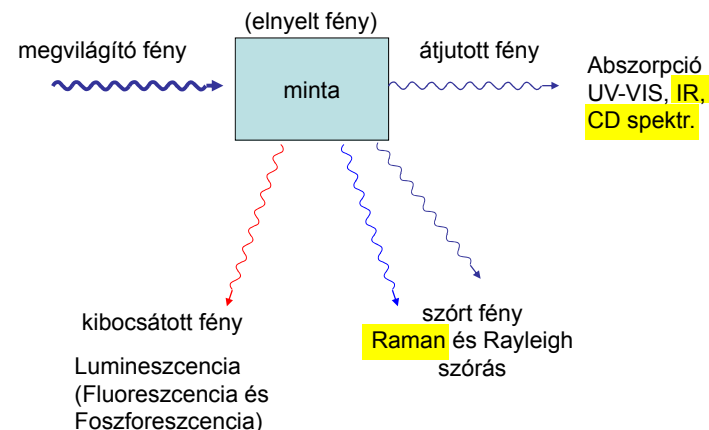


Infravörös és CD spektroszkópia a fehérjeszerkezet vizsgálatában

Smeller László

Mi történhet, ha egy mintát fénnel világítunk meg?

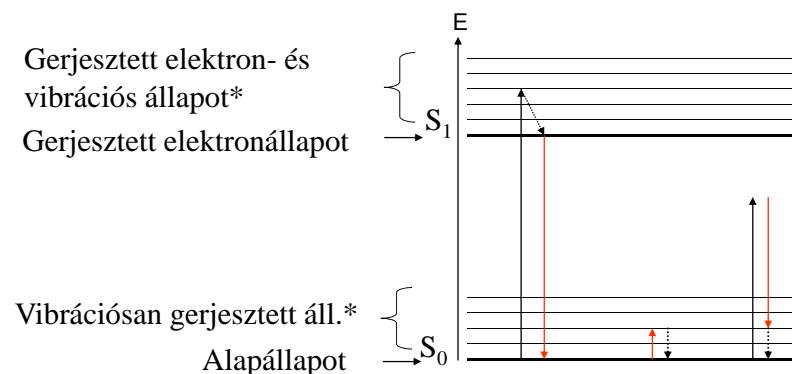


Abszorpciós és emissziós spektroszkópia

- Az átjutott vagy kibocsátott fény analízálása a hullámhossz függvényében.
- Információ:
 - atomok, molekulák azonosítása,
 - molekuláris szintű szerkezetváltozások (konformációváltozások) detektálása,
 - koncentráció meghatározás

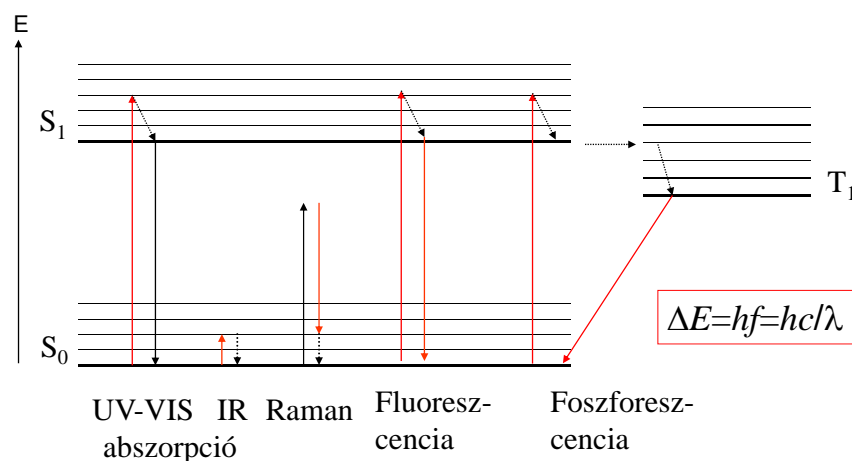
Miért nyel el ill. bocsát ki fényt egy atom v. molekula?

- Energiaátmenet: ld. Jablonski diagram

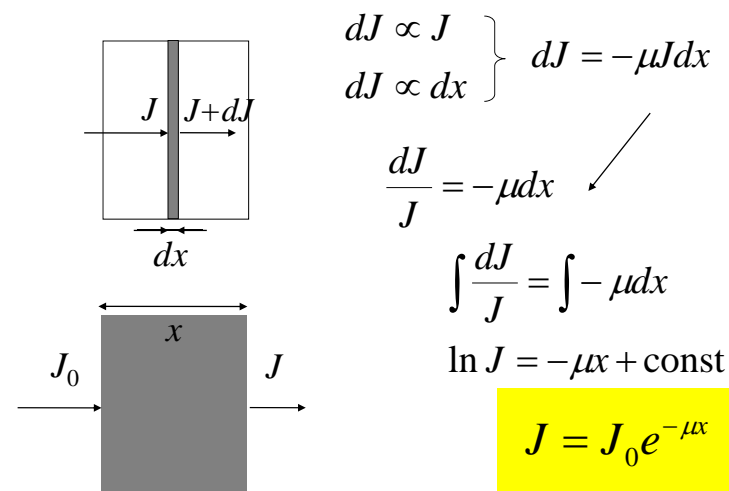


*csak molekuláknál!

Miért nyel el ill. bocsát ki fényt egy atom v. molekula?



Abszorpciós spektroszkópia Abszorpciós törvény



Abszorpciós spektroszkópia Lambert-Beer törvény

Elvi alapja: abszorpciós törvény: $J = J_0 \cdot e^{-\mu x}$
ahol $\mu(\text{anyag}, c, \lambda)$

• Lambert-Beer törvény:

$$A = \lg \frac{J_0}{J} = \varepsilon(\lambda) c x$$

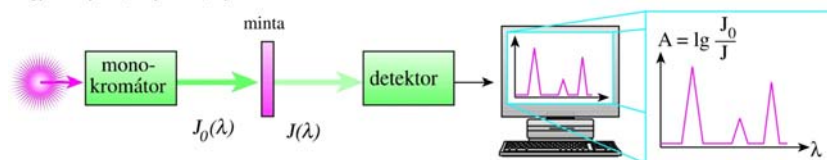
- spektrum: $A(\lambda)$
- mérés: spektrofotométer
- referencia oldat (J_0)
- információ: azonosítás
koncentráció.

Infravörös spektroszkópia

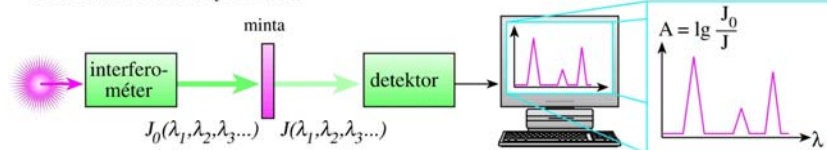
- Infravörös fény: $\lambda = 800 \text{ nm} - 1 \text{ mm}$
közép infra tartomány: $2,5 - 50 \mu\text{m}$
- abszorpciós spektroszkópia
- az elnyelt infravörös sugárzás
molekularezgéseket kelt
- érzékeny a molekulaszervezetre
- speciális detektálás: FT spektrométer
(FTIR spektroszkópia)

Az infravörös spektrum mérése: Fourier transzformációs spektrométer

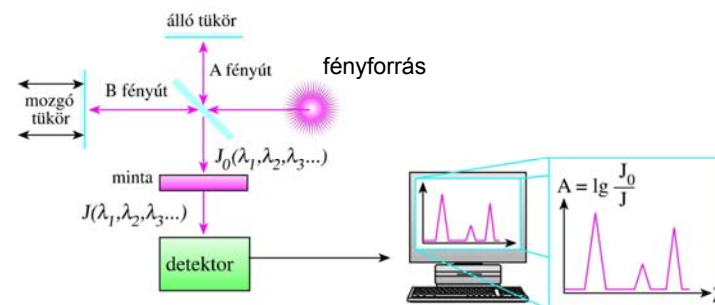
hagyományos (diszperziós) spektrométer



Fourier transzformációs spektrométer

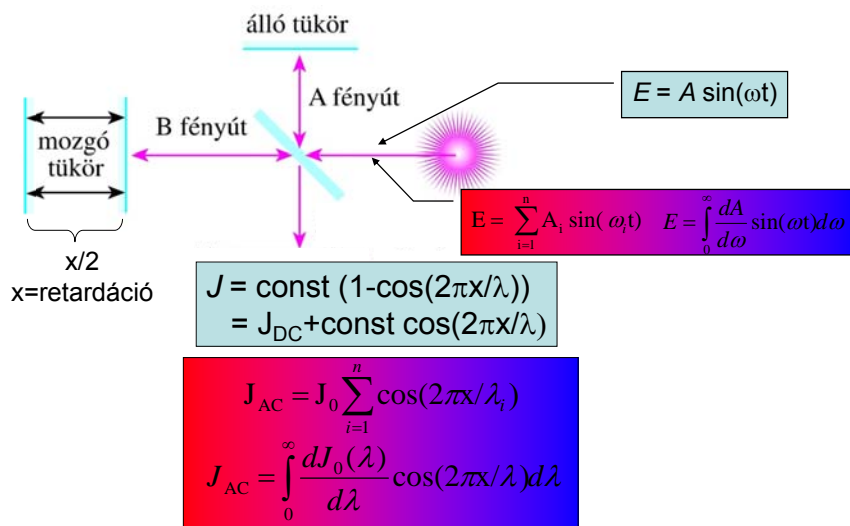


tk 6.17 ábra



tk 6.18 ábra

FTIR elve részletesen



Fourier transzformáció

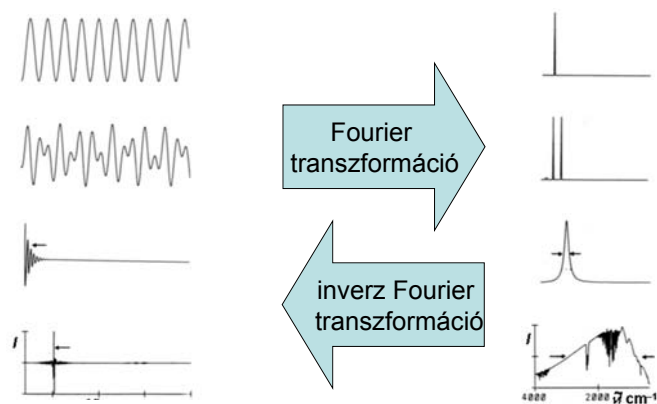
Egy $f(t)$ függvény Fourier transzformáltja a $g(x)$ függvény:

$$F(f(t)) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) e^{-2\pi i \nu t} dt = g(\nu)$$

A Fourier transzformáció inverze:

$$F^{-1}(g(\nu)) = \int_{-\infty}^{\infty} g(x) e^{2\pi i \nu t} d\nu = f(t)$$

A Fourier transzformáció szemléltetése



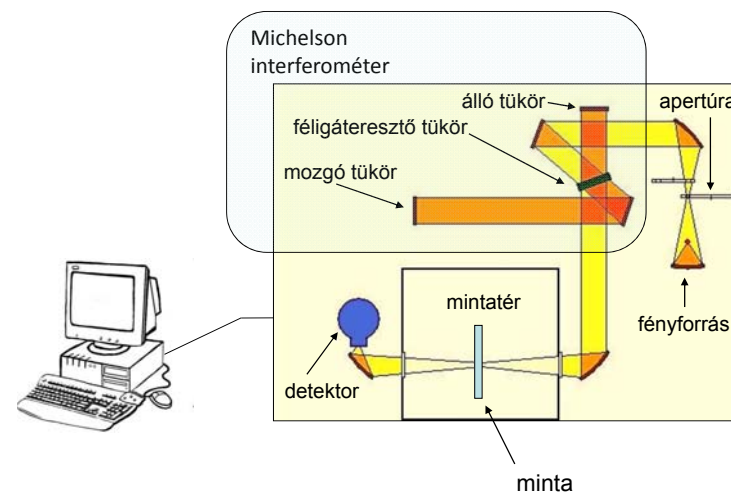
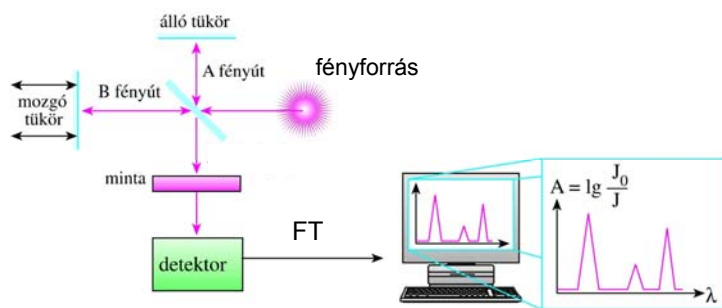
A spektrum számolása a Fourier transzformációs spektrométerben

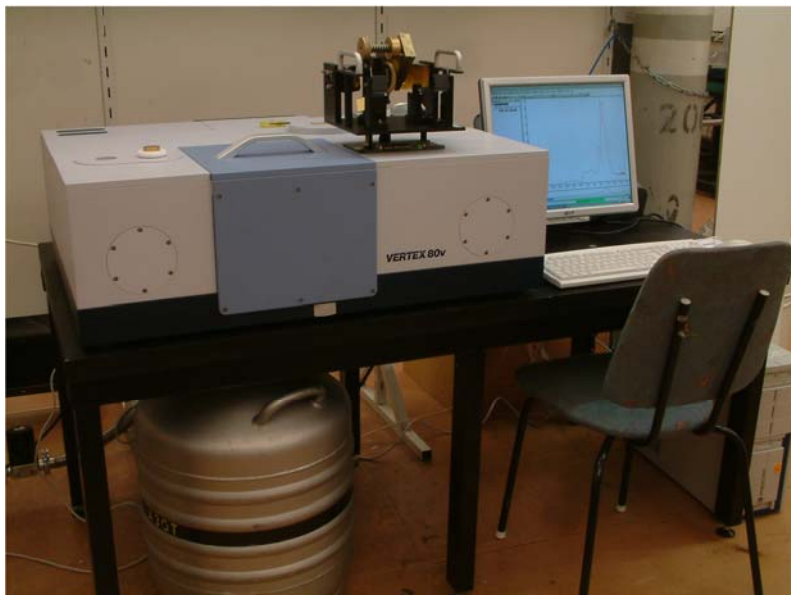
Az interferométeren keresztüljutott sugárzás:

$$J_{AC} = \int_0^{\infty} \frac{dJ_0(\lambda)}{d\lambda} \cos(2\pi x/\lambda) d\lambda$$

éppen a $\frac{dJ_0(\lambda)}{d\lambda}$ mennyiség *cosinus* transzformáltja

A spektrum a $\frac{dJ_0(\lambda)}{d\lambda}$ -nek a mintán való áthaladása után megmaradt részének és a $\frac{dJ_0(\lambda)}{d\lambda}$ -nak a hányadosa (transzmissziós spektrum)



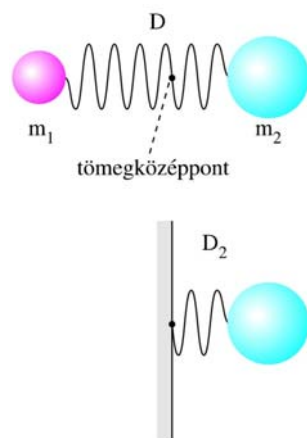
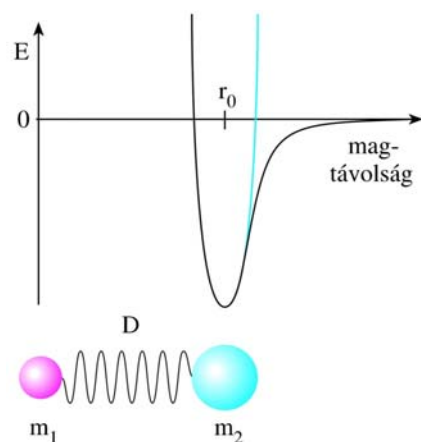


Molekularezgések

Az elektronok könnyűek, gyorsan követik az atommag mozgását, ezért az atommagok rezgéseit az elektronok nem befolyásolják.

A klasszikus fizikai leírásban az atommagok közti kötést, egy rugóval vesszük figyelembe.

Molekularezgések: kétatomos molekula

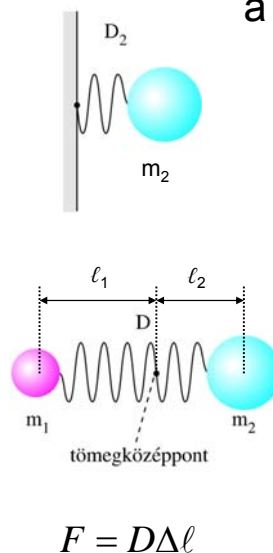


a középiskolából ismert:

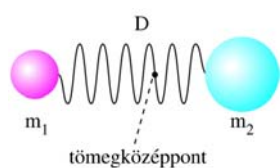
$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D_2}{m_2}}$$

$$\frac{m_2}{m_1} = \frac{\ell_1}{\ell_2} = \frac{\Delta \ell_1}{\Delta \ell_2}$$

$$\begin{aligned} \frac{m_1 + m_2}{m_1} &= \frac{\ell_1 + \ell_2}{\ell_2} = \frac{\ell}{\ell_2} = \frac{\Delta \ell}{\Delta \ell_2} = \\ &= \frac{F / D}{F / D_2} = \frac{D_2}{D} \end{aligned}$$



tehát: $\frac{m_1 + m_2}{m_1} = \frac{D_2}{D}$, amit az $f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D_2}{m_2}}$



egyenletbe helyettesítve
a rezgési frekvencia:

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D(m_1 + m_2)}{m_1 m_2}}$$

az $m_{\text{redukált}} = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$ mennyiséget redukált

tömegnek is nevezik, ezzel a frekvencia:

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D}{m_{\text{redukált}}}}$$

A hullámhossz: $\lambda = \frac{c}{f} = 2\pi c \sqrt{\frac{m_{\text{redukált}}}{D}}$

Az infravörös spektroszkópiában a λ
reciprokát, a hullámszámot (ν) használják:

$$\nu = \frac{1}{\lambda} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{D}{m_{\text{redukált}}}}$$

ν : hány hullám fér
el egységnyi
hosszúságon? [cm^{-1}]

Példa: CO

A mért rezgési hullámszám: $\nu = 2143 \text{ cm}^{-1}$

$$\Rightarrow \lambda = 4,67 \mu\text{m} \Rightarrow f = 6,43 \cdot 10^{13} \text{ Hz}$$

$$m_{\text{C}} = 2 \cdot 10^{-26} \text{ kg}, m_{\text{O}} = 2,7 \cdot 10^{-26} \text{ kg} \Rightarrow D = 1875 \text{ N/m}$$

Ha ν ismert, D számolható

ha D ismert, ν számolható

Kvantummechanikai leírás

Kvantummechanikai oszcillátor:

Tömegpont parabolikus erőterben.

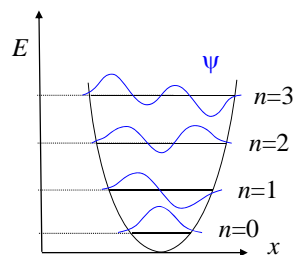
Hamilton operátor:

$$H = T + V$$

Schrödinger egyenlet:

$$-\frac{\hbar}{2m} \frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2} + V(x) \psi = E \psi$$

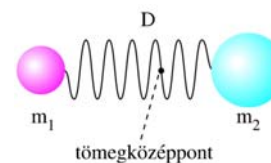
$$E_n = hf \left(n + \frac{1}{2} \right) \quad n = 0, 1, 2, \dots$$



Klasszikus fizikai rezgések és energianívók kapcsolata

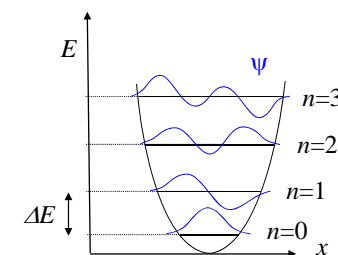
• Klasszikus kép

Energianívók



$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D}{m_{\text{redukált}}}}$$

rezonancia az f frekvenciájú fénnel



$$\Delta E = hf$$

u.a.!!!

A rezgési frekvencia függése a tömegtől és a kötéserősségtől

Tömeg:

Infravörös rezgési frekvenciák (cm^{-1})

B-H	C-H	N-H	O-H	F-H
2400	3000	3400	3600	4000
Al-H	Si-H	P-H	S-H	Cl-H
1750	2150	2350	2570	2890
	Ge-H	As-H	Se-H	Br-H
	2070	2150	2300	2650

Víz (O-H): $3600 \Rightarrow$ nehézvíz: 2600 cm^{-1}

Kötéserősség:

C-N: 1100 cm^{-1} ,
C=N: 1660 cm^{-1} ,
C \equiv N: 2220 cm^{-1} .

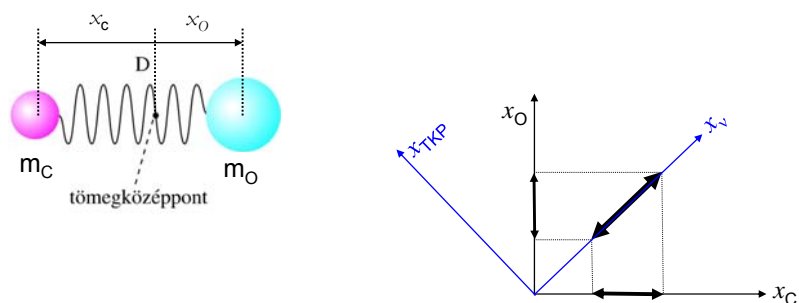
Sokatomos molekulák rezgései

N atomos molekula:

- $3N$ szabadsági fok, 3-3 a teljes molekula translációja ill. rotációja
- $3N-6$ rezgési szabadsági fok (lineáris molekuláknál csak $3N-5$)
- normálrezgések
- normálkoordináták

Normálkoordináták

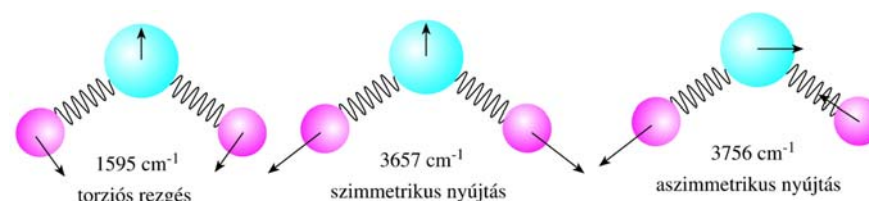
A kétatomos molekula példáján bemutatva:



Általános esetben $3N$ dimenziós koordináta-rendszer forgatása
Lineáris transzformáció (mátrixművelet)

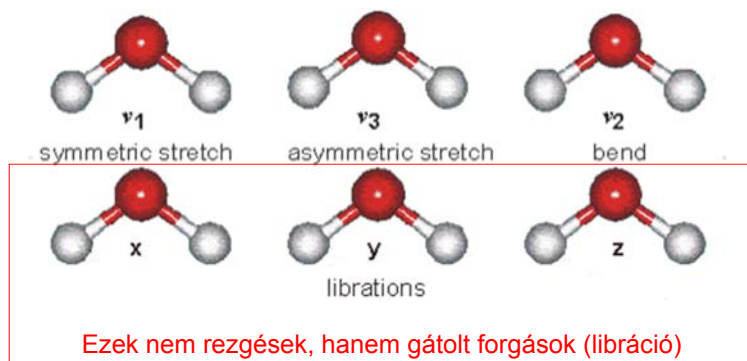
Normálrezgések

- Minden atom ugyanazzal a frekvenciával, fázissal, de különböző amplitúdóval és irányban rezeg.
- Pl. víz:

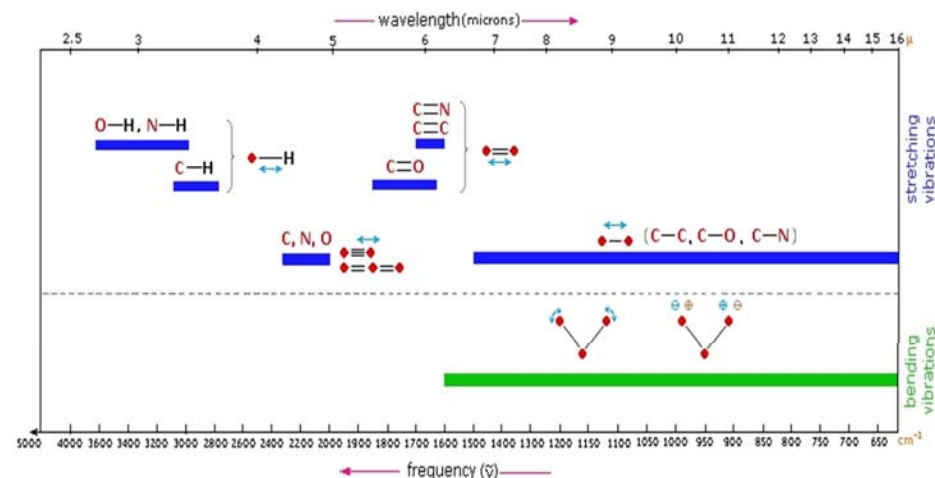


A normál módusok nem hatnak kölcsön egymással.

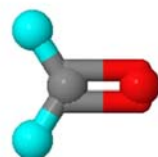
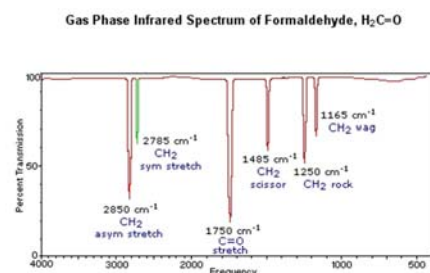
A víz normálrezgései



Néhány tipikus rezgési frekvencia



Példa: Formaldehid



- ☐ View CH₂ Asymmetric Stretch
- ☐ View CH₂ Symmetric Stretch
- ☐ View C=O Stretch
- ☐ View CH₂ Scissoring
- ☐ View CH₂ Rocking
- ☒ View CH₂ Wagging

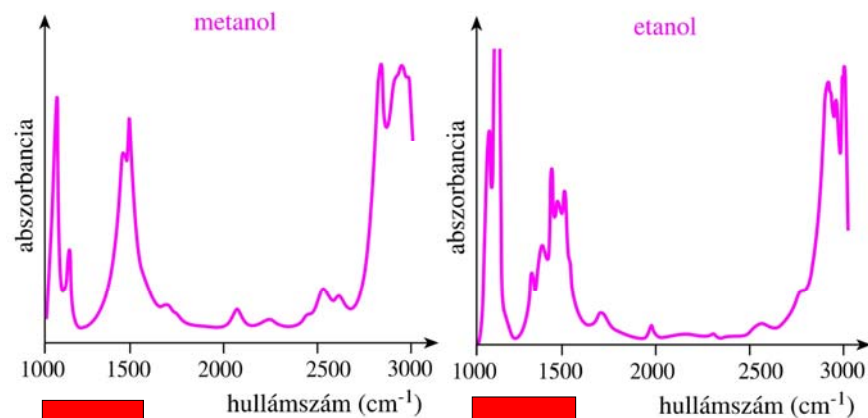
- ☐ Ball&Stick Model
- ☐ Spacefill Model
- ☐ Stick Model
- ☒ Motion Off

forrás: www.Spectroscopynow.com

Analitikai alkalmazások

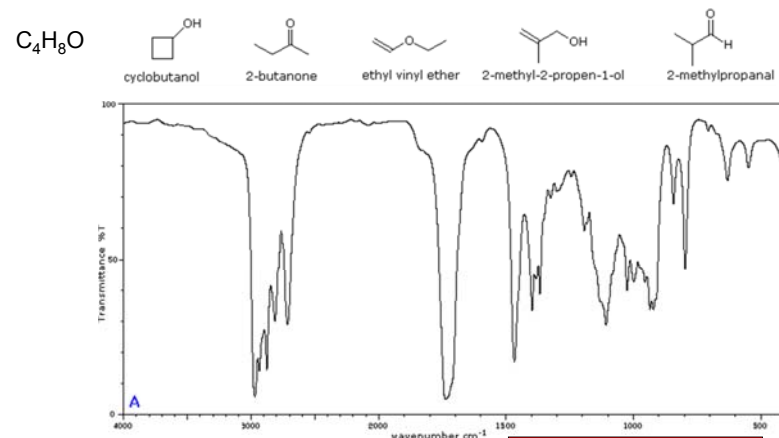
- szintézis: közti és végtermék azonosítás
- szerkezet bizonyítás
- metabolit kimutatás
- gyógyszerellenőrzés (tisztaság vizsgálat)
- Megj.: Lambert-Beer tv. itt is igaz, koncentráció meghatározás is lehetséges.

Molekula azonosítás



Fingerprint (ujlenyomat) tartomány

molekula azonosítás



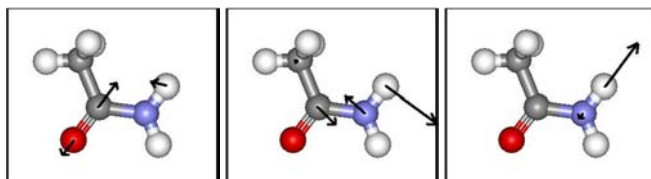
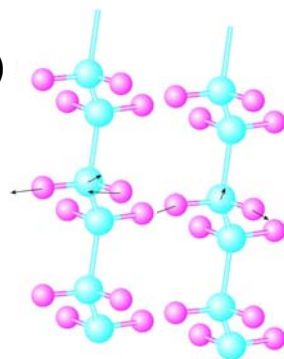
forrás: www.Spectroscopynow.com

Makromolekulák rezgései

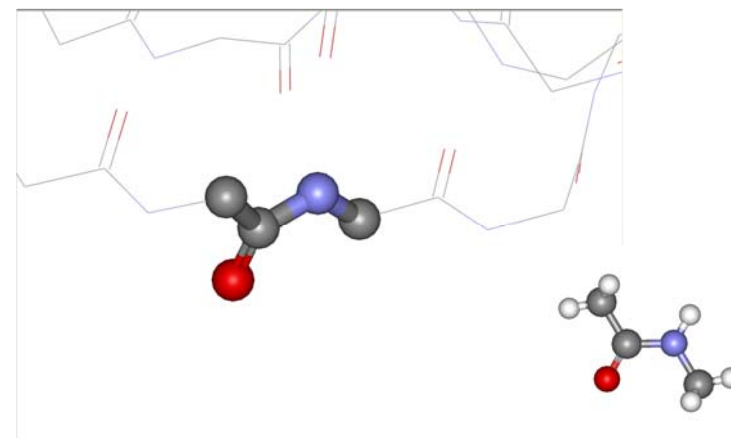
Globális rezgések (bonyolultak)

Lokalizált rezgések, pl:

- CH₂ rezgések a lipidekben
- amid rezgések a fehérjékben (acetamid rezgések)



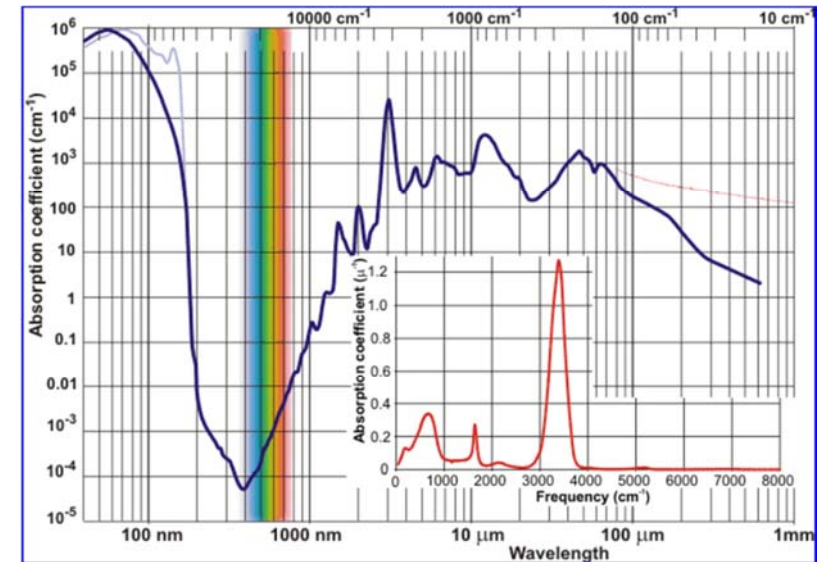
Az N-metilacetamid mint a fehérjelánc gerincének modellje



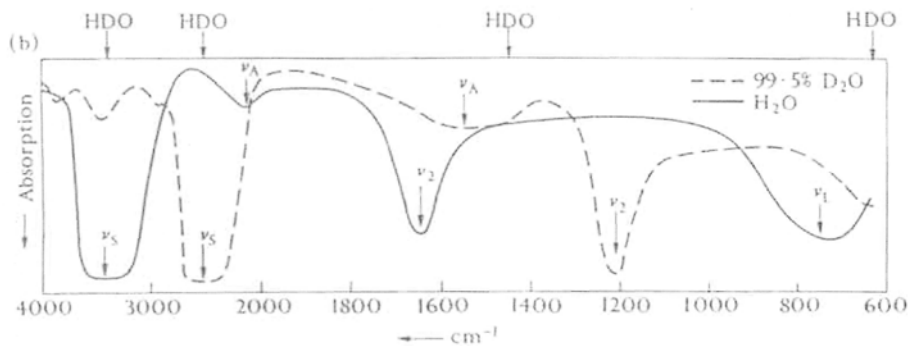
Fehérjék rezgési spektroszkópiája

- Gerinc: amid rezgések
 - konformáció (másodlagos szerkezet)
 - H/D csere, (harmadlagos szerkezet)
- Oldalláncok
 - kölcsönhatások más molekulákkal
 - pl Ca^{2+} kötés
- Fontos technikai megj.: nehézvíz (D_2O)

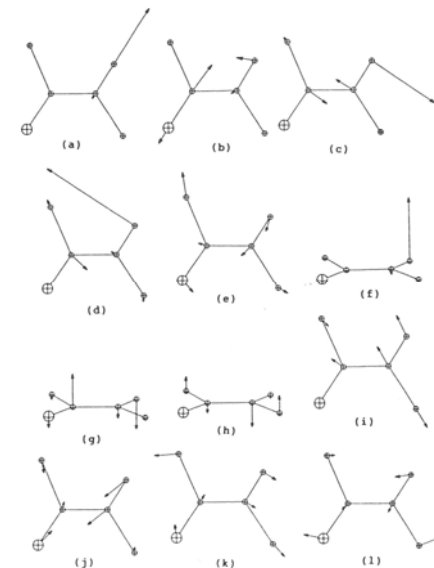
A víz abszorpciós spektruma



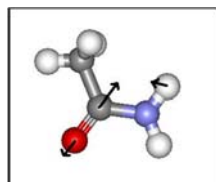
Víz és nehézvíz spektrumok



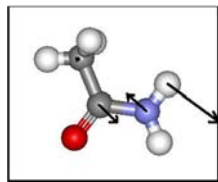
A fehérjék amid rezgései



A fehérjék amid rezgései

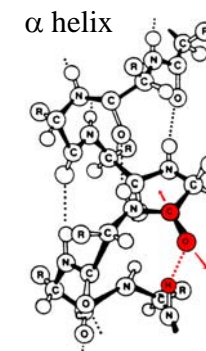
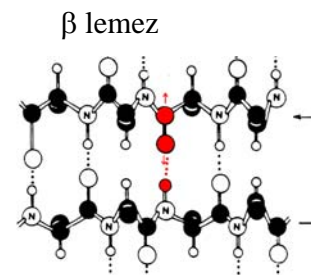
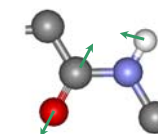


amid I
C=O rezgés
H-híd miatt
konformáció-
érzékeny

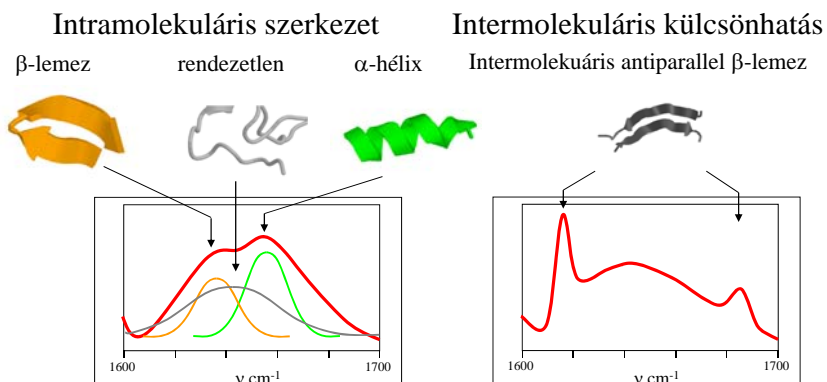


amid II
N-H nyújtási rezgés
H-D cserére érzékeny
Szerkezet kompaktsága
(harmadlagos szerk.)

Az amid I vibráció és a másodlagos szerkezet



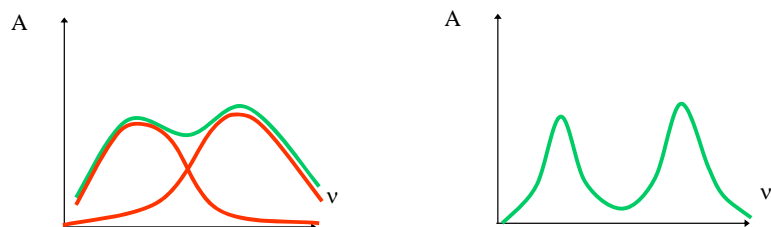
A másodlagos szerkezeti elemekhez tartozó jellegzetes amid I jel



Az amid I sáv komponenseinek hozzárendelése a másodlagos szerkezeti elemekhez (¹Byler és Susi (1986), ²Haris és Chapman, 1988, ³Ismail és mtsai, 1992 alapján)

hullámszám [cm^{-1}]	másodlagos szerkezet
1616	intermolekuláris béta szerkezet ³
1624-1637	kinyújtott láncok (béta szerkezet) ¹
1645	rendezetlen ¹
1654	alfa hélix ¹
1662	3_{10} hélix ²
1663-1670	hajlatok, hurkok ¹
1675	kinyújtott láncok (béta szerkezet) ¹
1683-1694	hajlatok, hurkok ¹
1685	intermolekuláris béta szerkezet ³

Az amid I sáv átlapoló komponensek
összege: dekonvolúció

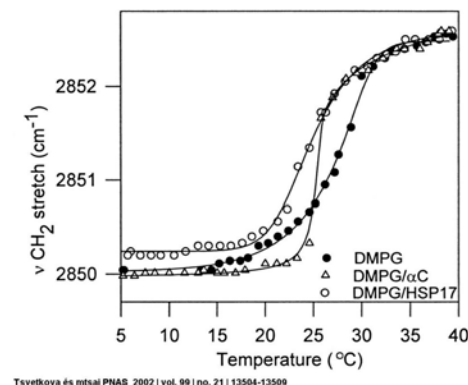


Fourier öndekonvolúció

Vonalak szétválasztása vonalkeskenyítéssel

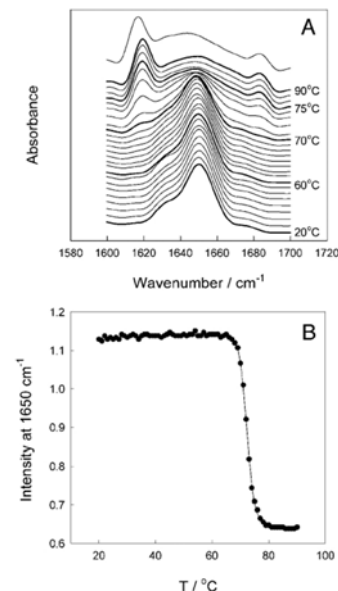
Alkalmazások

lipid fázisátalakulás

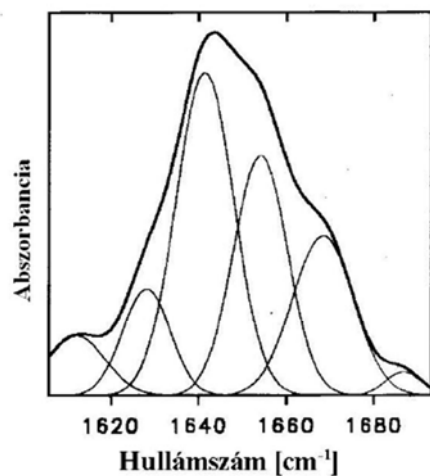


Tovetkova és mtsai PNAS 2002 | vol. 99 | no. 21 | 13504-13509

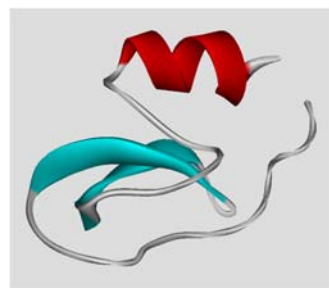
fehérjedenaturáció



Meersman és mtsai. Biophys J.

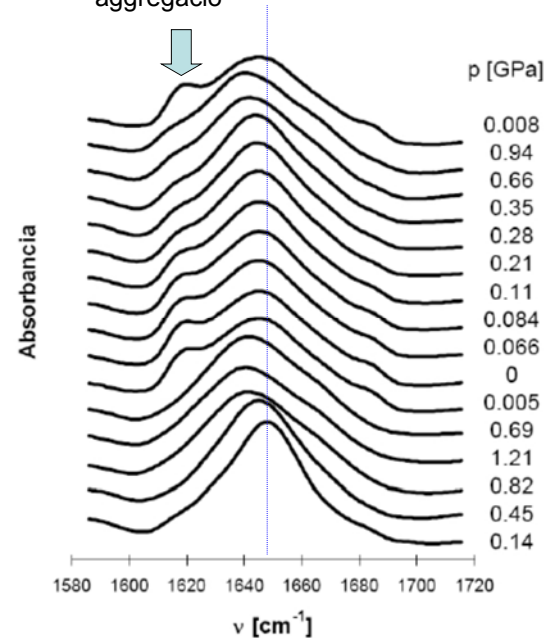


BPTI bovine
pancreatic
trypsin inhibitor



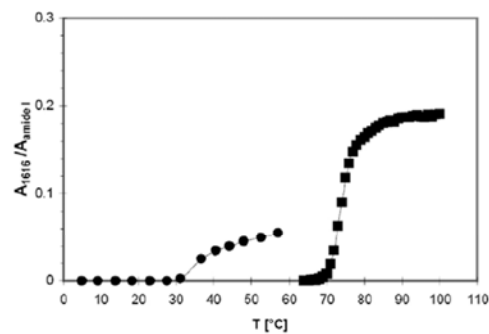
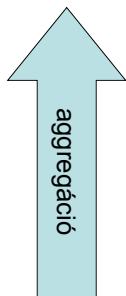
13. ábra. A BPTI atmoszférikus
nyomáson mért spektrumának
dekonvolált amid I sávja az illesztett
Gauss komponensekkel.

aggregáció



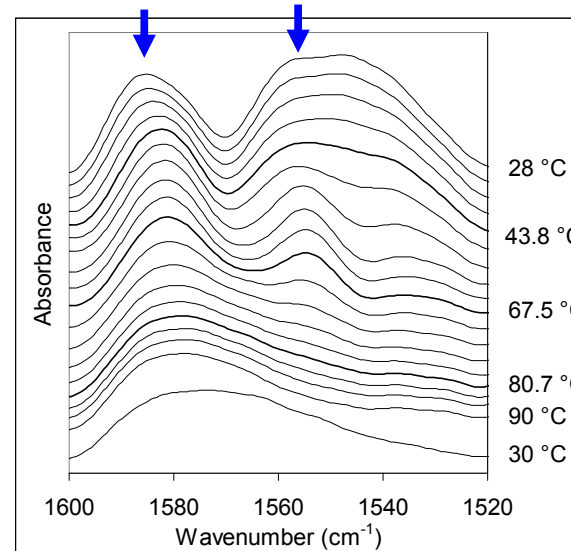
Mioglobin
(Nyomásciklus)





25. ábra. A mioglobin 1616 cm^{-1} -es sávjának relatív területe nyomásciklust követő (●) és a nyomáscikluson át nem esett (■) fehérje melegítése során.

Ca²⁺ kötés



Parvalbumin

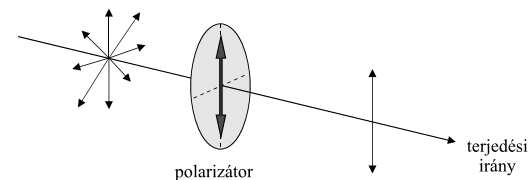


CD

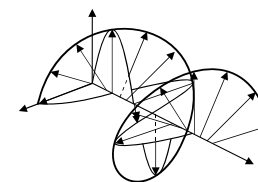
- Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

Poláros fény

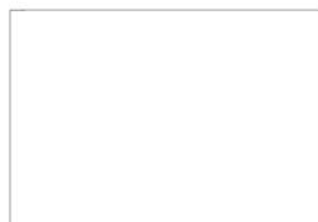
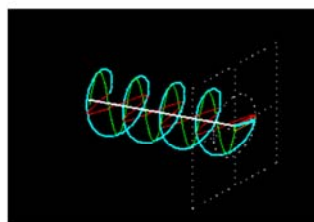
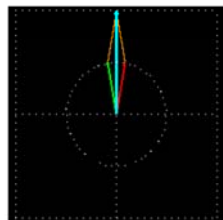
Síkban poláros:



Cirkulárisan poláros



lin. pol =
jobbra+
balra cirk. pol.



mozgó animációk: <http://www.enzim.hu/~szia/cddemo/demo0.htm>

A jobbra és balra forgó cirkulárisan polarizált
fénysugarakkal a királis molekulák
különbözőképpen hatnak kölcsön:

$$\Delta A = A_L - A_R = \Delta \epsilon \cdot c \cdot x$$

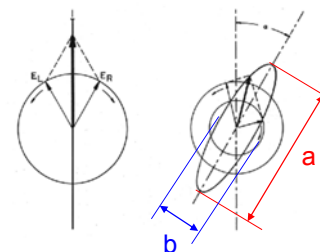
$$\Delta \epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$$

$$\text{Ellipticitás: } \theta \quad \text{tg } \theta = b/a$$

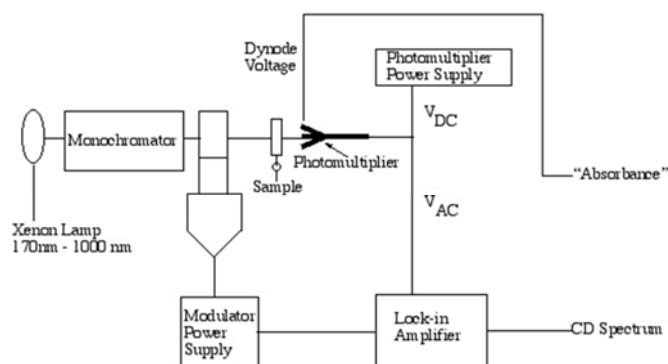
$$\theta = \frac{2.303}{4} \cdot (A_L - A_R) \cdot \frac{180}{\pi} \text{ [deg]}$$

$$\text{Lambert-Beer tv.: } \theta = c \cdot l \cdot \theta_m$$

(θ_m : moláris ellipticitás)



A CD spektrométer vázlata



CD és a fehérjeszerkezet

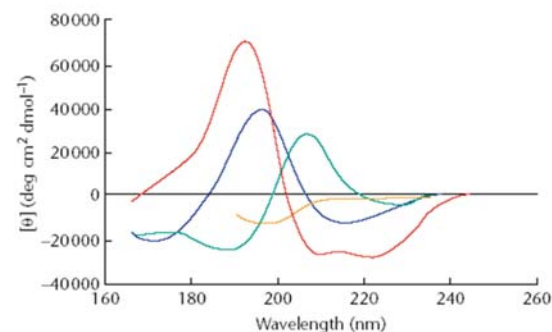
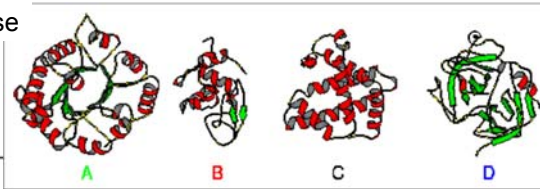
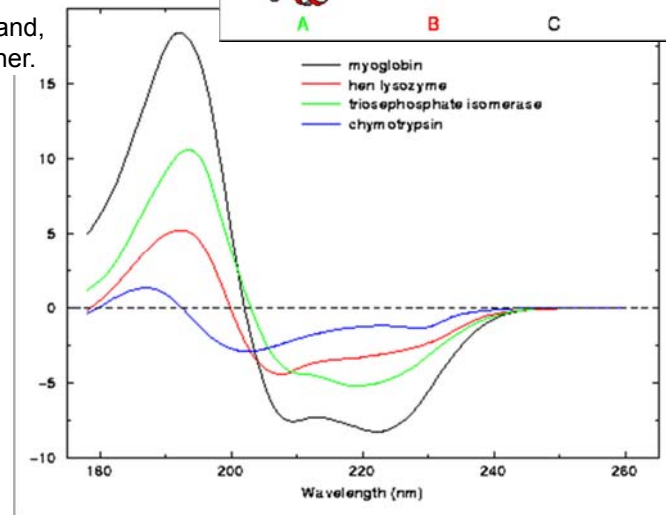
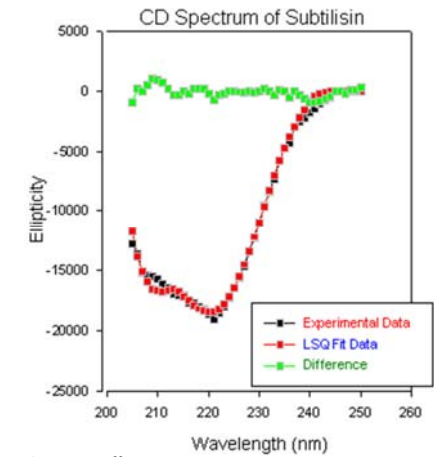
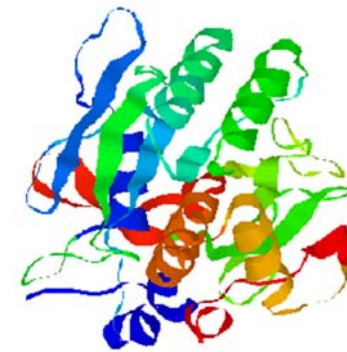


Figure 4 The far-UV CD spectra associated with various types of secondary structure elements in proteins. Red: α -helix; blue: antiparallel β -sheet; green: type I β -turn; orange: irregular structure. (Data taken from the Encyclopedia of Life Sciences)

A) triosephosphate isomerase
 B) hen egg lysozyme
 C) myoglobin
 D) chymotrypsin
 red:helix.
 green:strand,
 yellow:other.



The Structure and CD spectrum of Subtilisin



helix	sheet	coil
57.92	26.22	15.85

Vége