

CD-spektroszkópia

Az ORD spektroszkópia alapja

- A XIX. század elején **Biot** megfigyelte, hogy bizonyos, a természetben előforduló szerves anyagok a lineárisan polarizált **fény síkját elforgatják**.
- 1817-ben -, **Biot** és **Fresnel** egymástól függetlenül felismerték, hogy az elforgatás szöge függ az alkalmazott **fény hullámhosszától**, ami az ORD (Optikai Rotáció Diszperziója) mérések alapja.

A CD spektroszkópia alapja

1850 körül **Haidenger**:

a jobbra ill. balra cirkulárisan polarizált fényvel szemben az **abszorpciós tulajdonságok** is különbözőek lehetnek. Ez a fizikai jelenség képezi a Cirkuláris Dikroizmus (CD) mérések alapját.

(Haidenger kvarckristályokkal folytatott méréseket)

$$\Delta A = A_L - A_R = (\varepsilon_L - \varepsilon_R)cl = \Delta\varepsilon cl$$

A: abszorbancia,

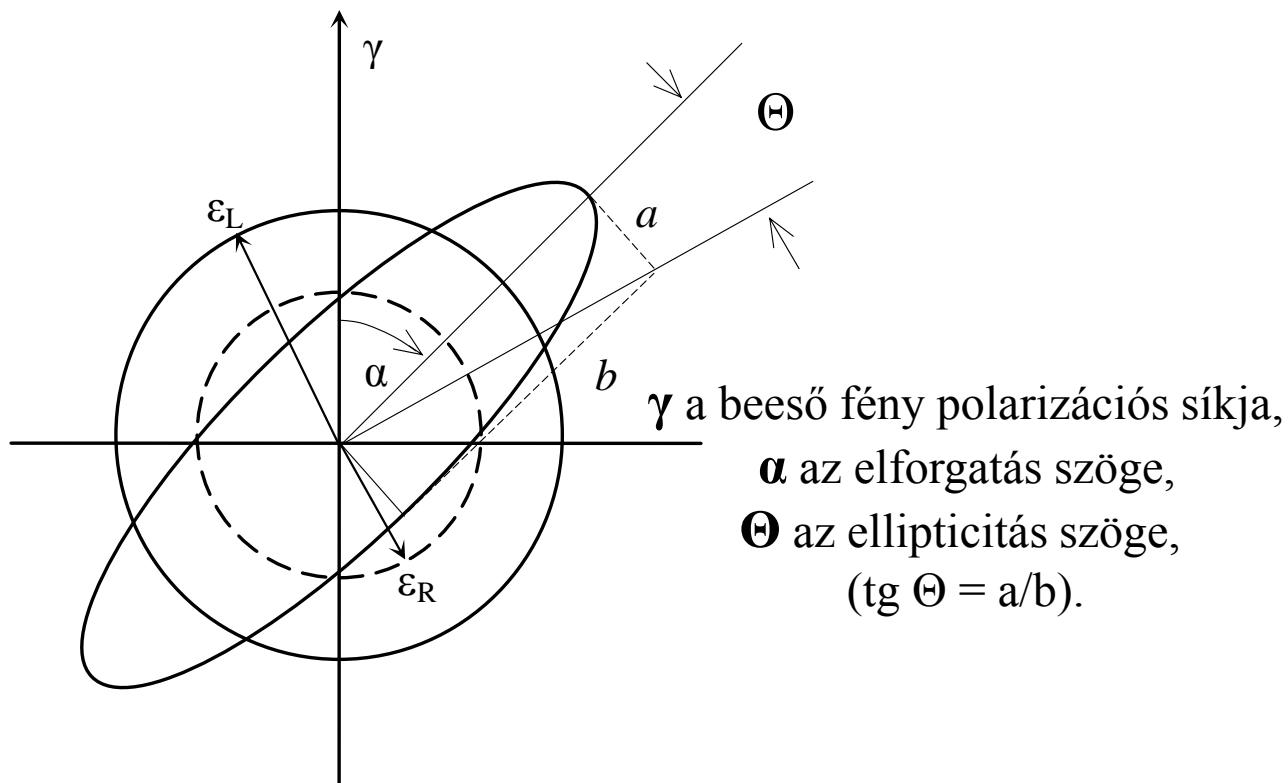
ε : moláris extinkciós koefficiens,

c: az oldat koncentrációja,

l: a közeg rétegvastagsága.

Az **L** és az **R** indexek a balra és a jobbra cirkulárisan polarizált fényre vonatkozó értékekre utalnak.

A jobbra és balra cirkulárisan polarizált fény **terjedési sebességének** és **abszorpciójának** eltérése az optikailag aktív anyagban egy másik jelenséget is eredményez:
 a lineárisan polarizált fény **elliptikusan polarizálttá válik**,
 amit moláris ellipticitásként mérhetünk:



Az elliptikusan polarizált fény kialakulásának szemléltetése.

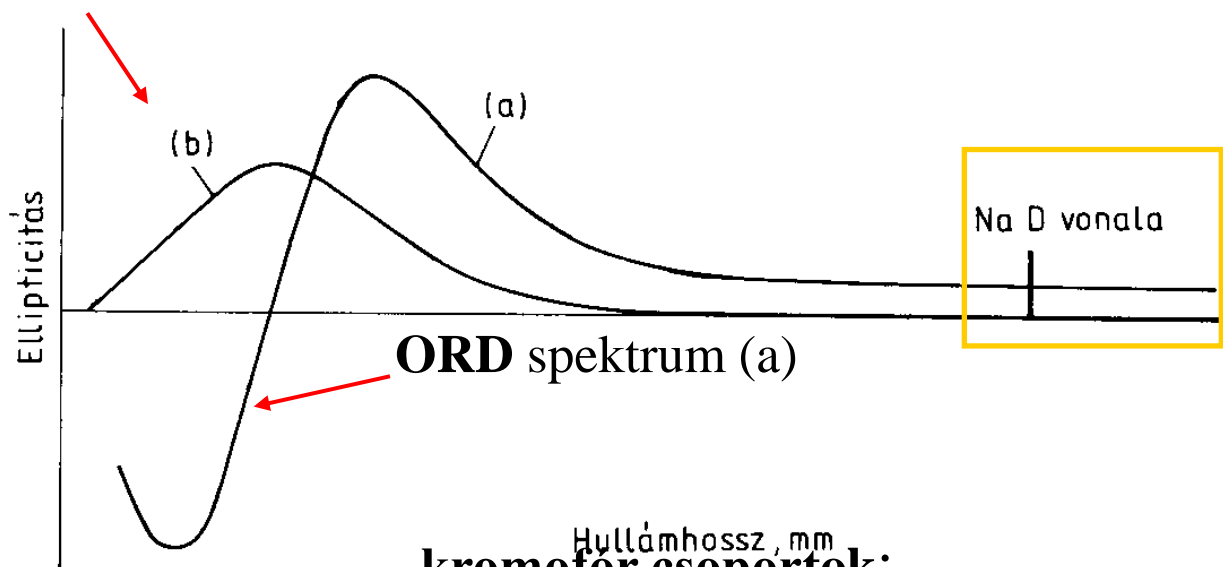
A cirkuláris dikroizmus ($\Delta\varepsilon$) és a moláris ellipticitás ($[\Theta]$) közötti összefüggés a következő:

$$[\Theta] = 3300\Delta\varepsilon$$

A **CD** mérések során egy-egy átmenethez tartozó sáv alakja egy vagy több Gauss görbével közelíthető

Az **ORD** mérések mindig egy pozitív-negatív vagy negatív-pozitív csúcs párt eredményeznek: amit Cotton effektusnak is nevezünk

CD spektrum (b)



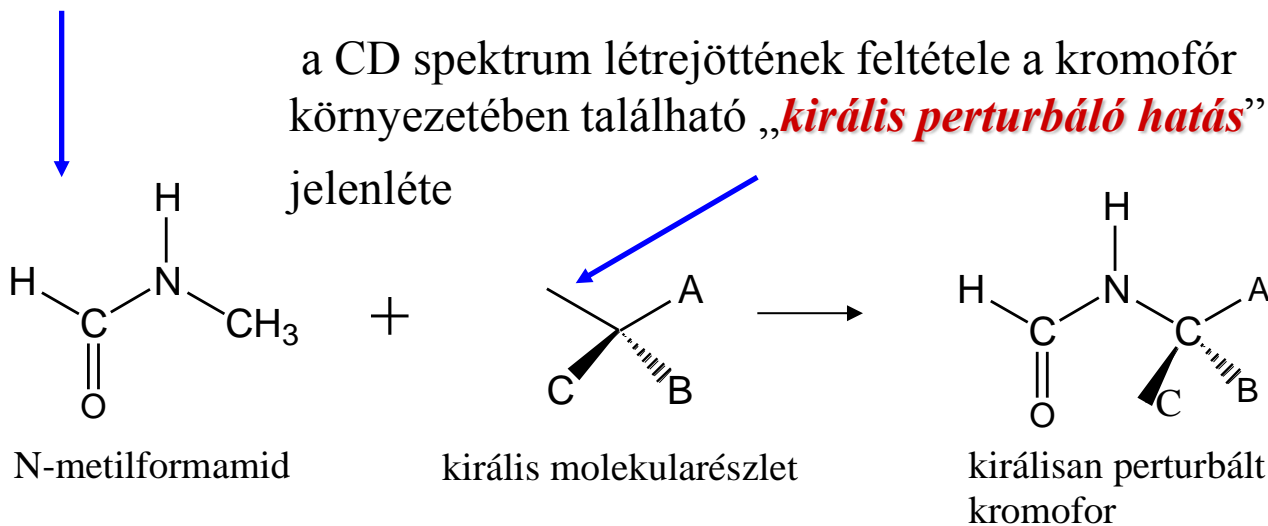
kromofór csoportok:

a molekulában található atomcsoportok, amelyek egy-egy elektronátmenetéhez rendelhetők hozzá a spektrumokban azonosítható sávok.

(UV spektroszkópiához hasonló)

a kromofórok leggyakrabban akirálisak:
(pl. aril-, amid-, esztercsoport)

a CD spektrum létrejöttének feltétele a kromofór környezetében található „**királis perturbáló hatás**” jelenléte



Az ORD spektrum

problémája: a csúcsok óhatatlanul **átfednek**

magyarázat: a sávok szélesek,
az abszorpciós maximumtól λ_0 távolságban
a $(\lambda^2 - \lambda_0^2)^{-2}$ függvény szerint közelítenek a nullához


következmény: ORD készülékek fokozatosan háttérbe szorultak

A Cirkuláris Dikroizmus fizikai alapjai

Pasteur (1848) molekulák szerkezetének disszimmetriája okozza

Drude (1892) elektrodinamikai alapokon nyugvó elméletét

Rosenfeld (1928) kvantummechanikai értelmezés


$$R_{0j} = \text{Im} \{ \mu_{0j} \cdot m_{j0} \}$$

a 0-val jelölt alapállapot

a j-vel jelölt gerjesztett állapot
közötti átmenet esetében létrejövő

rotátorerősség (R_{0j})

kifejezhető

az elektromos (m_{j0}) és

a mágneses átmeneti

dipólusmomentum (μ_{0j})

vektorok **skaláris szorzataként**

praktikus követelmény

a CD átmenet során a molekulában

az elektromos és mágneses átmeneti dipólusmomentumnak egyszerre

kell megváltozniuk **de úgy**, hogy a két átmeneti momentum vektor

nem lehet egymásra merőleges

Az elmélet és a gyakorlat kapcsolata

$$R = 2,297 \cdot 10^{-39} \int_0^{\infty} \frac{\Delta \varepsilon}{\lambda} d\lambda$$

A rotátorerősséget tehát a CD görbe alatti terület integrálásával kaphatjuk meg.

empirikus közelítés:

$$R \approx 2,297 \cdot 10^{-39} \frac{\Delta \varepsilon_{\max} \cdot \Delta \lambda}{\lambda_{\max}}$$

$\Delta \varepsilon_{\max}$ a maximális CD intenzitást

λ_{\max} a csúcs helyét

$\Delta \lambda$ a csúcs félérték szélességét jelenti.

CD spektroszkópia szerepe a szerkezetkutatásban:

- kezdetben csak diszkrét hullámhosszakon (általában 589 nm-en, a Na D-vonalán) mértek forgatóképességet.

- később

Doty, Moffit és Yang (1950) szintetikus polipeptideken ORD mértek

Crick és Kendrew (1957) α -hélixek szerkezetének tanulmányozása

Holzwarth és Doty (1965-ben) az első CD mérések α -hélixeken

Az amid kromofór CD spektroszkópiai viselkedése

méréstechnikai okok miatt: Elsősorban 250 nm-től a 180 nm-ig

$n \rightarrow \pi^*$ átmenet: a karbonil oxigén nemkötő pályája és az amid csoport π^* lazító pályája közötti,

$\pi \rightarrow \pi^*$ átmenet: másrészt az amid csoport legmagasabb energiájú kötő π pályájáról a lazító π^* pályára történő.

Az $n\pi^*$ átmenet (≈ 230 nm)

intenzitás: gyenge átmenet

oldószerfüggés : erős

a karbonil oxigén proton akceptor tulajdonsága miatt

hipszokróm eltolódás akár 210 nm-ig is

! mágneseesen megengedett, de elektromosan tiltott (a kiválasztási és szimmetria szabályok miatt)

Az $\pi\pi^*$ átmenet (≈ 190 nm)

intenzitás: erős átmenet

oldószerfüggés : jelentéktelen

! elektromosan megengedett, de mágneseesen tiltott

memo: Rotátor erősséget akkor „mérünk”, ha az elektromos átmeneti dipólusmomentum mellett mágneses átmeneti dipólusmomentum is létrejön

akirális amidok esetében nem várhatunk CD spektrumot (lásd átmenetek sajátosságai)

királis elektrosztatikus térben lévő amid csoport:

az egy elektron mechanizmus:

Ha a molekuláris környezete olyan

(pl. másik amid vagy poláris csoport van a közelében),

akkor az addig szimmetria tiltott átmenetek

a perturbáló hatás miatt CD spektrumot eredményezhetnek

μ -m mechanizmus (a csatolt oszcillátor vagy exciton modell):

több egymáshoz térben közeli amidcsoport elektromosan

megengedett együttes gerjesztése (például egy α -hélix mentén)

ennek során kialakuló cirkuláris töltésmozdulás hoz létre mágneses átmeneti dipólusmomentumot és így lesz CD spektrum

eredmény: a CD spektrum mindig két ellentétes előjelű sávból (CD *couplet*) áll

Peptidek és fehérjék jellegzetes CD spektrumai

Az **α -hélix:**

$n\pi^*$ átmenet gyenge negatív sáv (220 nm)

intenzitása nem nagyon függ a hélix hosszúságától.

$\pi\pi^*$ átmenet (190 nm) jelentkező sávja

exciton felhasadást szenved (192 nm-nél pozitív),

(208 nm-nél egy negatív sáv)

intenzitása a peptidlánc hosszúságától erősen függ.

(Woody jelölésmódjában C-típusú spektrum)

A **β -réteg:** két nagy sávból áll:

216 nm-nél egy negatív és

195-200 nm között egy erősebb pozitív sáv található.

legalább 5-7 aminosav hosszúságú β -réteg térszerkezetű lánc szükséges, formája nagyon változatos

(Woody jelölésmódjában A típusú spektrum)

Az **I és III típusú β -kanyarok:**

CD spektruma az α -hélixéhez hasonlóan C típusú

a $\pi\pi^*$ (200 nm tájékán) negatív sáv,

alacsonyabb hullámhossz tartományban egy pozitív sáv

az $n\pi^*$ (220 nm) az α -hélix spektrumához hasonlóan negatív előjelű

(Woody jelölésmódjában C-típusú spektrum)

A **II típusú β -kanyarok:**

a $\pi\pi^*$ (csúcsok előjel sorrendje fordított mint a C típusú spektrumban)

200 nm-nél a sáv pozitív előjelű,

a “couplet” alacsonyabb hullámhossznál jelentkező

másik sávja negatív előjelű.

(Woody jelölésmódjában B-típusú spektrum)

A **poliprolin-II** :

a kollagénekre különösen jellemző,
az $n\pi^*$ átmenet 226 nm-nél egy gyenge pozitív,
a $\pi\pi^*$ átmenet 206 nm-nél egy erős negatív sáv

(U típusú spektrum).

Aperiodikus vagy rendezetlen :

CD spektrumuk poliprolin-II szerű

200 nm tájékán egy változó erősségű negatív sáv található,

melyre 220 nm-nél egy negatív váll, vagy pozitív sáv szuperponálódik.

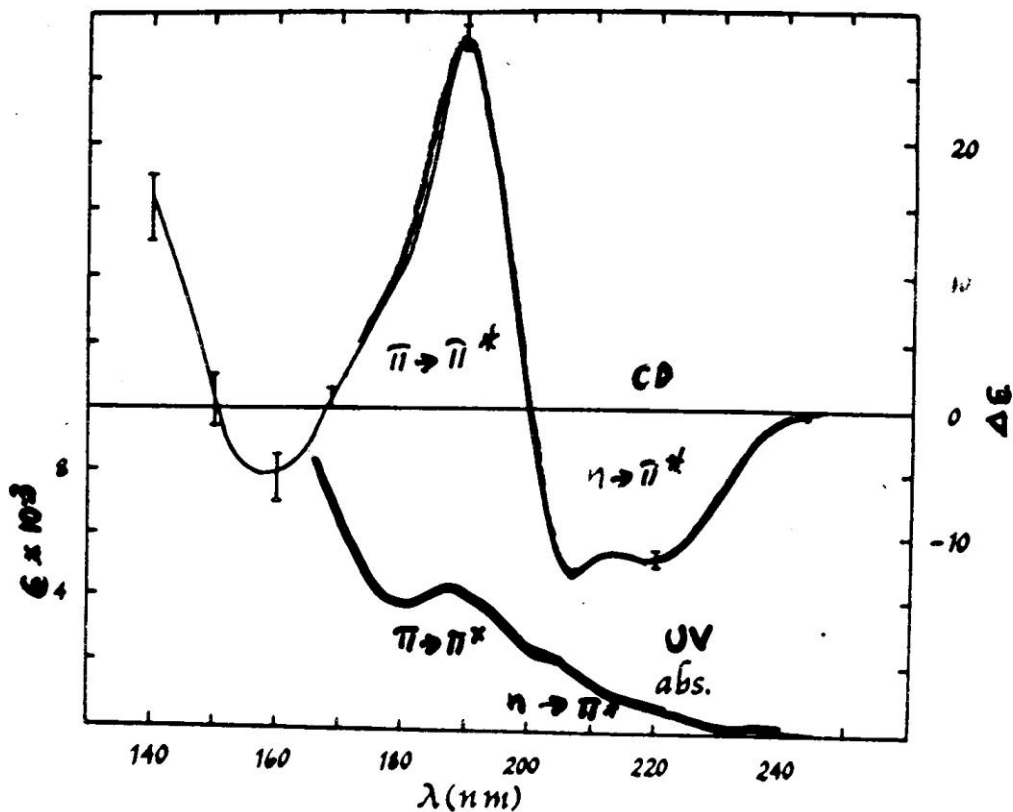


Figure 2. Absorption and CD spectra of poly(Glu-OMe) in hexafluoro-2-propanol (Johnson and Tinoco, 1972). [From Johnson and Tinoco (1972), with permission. Copyright 1972 American Chemical Society.]

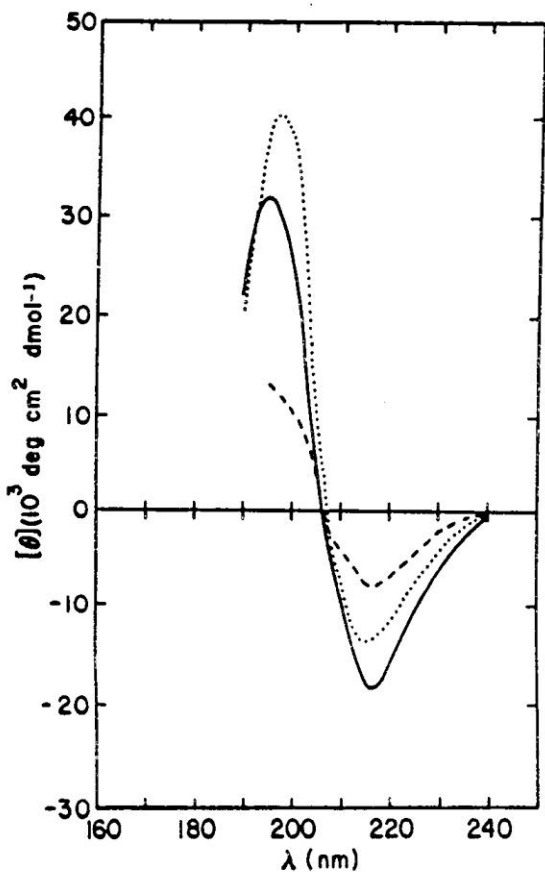


Figure 3. CD of polypeptides in the β pleated sheet conformation. —, Poly(Lys), pH 11.1, after heating at 52°C for 15 min, followed by cooling to 22°C (Greenfield and Fasman, 1969); ---, poly(Lys) in 1% sodium dodecyl sulfate (Li and Spector, 1969); ···, poly(Lys-Leu-Lys-Leu) in 0.1 M NaF, pH 7 (Brahms *et al.*, 1977).

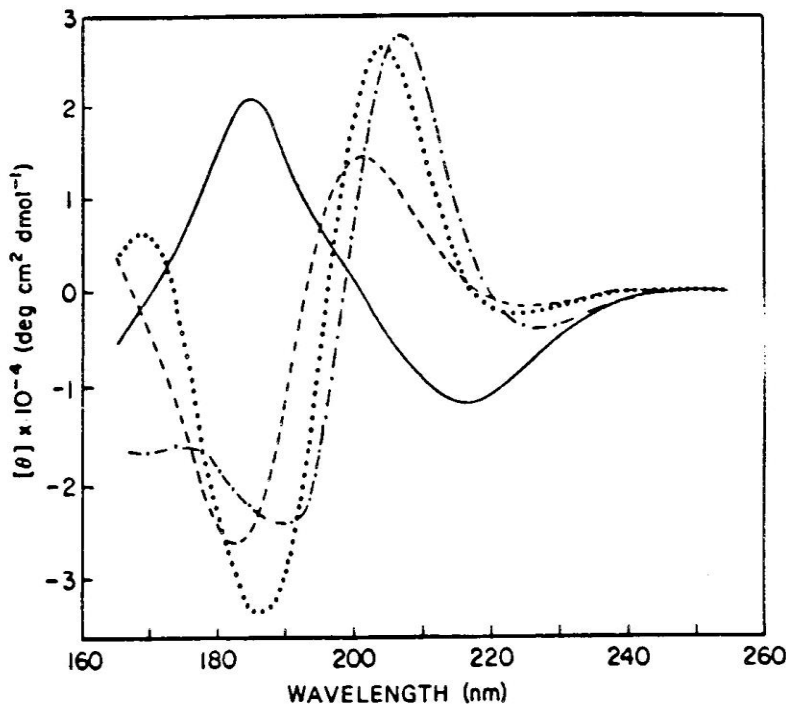


Figure 4. CD spectra of model β turns. ---, Poly(Ala₂-Gly₂) in H₂O. [Note that the experimental curve for this polypeptide is actually twice as intense as the curve shown, which is the one used by Brahms and Brahms (1980) in their analysis of protein secondary structure.] ···, *N*-Isobutyl-LPro-DAla-isopropylamide film cast from methanol solution. ---, *N*-Acetyl-LPro-Gly-LLeu-OH in trifluoroethanol at -60°C. - · - ·, cyclic polypeptide, cyclo(DAla-LAla-LAla-DAla-DAla-LAla) in D₂O. [From Brahms and Brahms (1980), with permission.]

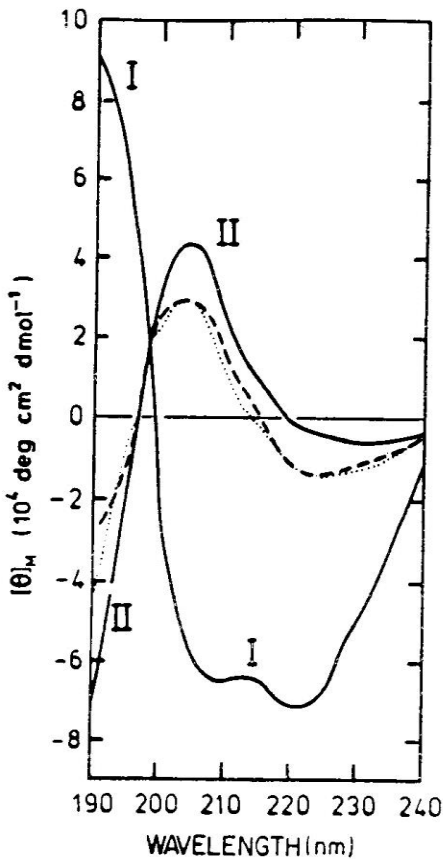


Figure 11. CD spectra of cyclo(LAla-LAla-Aca) (—, I), cyclo(LAla-DAla-Aca) (—, II), and cyclo(LAla-Gly-Aca) (---). The spectra were obtained at 22°C in methanol. The dotted line is a calculated CD spectrum corresponding to a linear combination of spectra I (15%) and II (85%). This corresponds to an 85:15 mixture of type II and I β turns, respectively. [From Bandekar *et al.*, (1982), with permission. Copyright 1982 Munksgaard International Publishers Ltd., Copenhagen.]

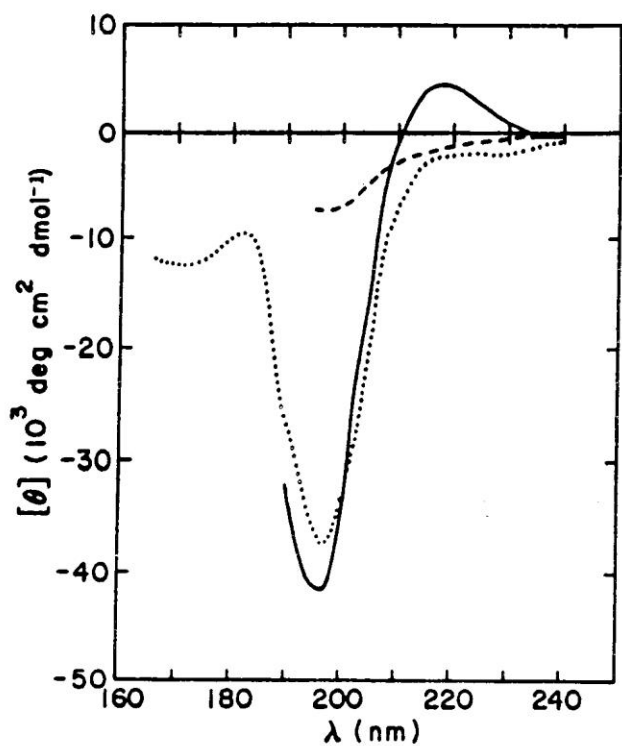
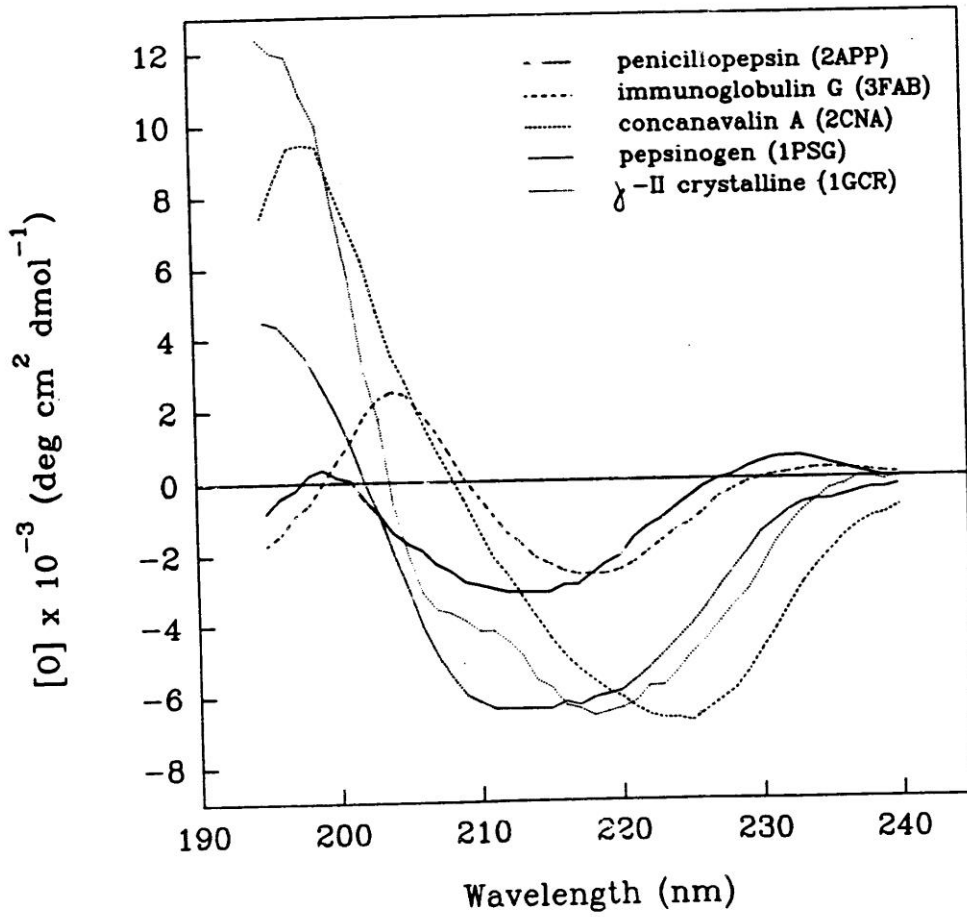
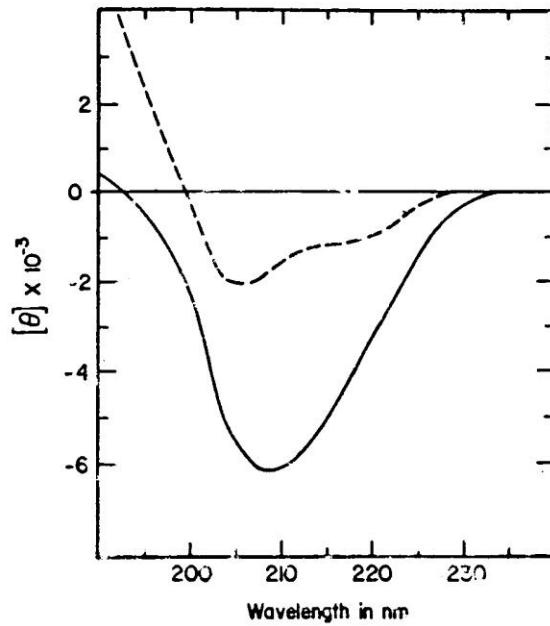


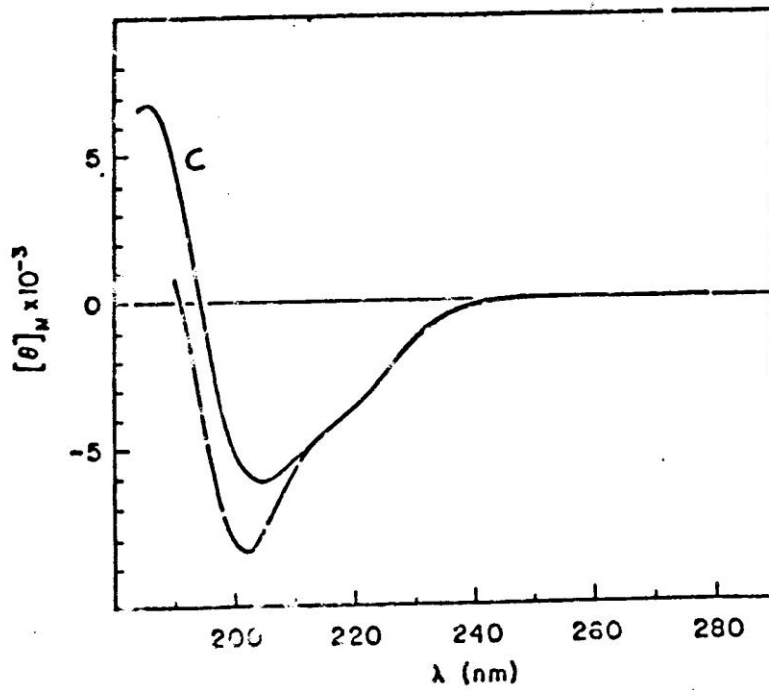
Figure 6. CD spectra of unordered polypeptides. —, Poly(Lys), pH 5.7, (Greenfield and Fasman, 1969); ---, poly(Ser) in 8 M LiCl (Quadrifoglio and Urry, 1968); ····, poly(Lys-Leu-Lys-Leu) in 0.1 M NaCl (Brahms *et al.*, 1977).

CD Spectra of β -Proteins





Circular dichroism of lacto-N-tetraose [β -Gal-(1 \rightarrow 3)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- β -Gal-(1 \rightarrow 4)-Glc], in water (—) and in hexafluoro-2-propanol (----) solution.



Class C spectrum (—) of cyclo[NH-(CH₂)₄-CO-Gly-Pro-Ser(OBu^t)-Gly]

A CD spektrumok kvantitatív kiértékelési lehetőségei

CD spektrum számos paraméter függvénye

$$\Theta_{\lambda} = f(\lambda, T, c, s, I, \dots)$$

Moffit féle, exciton modellből származó összefüggés
CD görbék értelmezéséhez

$$\alpha_{hélix}(\%) = \frac{|\Theta_{208}| - 4000}{33000 - 4000}$$

Tfh. egy CD spektrum $[f(\lambda)]$ additíven tevődik össze
a másodlagos térszerkezetre jellemző "tisza" komponens
spektrumokból vagy bázisgörbékéből $[g_i(\lambda)]$

$$f(\lambda) = \sum_{i=1}^N p_i \cdot g_i(\lambda) + zaj$$

A közelített j . CD görbét a következő formában írhatjuk fel

$$f_j^c(\lambda) = \sum_{i=1}^P p_{i,j} g_i(\lambda)$$

$p_{i,j}$ koefficiensek,
 $g_i(\lambda)$ az egyes bázisgörbék

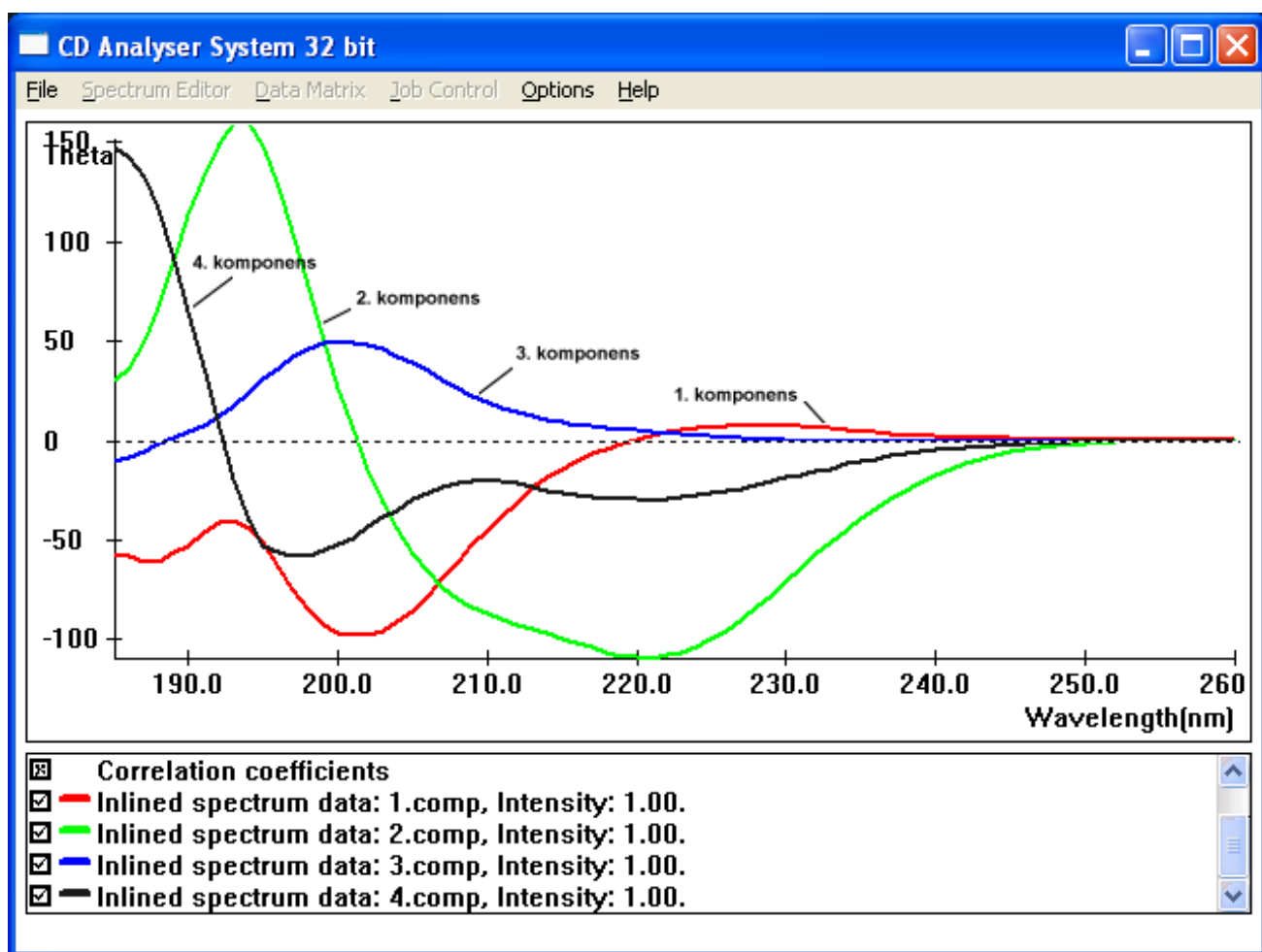
Cél: minimalizálás

$f_{jm}(\lambda)$ az N darab mért CD görbét,
 $f_{jc}(\lambda)$ a bázisgörbék lineáris kombinációjával közelített spektrum,
 P a bázisgörbék száma

$$\left[\sum_{j=1}^N f_j^m(\lambda) - \sum_{j=1}^N f_j^c(\lambda) \right]^2 = \left[\sum_{j=1}^N f_j^m(\lambda) - \sum_{j=1}^N \sum_{i=1}^P p_{i,j} \cdot g_i(\lambda) \right]^2$$

$$\sum_{i=1}^P p_{ij} = 1, \text{ ahol } j = 1, 2, \dots, N$$

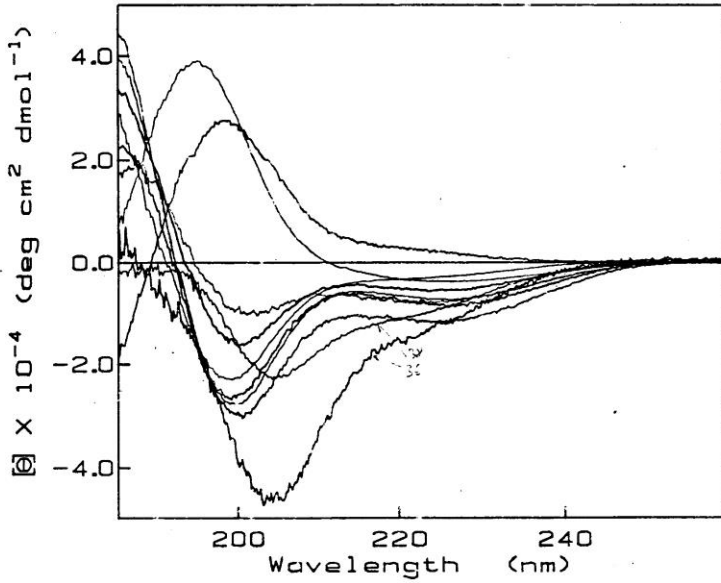
$$p_{ij} \geq 0, \text{ ahol } i = 1, 2, \dots, P \text{ és } j = 1, 2, \dots, N$$



A peptid modellek CD spektrumainak febonrásából (CCA+) kapott négy komponens spektrummal

PEPTIDES IN CH3CN

10-10-80



SENSITIVITY:
SE-08
STEP SIZE 0.00,
.2
NUMBER OF CYCLES
4
RESPONSE TIME (S)
2
CONC (MG/ML):
.04
PATHLENGTH (CM),
.02
MOL WT:
345.4

REMARKS:
BOC-LEU-THR-NHME
BOC-PRO-THR-NHME
BOC-VAL-TIR-NHME
BOC-PYL-D-SER-NH
BOC-PRO-SEA-NHME
BOC-VAL-SER-NHME1
BOC-VAL-D-SER-NH
BOC-GLY-SER-NHME
AP36
AP38

P=3
↙

P=2
↘

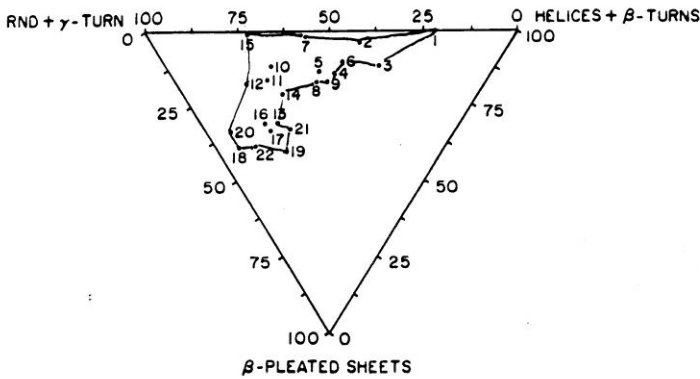
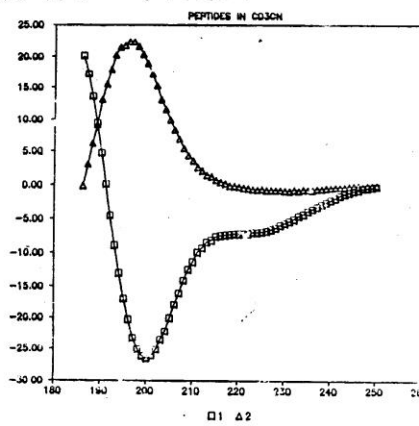
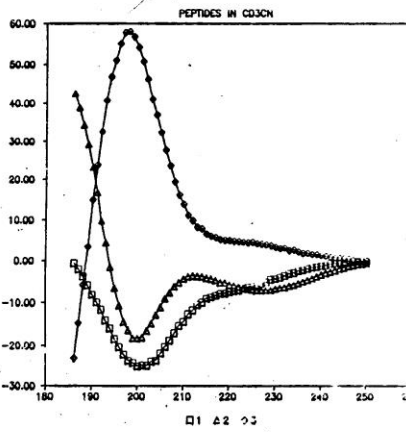
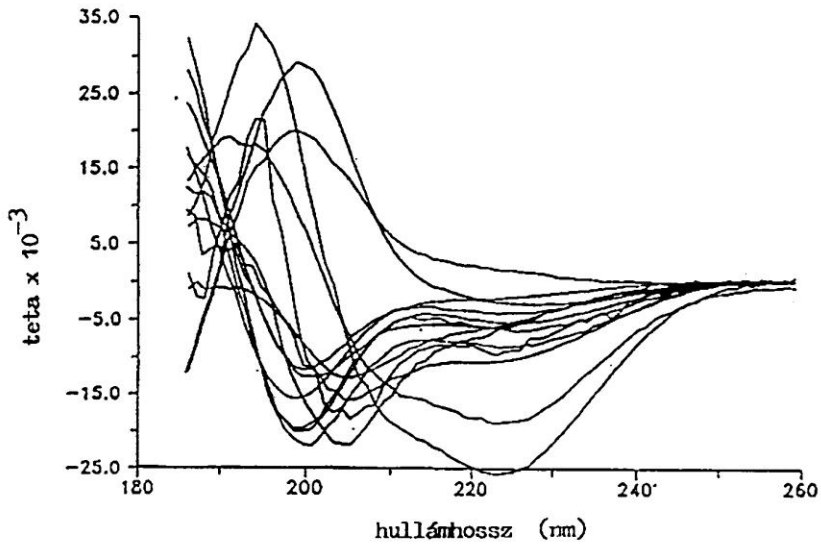
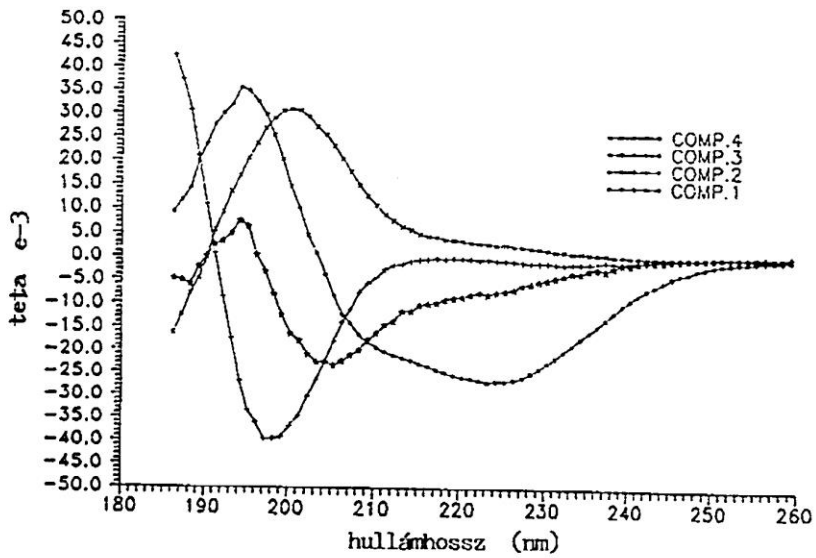


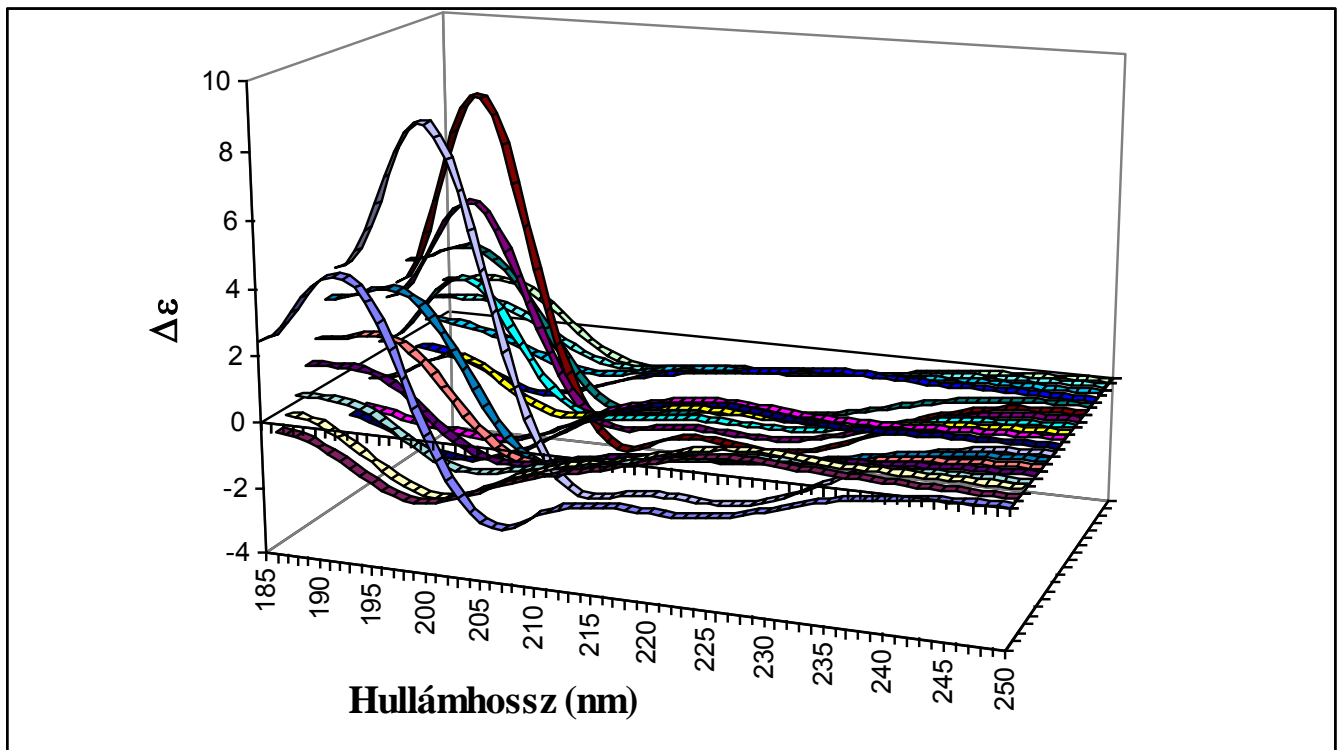
Fig. 2. The secondary structure "distribution" of the 22 proteins involved in the analysis. The three vertices of the triangle (simplex) are (RND + γ -turns), (α -helices + β -turns), and β -pleated sheets. The 3D structures of the proteins are mostly mixtures of these secondary structural elements. (Note that only one protein, the 1MBD is close to a vertex.)



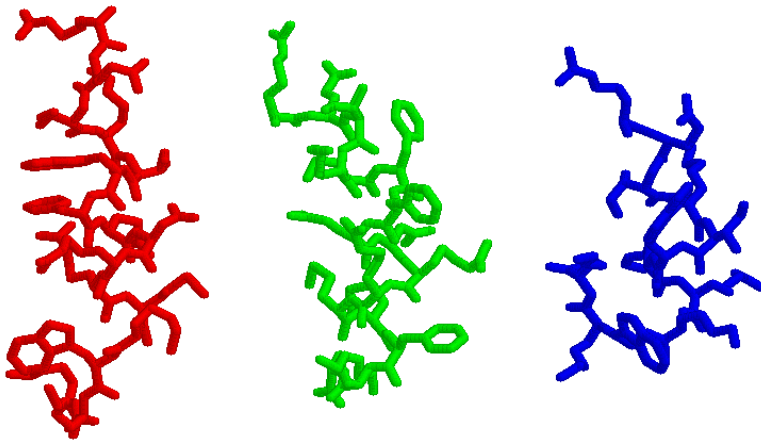
$$\left(\sum_{j=1}^N f_j^m(\lambda) - \sum_{j=1}^N \sum_{i=1}^P w_{ij} * g_i(\lambda) \right)^2 \longrightarrow \text{minim.}$$



3. ábra. N számú f^m CD görbe (felső rész) dekonvolúcióval felbontható P számú g komponensgörbére (alsó rész)



Penetratin és analógjainak különböző közegben felvett, összesen 19 CD spektruma



A penetratin és analógjainak NMR szerkezete