovém módu) a následné zpětné Fourierově transformaci. Volba filtru závisí na charakteru šumu, který chceme v ROA spektru potlačit. Pro odstranění statistického šumu z dat se používají pásmové propusti (band pass filtr), potlačit určité prostorové frekvence je možné pomocí notch filtru (pozitivního nebo negativního). Pouze částečně lze Fourierovou filtrací eliminovat složku šumu „flicker noise“, která se nepříznivě projevuje v ROA spektrech měřených v ICP strategii (Ramanova spektra odpovídající pravo- a levotočivě kruhově polarizovanému budícímu záření jsou zaznamenávána v různých časech a šum obou odečítaných komponent má rozdílný charakter). Fourierova filtrace není v případě šumu flicker noise příliš účinná, protože tato složka šumu ovlivňuje všechny prostorové frekvence. Z tohoto důvodu je vhodné potlačit flicker noise jiným způsobem, například prodloužením celkové akumulární doby (díky dobré stabilitě aparatury může celková doba měření činit až několik dní) a použitím co

nejvyšších koncentrací (to je však problematické u drahých a málo dostupných vzorků).

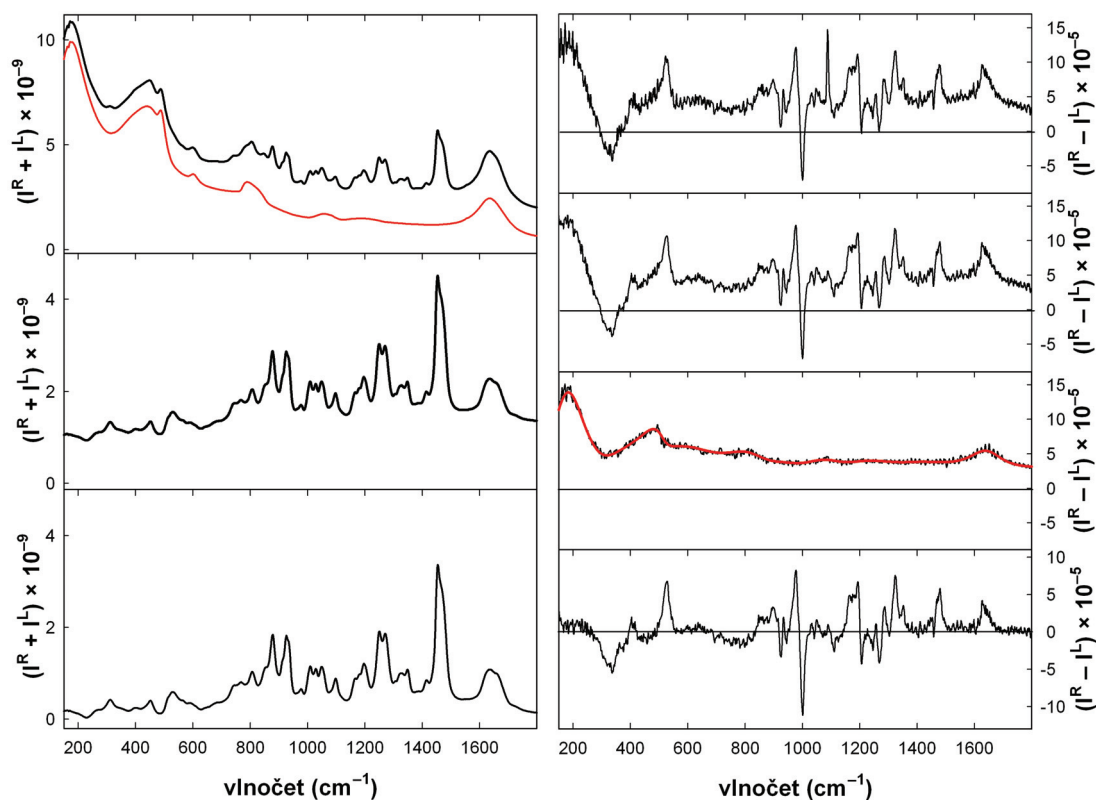
V případě našich měření byla Fourierova filtrace používána pro odfiltrování periodických artefaktů, které vznikají vlivem interferenčních jevů na přední stěně kyvety (především oblast pod 600 cm^{-1}) a v místech intenzivního Ramanova signálu rozpouštědla (pro vodu oblast pod 600 cm^{-1} a pás u 1600 cm^{-1}). Periodické artefakty tohoto typu jsou ve Fourierově obraze spektra dobře odlišitelné od ROA signálu a lze je efektivně odstranit použitím negativního obdélníkového notch filtru způsobem, jaký je znázorněn na obr. 3.5. Ve výsledném spektru (získaném zpětnou Fourierovou transformací) je periodický signál poměrně dobře potlačen, zbylá část spektra přitom zůstává prakticky nezměněná.



Obr. 3.5: Aplikace negativního obdélníkového notch filtru na ROA spektrum poly(D-glutamové kyseliny). Nahoře: CID spektrum ve spektrálním módu, obsahující periodický šum (vlevo) a projev šumu ve Fourierově obraze spektra (vpravo). Dole: Aplikace negativního obdélníkového notch filtru na Fourierův obraz spektra (vpravo) a výsledné CID spektrum po provedení zpětné Fourierovy filtrace (vlevo). Oblasti, ve kterých se vyskytují periodické artefakty, jsou označeny šipkami.

K dalšímu zpracování spekter (po převedení do jednodimenzionální podoby a následné kalibraci) byl používán program GRAMS/AI (Thermo Electron Corporation). U Ramanových spekter byl vždy nejprve odečten signál rozpouštědla a poté provedena korekce pozadí na fluorescenci (obvykle proložením vhodným polynomem). U ROA spekter je zpracování komplikovanější. Přestože by měl být ROA signál kyvety naplněné rozpouštědlem nulový, pozorujeme v ROA spektrech obvykle falešný signál, který deformuje pozadí v oblasti pod 600 cm^{-1} a částečně

v oblasti kolem 1600 cm^{-1} (v případě kyvety s vodou). Tento efekt může nepříznivě ovlivnit identifikaci ROA pásů v oblasti nízkých vlnočtů (to představuje problém především v případě studia S–S můstků, protože jejich nejvýznamnější vibrace se nacházejí právě v této oblasti). Ukazuje se navíc, že tvar signálu může být pro různé kyvety odlišný. Z tohoto důvodu se od ROA spektra vzorku odečítá signál rozpouštědla změřený ve stejné kyvetě, ve které bylo měřeno spektrum vzorku. Vzhledem k tomu, že korekční spektrum je obvykle více zašuměné (měříme ho kratší dobu), vyhlazuje se nejprve pomocí kubických splinů (v prostředí Matlab); tím se zabrání zhoršení poměru S/N v upravovaném spektru. Postup při úpravách Ramanova a ROA spektra vzorku poly(Pro-Gly-Pro) ve vodném roztoku znázorňuje obr. 3.6.



Obr. 3.6: Postup při zpracování Ramanova (vlevo) a ROA spektra (vpravo) vodného roztoku poly(Pro-Gly-Pro). V případě Ramanova spektra jsou shora znázorněna: naměřené (nezpracované) spektrum společně se spektrem rozpouštědla (červeně), spektrum po odečtu signálu rozpouštědla a výsledné spektrum po korekci pozadí. V případě ROA spektra jsou shora znázorněna: naměřené nezpracované spektrum, spektrum po provedení procedury CLEAN FIELD a Fourierovy filtrace, spektrum kyvety s rozpouštědlem společně s vyhlazeným spektrem (červeně) a výsledné spektrum po odečtu spektra kyvety s rozpouštědlem a korekci pozadí (zpravidla pouze posunutí základní linie spektra do nuly).

3.1.4 Příprava měření

Vzorky byly nejprve rozpuštěny v destilované deionizované vodě (Milli-Q). Kvůli odstranění případných nečistot nebo nerozpuštěných částí vzorku byly roztoky přefiltrovány přes mikrofiltry Millipore (Ultrafree-MC, velikost póru 0,22 μm , centrifugace po dobu cca 4 minut). Pro měření byly použity křemenné kyvety Hellma (111.057-QS) s vnitřními rozměry 5 \times 5 mm.

Před spuštěním experimentu bylo nutné nastavit v programu řídícím ROA experiment potřebné parametry měření. Doba expozice se volila v závislosti na velikosti signálu tak, aby byl využit dynamický rozsah celého detektoru, ale aby nedošlo k jeho přesycení v některých pixelech (u našich měření vzhledem ke koncentracím studovaných vzorků obvykle 3 – 5 s). Počet akumulací v jednom měřicím bloku se v závislosti na době expozice volil tak, aby celková doba akumulace byla 60–90 minut. Celková doba měření se nastavila tak, aby bylo dosaženo požadovaného poměru signál/šum (v našem případě obvykle několik desítek hodin).

Vzorky, které vykazovaly fluorescenční pozadí, byly nejprve na několik hodin ponechány v laserovém svazku. Často došlo k výraznému vybělení fluorescence příměsí a bylo možné zahájit ROA měření, v opačném případě bylo nutné vzorky chemicky přečistit.

3.2 *Měření elektronového cirkulárního dichroismu*

ECD spektra byla měřena na spektropolarimetru Jasco 815 (Japonsko) při pokojové teplotě. Pro měření byly použity křemenné kyvety Hellma s optickou drahou 1 – 0,05 cm v závislosti na měřeném spektrálním oboru a koncentraci vzorku (pro oblast disulfidů 1 cm, pro oblast amidu 0,1 nebo 0,05 cm). Vzorky byly rozpuštěny ve vodě nebo ve fosfátovém pufru (PBS, pH 7, 10 mM). Spektrální rozsah byl při měření absorpce disulfidů 400 – 250 nm, při určování konformace peptidů 350 – 190 nm (skenovací rychlost: 50 nm/min, časová odezva: 4 s, počet skenů: 3). Referenční spektra (tj. signál kyvety s rozpouštědlem) byla měřena za stejných experimentálních podmínek.

Spektra byla přepočtena v případě měření signálu disulfidů na molární CD $\Delta\varepsilon = \Delta A/(cl)$ (v jednotkách $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$; A značí absorbanci, c molární koncentraci v jednotkách mol/l a l optickou dráhu v jednotkách cm) a v případě spekter určujících konformaci peptidů (z historických důvodů) na molární elipticitu $[\theta] = \theta/(10cl) = 32980 \Delta A/(10cl)$ (v jednotkách $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$; θ značí elipticitu v jednotkách mdeg).

4 Výsledky a diskuze

4.1 Rozvoj experimentu

Spolehlivost ROA aparatury byla zatím testována jen na poměrně jednoduchých systémech, jako je dipeptid L-alanyl-L-alanin. Abychom zjistili, jaká je úroveň artefaktů v případě složitějších molekul, zkusili jsme změřit ROA spektra poly(glutamové kyseliny) – jednoho z mála biopolymerů, pro který máme k dispozici oba enantiomery.

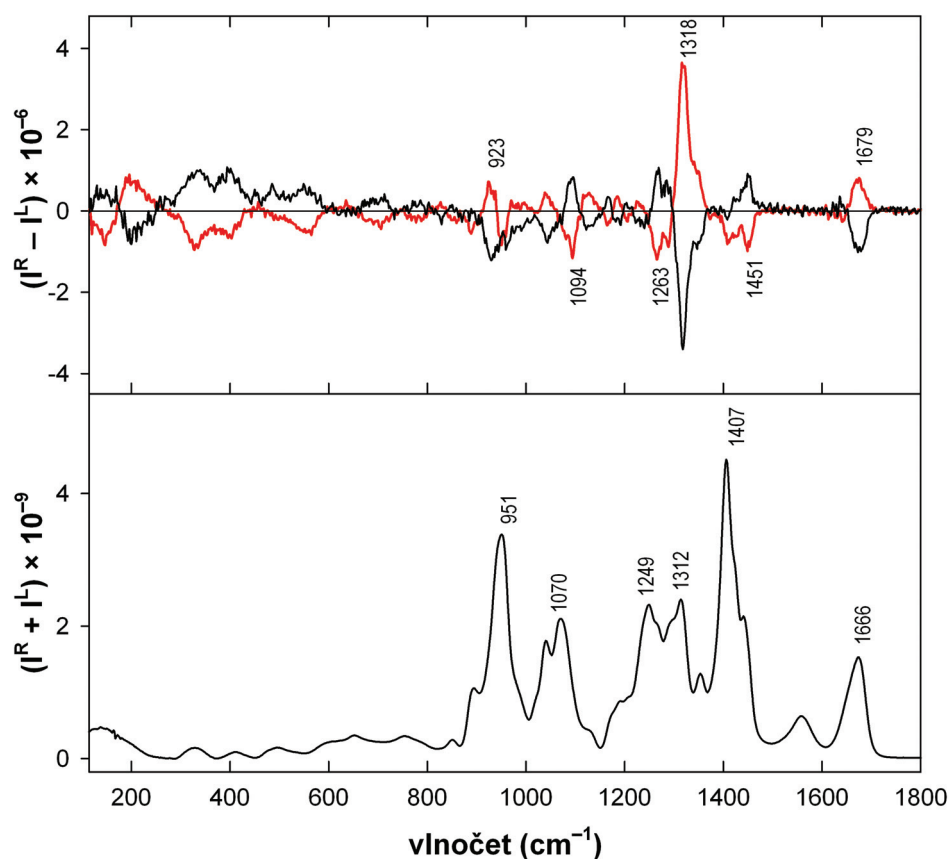
Pro další testování aparatury jsme využili novou mřížku (HSG-532-LF), původně zakoupenou pro měření s laserem Verdi (ten musel být kvůli své nestabilitě nahrazen dříve používaným argonovým laserem Coherent Innova). Mřížka umožňuje rozšířit měření do oblasti valenčních vodíkových vibrací ($\sim 3000 \text{ cm}^{-1}$), zároveň ale pokrývá i značnou část konvenčně měřené spektrální oblasti (spektrální rozsah je $\sim 570 - 3060 \text{ cm}^{-1}$) a umožňuje tak kontrolu správnosti měření.

4.1.1 Měření ROA poly(glutamové kyseliny)

Poly(glutamová kyselina) je modelový polypeptid, který se díky dobře definované změně konformace v závislosti na pH a teplotě často používá pro spektroskopickou identifikaci charakteristických znaků sekundární struktury v peptidech a proteinech. ROA spektra poly(L-Glu) byla publikována v řadě prací (např. Hecht a kol., 1999, Ashton a kol., 2007), zatím však pouze v oblasti nad 600 cm^{-1} .

Díky tomu, že pro poly(Glu) máme k dispozici oba enantiomery (L i D formu), je možné použít vzorek pro testování spolehlivosti ROA aparatury. Správnost měření můžeme ověřit jednak porovnáním se známými ROA spektry L-formy v oblasti nad 600 cm^{-1} , ale i na základě symetrie v ROA spektrech obou enantiomerů.

Změřili jsme spektra obou enantiomerů poly(Glu) (L-forma: Sigma P-4886, D-forma: Sigma P-4637; M.W. 50000-100000; 1,3 mM v H₂O) v mírně zásaditém prostředí (L-forma: pH 7,33; D-forma: pH 7,67). (Při výpočtech molární koncentrace polymerních vzorků obsahujících polypeptidy o různé délce řetězce byla vždy uvažována střední hodnota z udávaného intervalu molekulových hmotností). Naměřená data znázorňuje obr. 4.1.



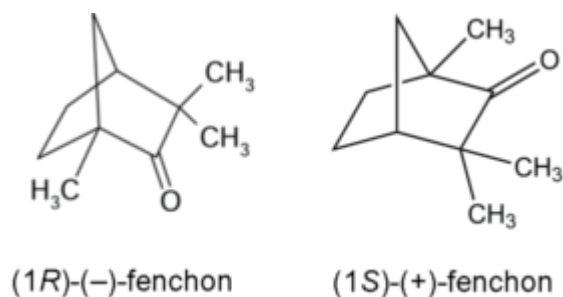
Obr. 4.1: ROA (nahore) a Ramanovo spektrum (dole) 1,3 mM roztoku poly(L-Glu) (červeně) a poly(D-Glu) (černě) v H₂O (čistá akumulční doba 44 hod pro L-formu, 21 hod pro D-formu). Spektra byla normalizována na experimentální podmínky.

Ramanovo i ROA spektrum poly(L-Glu) jsou v oblasti nad 600 cm⁻¹ v dobré shodě s publikovanými výsledky. Intenzivní pozitivní ROA pás v oblasti amidu III u 1318 cm⁻¹ a slabý pozitivní ROA pás v oblasti amidu I u 1679 cm⁻¹ jsou charakteristickými znaky PPII konformace (důležitý prvek tzv. neuspořádané struktury, Tiffany a Krimm, 1968), kterou polypeptid zaujímá v neutrálním a zásaditém prostředí. Porovnáme-li ROA spektra obou enantiomerů, vidíme, že spektra jsou velmi dobře zrcadlově symetrická, a to i v oblasti nízkých vlnočtů (pod 600 cm⁻¹); ve spektrech jsou zřetelné jen dva drobné artefakty v oblasti u 950 a 1400 cm⁻¹. Tento výsledek ukazuje, že i v případě polymerních vzorků lze v oblasti nízkých vlnočtů získat kvalitní ROA signál.

4.1.2 Rozšíření měření do oblasti valenčních vodíkových vibrací

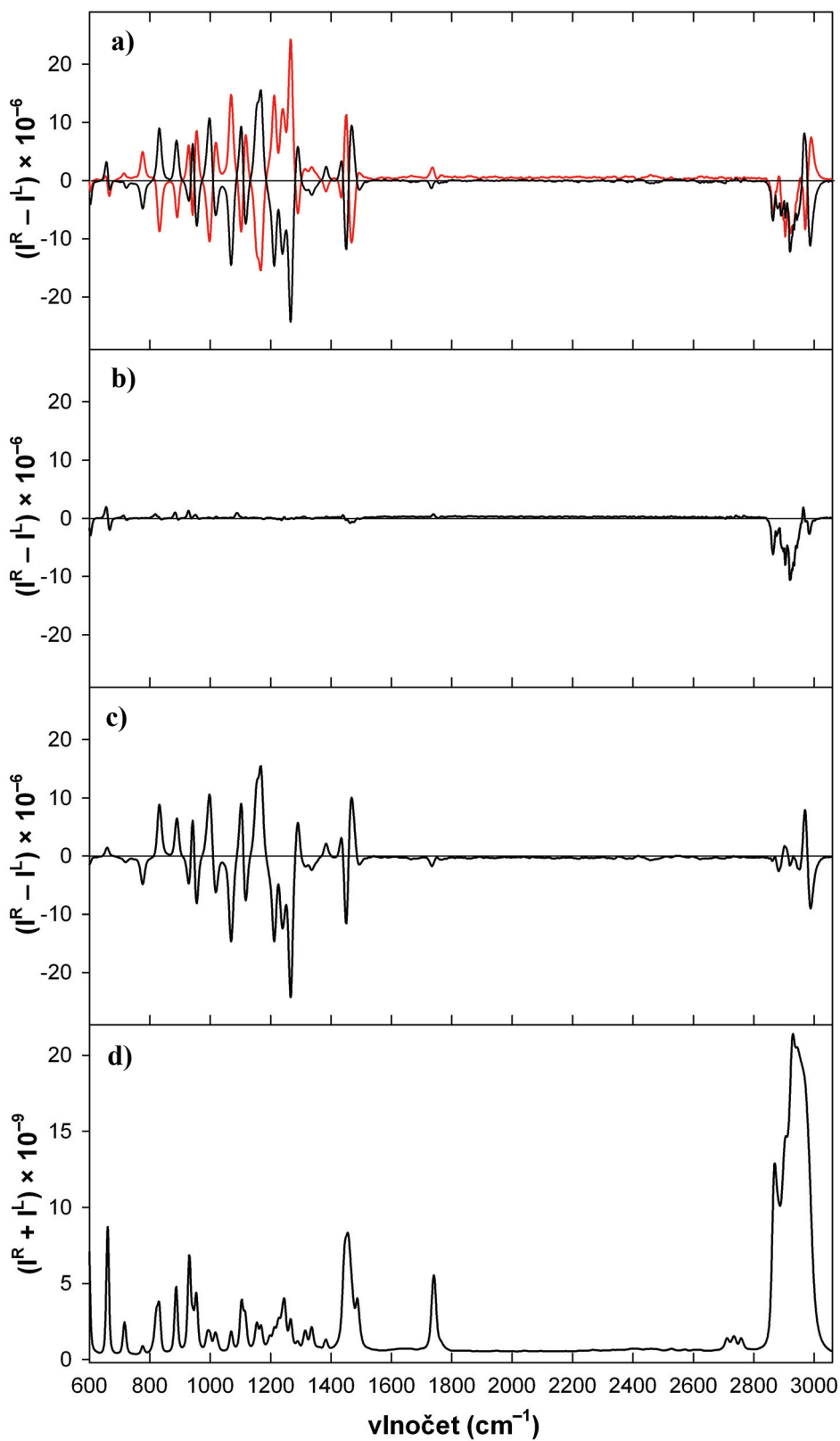
ROA měření se běžně provádějí ve spektrální oblasti $\sim 120\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$. Výměnou mřížky je možné změnit spektrální rozsah na $\sim 570\text{--}3060\text{ cm}^{-1}$. Oblast kolem 3000 cm^{-1} , ve které se nachází signál příslušející valenčním vodíkovým vibracím, je v ROA spektroskopii doposud málo prozkoumaná (v literatuře jsme našli jen jednu publikaci, obsahující změřený ROA signál v oblasti valenčních vodíkových vibrací $(-)\text{-}\alpha\text{-pinenu}$ a $(+)\text{-}\alpha\text{-fenylethylaminu}$ – Hug a kol., 1975). Měření v oblasti vyšších vlnočtů jsou problematická, protože ROA spektra jsou náchylná ke vzniku artefaktů, navíc se oblast nachází na hraně intenzivního Ramanova pásu vody.

Pro testovací měření v oblasti valenčních vodíkových vibrací jsme použili molekulu fenchon (viz obr. 4.2). Výhodou vzorku pro ROA měření je, že máme k dispozici oba enantiomery ($(1R)$ -forma: Aldrich 19,643-6, $(1S)$ -forma: Fluka 46210).



Obr. 4.2: Dva enantiomery fenchonů.

Změřili jsme ROA a Ramanova spektra obou enantiomerů fenchonů (viz obr. 4.3). Naměřená ROA spektra jsou uvedena na obr. 4.3a. Porovnáme-li spektra obou enantiomerů, můžeme na základě zrcadlové symetrie odlišit ROA signál od artefaktů, které se v tomto případě nacházejí především v oblasti valenčních vodíkových vibrací. Nejlépe artefakty vyniknou, pokud ROA spektra obou enantiomerů sečteme – v ideálním případě by měl být výsledkem nulový signál, my však získáváme „spektrum artefaktů“, které znázorňuje obr. 4.3b. Artefakty je však možné poměrně spolehlivě eliminovat, pokud od sebe ROA spektra obou enantiomerů odečteme. Získáváme tak spektrum znázorněné na obr. 4.3c.

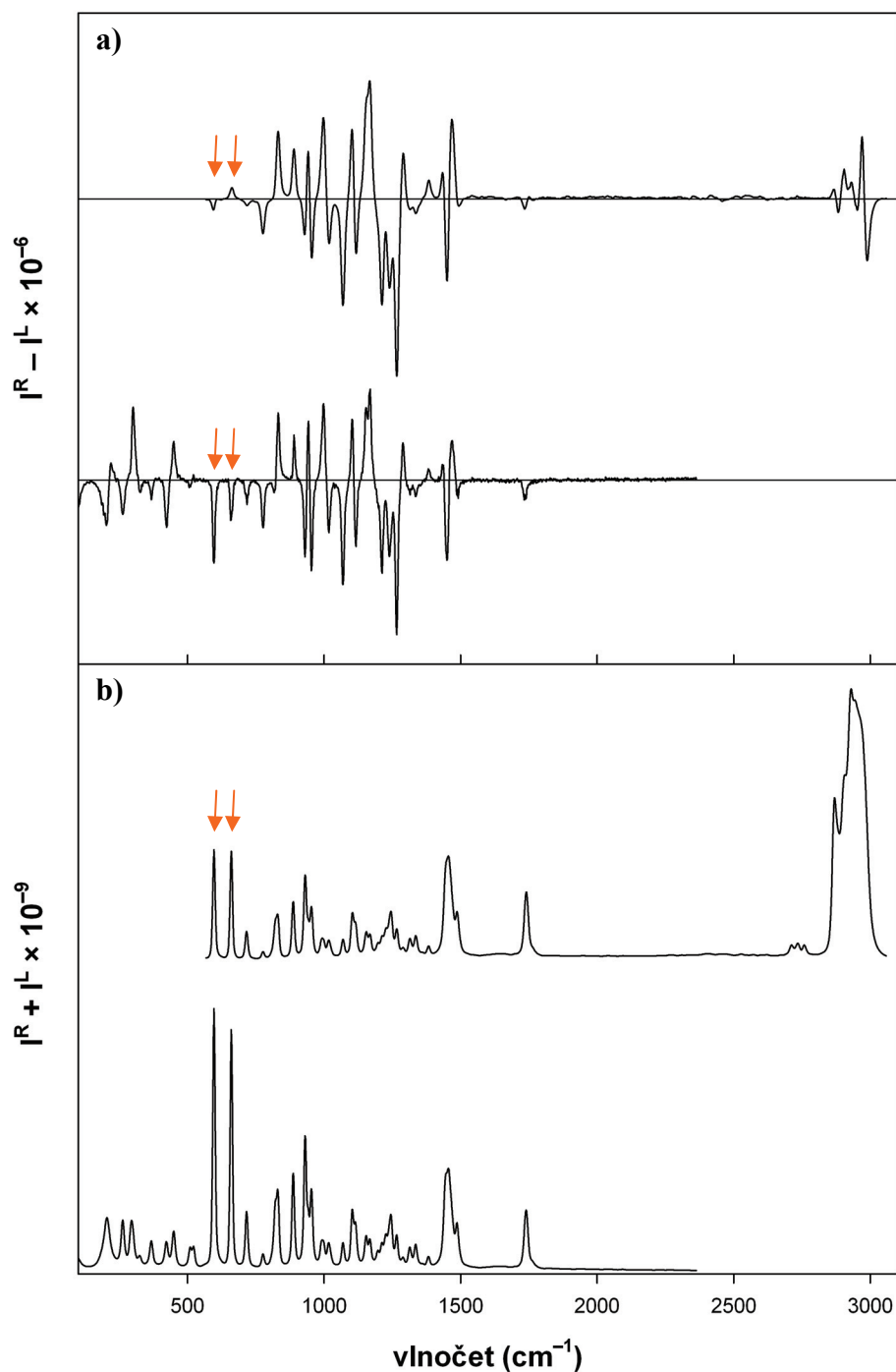


Obr. 4.3: a) ROA spektrum (1*R*)-(-)-fenchonu (černě) a (1*S*)-(+)-fenchonu (červeně), (čistá akumulční doba 1,3 hod pro (1*R*)-formu, 1,7 hod pro (1*S*)-formu). b) Spektrum získané jako součet ROA spekter obou enantiomerů. c) Rozdíl ROA spekter (1*R*) a (1*S*) enantiomeru. d) Ramanovo spektrum (1*R*)-(-)-fenchonu.

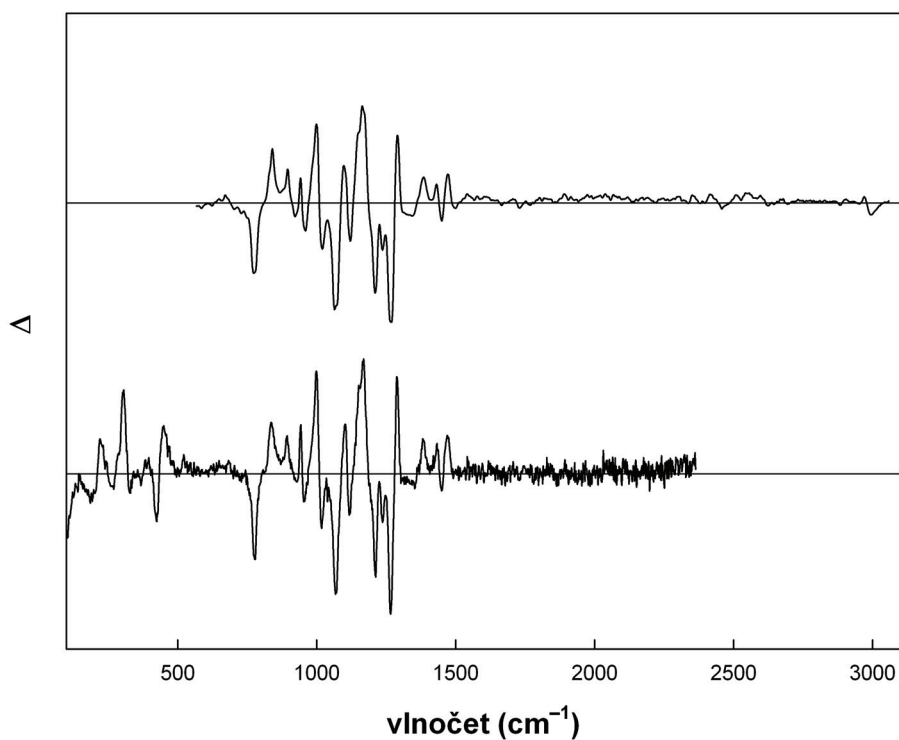
Srovnáme-li spektrum získané jako rozdíl ROA spekter (*1R*) a (*1S*) enantiomeru s ROA spektrem (*1R*)-(-)-fenchonu změřeným s jinou mřížkou ve spektrální oblasti 120–2000 cm^{-1} (obr. 4.4), vidíme, že se obě spektra v oblasti do 2000 cm^{-1} velmi dobře shodují (horší poměr S/N v případě spektra změřeného v oblasti nižších vlnočtů je dán kratší dobou měření; naopak menší rozlišení u spektra změřeného v oblasti vyšších vlnočtů je důsledkem menší disperze použité mřížky – ztráta rozlišení se ale výrazněji projevuje jen u dubletu ~ 1151 a 1170 cm^{-1}). Vzhledem k dobré shodě obou spekter můžeme usuzovat, že i ROA signál v oblasti valenčních vodíkových vibrací u $\sim 2900 \text{ cm}^{-1}$ je realistický.

V oblasti do 2000 cm^{-1} se obě ROA spektra liší pouze v místech silně polarizovaných pásů v Ramanových spektrech (v obr. 4.4 označených šipkami). Takovýchto artefaktů se lze obvykle zbavit tím, že spektra vyjádříme pomocí diferenční cirkulární intenzity Δ (vztah 2.1; právě prezentace měření ROA pomocí Δ spekter umožňuje také srovnávat měření na různých spektrometrech, neboť eliminuje nejen vliv podmínek měření, ale také vliv odezvy spektrometru; Haesler a Hug, 2008). Srovnání Δ -spekter (*1R*)-(-)-fenchonu měřených ve dvou spektrálních oblastech s různými mřížkami a za různých experimentálních podmínek je znázorněno na obr. 4.5. Z obrázku je zřejmé, že shoda spekter v překrývající se oblasti je opravdu velmi dobrá. Tento způsob prezentace naopak zvýrazňuje fakt, že ROA signál v oblasti valenčních vodíkových vibrací normovaný na příslušný Ramanův signál (tedy Δ -spektrum) je velmi slabý (řádově 10^{-4}). Právě proto je měření v této oblasti náchylné ke vzniku artefaktů a je třeba věnovat patřičnou pozornost jejich identifikaci a odstranění.

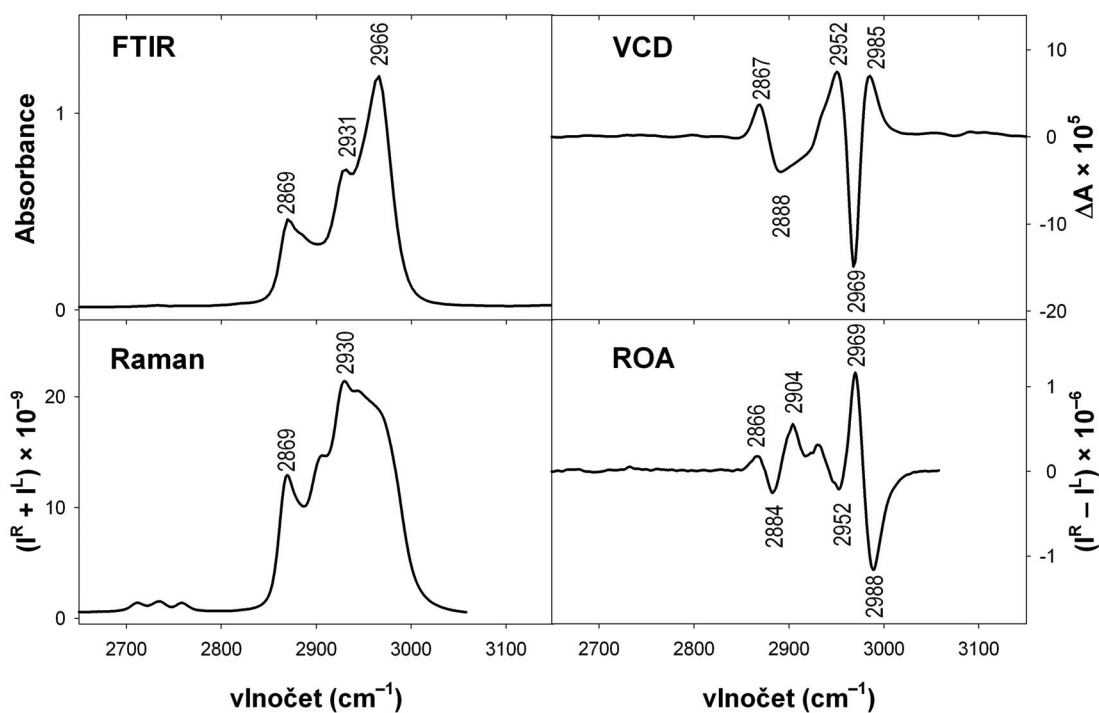
To, že námi změřený ROA signál v oblasti valenčních vodíkových vibrací je reálný, lze potvrdit na základě srovnání se spektrem VCD (obr. 4.6). Ve spektrech VCD a ROA se velmi dobře shodují pozice pásů ~ 2867 , 2888 , 2952 , 2969 i 2985 cm^{-1} (přímé srovnání spekter VCD a ROA je možné díky tomu, že ROA je spojena s kvantovým přechodem mezi stejnou dvojicí stavů jako VCD). Také v odpovídajícím Ramanově a FTIR spektru se shodují pozice pásů ~ 2869 a 2930 cm^{-1} .



Obr. 4.4: Porovnání a) ROA spekter, b) Ramanových spekter (1*R*)-(-)-fenchonu měřených ve dvou různých spektrálních oblastech s různými mřížkami. Šipky označují místa intenzivního signálu v Ramanových spektrech (tyto oblasti jsou náchylné ke vzniku artefaktů v ROA spektrech). Rozdíly v relativních intenzitách pásů v Ramanových spektrech jsou způsobeny tím, že nebyla provedena korekce na spektrální odezvu aparatury. Spektra byla normována na Ramanův pás $\sim 1455 \text{ cm}^{-1}$.



Obr. 4.5: Porovnání Δ -spekter (1*R*)-(-)-fenchonu měřených ve dvou různých, částečně se překrývajících spektrálních oblastech (měření s různými mřížkami).



Obr. 4.6: Srovnání FTIR a Ramanova spektra (vlevo) a VCD a ROA spektra (vpravo) (1*R*)-(-)-fenchonu v oblasti valenčních vodíkových vibrací. (FTIR a VCD spektrum pro srovnání laskavě poskytla prof. M. Urbanová z Ústavu analytické chemie VŠCHT).

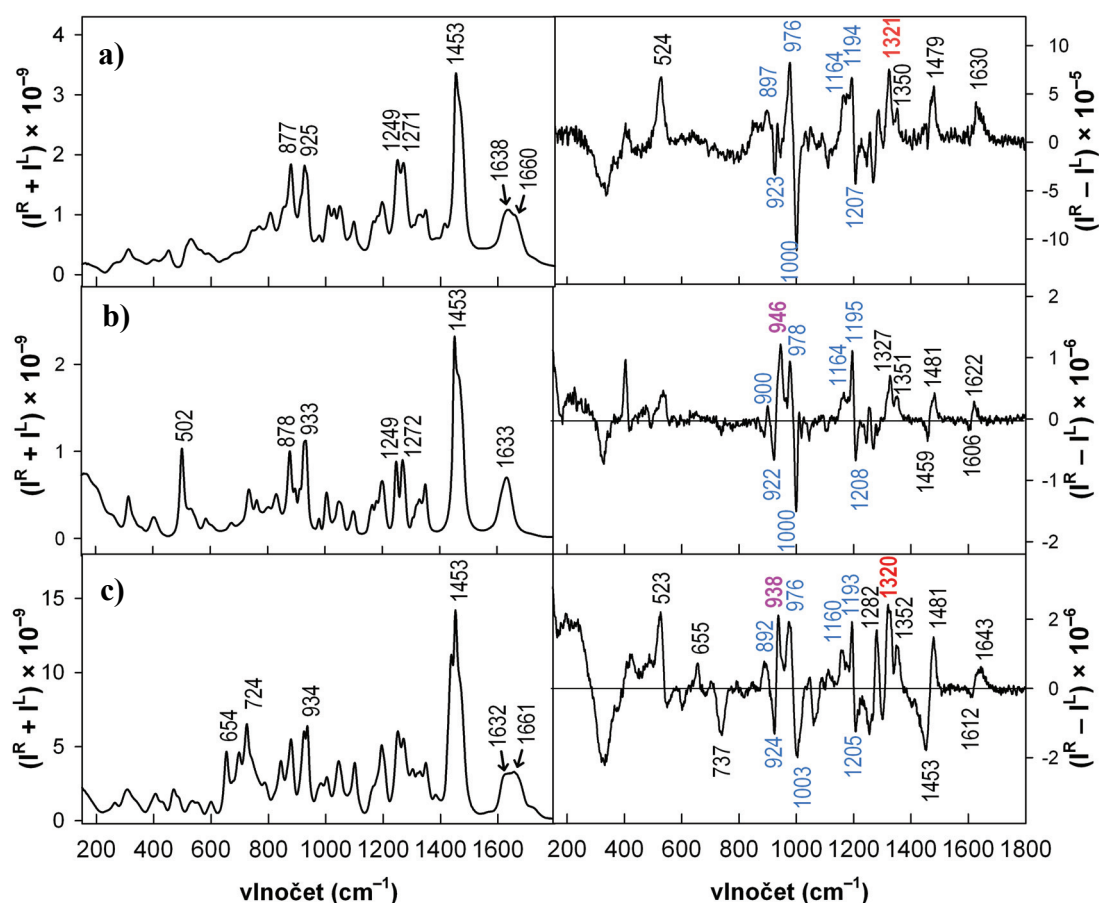
Výsledky naznačují, že i při současném nastavení aparatury je měření v oblasti valenčních vodíkových vibrací možné, i když zatím jen v případě jednoduchých molekul, u kterých máme k dispozici oba enantiomery. Pro složitější molekuly ve vodných roztocích zatím nejsou výsledky příliš uspokojivé, do budoucna by proto bylo vhodné experiment dále rozvíjet.

4.2 Charakteristické znaky konformace polyprolin II v polypeptidu poly(Pro-Gly-Pro)

Konformace polyprolin II (PPII) je důležitý strukturální prvek neuspořádaných polypeptidů a proteinů (Shi, 2002) a z tohoto důvodu se jí v poslední době zabývá řada prací. Pomocí ROA byla dosud PPII konformace studována především u peptidových sekvencí složených převážně z neprolinových reziduí. ROA spektra samotného poly(L-prolinu) byla poprvé publikována teprve ve studii Kapitána a kol. (2006d), na kterou navazujeme ROA studií dalšího polypeptidu bohatého na prolin – poly(Pro-Gly-Pro).

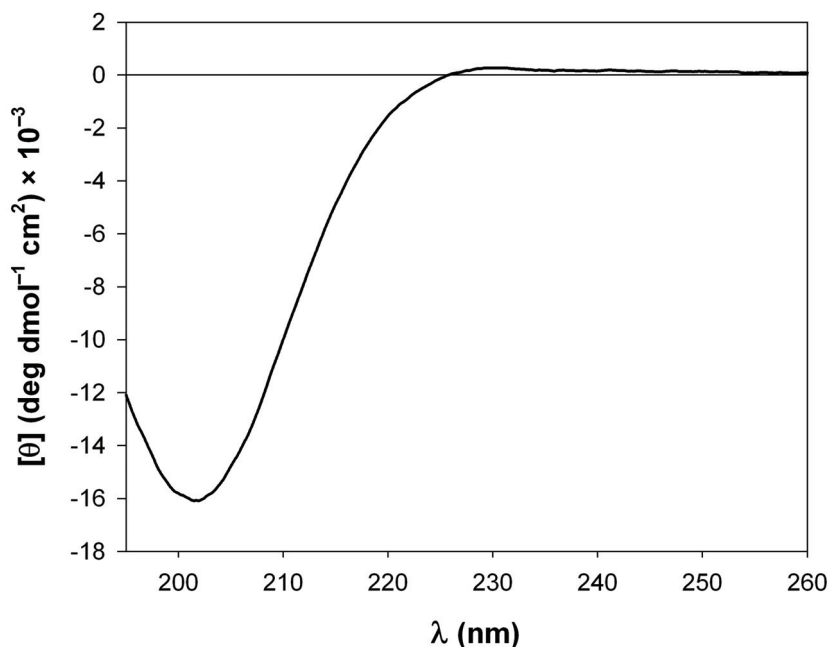
ROA a Ramanovo spektrum poly(Pro-Gly-Pro) (Sigma P6665, M.W. 2000–10000, 10mg/100 μ l v H₂O), (obr. 4.7a) je srovnatelné se spektry poly(L-Pro) (převzato z Kapitán a kol., 2006d), (obr. 4.7b). V ROA spektrech obou polypeptidů lze najít řadu podobných spektrálních rysů, především v oblasti 900–1000 cm⁻¹ (pozitivní pás ~ 900 cm⁻¹, negativní ~ 922 cm⁻¹, pozitivní ~ 978 cm⁻¹ a negativní ~ 1000 cm⁻¹) a v oblasti 1160–1210 cm⁻¹ (pozitivní pás ~ 1164 cm⁻¹, pozitivní ~ 1195 cm⁻¹ a negativní ~ 1208 cm⁻¹), což je ve shodě se studií Kapitána a kol. (2006e), podle které mohou být uvedené spektrální rysy indikátorem přítomnosti PPII konformace v peptidech bohatých na prolin. Překvapivě ale v ROA spektru poly(Pro-Gly-Pro) chybí výrazný pozitivní ROA pás ~ 946 cm⁻¹, pozorovaný jak v ROA spektru poly(L-Pro), tak i v ROA spektrech peptidů bohatých na prolin (Kapitán a kol., 2006e); ROA a Ramanovo spektrum jednoho ze studovaných peptidů – H-Thr-Met-Pro-Pro-Met-Pro-Ala-Pro-OH (peptid I), je pro srovnání uvedeno na obr. 4.7c. Absence pozitivního ROA pásu ~ 946 cm⁻¹ u poly(Pro-Gly-Pro) naznačuje, že znaménka ROA pásů + – + + – v oblasti 900–1010 cm⁻¹ nemusí být charakteristickým znakem PPII konformace u struktur bohatých na prolin.

Ve spektrech srovnávaných struktur lze nalézt i některé další rozdíly. Zatímco ROA signál v rozšířené oblasti amidu III je slabý u poly(L-prolinu), v ROA spektru poly(Pro-Gly-Pro) i peptidu I je zřetelný pozitivní pás $\sim 1321 \text{ cm}^{-1}$. Ten je indikátorem PPII konformace u struktur obsahujících neprolinová rezidua (struktura složená pouze z prolinových reziduí obsahuje terciární amidy a nemá tedy na atomu N peptidové páteře navázán atom H; v molekule proto nejsou přítomny N-H vibrace, které jsou dominantní v rozšířené oblasti amidu III). Další odlišností je posun pozitivního ROA pásu v oblasti amidu I u poly(L-Pro) k nižším vlnočtům. Změny v oblasti amidu I lze pozorovat i v Ramanově spektru – u polypeptidu poly(Pro-Gly-Pro) i peptidu I se pás $\sim 1630 \text{ cm}^{-1}$ rozšiřuje a posouvá k vyšším vlnočtům (složka s nižším vlnočtem odpovídá prolinovým reziduíům, obsahujícím terciární amidy, složka s vyšším vlnočtem neprolinovým reziduíům, která obsahují sekundární amidy).



Obr. 4.7: Ramanovo (vlevo) a ROA spektrum (vpravo) a) 1,67 mM roztoku poly(Pro-Gly-Pro) v H_2O (čistá akumuláční doba 17,5 hod), b) poly(L-Pro) (převzato z Kapitán a kol., 2006d), c) peptidu H-Thr-Met-Pro-Pro-Met-Pro-Ala-Pro-OH (peptid I, převzato z Kapitán a kol., 2006e). Modře jsou vyznačeny ROA pásy charakteristické pro PPII konformaci ve strukturách bohatých na prolin, červeně ROA signál indukující PPII konformaci u struktur obsahujících neprolinová rezidua. Fialově je označen pozitivní ROA signál, který chybí ve spektru poly(Pro-Gly-Pro).

Na obr. 4.8 je znázorněno spektrum ECD poly(Pro-Gly-Pro) (1,6 mM vodný roztok), které potvrzuje, že polypeptid zaujímá PPII konformaci.



Obr. 4.8: Spektrum ECD 1,6 mM roztoku poly(Pro-Gly-Pro) v H₂O.

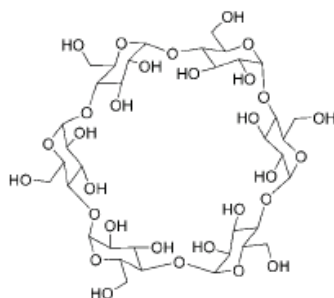
4.3 Studium disulfidových můstků pomocí ROA

4.3.1 Cyklodextriny přemostěné S-S můstky

Studium disulfidových můstků v komplexních systémech jako jsou peptidy a proteiny je komplikované. Z tohoto důvodu jsme hledali vhodné modelové systémy, na kterých bychom mohli ověřit, zda je signál příslušející S–S vibracím v ROA spektrech vůbec detegovatelný. Cyklodextriny s disulfidovými můstky, syntetizované pro výzkum v oblasti supramolekulární chemie a mezimolekulárních interakcí dr. Tomášem Krausem na Ústavu organické chemie a biochemie AVČR plně vyhovovaly našim potřebám.

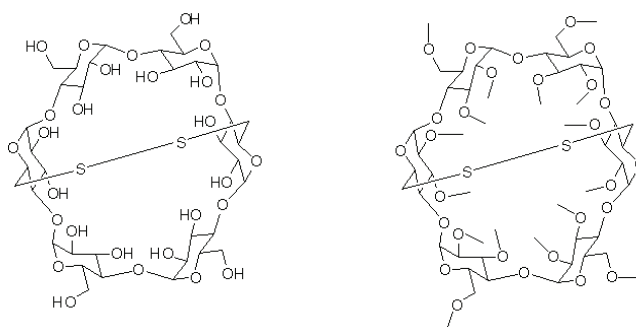
Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy, složené z pěti nebo více glukopyranosových jednotek (viz obr. 4.9), které díky své schopnosti vytvářet inkluzivní komplexy s celou řadou organických molekul ve vodném prostředí

(Doziuk a kol., 2006) našly široké uplatnění v mnoha odvětvích průmyslu (chemickém, farmaceutickém, kosmetickém, ...).

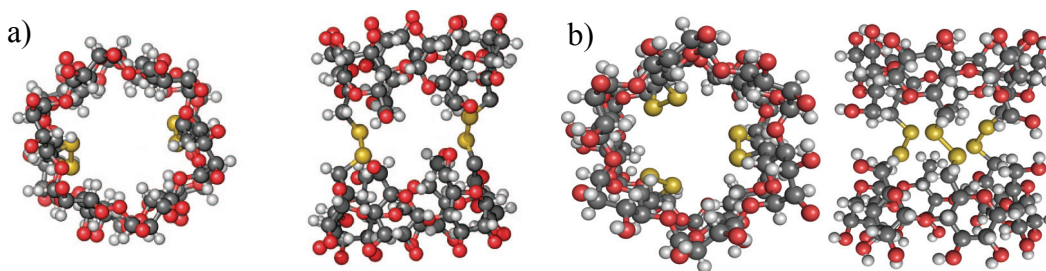


Obr. 4.9: Struktura α -D-cyklodextrinu, skládajícího se z šesti α -1,4 spojených D-glukopyranosových jednotek.

V dnešní době jsou cyklodextrinové struktury poměrně dobře prostudované a vzhledem k tomu, že jsou produkovány ve velkém množství, jsou navíc i jednoduše dostupné. Látky s disulfidovými můstky jsou však unikátní a nové. K dispozici jsme měli α -D-cyklodextrinové a methylované α -D-cyklodextrinové monomery přemostěné jedním disulfidovým můstkem (monomer I a monomer II, viz obr. 4.10) a cyklodextrinové duplexy přemostěné dvěma nebo třemi disulfidovými můstky (dimer I, dimer II, viz obr. 4.11). Výhodou uvedených struktur by měla být očekávaná poměrně značná rigidita založená na předpokladu, že cyklodextrinový makrocyklus stabilizuje strukturu disulfidového můstku.



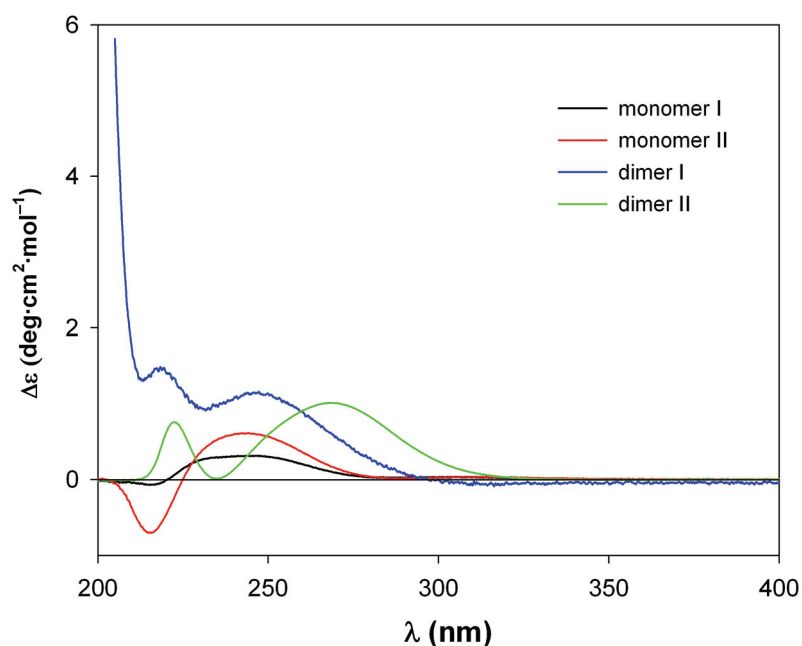
Obr. 4.10: Vlevo struktura monomeru I (α -D-cyklodextrin přemostěný jedním disulfidovým můstkem), vpravo struktura monomeru II (methylovaný α -D-cyklodextrin přemostěný jedním disulfidovým můstkem (struktura připomíná košík, ve kterém S-S můstek představuje rukojeť).



Obr. 4.11: a) Struktura dimeru I (cyklodextrinového dimeru se dvěma S–S můstky). b) Struktura dimeru II (cyklodextrinového dimeru se třemi S–S můstky). Vlevo vždy pohled shora, vpravo pohled z boku. Převzato z Kumprecht a kol., 2009.

V případě obou dimerů jsou k dispozici jejich krystalografické struktury. U dimeru I se dvěma S–S můstky existují v krystalu dvě alternativní uspořádání: velikost dihedrálního úhlu χ_{S-S} prvního disulfidového můstku je $+93^\circ$, u druhého S–S můstku existují alternativně dvě konformace – buď $+119^\circ$, nebo -110° . Pro dimer II byly zjištěny dihedrální úhly $\chi_{S-S} +79,8^\circ$, $+89,3^\circ$, a $+80,9^\circ$ (absolutní konfigurace byly odvozeny z relativní konfigurace vůči cyklodextrinu, o kterém víme, že je složen výhradně z α -D-glukózy).

Uvedené struktury byly nejprve studovány pomocí ECD (viz obr. 4.12). Obr. 4.12 ilustruje, že cyklodextrinové struktury jsou pro ECD vhodným modelem, protože signál příslušející S–S můstkům je v tomto případě pozorovatelný v celé spektrální oblasti (na rozdíl od peptidů totiž cyklodextriny neobsahují amidový chromofor, jehož signál zpravidla CD signál od S–S můstků z velké části překrývá).



Obr. 4.12: ECD spektra monomeru I a II, dimeru I (se dvěma S–S můstky) a dimeru II (se třemi S–S můstky). Spektra byla normalizována na disulfidový chromofor.

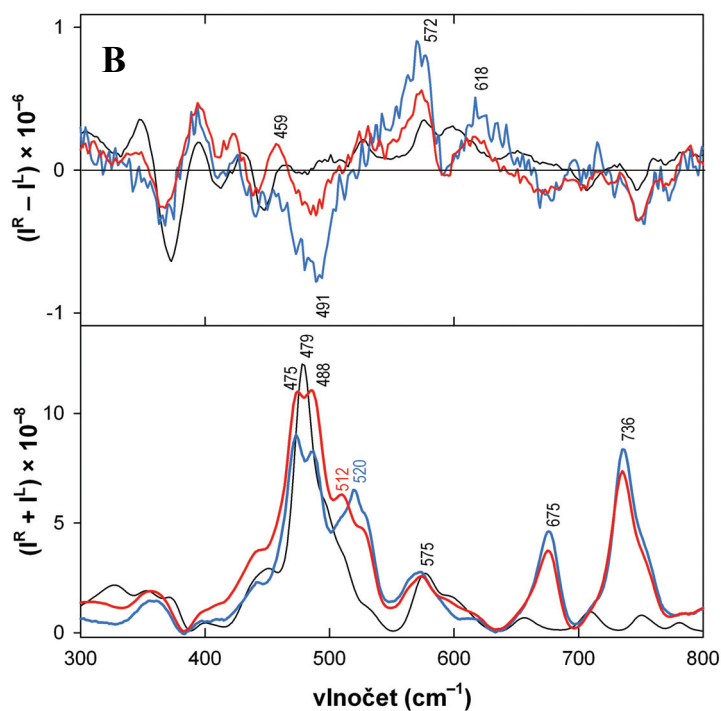
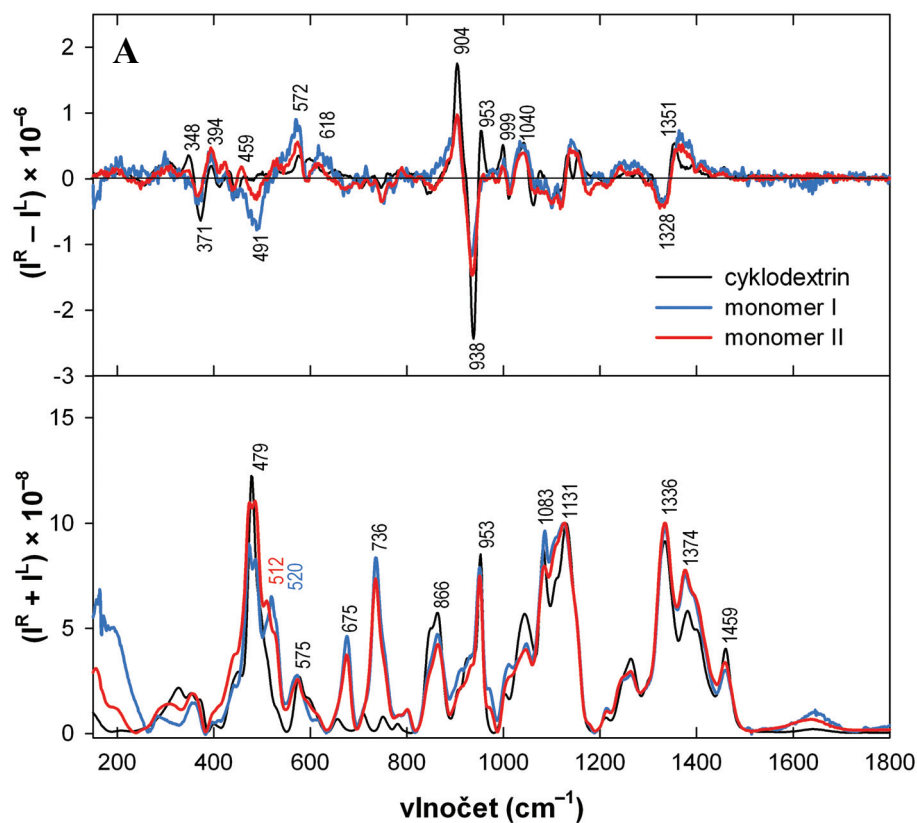
Studium cyklodextrinů pomocí ROA

Změřili jsme Ramanova a ROA spektra α -D-cyklodextrinu, monomeru I a II a dimeru I a II. Přehled koncentrací a doby měření jednotlivých vzorků je uveden v Tab. 4.1.

Struktura	Kód	c [mM]	Čistá doba akumulace signálu [hod]
α -D-cyklodextrin		126,65	18,4
α -D-cyklodextrin přemostěný 1 S-S můstkem (monomer I)	lk175x	39,04	30,8
methylovaný α -D-cyklodextrin přemostěný 1 S-S můstkem (monomer II)	lk345	12,66	66,6
α -D-cyklodextrinový duplex přemostěný 2 S-S můstky (dimer I)	lk325	2,67	63,4
α -D-cyklodextrinový duplex přemostěný 3 S-S můstky (dimer II)	lu93	6,71	16,6

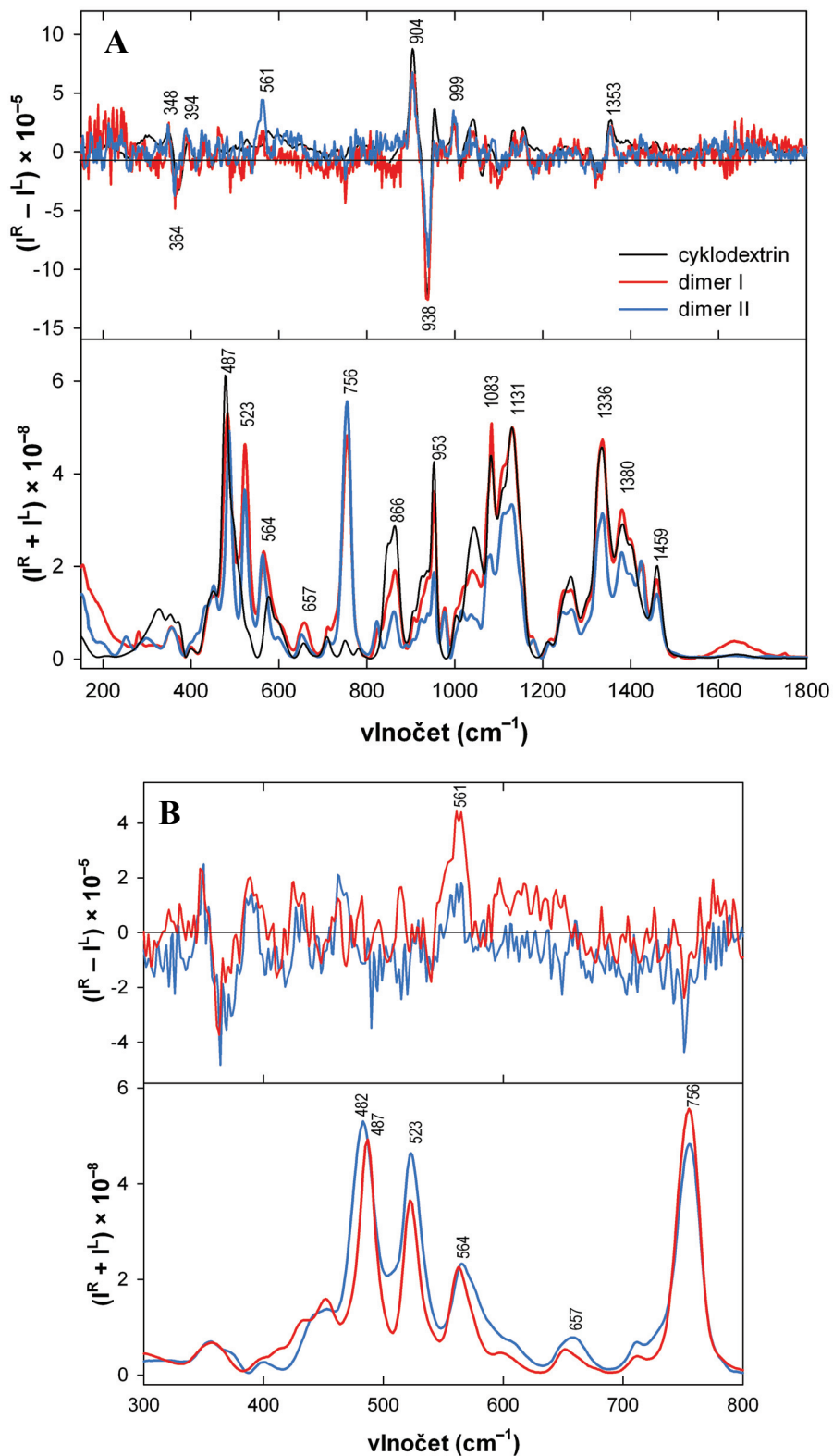
Tab. 4.1: Přehled použitých cyklodextrinových vzorků.

Srovnání ROA a Ramanových spekter monomeru I a II se spektry α -D-cyklodextrinu je uvedeno na obr. 4.13. V Ramanových i ROA spektrech obou monomerů můžeme pozorovat řadu podobných spektrálních rysů. V oblasti C–S valenčních vibrací jsou v Ramanových spektrech monomeru I a II zřetelné intenzivní pásy $\sim 675\text{ cm}^{-1}$ a 736 cm^{-1} , které se nevyskytují v Ramanově spektru cyklodextrinu a které by mohly indikovat P_C a P_H konformaci (Havel, 1996). V oblasti je patrný i slabý signál v ROA spektru. V oblasti S–S valenčních vibrací je v Ramanově spektru monomeru II rozpoznatelný signál $\sim 520\text{ cm}^{-1}$, u monomeru I je vidět náznak pásu $\sim 512\text{ cm}^{-1}$. V ROA spektrech monomeru I a II se v této oblasti nachází negativní pás $\sim 491\text{ cm}^{-1}$, který v cyklodextrinu nebyl pozorován a který podle teoretických výpočtů na modelových disulfidech naznačuje záporný dihedralní úhel χ_{S-S} (Bednářová a kol., submitted). Protože však u monomerů nemáme k dispozici krystalografickou strukturu, nelze tuto interpretaci ověřit. Pozitivní ROA signál v oblasti S–S valenčních vibrací $\sim 572\text{ cm}^{-1}$ nemusí pocházet od S–S můstků, neboť náznak podobného signálu lze pozorovat i v ROA spektru cyklodextrinu.



Obr. 4.13: (A) Nahoře ROA spektrum, dole Ramanovo spektrum 126,65 mM roztoku α -cyklodextrinu (černě), 39,04 mM roztoku monomeru I (červeně) a 12,66 mM roztoku monomeru II (modře) v H_2O (celková doba akumulace 18,3 hod pro cyklodextrin, 30,8 hod pro monomer I a 66,7 hod pro monomer II). Spektra jsou normalizována na Ramanův pás cyklodextrinu $\sim 1131\text{ cm}^{-1}$. (B) Výřez spektra v oblasti vibrací disulfidového můstku.

Srovnání ROA a Ramanových spekter cyklodextrinu, dimeru I se dvěma S–S můstky a dimeru II se třemi S–S můstky je uvedeno Na obr. 4.14



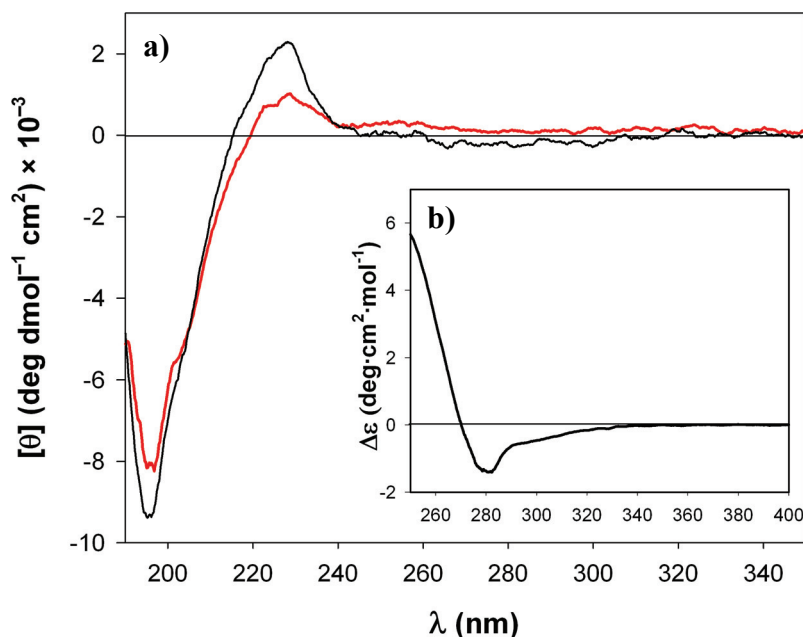
Obr. 4.14: (A) Nahoře ROA spektrum, dole Ramanovo spektrum 126,65 mM roztoku α -cyklodextrinu (černě), 2,67 mM roztoku dimeru I (červeně) a 6,71 mM roztoku dimeru II (modře) v H₂O (celková doba akumulace 63,3 hod pro dimer I a 16,7 hod pro dimer II). Spektra byla normalizována na počet S-S můstků. (B) Výřez spektra v oblasti vibrací disulfidového můstku.

Ve spektrech obou dimerů, která se výrazně liší od spekter monomerů, můžeme opět pozorovat řadu podobných spektrálních znaků. V Ramanových spektrech dimerů je v oblasti C–S valenčních vibrací zřetelný pás $\sim 756 \text{ cm}^{-1}$, v ROA spektrech však v této oblasti není pozorovatelný žádný signál. V oblasti S–S valenčních vibrací jsou v Ramanových spektrech obou dimerů výrazné pásy ~ 523 a 564 cm^{-1} , které se nevyskytují ve spektru cyklodextrinu. V ROA spektrech je zvláště u dimeru II zřetelný pozitivní signál $\sim 561 \text{ cm}^{-1}$, který by podle teoretických výpočtů odpovídal kladnému dihedralnímu úhlu χ_{S-S} (Bednářová a kol., submitted). To je v případě dimeru II ve shodě s krystalovou strukturou, podle které mají všechny S–S můstky dihedralní úhly χ_{S-S} blízké $+90^\circ$.

4.3.2 Oxytocin

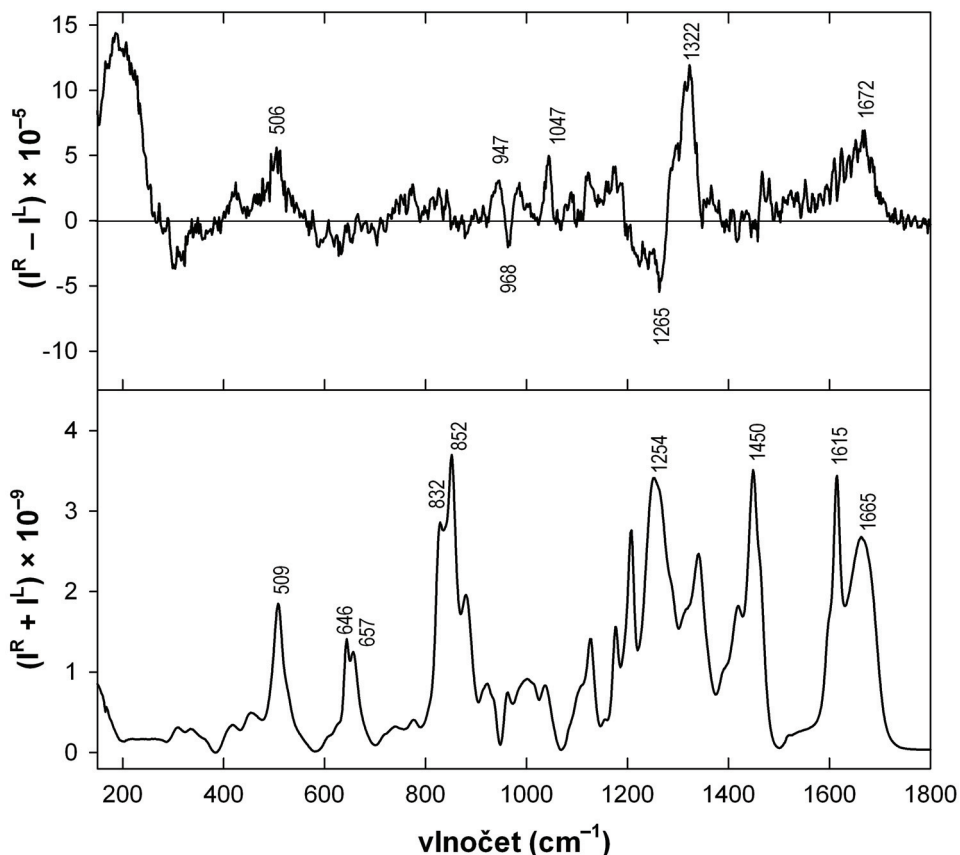
Disulfidové můstky jsme kromě modelových cyklodextrinových struktur studovali i ve vybraných peptidech. Jako modelovou strukturu jsme použili oxytocin – cyklopeptid $\text{H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH}_2$ s jedním S–S můstkem. Oxytocin je hormon, který se přirozeně vyskytuje v podvěsku mozkovém savců. V organismu má řadu funkcí – ovlivňuje např. krevní tlak, má vliv na děložní stahy při porodu i na kojení. Oxytocin je v dnešní době hojně využíván ve farmaceutickém průmyslu.

Byla změřena ECD spektra oxytocinu (v H_2O a PBS) v oblasti absorpce amidů a disulfidů (viz obr. 4.15). Signál v oblasti absorpce amidů naznačuje PPII konformaci. V oblasti, ve které lze detegovat signál disulfidů, vyniká záporný pás u $\sim 280 \text{ nm}$, který pochází od tyrosinu. Signál disulfidového chromoforu lze pozorovat pouze v dlouhovlnné oblasti ECD spektra.



Obr. 4.15: ECD spektra oxytocinu v H₂O (černě) a v PBS (červeně). a) Spektrum sekundární struktury oxytocinu (1,6 mM v H₂O a 3,5 mM v PBS), b) oblast signálu disulfidů (1,8 mM v H₂O).

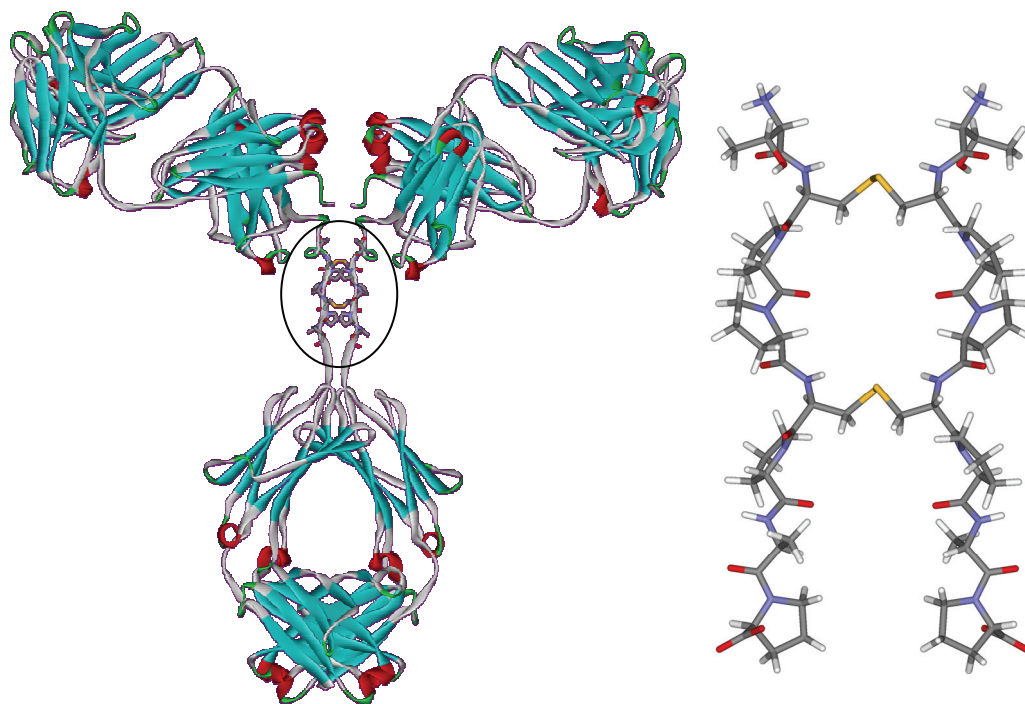
Změřili jsme ROA a Ramanovo spektrum 66,85 mM roztoku oxytocinu v H₂O (viz obr. 4.16). V Ramanově spektru jsou dominantní pásy příslušející vibracím tyrosinu (intenzivní pás $\sim 1615 \text{ cm}^{-1}$ a dublet ~ 832 a 852 cm^{-1}), signál v oblasti amidu III (1254 cm^{-1}) a amidu I (pás amidu I $\sim 1665 \text{ cm}^{-1}$ se nachází v oblasti vyšších vlnočtů než u struktur bohatých na prolin). Intenzivní signál lze ale nalézt i v oblasti C–S valenčních vibrací (dublet ~ 645 a 657 cm^{-1}) a S–S valenčních vibrací (pás $\sim 509 \text{ cm}^{-1}$). V ROA spektrech lze pozorovat intenzivní pozitivní pás $\sim 1322 \text{ cm}^{-1}$ v rozšířené oblasti amidu III, naznačující PPII konformaci. Pozitivní pás $\sim 1672 \text{ cm}^{-1}$ v oblasti amidu I, který se opět nachází v oblasti vyšších vlnočtů než u struktur tvořených převážně prolinovými rezidui, rovněž indikuje PPII konformaci. V oblasti C–S valenčních vibrací není v ROA spektrech žádný pozorovatelný signál, v oblasti S–S valenčních vibrací se ale vyskytuje poměrně zřetelný pozitivní ROA pás $\sim 506 \text{ cm}^{-1}$, který by podle teoretických výpočtů (Bednářová a kol., submitted) měl odpovídat konformaci disulfidového můstku $g^-g^-dg^-g^-$ (kladný dihedrální úhel χ_{S-S} a záporné dihedrální úhly $\chi_{C\alpha-C\beta}$ a $\chi_{C\beta-S}$). Tento výsledek je ve shodě s krystalovou strukturou, podle které má dihedrální úhel χ_{S-S} velikost $+76^\circ$ (*d* konformace).



Obr. 4.16: Nahoře ROA spektrum, dole Ramanovo spektrum 66,85 mM roztoku oxytocinu v H₂O (celková akumuláční doba 41,7 hod).

4.3.3 ROA hinge peptidu s navázanou antigenní sekvencí

Studium hinge peptidu s navázanou antigenní sekvencí navazuje na práce Kapitána a kol. (2005, 2006a), které se zabývaly ROA hinge peptidu (centrální části lidského imunoglobulinu IgG1, viz obr. 4.17, fragment 225-232/225'-232'). Hinge peptid je paralelní dimer peptidu H-Thr-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-OH (primární struktura má C₂ symetrii). Struktura je bohatá na prolin a je stabilizovaná dvěma disulfidovými můstky. Hinge peptid může sloužit jako nosič různých aktivních sekvencí (obsahuje šest nezávislých koncových skupin, sám o sobě je však imunologicky neutrální). Práce Kapitána a kol. potvrdily, že v polypeptidu převažuje PPII konformace. V ROA spektrech byl identifikován signál pocházející od C–S valenčních vibrací, signál odpovídající S–S valenčním vibračním ale nebyl potvrzen.



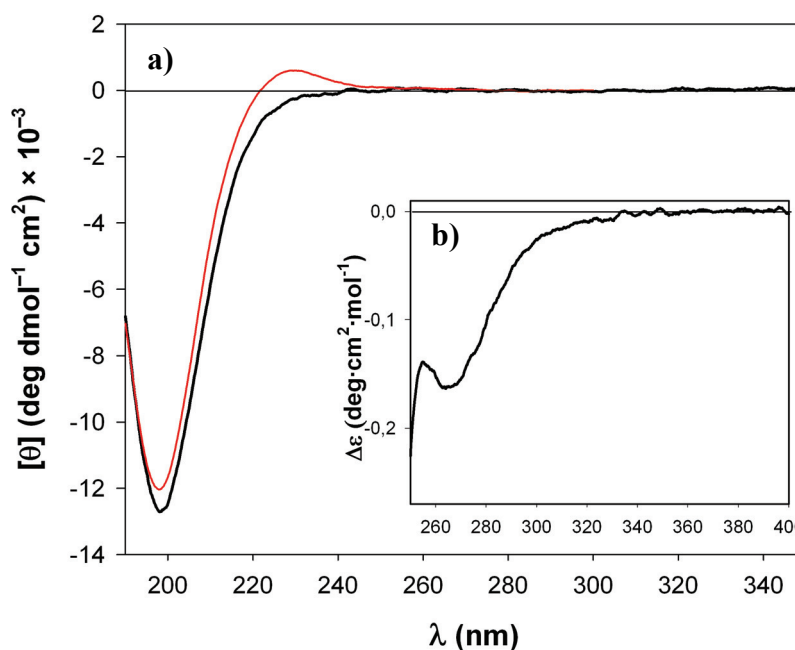
Obr. 4.17: Model lidského imunoglobulinu IgG1 (vlevo) (Padlan, 1994), jehož centrální část tvoří hinge peptid (detail vpravo).

Hinge peptid s navázanou antigení sekvencí měl původně představovat vzorek, jehož schéma je znázorněno na obr. 4.18a (struktura I). Ukázalo se však, že se jedná o směs dimerů se dvěma S–S můstky a monomerních vláseček s jedním S–S můstkem (struktura II na obr. 4.18b). Aby se zabránilo tvorbě monomerů, byla na jeden cystein každého vlákna navázána chránicí skupina acetamidomethyl (Acm), (struktura III, viz obr.4.18c).



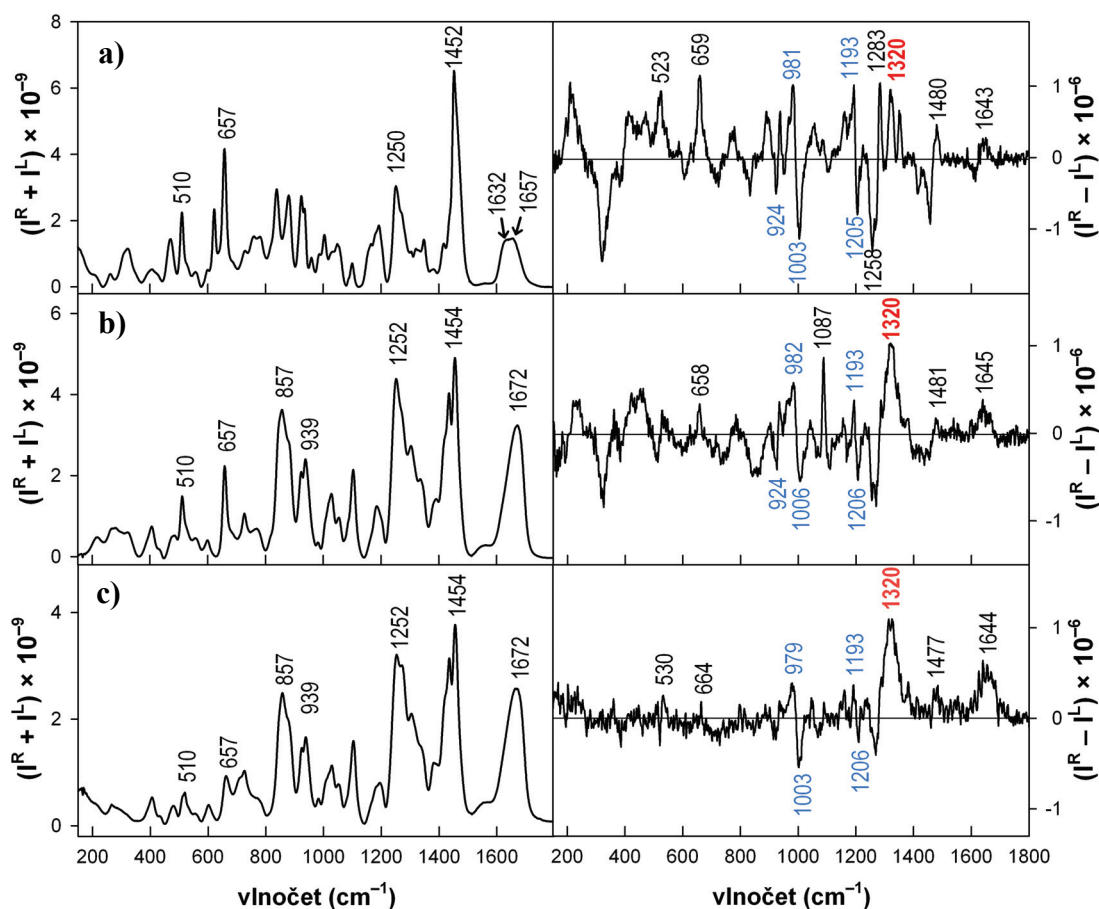
Obr. 4.18: Schematické znázornění a) struktury I (dimer se dvěma S–S můstky), b) struktury II (monomer s jedním S–S můstkem) a c) struktury III (dimer s jedním S–S můstkem). Struktura I a III má představovat nosič s navázanou antigení sekvencí (Gly-Ala-Gly)₄-NH₂.

Byla změřena spektra ECD obou vzorků hinge peptidu s navázanou antigenní sekvencí (vzorku, který je směsí struktury I a II, a struktury III) v H₂O (viz obr. 4.19). Signál v oblasti absorpce amidů potvrzuje, že obě struktury zaujímají PPII konformaci. Disulfidovým můstkům přísluší negativní pás v oblasti ~ 265 nm.



Obr. 4.19: Spektra ECD hinge peptidu s navázanou antigenní sekvencí (červeně spektrum vzorku, který je směsí struktury I a II a černě spektrum struktury III). a) Spektrum sekundární struktury (3,9 mM roztok struktury III a roztok struktury I a II v H₂O), b) oblast signálu disulfidů (0,98 mM roztok struktury III v H₂O).

Na obr. 4.20 jsou znázorněna Ramanova a ROA spektra samotného hinge peptidu (převzato z Kapitán a kol., 2006e), vzorku, který je směsí struktur I a II (vodný roztok – koncentrace neuvedena vzhledem k neznámému poměru obou struktur ve vzorku), a struktury III (vodný 11,07 mM roztok). V Ramanových spektrech všech vzorků je v oblasti C–S valenčních vibrací vidět pás ~ 657 cm⁻¹ a v oblasti S–S valenčních vibrací pás ~ 510 cm⁻¹. Relativní intenzita obou pásů je nejvyšší u samotného hinge peptidu (nejvyšší počet S–S můstků v poměru k délce řetězce). U vzorku, který je směsí struktur I a II, je signál v oblasti S–S a C–S valenčních vibrací ve srovnání s hinge peptidem méně intenzivní, ale stále ještě poměrně výrazný, zato v případě struktury III je již jeho relativní intenzita velmi slabá, neboť peptid obsahuje pouze jeden S–S můstek.



Obr. 4.20: Ramanovo (vlevo) a ROA spektrum (vpravo) a) hinge peptidu (převzato z Kapitán a kol., 2006e); b) vodného roztoku vzorku, který je směsí struktur I a II (čistá akumuláční doba 74,2 hod); c) 11,07 mM vodného roztoku struktury III (čistá akumuláční doba 63,3 hod). Modře jsou vyznačeny ROA pásy charakteristické pro PPII konformaci ve strukturách bohatých na prolin, červeně ROA signál indikující PPII konformaci u struktur obsahujících neprolinová rezidua.

Pozitivní signál v ROA spektrech v oblasti $\sim 658 \text{ cm}^{-1}$ byl v práci Kapitána a kol. spolehlivě identifikován jako pás odpovídající C–S valenčním vibracím. Naopak se ukázalo, že pozitivní ROA signál ve spektru hinge peptidu $\sim 523 \text{ cm}^{-1}$ nepřísluší S–S valenčním vibracím. Pozitivní ROA signál $\sim 658 \text{ cm}^{-1}$ lze pozorovat i ve spektrech obou vzorků s navázanou antigenní sekvencí, ale v případě struktury III je již jeho intenzita na hranici rozlišitelnosti nad úroveň šumu. ROA signál v oblasti S–S valenčních vibrací však nelze s jistotou rozpoznat ani u jedné ze struktur (v ROA spektru struktury III lze sice pozorovat slabý pozitivní signál $\sim 530 \text{ cm}^{-1}$, ten je však téměř na hranici šumu a jeho existence je tedy nejistá). Tento výsledek naznačuje, s jakými problémy se při studiu disulfidových můstků můžeme potýkat. Zatímco u vhodně zvolených modelových struktur je šance nalezení ROA signálu

disulfidových můstků poměrně vysoká, u složitějších systémů, ve kterých je relativní intenzita Ramanova signálu v oblasti C–S a S–S valenčních vibrací vůči ostatním pásům příliš nízká, může být odpovídající signál v ROA spektru velmi slabý a obtížně rozlišitelný.

V ROA spektrech všech tří peptidů lze nalézt charakteristické znaky PPII konformace. Pozitivní pás $\sim 1320 \text{ cm}^{-1}$, který je v případě samotného hinge peptidu poměrně málo intenzivní, vyniká ve spektrech obou hinge peptidů s navázanou antigenní sekvencí (pás je charakteristický pro peptidy s neprolinovými rezidui – těch je ve strukturách I, II a III mnohem více než v samotném hinge peptidu). Naopak tvar ROA signálu v oblasti $\sim 920\text{--}1005 \text{ cm}^{-1}$ a $\sim 1190\text{--}1205 \text{ cm}^{-1}$, charakteristický pro PPII konformace v peptidech bohatých na prolin, je v případě hinge peptidu s navázanou antigenní sekvencí sice méně zřetelný, ale stále rozpoznatelný.

V Ramanových spektrech lze pozorovat změny v poloze a tvaru pásu v oblasti amidu I. Zatímco u samotného hinge peptidu je pás rozšířený (lze ještě rozlišit složku odpovídající prolinovým a neprolinovým reziduím) a nachází se v oblasti nižších vlnočtů $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$, u struktur s navázanou antigenní sekvencí je pás v oblasti amidu I úzký a nachází se u $\sim 1670 \text{ cm}^{-1}$ – tedy v oblasti, ve které je pozorován i u proteinových struktur.

5 Závěr

Ramanova optická aktivita je unikátní spektroskopická metoda, která umožňuje mimo jiné detailně studovat strukturu a další vlastnosti biomolekul v roztoku. Vzhledem k poměrně velké náročnosti experimentu i teoretických výpočtů však zatím ROA není rutinně používanou technikou a dosud nebyly řádně prozkoumány všechny oblasti, ve kterých může být úspěšně využívána.

V této práci jsme se zaměřili jednak na rozvoj ROA experimentu (ověření spolehlivosti aparatury při měření biopolymerních vzorků a rozšíření měření do oblasti valenčních vodíkových vibrací) a dále na studium konformace polyprolin II (PPII) a disulfidových můstků.

Dosažené výsledky lze shrnout do následujících bodů:

- Na modelovém polypeptidu poly(Glu) byla otestována spolehlivost ROA aparatury při měření biopolymerních vzorků. Bylo ukázáno, že i v případě polymerních vzorků lze získat kvalitní ROA signál, a to jak v konvenčně měřené oblasti (nad 600 cm^{-1}), tak v oblasti nízkých vlnočtů (až do $\sim 100\text{ cm}^{-1}$).
- Byla provedena testovací ROA měření v oblasti valenčních vodíkových vibrací. I když je tato oblast díky nepříznivému poměru mezi ROA a Ramanovým signálem ($\sim 10^{-4}$) velmi náchylná ke vzniku artefaktů, výsledky pro molekulu fenchonu naznačují, že i za těchto podmínek lze v dané oblasti relativně jednoduchým postupem získat reálný ROA signál. Spolehlivé měření je však zatím možné pouze v případě jednoduchých molekul, kdy máme k dispozici oba enantiomery. Pro složitější systémy ve vodných roztocích zatím nebylo dosaženo dobrých výsledků a experiment je třeba dále rozvíjet.
- Byla změřena ROA spektra vybraných modelových peptidů, které zaujímají PPII konformaci. U struktury poly(Pro-Gly-Pro) byly v oblastech $900\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ a $1160\text{--}1210\text{ cm}^{-1}$ potvrzeny podobné spektrální rysy jako u poly(L-Pro) a dalších peptidů bohatých na prolin. Chybějící pozitivní pás $\sim 946\text{ cm}^{-1}$ však není v souladu s předpokladem, že lze struktury bohaté na prolin v oblasti $900\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ charakterizovat ROA pásy se znaménky $+ - + + -$. Charakteristické znaky PPII konformace pro struktury obsahující neprolinová rezidua byly nalezeny

v ROA spektrech oxytocinu a hinge peptidu s navázanou antigenní sekvencí, ale i v ROA spektru poly(Pro-Gly-Pro).

- Pomocí ROA byly studovány struktury obsahující disulfidové můstky. U modelových systémů (cyklodextrinové struktury různě přemostěné S–S můstky) byl v ROA spektrech nalezen signál v oblasti S–S valenčních vibrací. Pozitivní ROA signál ve spektru dimeru se třemi S–S můstky, který podle teoretických výpočtů na modelových disulfidech odpovídá kladnému dihedralnímu úhlu χ_{S-S} , je ve shodě s krystalovou strukturou (všechny tři dihedralní úhly χ_{S-S} jsou kladné). Nepodařilo se potvrdit signál odpovídající disulfidovým můstkům v ROA spektrech hinge peptidu s navázanou antigenní sekvencí, neboť ROA signál v oblasti S–S valenčních a C–S valenčních vibrací byl na hranici rozlišitelnosti nad úrovní šumu. Pozitivní ROA signál v oblasti S–S valenčních vibrací, odpovídající podle teoretických výpočtů kladnému dihedralnímu úhlu χ_{S-S} , byl ale nalezen v ROA spektru oxytocinu. Tento výsledek je ve shodě s krystalovou strukturou.

Seznam použité literatury

Adzhubei, A. A., Sternberg, M. J. E. (1993): Left-handed polyproline II helices commonly occur in globular proteins. *J. Mol. Biol.* **229**, 472–493.

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

Ashton, L., Barron, L. D., Hecht, L., Hyde, J., Blanch, E. W. (2007): Two-dimensional Raman and Raman optical activity correlation analysis of the α -helix-to-disordered transition in poly(L-glutamic acid). *Analyst* **132**, 468-479.

Barron, L. D., Buckingham, A. D. (1971): Rayleigh and Raman scattering from optically active molecules. *Mol. Phys.* **20**, 1111-1119.

Barron, L. D., Bogaard, M. P., Buckingham, A. D. (1973): Raman Scattering of Circularly Polarized Light by Optically Active Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 603-605.

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., 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. (2004a): Raman optical activity comes of age. *Mol. Phys.* **102**, 731-744.

Barron, L. D. (2004b): *Molecular Light Scattering and Optical Activity*, 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge.

Bednářová, L., Maloň, P., Bouř, P. (submitted): Vibrational and Electronic Optical Activity of the Chiral Disulphide Group. Implications for Disulphide Bridge Conformation. *Chirality*.

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. Spectrosc.* **35**, 87-92.
- 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.
- Creamer, T. P., Campbell, M. N. (2002): Determinants of the polyproline II helix from modelling studies. *Adv. Protein Chem.* **62**, 263–282.
- Deplazes, E., Van Bronswijk, W., Zhu, F., Barron, L. D., Ma, S., Nafie, L. A., Jalkanen, K. J. (2008): 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. Acc.* **119**, 155-176.
- Dodziuk, H (2006): *Cyclodextrins and Their Complexes*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Dukor, R. K., Keiderling, T. A. (1991): Reassessment of the Random Coil Conformation: Vibrational CD Study of Proline Oligopeptides and Related Polypeptides. *Biopolymers* **31**, 1747-1761.
- Gargaro, A. R., Barron, L. D., Hecht, L. (1993): Vibrational Raman Optical Activity of Simple Amino Acids. *J. Raman Spectrosc.* **24**, 91-96.
- Haesler, J., Schindelholz, I., Riguet, E., Bochet, C. G., Hug, W. (2007): Absolute configuration of chirally deuterated neopentane. *Nature* **446**, 526-529.
- Haesler, J., Hug, W. (2008): Raman Optical Activity: A Reliable Chiroptical Technique. *Chimia* **62**, 482-488.
- Hanzlíková, J., Praus, P., Baumruk, V. (1999): Raman optical activity spectrometer for peptide studies. *J. Mol. Struct.* **481**, 431-435.
- Havel, H. A. (1996): *Spectroscopic Methods for Determining Protein Structure in Solution*. VCH Publishers, Inc., New York.
- Hecht, L., Phillips, A. L., Barron, L. D. (1995): Determination of Enantiomeric Excess Using Raman Optical-Activity. *J. Raman Spectrosc.* **26**, 727-732.
- Hecht, L., Barron, L. D., Blanch, E.W., Bell, A. F., Day, L. A. (1999): Raman Optical Activity Instrument for Studies of Biopolymer Structure and Dynamics *J. Raman Spectrosc.* **30**, 815–825.
- Hug, W., Kint, S., Bailey, G. F., Scherer, J. R. (1975): Raman circular intensity differential spectroscopy. Spectra of (-)-alpha-pinene and (+)-alpha-phenylethylamine. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 5589-5590
- 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., Elstner, M., Suhai, S. (2004): Amino acids and small peptides as building blocks for proteins: comparative theoretical and spectroscopic studies. *J. Mol. Struct.* **675**, 61-77.

Kapitán, J., Baumruk, V., Gut, V., Hlaváček, J., Dlouhá, H., Urbanová, M., Wunsch, E., Maloň, P. (2005): Raman Optical Activity of the Central Part of Hinge Peptide. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **70**, 403-409.

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

Kapitán, J., Baumruk, V., Kopecký Jr., V., 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 Jr., V., 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.

Kapitán, J., Baumruk, V., Hulačová, H., Maloň, P. (2006e): Raman optical activity of the hinge peptide. *Vib. Spectrosc.* **42**, 88-92.

Krimm, S., Mark, J. E. (1968): Conformations of Polypeptides with Ionized Side Chains of Equal Length. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **60**, 1122-1129.

Kumprecht, L., Buděšínský, M., Vondrášek, J., Vymětal, J., Černý, J., Císařová, I., Brynda, J., Herzig, V., Koutník, P., Závada, J., Kraus, T. (2009): Rigid Duplex α -Cyclodextrin Reversibly Connected With Disulfide Bonds. Synthesis and Inclusion Complexes. *J. Org. Chem.* **74**, 1082-1092.

McCull, I. H., Blanch, E. W., Gill, A. C., Rhie, A. G. O., Ritchie, M. A., Hecht, L., Nielsen, K., Barron, L. D. (2003): A New Perspective on β -Sheet Structures Using Vibrational Raman Optical Activity: From Poly(L-lysine) to the Prion Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 10019-10026.

Nafie, L. A. (1995): Circular Polarization Spectroscopy of Chiral Molecules. *J. Mol. Struct.* **347**, 83-100.

Padlan E.A (1994): Anatomy of the antibody molecule. *Mol. Immunol.* **31**, 169.

Petsko, G. A., Ringe, D. (2004): *Protein structure and function*. New Science Press, Ltd, London.

Prosser, V. a kol. (1989): *Experimentální metody biofyziky*. Academia, Praha.

Siebert, F., Hildebrandt, P. (2007): *Vibrational Spectroscopy in Life Science*. Wiley-WCH, Weinheim.

Tiffany, M. L., Krimm, S. (1968): New chain conformations of poly(glutamic acid) and polylysine. *Biopolymers* **6**, 1379-1382.

Yu, G. S., Freedman, T. B., Nafie, L. A., Deng, Z. Y., Polavarapu, P. L. (1995): Experimental Measurement and *ab initio* Calculation of Raman Optical Activity of L-Alanine and its Deuterated Isotopomers. *J. Phys. Chem.* **99**, 835-843.

Zhu, F., Isaacs, N. W., Hecht, L., Barron, L. D. (2005): Raman Optical Activity: A Tool for Protein Structure Analysis. *Structure* **13**, 1409-1419.