

DIPLOMAMUNKA

Fehérjék másodlagos szerkezetének meghatározása cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával

Orbánová Agnesa

Témavezető: Dr. Kézsmárki István
egyetemi docens
BME Fizika Intézet
Fizika Tanszék



2012

Nyilatkozat az önálló munkáról

Alulírott, *Orbánová Agnesa*, a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem hallgatója, büntetőjogi és fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem és sajátkezű aláírásommal igazolom, hogy ezt az Msc szakdolgozatot meg nem engedett segítség nélkül, saját magam készítettem az általam elvégzett kutatómunka alapján, a felhasznált források egyértelmű megjelölésével.

Budapest, 2010. május 31.

Orbánová Agnesa

Tartalomjegyzék

Bevezetés	4
1. Irodalmi áttekintés	5
1.1 A fehérjék felépítése	5
1.2 Fehérjeszerkezet-meghatározás elektronikus és vibrációs CD spektroszkópiával	15
2. Az általam vizsgált fehérje (UDE) bemutatása	19
3. A fehérjék CD spektroszkópiájának elméleti alapjai	23
3.1 Egy egyszerű modell α -hélix cirkuláris dikroizmusának szemléltetésére	23
3.2 A cirkuláris dikroizmus mikroszkopikus eredete	26
4. A CD spektroszkópia méréstechnikája	30
4.1 A polarizáció-modulációs méréstechnika alapjai	30
4.2 CD spektroszkópia a távoli-UV hullámhossztartományon	36
4.3 VCD spektroszkópia Fourier-transzformációs méréstechnikával	39
5. A mérési eredmények kiértékelése és értelmezése	48
5.1 A fehérjeminták elektronikus CD spektrumai és kiértékelésük	48
5.2 A másodlagos szerkezeti elemek elhelyezkedése a szekvenciában	54
5.3 Az UDE fragmenseinek spektrumai és másodlagos szerkezetük	57
Összefoglalás	67
Köszönetnyilvánítás	69
Függelék	70
Irodalomjegyzék	70

Bevezetés

A fehérjék háromdimenziós szerkezete fontos szerepet játszik funkciójuk betöltésében, a sejt biokémiai folyamataiban való részvételükben. Ennek megfelelően a szerkezetmeghatározás kulcsfontosságú eleme egy újonnan szintetizált fehérje teljes jellemzésének. A szerkezetmeghatározás általánosan alkalmazott mérés technikái a röntgen krisztallográfia és a mágneses magrezonancia. Ezen módszerek korlátait első esetben a fehérjekristályosítás nehézsége, a másodikban pedig – bizonyos fehérjék esetében – a túl nagy molekulatömeg jelenti.

A fenti vizsgálati módszereknél közvetettebb információt nyújt, de szinte minden fehérjemintánál kivitelezhető a cirkuláris kettőtörés (CD) spektroszkópia. Ennek alapelve, hogy a fehérjemolekulák, mint királis objektumok, eltérő arányban nyelik el a fény jobbra, ill. balra cirkulárisan polarizált komponenseit.

Dolgozatomban egy egyszerű számolás keretében bemutatom a cirkuláris kettőtörés spektroszkópia fizikai alapelvét, illetve azt, hogy speciálisan hogyan alkalmazható fehérjemolekulák másodlagos szerkezetének meghatározására. Munkám során egy uracil-DNS degradáló faktor (UDE) elnevezésű fehérjemolekula másodlagos szerkezetének meghatározása volt a célom. E napjainkban szintetizált fehérje érdekességét az adja, hogy feltehetőleg fontos szerepet játszik bizonyos rovarok egyedfejlődési stádiumainak átalakulásában a DNS-ükben megjelenő uracil felismerésén keresztül. Mivel a DNS-ben az uracil beépülése hibát jelent, egy ilyen fehérje működésének megfejtésével komoly előrelépést érhetünk el a DNS javítási folyamatok megértése terén.

Az UDE szerkezetének meghatározásához a teljes fehérje és mintegy 10 fragmense esetében mértem meg a CD spektrumot a peptidkötések gerjesztéseinek tartományában ($\lambda=170-260$ nm). A spektrumok analíziséből meghatároztam az alapvető másodlagos szerkezeti elemek (α -hélix, β -redő, kanyar stb.) arányát. A kapott eredmények azt mutatják, hogy az UDE rendezett szakaszai (az összes aminosav kb. 64%-a) α -hélix formában stabilizálódnak. Ezen adatokat és az ismert aminosav szekvenciát egy neurális hálózati elven működő programmal összevetve javaslatot tettem az UDE teljes másodlagos szerkezetére.

A fentieken túl a BME Fizika Tanszék optikai laboratóriumában befogtam egy Fourier-transzformációs elven működő vibrációs cirkuláris dikroizmus spektrométer (FTIR VCD) megépítésébe, mellyel a fehérjéket alkotó atomok vibrációs módusain keresztül kaphatunk információt a másodlagos szerkezetéről.

1. fejezet

Irodalmi áttekintés

1.1. A fehérjék felépítése

A fehérjék aminosavak lineáris láncából felépülő makromolekulák, melyeket az élő szervezetek, a fehérjét kódoló gén által tartalmazott nukleotidok sorrendjét alapul véve képesek felépíteni. A fehérjék olyan különleges adottságokkal rendelkező molekulák, melyekből akár általunk meghatározott feladatot is ellátó molekuláris szerkezetek hozhatók létre. Ezen célfehérjék felhasználása sokrétű lehet, a gyógyászatban alkalmazható nanogyógyszerektől kezdve egészen az analitikában használható receptor struktúrákig, így kutatásuk számos terület szempontjából érdekes [1].

Egy fehérjemolekula átlagosan több száz, esetenként több ezer alapegység rendezett halmaza. Az élő szervezetekben ezeket az alapegységeket 20féle aminosav jelentheti. Egy adott fehérjét egyértelműen meghatároz az öt felépítő aminosavak sorrendje (szekvenciája), amit a fehérjék elsődleges szerkezetének nevezünk (1.1.1. ábra felső része). Az egymáshoz peptidkötéssel kapcsolódó aminosavak alkotta polipeptidlánc a szintézis során egy jól definiált, kompakt térszerkezetet vesz fel, mely sokfélesége és stabilitása lehetővé teszi, hogy a létrejött fehérjék változatos feladatokat lássanak el a szervezetben. Sok fehérje például enzimként katalizálja a sejten belül lezajló biokémiai folyamatokat, mások szerkezeti vázként épülnek be a sejtfalla, léteznek továbbá reakció specifikus jelölőfehérjék és olyanok is, melyek az immunválasz kialakításában vesznek részt.

A fehérjék szerkezetének jellemzéséhez általában négy szerkezeti szintet különböztetünk meg biokémiai szempontból.

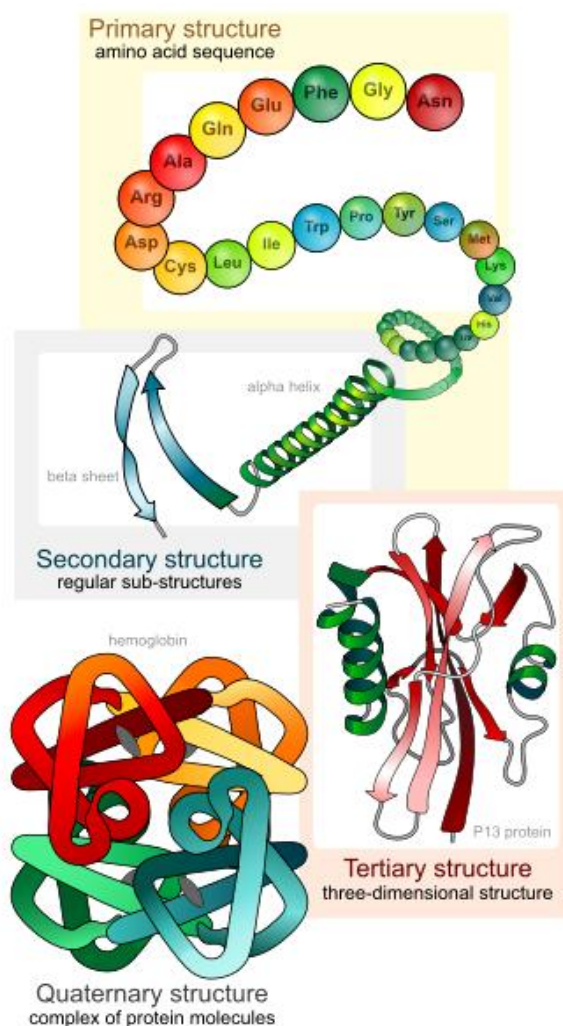
Elsődleges szerkezet (kovalens szerkezet): az aminosavak sorrendje a fehérje polipeptidláncában.

Másodlagos szerkezet: a teljes polipeptidlánc lokálisan rendezett, szabályos mintázatot megvalósító (kb. 4-20 aminosavra kiterjedő) szakaszainak konformációja, feltekeredettsége. A másodlagos szerkezet megkülönböztetésének alapja, hogy ezt a méretskálát néhány stabil szerkezeti elem (α -hélix, β -redő, stb.) dominálja.

Harmadlagos szerkezet: egyetlen polipeptidlánc térbeli szerkezete, a másodlagos szerkezeti elemek egymáshoz viszonyított térbeli elrendeződése.

Negyedleges szerkezet: a több polipeptidláncból álló fehérjék esetén az alegységek relatív elhelyezkedése.

Bár a fenti kategóriák első ránézésre önkényesnek tűnhetnek, a fehérjék funkcionalitásának megértésében jó fogódzót jelentenek.



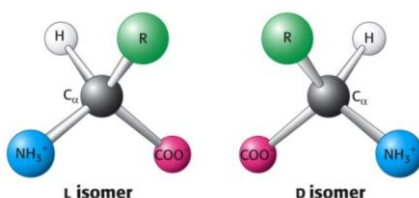
1.1.1 Ábra: A fehérjék egyes szerkezeti szintjei, legfelül az elsődleges szerkezet, alatta a másodlagos szerkezeti szint, tőle jobbra lefelé a harmadlagos és végül legalul egy fehérjekomplex negyedleges szerkezeti szintje

1.1.1 Elsődleges szerkezet

Ma 3-4 millió fehérje aminosav szekvenciája ismert míg, az emberi genom közelítőleg harmincezer fehérjét kódol. Egy adott típusú fehérje aminosav szekvenciája a rokon

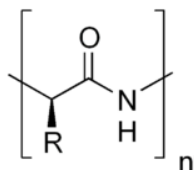
élőlényekben nagyrészt megegyezik, így több élőlényt megvizsgálva megkapjuk, hogy egy-egy tulajdonságért a genom mely régiója felelős.

A fehérjéket felépítő aminosavak azonos vázból és egy ahhoz csatlakozó egyedi oldalláncból épülnek fel. A vázat a központi szénatom és az ahhoz kapcsolódó karboxil- és aminocsoport, valamint egy hidrogén alkotja. Az egyes aminosavak az R-rel jelölt oldalláncok minőségében különböznek egymástól. Mivel a központi szénatomhoz négyféle funkciós csoport kapcsolódik, melyek egy egyedülálló aminosavban nem azonos síkban helyezkednek el, így az aminosavak királis¹ objektumok. Mesterségesen szintetizált aminosavak esetén racém (mindkét királis módosulatot közelítőleg azonos arányban tartalmazó) elegy keletkezik, viszont az élőlények fehérjeiben minden aminosavból kizárólag az L-izomer fordul elő.



1.1.2 Ábra: Egy aminosav két lehetséges, különböző kiralitású módosulata

Két aminosav reakciója során az egyik karboxilcsoportja vízkilépés közben peptidkötést alakít ki a másik aminocsoportjával. A dipeptid mindkét végéhez újabb aminosavak kapcsolódnak és kialakul a lineáris polimer (1.1.3. ábra). A polipeptidláncok váza az N-C-C atomok ismétlődésével kialakuló periodikus szerkezet, mely minden fehérjében azonos, míg a specifikusságot a különféle R oldalláncok adják.



1.1.3 Ábra: Egy aminosav peptidegység a lineáris polimerláncon belül. A két C atomhelyét csak kötések adják meg, nincs címkével jelezve.

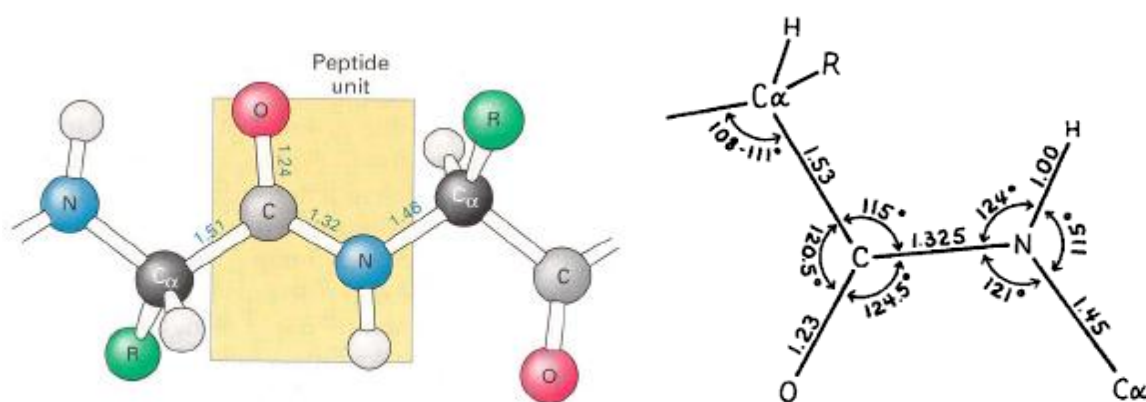
A peptidkötés kialakulásakor (lásd 1.1.4. ábra) a kötésben részt vevő C és N atomra, valamint a hozzájuk kapcsolódó O és H atomokra kiterjedő delokalizáció jön létre. Ennek következtében

¹ Nincs inverziós és tükörszimmetria, általánosan: nem létezik $S_n = \sigma_h C_n$ bármely n-re. Részletesebben lásd. 3. fejezet.

² Csoportrezgés: makromolekulákban néhány atomra, ill. belső koordinátára koncentrálnak rezgések

³ Az interferogram x intervallumát n-szeresére növeljük, a hiányzó y értékeket pedig 0-nak definiáljuk. Ezáltal

a C-N kötés részleges kettőskötésként viselkedik, körülötte a rotáció nem megengedett. Ezáltal a peptid egység négy szomszédos atomja (N-C-O-C) egy síkban helyezkedik el, szemben a különálló peptid esetével, és a peptidcsoport egy merev egységet képez. Az R oldalláncok a kötés két ellentétes oldalán helyezkednek el, transz konfigurációban. A peptidcsoportot és geometriai paramétereit az 1.1.4. ábra mutatja, ahol a feltüntetett kötéshosszak és kötésszögek a lokális szerkezet energiaminimumában értendők. Egy teljes fehérjében a szerkezet ezen értékek körül fluktuál egy adott peptidcsoport esetén időben, ill. több peptidcsoport esetén a teljes sokaságra vonatkozóan is. A kötéshosszak variációja kicsi, hiszen az őket meghatározó lokális kölcsönhatások erősek, míg a szögek fluktuációja valamivel nagyobb tartományban lehetséges [2].



1.1.4 Ábra: A jobb oldalon egy peptidegység sematikus rajza, a bal oldalon az egységen belüli kötésszögek és kötéshosszak láthatók. A központi C és N atom körül összeadva a szögeket jól látszik, hogy a peptidegység négy atomja (N-C-O-C) egy síkban helyezkedik el.

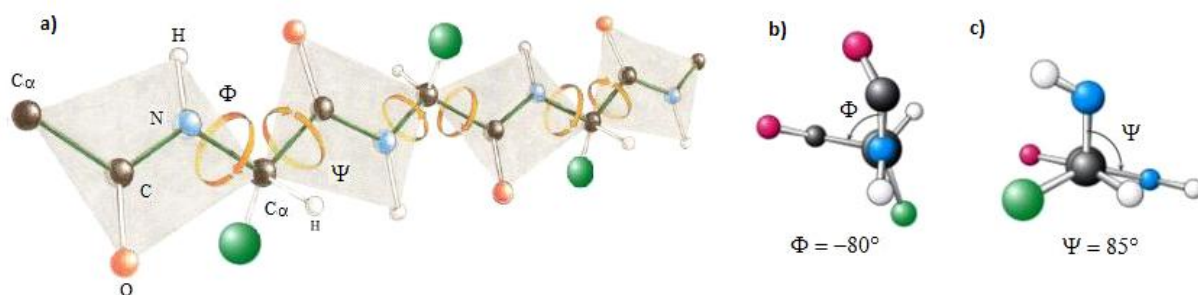
A peptidcsoporton belül lokális töltésszeparáció lép fel, ami viszonylag nagy dipólmomentumot eredményez. Ezen polárosságnak köszönhetően gyakran alakul ki hidrogénhíd-kötés – melyben az NH csoportok donorként, míg a CO csoportok akceptorként viselkednek – ami a másodlagos szerkezet stabilitásához járul hozzá.

1.1.2 Másodlagos szerkezet

A másodlagos szerkezet a polipeptidváz rendezett szerkezeti elemeit foglalja magában. Ezen elemek leírásához további szögparaméterekre van szükség, melyekkel a szomszédos peptidcsoportok által alkotott síkok egymáshoz viszonyított helyzete határozható meg. Ahogyan az 1.1.5-ös ábrán is látható, ezt két torziós szöggel írhatjuk le.

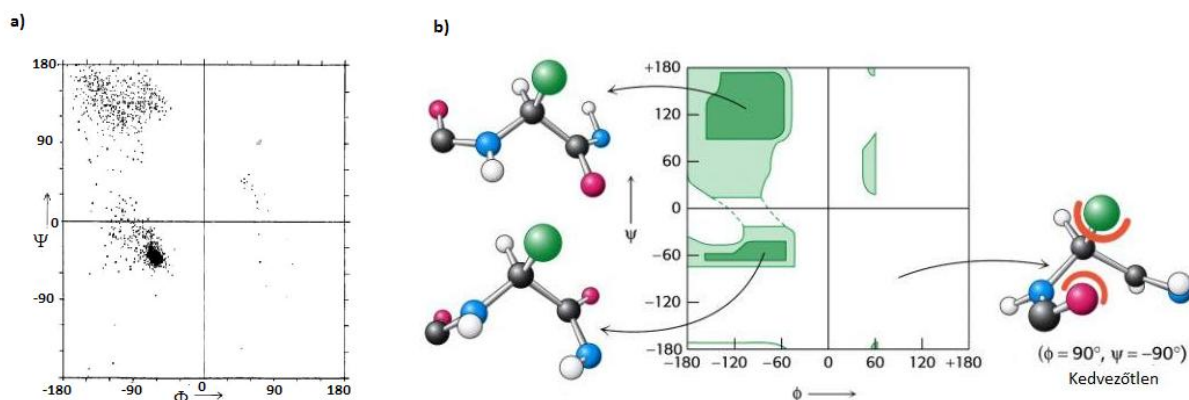
A Φ szög definíciója a következő: az n -ik peptidcsoport N és az $(n+1)$ -ik csoport C_α atomja meghatároz egy tengelyt. Ha ezen tengelyre merőleges síkra levetítjük az N és C_α atomot a hozzájuk kötődő két központi szénatommal együtt, akkor a központi szénatomok által bezárt szög, melynek csúcsa az egymásra kerülő N és C_α atom, lesz a Φ (lásd. 1.1.5 a és b ábra).

A ψ szög definíciója teljesen hasonló, ahogy ez az 1.1.5 a és c ábrán nyomon követhető. Ezen két szög már kimerítően leírja két olyan sík egymáshoz viszonyított helyzetét, melyek egy közös pontban, esetünkben az $(n+1)$ -ik csoport C_α atomján érintkeznek.



1.1.5 Ábra: a) A peptidsíkok egymáshoz viszonyított helyzete a polimerláncban. b) A Φ torziós szög meghatározásának módja. c) A ψ torziós szög meghatározásának módja.

A Φ és ψ torziós szögek előforduló értékeit egy kétdimenziós grafikonon, az ún. Ramachandran-térképen szokás ábrázolni, melyről leolvashatók a szabályos, periodikus szerkezeti elemeknél gyakran megvalósuló és az egyéb, összekötő szakaszokhoz tartozó lehetséges szögeértékek. (Ramachandran indiai származású tudós a Φ és ψ torziós szögek lehetséges értékeire adott elméleti becslést alanin aminosavak láncai esetén.) Az 1.1.6 ábrán két ilyen Ramachandran-térkép látható.



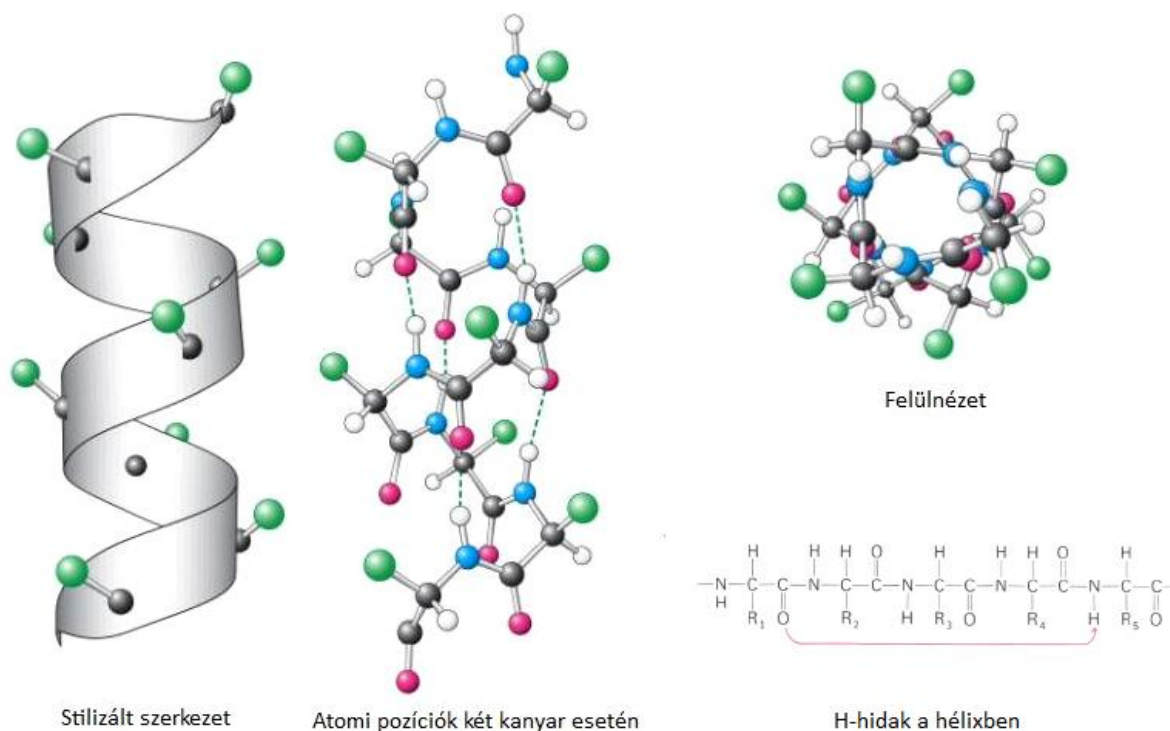
1.1.6 Ábra: a) fehérjeminták mért szerkezetéből meghatározott $(\Phi;\psi)$ szögpárok b) elméleti úton meghatározott lehetséges $(\Phi;\psi)$ szögpárok [2] és az adott szögeknél megvalósuló konformációk.

Az 1.1.6 a ábrán lévő grafikon olyan mérési pontokat ábrázol, melyeket reprezentatív fehérjeminták röntgenképei alapján állapítottak meg [2], míg az 1.1.6 b ábra első elvekből történt számítások alapján becsült jellemző (Φ ; ψ) szögpárokat mutat. Az egyes régiók azon konformációkról kapták a nevüket, melyek kialakulnak, ha egy (Φ ; ψ) szögpár az adott régióból periodikusan ismétlődik a peptidláncban.

A bal alsó klasztert, mely mind a mért, mind a számított ábrán jól lokalizált – (-60° ; -40°) körül – jobbkezes α -helikálisnak, a kiszélesedő bal felsőt – (-120° ; 140°) körül – pedig, β -redő klaszternek nevezik. A jobb oldalon található pontok a hajlatrégióba (vagy L-tartományba) tartoznak. Az üres területek olyan elrendezéseket jelentenek, ahol egy dipeptid egységen belül kedvezőtlenül közel kerülnek egymáshoz bizonyos atomok: pl. a (0° ; 0°) pont környezetében az (n-1)-ik aminosav oxigénje beleütközne az n-ik aminosav karbonil-csoportjához tartozó szénatomba. A grafikon aszimmetriája az R oldalláncok első szénatomjával (minden oldallánc egy C-C kötéssel kapcsolódik a központi szénatomhoz) való ütközésekből adódik.

Viszonylag sok pont található a (-60° ; 140°) és (-90° ; 0°) koordináták környezetében. Ezek a területek nem jelentenek sem lokális energiaminimumot, sem kedvező elrendezést periodikus szerkezet kialakulására, mégis viszonylag gyakran előfordulnak rendezett struktúrájú fehérjékben. Funkciójuk az, hogy az általuk összekötött szénatomok közelítőleg merőlegesen helyezkednek el egymáshoz képest, szemben a szabályosan ismétlődő szerkezetek párhuzamos beállításával. Ennek megfelelően határegységeknek tekinthetők, melyek mentén a mozgás szabadabb, így a másodlagos szerkezeti elemek kialakulása után a legtöbb fehérje globuláris alakot tud felvenni. Mivel összességében kevés olyan helyzet fordul elő, amikor a torziós szögek 90° körüli értéket vesznek fel, a peptidláncban csupán néhány olyan régió fordul elő, melyek a közvetlen környezetüktől független mozgásokra lennének képesek. A konformációs változások így közelítőleg egyszerre következnek be, amit a fehérjeszerkezet kooperatív viselkedésének nevezünk.

Ha a Ramachandran-térképen a megengedett tartományokból egy szögpárértéket vesz fel több egymás utáni aminosav, akkor periodikus térbeli szerkezethez jutunk. Ezeket a főváz atomjai közt kialakuló másodlagos kötések stabilizálják, így kedvező kölcsönhatás-mintázatok esetén különösen stabil, gyakran előforduló szerkezeti elemek alakulnak ki. Ilyenek a már említett α -hélix és β -redő. Az α -hélix a Ramachandran-térkép (-60° ; -40°) körüli tartományában található szögpárértékeknek megfelelő periodikus szerkezet.



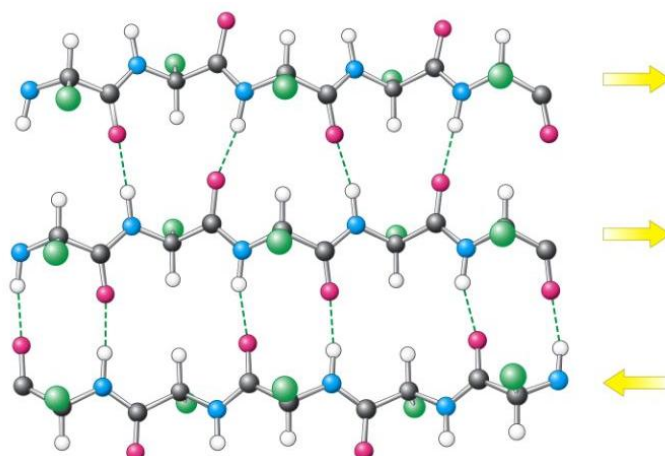
1.1.7 Ábra: Az α -hélix másodlagos szerkezeti elem különféle szerkezeti ábrái

Az 1.1.7-es ábrán látható módon a hélixet periodikusan ismétlődő hidrogénhid-kötések stabilizálják. A hidrogénkötésben az n -ik aminosav CO csoportja az akceptor, míg az $n+4$ -ik aminosav NH csoportja a donor, miközben a Φ és ψ torziós szögek -60° és -40° körüli értéket vesznek fel. A szerkezet nagyfokú stabilitását azt teszi lehetővé, hogy ilyen elrendezés mellett a donoratom–hidrogénatom–akceptoratom által kijelölt szög 180° körüli, ami maximalizálja a híd kötési energiáját. Egy ilyen elrendezésben ráadásul – a szélektől eltekintve – az összes lehetséges vázbeli hidrogénkötés telítődik.

A hélixben egy teljes körbefordulás 3,6 aminosavanként következik be, menetemelkedése átlagosan 5,4 Å, átmérője 6 Å, a C_α atomok távolsága 1,5 Å. Fehérjékben 4-30 aminosavból áll, átlagosan 11-ből, azaz 3 kanyarból. Jobbkezes hélixek esetén az oldalláncok kifelé állnak, míg balkezes hélixek pont az oldalláncok lehetséges ütközései miatt nem alakulnak ki.

Létezik egy másik helikális szerkezeti elem is, melyet 3_{10} hélixnek neveznek. Ilyenkor 3 aminosavanként alakul ki egy H-híd, mely 10 atomot fog össze, a túl szoros pakoltság és a torzult hidrogénkötések miatt ugyanakkor kedvezőtlenebb, így csak rövid szakaszokon fordul elő, többnyire α -hélixek utolsó fordulataként.

Ha a Ramachandran-térkép (-120° ; 140°) pont körüli klaszteréből választunk egy ismétlődő szögpárt, megkapjuk a másik leggyakrabban előforduló periodikus másodlagos szerkezeti elemet, a β -redőt. Ilyenkor a láncszögek tompaszögek, így egy erősen nyújtott lánckonformáció jön létre (nyújtott helikális szerkezetként is felfogható). Egy körülfordulásra csak két aminosav esik, a szomszédos $C\alpha$ atomok távolsága pedig 3,2-3,4 Å-re nő. Egy láncon belül nem tudnak H-hidak kialakulni, de a fehérjékben a láncok tipikusan egymás mellé rendeződnek és az egyes β -láncok között H-hidak által stabilizált lemezes szerkezet jön létre (β -redő).

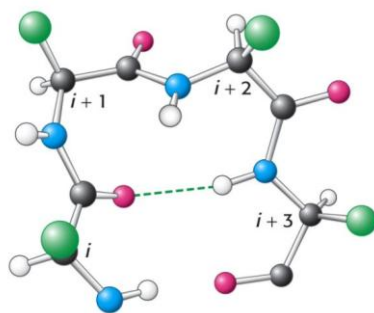


1.1.8 Ábra: *Parallel és antiparallel β -redő kialakulása β -láncok H-hidakon keresztül történő stabilizációjával*

Az 1.1.8 ábrán három β -lánc látható, melyek közül az első kettő megegyező (parallel redő), míg a második kettő ellentétes irányban fut (antiparallel redő). Az antiparallel lemezek energetikailag stabilabbak, mert itt a láncokra merőlegesen kialakuló hidrogénhidakat alkotó atomok közelítőleg egy egyenesbe esnek. A parallel láncokban a hidak torzítottak, így az előbbinél gyengébb kötések alakulnak ki. Mindkét szerkezetben az oldalláncok a lemezek síkja alatt és felett, míg a H-hidak a lemez síkjában helyezkednek el. A teljes globuláris szerkezet kialakulásához a nyújtott láncszakaszok időnként megtörnek és 180° -hoz közeli szögben visszahajolnak.

A periodikus elemek mellett egy globuláris fehérjében szinte mindig előfordulnak olyan konformációk is, melyek stabilak ugyan, de változó (Φ ; ψ) szögpárok jellemzik őket. Ezek leggyakrabban periodikus elemeket kötnek össze, de önállóan is megjelenhetnek akár hosszabb szakaszokat is alkotva.

Az 1.1.9-es ábrán látható β -hajlat a Ramachandran-térkép L-tartományának megfelelő konformáció. Egy ilyen szerkezettel a polipeptidlánc négy aminosavon belül 180° -os fordulatot vesz. Stabilitását az ábrán is látható H-hidak adják.



1.1.9 Ábra: Egy tipikus β -hajlat szerkezete

A nem periodikus elemek sokkal nagyobb változatosságot mutatnak, mint a korábban vázolt periodikus struktúrák, így osztályozásuk is sokféle lehet, általában különféle β - (7 féle) és γ -hajlat (2 féle) szerkezeteknek nevezik őket.

1.1.3 Harmadlagos szerkezet

Egy polipeptidlánc végső, háromdimenziós térszerkezete a harmadlagos szerkezeti szint. A vízdékes fehérjék harmadlagos szerkezetének általános jellemzői a tömör térkitöltés, a poláros felszín és hidrofób mag, a lehetséges H-híd kötések maximálisan kihasználtak, az egyes dipeptidkonformációk alapvetően a megengedett Ramachandran régióknak felelnek meg.

A térkitöltés általában tömörebb, mint egy átlagos molekulakristály szerkezete, belsejében többnyire nincsenek üregek, ha vannak, azt víz tölti ki és valamilyen funkcionális szerepe van. A tömör térszerkezet annak a törekvésnek az eredménye, hogy peptidvázat alkotó atomok és az oldalláncok atomjai közti lehetséges stabilizáló kötések kialakuljanak.

Több ezer fehérje atomi precizitású térszerkezetének meghatározásával sikerült a fehérjék harmadlagos szerkezetét négy nagy alosztályra bontani aszerint, hogy milyen másodlagos szerkezeti elemek ismétlődnek bennük.

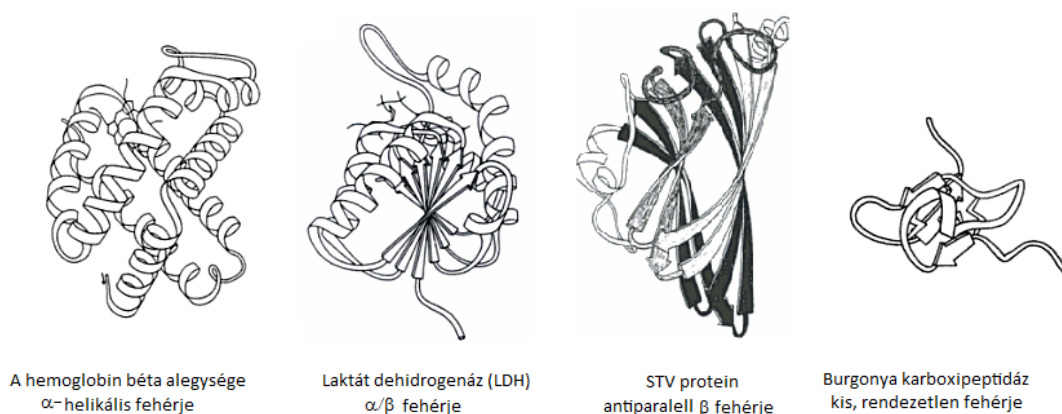
Az első a csak (kanyarok és rendezetlen szakaszok mellett) α -helikális szerkezetet tartalmazó csoport. Az ilyen típusú fehérjékben a hélixek antiparallel vagy közelítőleg merőleges elrendezésben helyezkednek el. A jelenség lehetséges magyarázata, hogy a hélixek a elektromos dipólmomentummal rendelkeznek, így az elektrosztatikus kölcsönhatások következtében energetikailag kedvezőbb az antiparallel beállítás.

A második nagy csoport a párhuzamos α/β . Az ilyen típusú fehérjékben a szekvencia szerint közelítőleg váltakozó hélixeket és β -szálakat találunk többrétegű felépítésben,

párhuzamos β -redőkkel és őket takaró hélixekkel. Az α/β struktúrájú fehérjék domináns rendezőelve a teljes jobbkezesesség. A jelenség részleges magyarázata lehet, hogy a β -redők enyhe csavarodása miatt a teljes szerkezet így lesz szorosan pakolt, illetve az, hogy a feltekeredéskor az α -hélixek jobbkezesességéhez csatolódik a teljes domén térszerkezete, de a kizárólagosság oka még nem teljesen tisztázott.

A harmadik típus az antiparallel β -redők alkotta fehérjék csoportja, melyben a β -szálak hordókba vagy egyéni redőkbe rendeződnek. Az egyik leggyakoribb ilyen struktúra az 1.1.10 ábrán látható „görög-kulcsos” β -hordó, melyben a β -szálakat a hordós szerkezet alján és tetején keresztirányú kötőmotívumok fűzik össze.

A kisméretű fehérjék besorolása valamilyen harmadlagos szerkezeti csoportba általában nem lehetséges, többnyire eleve kevés másodlagos szerkezeti elemet tartalmaznak. Legtöbbször nem ismétlődő, szabálytalan struktúrát tudnak csak felvenni vagy eleve rendezetlenek és nem képesek feltekeredni.

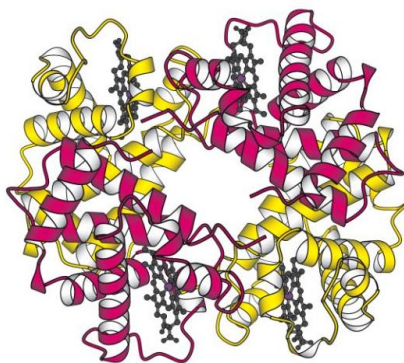


1.1.10 Ábra: Egy-egy példa a fehérjék tipikus harmadlagos szerkezeti csoportjaiból

1.1.4 Negyedleges szerkezet

Sok fehérje valójában több polipeptidlánc együtteséből tevődik össze, mely láncokat fehérje alegységeknek nevezik. Az alegységek harmadlagos szerkezete mellett a teljes komplex egy negyedleges szerkezettel is rendelkezik, mely az alegységek egymáshoz viszonyított helyzetét jelenti. Az egyes elemeket többnyire hidrofób és elektrosztatikus kölcsönhatások kötik egymáshoz. Az ilyen összetett fehérjék működése során az egyes alegységek egymáshoz viszonyított helyzete megváltozhat, aminek következtében képesek más molekulákat, ionokat

kötni, csatornát képezni stb. Az ilyen konformációs átalakulások a teljes szerkezet kooperatív jellegét támasztják alá.



1.1.11 Ábra: A hemoglobin fehérjekomplex negyedleges szerkezete

1.2 Fehérjeszerkezet-meghatározás elektronikus és vibrációs CD spektroszkópiával

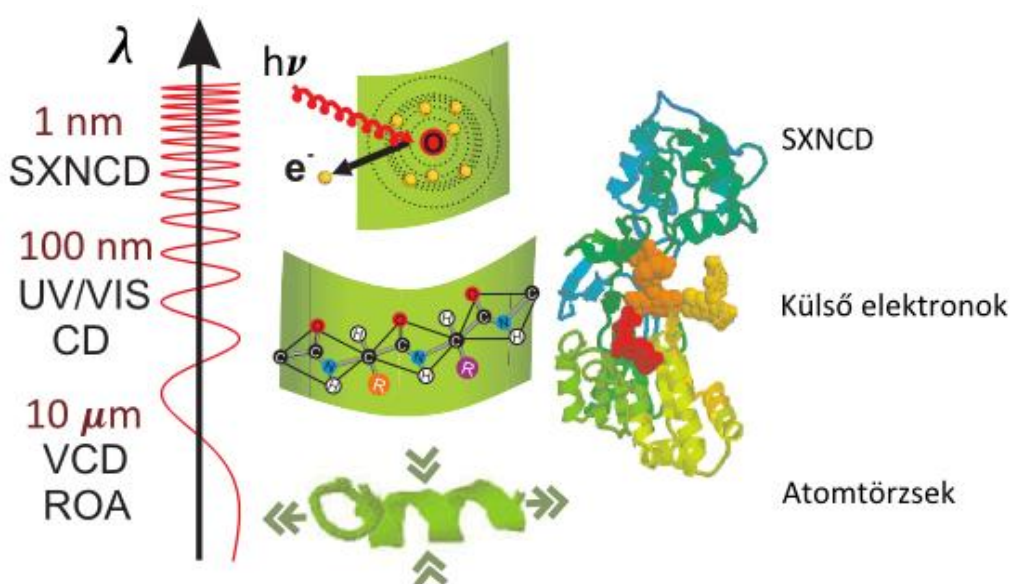
Makromolekulák háromdimenziós térszerkezet-meghatározásnak legközvetlenebb módja a röntgenkristallográfia, mely technikának köszönhetően ma már néhány tízezer makromolekula (főleg fehérjék és nukleinsavak) atomi precizitású térszerkezete ismert [3]. Az atomi felbontást (néhány Å) az teszi lehetővé, 0,1-10 nm hullámhosszúságú röntgensugárzást használnak ezen diffrakciós mérésekhez. A módszer alkalmazásához ugyanakkor megfelelő minőségű kristályosított mintára van szükség, melynek előállítása nagy fehérjemolekulák esetén meglehetősen költséges és időigényes, ráadásul nem is mindig kivitelezhető feladat. További hátránya, hogy a szerkezetről statikus képet ad, mely eltérhet a folyadékfázisban felvett, dinamikusan változó struktúrától.

A fehérjeszerkezet-vizsgálat másik, egyre elterjedtebben alkalmazott módszere az NMR spektroszkópia [4], melynek nagy előnye éppen abban rejlik, hogy a szerkezet mellett meghatározhatók vele bizonyos dinamikai paraméterek is. Ennél a technikánál a korlátot a molekulát alkotó atomok száma jelenti, túl nagy tömegű fehérjék (kb. 40 000 au fölött) térszerkezetét ma még nem tudják vele felbontani [5]. Ennek egyik oka, hogy az egyre növekvő protonszám és környezeti méret miatt egyre több lesz az egymásba olvadó rezonancia-csúcs, a másik pedig az, hogy a nagyobb méret miatt a mágnesezettség gyorsabban relaxálódik, aminek következtében a csúcsok kiszélesednek és gyengül az intenzitásuk [6].

A fent említett méréstechnikákkal egy adott fehérjemolekula teljes háromdimenziós társzerkezete meghatározható. Ehhez képest a cirkuláris dikroizmus spektroszkópia kevesebb információt nyújt, hiszen alapvetően a másodlagos szerkezet vizsgálatára alkalmas, ugyanakkor szinte bármilyen molekulatömegű fehérjére alkalmazható és nem igényel speciális mintaelőkészítést.

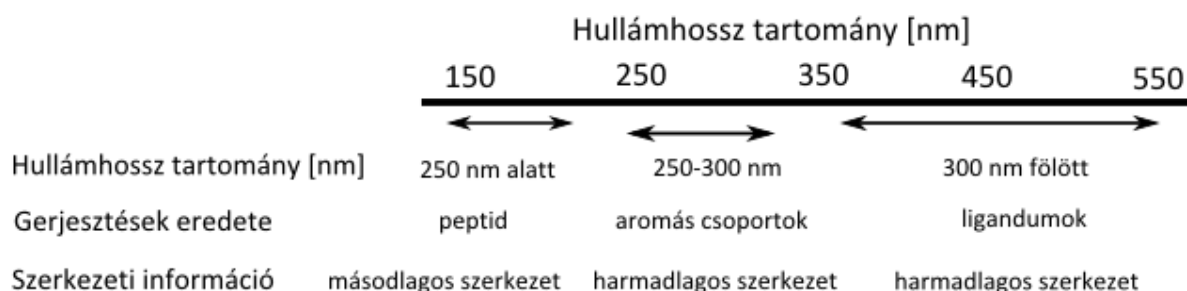
A fehérjék az őket felépítő másodlagos szerkezeti elemeknek köszönhetően királis makromolekulák, így különbözőképpen nyelik el a fény két cirkulárisan polarizált komponensét, azaz természetes cirkuláris dikroizmust mutatnak (a természetes szó itt arra utal, hogy külső mágneses tér jelenléte nélkül teszik). Amennyiben ezt a polarizációs effektust a foton energia szélesebb tartományában vizsgáljuk, CD spektroszkópiáról beszélünk.

A teljes elektromágneses spektrumból biológiai minták szerkezetvizsgálatára manapság a távoli ultraibolyától (far-UV) a közép infravörösig (MIR) terjedő tartományt alkalmazzák, melyet két nagy részre oszthatunk aszerint, hogy milyen átmenetek gerjeszthetők az adott fotonenergia segítségével (1.2.1 ábra): a távoli UV – látható spektrumban beszélünk az elektronok gerjesztéseiről, míg az infravörös tartományban a molekulát alkotó atomtörzsek vibrációs gerjesztéseiről.



1.2.1 Ábra: A fehérjék CD spektroszkópiájának jellegzetes hullámhossz tartományai
SXNCD: lágy röntgen természetes cirkuláris dikroizmus (soft X-ray natural circular dichroism) – ezek a királis molekulát alkotó atomok mély nívóin lévő elektronok gerjesztéseinek CD-je
UV/VIS CD: UV és látható cirkuláris dikroizmus – a peptidkötésben résztvevő elektronok gerjesztéseinek CD-je
VCD: vibrációs cirkuláris dikroizmus és **ROA:** Raman optikai aktivitás – a molekulákat alkotó atomtörzsek vibrációs gerjesztéseinek CD-je

Az UV és látható spektrumot, vagyis az elektronok gerjesztéseinek tartományát, – az 1.2.2 ábrán látható módon – általában további három részre osztják aszerint, hogy milyen, a fehérjékben megtalálható kötések elektrongerjesztései dominálnak bennük. Az első, a távoli-UV tartomány ($\lambda < 250$ nm alatt), ahol a peptidkötések gerjesztései jellemzőek, a második a közép UV tartomány ($\lambda = 250\text{--}300$ nm), ahol az aminosavak aromás oldalláncai adnak jelentős járulékot és végül a harmadik a közeli UV – látható régió ($\lambda = 300\text{--}700$ nm), ahol az oldalláncok ligandumainak gerjesztései láthatóak. A CD spektroszkópia fehérjeszerkezet-számításra vonatkozó alkalmazásai a spektrum egyes szakaszainak ezen karakterisztikus eredetét használják ki.



1.2.2 Ábra: A fehérjék elektronikus CD spektroszkópiájának jellegzetes hullámhossz tartományai

Dolgozatomban a CD spektroszkópia (távoli-UV és infravörös) mérés technikájának bemutatása mellett a távoli UV tartományban felvett spektrumok kiértékelésével foglalkozom. Mivel a spektrum ezen részén a peptidkötések gerjesztései dominálnak, a CD mértékét éppen a környező peptidegységek relatív orientációja határozza meg, mely egy periodikus mintázatot megvalósító másodlagos szerkezeti elem esetén azonos, így a spektrum alakjából a másodlagos szerkezetre vonatkozó információt nyerhetünk. Napjainkban a spektrumok kiértékelésénél használt számítási módszerek folyamatos fejlődésével egyre pontosabb eredményeket érnek el. A módszer pontosságát növeli, ha növeljük a vizsgált spektrális tartományt. Ezt a távoli UV tartomány esetén nagy fényességű szinkrotron források teszik lehetővé.

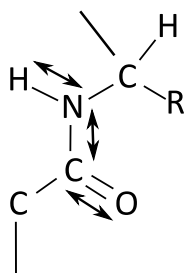
A távoli UV energiatartomány mellett az elektromágneses spektrum közeli- és közép-infravörös szakasza az, amelyet ma elterjedten alkalmaznak különböző szerves eredetű, királis molekulák szerkezetvizsgálatára. Az infravörös spektroszkópia nagy előnye a rövidebb hullámhossztartományokkal szemben, hogy az abszorpciós vonalak élesebbek és jobban elkülönülnek egymástól, hiszen az egyes vibrációs módusok a kötést kialakító magpárok típusától és egymáshoz viszonyított elmozdulásától is függenek. Ennek megfelelően már egy

egyszerű infravörös abszorpciós spektrum is több, a lokális szerkezetre érzékeny információt tartalmaz, amit még tovább tudunk árnyalni cirkuláris dikroizmus spektroszkópia alkalmazásával. A mérés technika igazi ereje kisméretű (<200 atom) molekulák abszolút konfigurációjának és az oldatban lévő molekulák konformációs részarányainak meghatározásában mutatkozik meg, hiszen ekkora rendszerek lehetséges alapállapotú konfigurációit már modellezni tudják különféle *ab initio* módszerekkel, mely térszerkezetek alapján azok VCD spektruma is számolható és a mért, valamint számolt spektrumok összevethetők [7].

A több száz aminosavból, így több ezer atomból álló fehérjemolekulák teljes térszerkezetének és vibrációs spektrumának kvantumkémiai számítása ma még nem kivitelezhető feladat, így ezen minták spektrumát továbbra is empirikus statisztikai módszerekkel szokás kiértékelni ismert térszerkezetű fehérjék VCD spektrumaival történő összehasonlítás alapján [8].

Fehérjék spektrumának kiértékeléséhez jó fogódzót jelent (illetve önmagában is izgalmas és dinamikusan fejlődő terület) mesterségesen előállított, csupán néhány féle aminosavat tartalmazó polipeptidok spektrumának vizsgálata [9]. Ezeket a molekulákat tekinthetjük akár olyan egyszerű fehérjemodelleknek is, melyek másodlagos szerkezetét a szintézis során a megfelelő aminosavak kiválasztásával befolyásolni tudjuk, létrehozva így például tisztán α -hélix, 3_{10} -hélix vagy β -redő struktúrájú molekulákat [10]. Polipeptideken végzett mérésekkel sikerült többek között igazolni, hogy az amid csoport² vibrációs CD spektruma csak a polipeptid-lánc konformációjától függ, az oldalláncok funkció csoportjai nem befolyásolják számottevően [11]. Azaz a fehérjék és peptidok másodlagos szerkezetének VCD spektroszkópiával történő vizsgálata során az UV CD-hez hasonlóan, a peptidkötést alkotó atomok, vagyis az amid csoport gerjesztéseit érdemes mérnünk, hiszen ezen módusok érzékenyek leginkább a peptidlánc konformációjára. A vibrációs gerjesztésekben részt vevő atomok láthatók az 1.2.3-as ábrán, a gerjesztések hullámszám értékei pedig az alábbi táblázatban. Ezek közül az amid I módus helye és a CD vonalának alakja a legérzékenyebb a másodlagos szerkezetre.

² Csoportrezgés: makromolekulákban néhány atomra, ill. belső koordinátára koncentrálódó rezgés



Módus	Frekvencia [cm ⁻¹]	Hullámhossz [nm]	Leírás
Amid A	~ 3300	~ 3030	N–H vibráció és amid II 2. harmonikusa
Amid B	~ 3100	~ 3225	N–H vibráció és amid II 2. harmonikusa
Amid I	1600-1690	6250-5917	C=H vibráció
Amid II	1480-1575	6756-6349	C–N vibráció, N–H kihajlás
Amid III	1229-1301	8136-7686	C–N vibráció, N–H kihajlás
Amid IV	625-767	16000-13037	O–C–N kihajlás, más módusokkal keverve
Amid V	640-800	15625-12500	N–H kihajlása a síkból
Amid VI	537-606	18621-16501	C=H kihajlása a síkból
Amid VII	~200	~50000	a peptidváz torziós deformációja

1.2.3 Ábra: A peptidcsoport vibrációs gerjesztéseiben részt vevő atomok és a vibrációs, valamint hajlási módusok energiái

2. fejezet

Az általam vizsgált fehérje (UDE) bemutatása

Az élő szervezetekben a nukleinsavak a genetikai információ tárolásának és továbbításának makromolekulái. A kétféle molekula (DNS és RNS) közül az élőlények túlnyomó többségében az öröklődő tulajdonságokat hordozó molekula a DNS. Felépítését tekintve a DNS egy polimer, mely vázát foszfodiészter kötésekkel egymáshoz kapcsolódó dezoxiribózok alkotják, melyekhez a négyféle nukleobázis (adenin-A, guanin-G, timin-T, citozin-C) valamelyike kötődik. Két ilyen polinukleotid lánc bázispárokon keresztül történő összekapcsolódásával jön létre az ismert kettős spirál szerkezet. Az ellentétes helicitású polinukleotid láncokat tehát a komplementer bázispárok rögzítik hidrogénhid-kötésekkel. A komplementaritás azt jelenti, hogy az adenin nukleobázis mindig timinnel, a guanin pedig citozinnal alakít ki hidrogénhid-kötést a két lánc között. A DNS egyik hélice már önmagában tartalmazza a teljes genetikai információt, de a genetikai tartalom megőrzéséhez és reprodukciójához szükséges a bázispárok szigorú komplementaritása.

A DNS-ben tárolt információtartalom számos roncsoló hatásnak van kitéve, melyek a dupla spirál szerkezet ellenére mutációhoz vezethetnek. A mutációk egy gyakran előforduló formája az uracil megjelenése a DNS-ben. Az uracil az RNS-ben a timin szerepét tölti be, tőle csupán egy metil csoportban különbözik, így képes az adenin bázispárjaként viselkedni, a DNS-ben való megjelenése ugyanakkor hibának tekintendő.

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy minden eddig vizsgált állati és bakteriális szervezetben, kivéve néhány teljes átalakulással fejlődő rovar, kimutatható egy enzim (uracil-DNS glikoziláz), amely a DNS-ben található uracilt kimetszi és bázismentes helyet hagy hátra [12]. Ezen rovarok genomjának vizsgálatával kimutatták, hogy például az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) lárvában hiányzik ez az enzim, így tartósabban létrejöhet benne uracil-tartalmú DNS [12]. Az uracil-tartalmú DNS-nek (u-DNS) a lárvaalapot követő bábállapot során bekövetkező programozott sejthalálban lehet szerepe, ezen folyamatot ugyanis beindíthatja a mutáns DNS kettősszálú töreése. Vagyis, ha felhalmozódik az uracil a DNS-ben, az ezen hibát javító, a DNS kettős szálát ugyanakkor a javítási folyamat során

felhasító enzim túlzott működése olyan mértékű DNS törést generál, hogy beindul a programozott sejthalál.

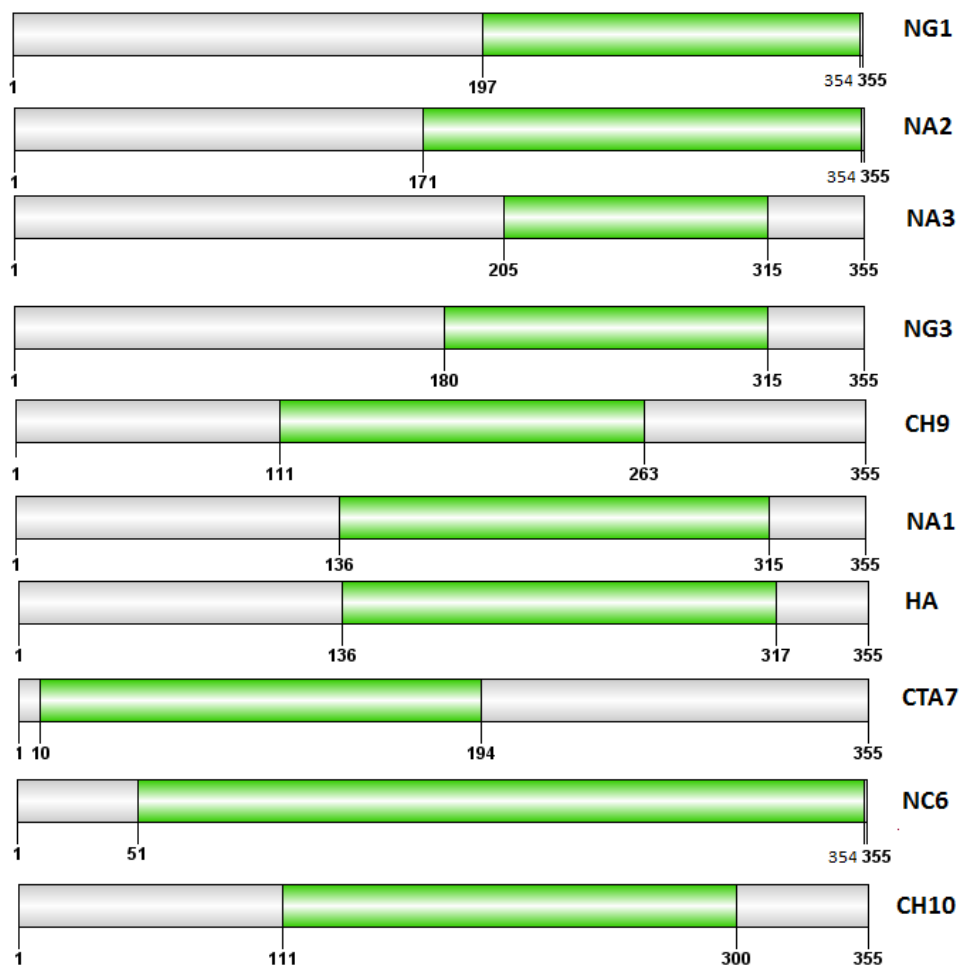
A legújabb kutatások azt jósolják, hogy az u-DNS az ecetmuslicában megőrződhet a harmadik lárvastádium végéig, amikor egy újonnan azonosított uracil-specifikus DNS degradáló faktor (UDE) el nem kezd termelődni, mely az u-DNS hasításáért felelős [13]. A jelenleg folyó vizsgálat fő célkitűzése az, hogy megfejtsek az uracil-felismerés és DNS hasítás mechanizmusát. Az ehhez vezető egyik ígéretes út az UDE működésének leírása, melynek első fontos lépése a fehérje teljes térszerkezetének feltérképezése.

Ahogy azt a korábbi fejezetekben ismertettem, a fehérjeszerkezet-maghatározás általánosan alkalmazott módszerei a röntgen krisztallográfia és az NMR spektroszkópia. Az UDE fehérjét azonban eddig nem sikerült kristályosítani, molekulatömege (~40 kDa) pedig túl nagy ahhoz, hogy megbízható eredményt szolgáltatson az NMR spektroszkópia. Ezen okoknál fogva a szerkezetmeghatározás egy kevésbé direkt módszerét, a CD spektroszkópiát használtam az UDE másodlagos szerkezetének analízisére.

A teljes hosszúságú fehérje analízisen kívül különféle biokémiai módszereknek köszönhetően lehetőség van fehérje fragmensek előállítására, melyek tulajdonképpen a teljes fehérjeszekvenciából kivágott, önállóan is stabilizálódni képes szakaszok. Az általam vizsgált fragmensek előállítása ESPRIT (Expression of Soluble Proteins by Random Incremental Truncation) módszerrel történt, melynek lényege, hogy a fehérjét kódoló gént különböző szakaszokon elhasítják, majd a szélektől kezdve megfelelő enzimekkel felemésztetik [14]. Mivel a lebontási folyamat a láncvégektől kezdődik és állandó sebességgel halad a lánc mentén, így az enzimek általi bontást adott időközönként leállítva a gén különböző hosszúságú közbülső szakaszait kapjuk. Ezen kódszakaszokat baktériumok DNS-ébe beépítve gyakorlatilag a szekvencia bármely, folytonos szakaszának megfelelő fehérje fragmens termelése beindítható, viszont csak azon fragmensek koncentrációja lesz megfelelő a fehérjetermelés végén, melyek önállóan is stabil szerkezettel rendelkeznek. Az így készült fragmensek közül végül tízet választottunk ki a CD spektroszkópiai mérések elvégzésére.

Itt szeretném megjegyezni, hogy az ESPRIT módszer jellegéből fakadóan a szintetizált fehérjefragmensek aminosav-szekvenciája valamivel hosszabb, mint a natív fehérje szekvenciájának az adott fragmensnek megfelelő része, mivel a kezdő- és végszakaszokon van néhány speciális aminosav, melyek kötő- és vágóhelyeket jelölnek ki a szintézis és tisztítás során. Ennek megfelelően az UDE spektrumának kiértékeléskor úgy tekintettem, hogy 370 aminosavat tartalmaz a minta, de a végeredmények csak az eredeti, 355 aminosav hosszú szakaszra vonatkoznak.

A szintetizált fragmensek szekvenciáinak elhelyezkedése a teljes hosszú aminosavláncban a 2.1 ábrán láthatóak.



2.1 Ábra: A fehérje fragmensek szekvenciáinak elhelyezkedése a teljes fehérjén belül

3. fejezet

A fehérjék CD spektroszkópiájának elméleti alapjai

3.1. Egyszerű modell α -hélix cirkuláris dikroizmusának szemléltetésére

A következőkben az α -hélix mint jellemző másodlagos szerkezeti elem legegyszerűbb modelljén szeretném bemutatni a cirkuláris dikroizmus jelenségét és szimmetriatulajdonságait G. H. Wagniere és G. Rikken gondolatmenetét követve [15].

A modellünk legyen a következő: egy kvázi-végtelen hélix mentén szabadon mozog egy elektron. A hélixet, mely D_∞ szimmetriával rendelkezik, paraméterezzük a szokásos módon, $(a \cos \varphi, a \sin \varphi, b\varphi)$, ahol a a hélix sugara, $2\pi b$ pedig a menetemelkedése.

Az elektron Lagrange-függvénye ilyen feltételek mellett:

$$L = \frac{1}{2} m (\dot{\varphi}^2), \quad (3.1)$$

ahol $\varphi \in [0; 2\pi N]$ az általános koordináta, melyhez tartozó általános impulzus:

$$p_\varphi = \frac{\partial L}{\partial \dot{\varphi}} = m (\dot{\varphi}) \Rightarrow \dot{\varphi}^2 = \frac{p_\varphi^2}{m^2 (\dot{\varphi})^2} \quad (3.2)$$

Az ebből származtatható Hamilton-függvény, illetve kanonikus kvantálás után a Hamilton operátor:

$$H_0 = \frac{1}{2} m (\dot{\varphi}^2) = \frac{1}{2} \frac{1}{m (\dot{\varphi})^2} p_\varphi^2 = \frac{-\hbar^2}{2} \frac{1}{m (\dot{\varphi})^2} \frac{\partial^2}{\partial \varphi^2}, \quad (3.3)$$

melynek sajátfüggvényei

$$|n\rangle = L^{\frac{1}{2}} \exp(in\varphi / N) \quad (3.4)$$

alakúak, sajátértékei pedig az n pozitív egészek. N a hélix meneteinek száma (melyre az $N \rightarrow \infty$ határesetet fogjuk tekinteni), $L = 2\pi N (a^2 + b^2)^{\frac{1}{2}}$ pedig a hélix vonalának teljes hossza.

Ahhoz, hogy kiszámoljuk egy z -tengely mentén propagáló elektromágneses hullámmal való kölcsönhatás során létrejövő gerjesztések átmeneti mátrixelemeit, szükségünk lesz a következő impulzus-operátorokra:

$$p_x = m \frac{\partial x}{\partial \varphi} \dot{\varphi} = ma(-\sin \varphi) \frac{p_\varphi}{m(a^2 + b^2)} = \frac{\hbar}{i} \left(\frac{-a \sin \varphi}{a^2 + b^2} \right) \frac{\partial}{\partial \varphi}, \quad (3.5)$$

melyet a következő kiegészítéssel tudunk hermitikussá tenni [16]:

$$p_x = \frac{i\hbar a}{a^2 + b^2} \left(\sin \varphi \frac{\partial}{\partial \varphi} + \frac{1}{2} \cos \varphi \right). \quad (3.6)$$

Hasonlóan megkaphatjuk az impulzus operátor y komponensét:

$$p_y = \frac{-i\hbar a}{a^2 + b^2} \left(\cos \varphi \frac{\partial}{\partial \varphi} - \frac{1}{2} \sin \varphi \right). \quad (3.7)$$

Egy $\mathbf{p}$ impulzusú elektron és az $\mathbf{A}$ vektorpotenciállal jellemzett elektromágneses tér kölcsönhatását leíró Hamilton-operátor megfelelő mértékválasztással a következő alakú:

$$H_{\text{int}} = \frac{(-e)}{mc} \mathbf{A} \cdot \mathbf{p}. \quad (3.8)$$

Ha a hélixet lineárisan polarizált fénnel világítjuk meg, akkor azt két azonos amplitúdójú cirkulárisan polarizált komponens (L, R) összegeként írjuk fel, mely a hélix hossz tengelye mentén, azaz z irányban terjed. Így a következő alakú lesz a vektorpotenciál:

$$\mathbf{A}_{L/R} = \frac{A_0}{2} (-i\mathbf{u} \pm \mathbf{j}) \exp(-i(\omega t - kz)) + c.c. \quad (3.9)$$

Az (3.6), (3.7) és (3.9) kifejezéseket a kölcsönhatási Hamilton-operátor általános alakjába, (3.8)-ba behelyettesítve a következő operátoralakot kapjuk:

$$H'_{L/R} = \left(\frac{-A_0 e}{2mc} \right) \left(\frac{i\hbar a}{a^2 + b^2} \right) \left[-i \left(\sin \varphi \frac{\partial}{\partial \varphi} + \frac{1}{2} \cos \varphi \right) \mp \left(\cos \varphi \frac{\partial}{\partial \varphi} - \frac{1}{2} \sin \varphi \right) \right] \exp(+ikz). \quad (3.10)$$

Ezen Hamilton-operátor esetén nincs szükség arra, hogy a fény-anyag kölcsönhatás alakját közelítsük az általában alkalmazott multipólus sorfejtéssel, az anyagban létrejövő abszorpciót közvetlenül a (3.10) operátorra ki tudjuk számolni a Fermi-arany szabály révén, azaz a perturbációszámítás második rendjében:

$$I(n \rightarrow m) \propto \frac{2\pi}{\hbar} |\langle m | H' | n \rangle|^2. \quad (3.11)$$

A mátrixelemet ki tudjuk számolni, ha behelyettesítjük a (3.4) sajátfüggvényeket és a Hamilton-operátor (3.10) alakját:

$$|\langle m | H'_{L/R} | n \rangle|^2 = C \left[\frac{N \pm 2n}{N(n - m \pm N(1 \pm kb))} \right]^2 \cdot (2 - 2\cos(2\pi Nkb)), \quad (3.12)$$

ahol $C = \left[\frac{A_0 e \hbar a}{8 \pi m c (a^2 + b^2)} \right]^2$ és megfigyelhetjük, hogy ha $2 \pi b k = 4 \pi^2 b \frac{1}{\lambda}$ értéke 0 – tehát

végtelenhez tart a fény hullámhossza –, akkor az abszorpció eltűnik, ahogy ezt várjuk.

A következő lépésben – anélkül, hogy a megfontolásunk veszítene általános érvényéből – feltesszük, hogy az átmenet az $n=0$ -val jellemzett alapállapot és valamely m , mágneses momentummal rendelkező állapot közt jön létre. Ekkor az abszorbeált intenzitások különbsége:

$$I_L - I_R \propto \frac{1}{(-m + N(1 + kb))^2} - \frac{1}{(-m - N(1 - kb))^2} = \frac{-4N^2 kb + 4Nm}{(-m + N(1 + kb))^2 (-m - N(1 - kb))^2}. \quad (3.13)$$

A CD anizotrópia faktor pedig:

$$g_{CD} \equiv \frac{I_L - I_R}{I_L + I_R} = \frac{-2N^2 kb + 2Nm}{m^2 - 2mNkb + N^2 + N^2 k^2 b^2} \xrightarrow{N \rightarrow \infty} \frac{-2kb}{1 + k^2 b^2}. \quad (3.14)$$

A fenti kifejezés alakjából a cirkuláris dikroizmus következő tulajdonságait állapíthatjuk meg:

- inverziót végrehajtva a hélixen csavarodása ellentétes irányúra vált, ami azt jelenti, hogy a b paraméter előjelet vált, vagyis a másik enantiomert kapjuk. Ekkor az anizotrópia faktor előjele is megváltozik, ami azt jelenti, hogy az effektus inverzióra páratlan.
- időtükrözésre invariáns az anizotrópia faktor, hiszen nincs olyan mennyiség a (3.14) kifejezésben, ami megváltozna az időtükrözés során. A k érték a hullámszám vektor nagyságát jelenti, azaz ugyanezt az eredményt kapjuk ellentétes irányú terjedés esetén is.
- $b \rightarrow 0$ határesetben, azaz ha a hélix elveszíti menetemelkedését, az effektus megszűnik. Ez azt jelenti, hogy amíg királis az objektumunk, megfigyelhetünk cirkuláris dikroizmust, amikor azonban a szimmetriája megnő, a jelenség eltűnik.

A helikális fehérjék kvalitatívabb leírását kaphatjuk meg ha nem egy folytonos, végtelen hélix mentén mozgó elektron esetét vizsgáljuk, hanem egy – a természetben is előforduló – benzolgyűrűkből álló helikális molekulára számítjuk ki például a CD spektrumot [17].

A fehérjékben is megfigyelt cirkuláris dikroizmusra általános esetben is igazak ezek a tulajdonságok, melyeket a fenti egyszerű modell alapján megállapítottunk. A következő alfejezetben ezt az állítást szeretném általánosan is megmutatni a lineáris válaszelmélet és szimmetria megfontolások segítségével.

3.2. A cirkuláris dikroizmus mikroszkopikus eredete

Az előző szakaszban láthattuk, hogy egy α -helikális pályára kényszerített elektron esetén az elektronállapotok gerjesztései olyanok lesznek, hogy különböző arányú abszorpcióhoz vezetnek a fény két cirkulárisan polarizált komponensére, vagyis királis elektronpálya esetén megfigyelhető lesz a cirkuláris kettőstörés jelensége. A következőkben azt szeretném bemutatni a lineáris válaszmélet felhasználásával, hogy milyen szimmetria feltételei vannak a rendszerre nézve annak, hogy létrejöjjön cirkuláris kettőstörés és hogyan kapcsolódik ez a vizsgált objektumok kiralitásához.

A lineáris válaszmélet értelmében feltételezzük, hogy egy kis perturbáció hatására a rendszerben bekövetkező változás kicsi, vagyis a hatás és a válasz közt lineáris kapcsolat van. Ezt a kapcsolatot írja le a χ általános szuszceptibilitás. Tekintsünk egy harmonikus időfüggésű perturbációt:

$$\delta H(t) = q \cdot f^\omega e^{i\omega t}, \quad (3.15)$$

ahol f^ω a külső tér ω frekvenciás komponense, q pedig az anyag hozzá csatolódó mennyiségét leíró operátor. A lineáris válaszmélet értelmében egy ilyen perturbáció hatására egy rendszerre jellemző p mennyiség megváltozásának várható értéke a következő lesz:

$$\langle \Delta p \rangle_\omega = \chi_{pq}(\omega) f^\omega. \quad (3.16)$$

Speciálisan a fény-anyag kölcsönhatást leíró perturbáló Hamilton-operátor multipól alakja a következő lesz [18]:

$$\delta H = -p_\alpha (E_\alpha)^0 - \frac{1}{3} \Theta_{\alpha\beta} (\partial_\alpha E_\beta)^0 - m_\alpha (B_\alpha)^0 + \dots, \quad (3.17)$$

ahol, $p_\alpha = \sum_i e_i r_{i\alpha}$ az elektromos dipól operátor, $\Theta_{\alpha\beta} = \frac{1}{2} \sum_i e_i (3r_{i\alpha} r_{i\beta} - r_i^2 \delta_{\alpha\beta})$ az elektromos

kvadrupól operátor, $m_\alpha = \sum_i \frac{e_i}{2m_i} (l_{i\alpha} + g_i S_{i\alpha})$ a mágneses dipól operátor, valamint $(E_\alpha)^0$ és

$(B_\alpha)^0$ a térerősség és a mágneses indukcióvektor α komponensének a töltésrendszer origójában felvett értéke, $(\partial_\beta E_\alpha)^0$ pedig az elektromos térerősség α komponensének a helyvektor β komponense szerinti deriváltja ugyanitt.

Ezen operátorok mátrixelemei szerepelhetnek az egyes szuszceptibilitások kifejezésében, melyek a mérendő cirkuláris dikroizmust adják. Valamely p mennyiség

várható értékének megváltozására a fény-anyag kölcsönhatás következtében, a (3.16) kifejezés több operátorra való általánosításával a (3.17)-ben szereplő perturbáló operátor esetén következő alakot kapjuk:

$$\langle \Delta p \rangle_\omega = \chi_{p_\alpha p_\beta} (E^\omega)_0 + \frac{1}{3} \chi_{p_\alpha \Theta_{\beta\gamma}} (\partial_\beta E^\omega_\gamma)_0 + \chi_{p_\alpha m_\beta} (B^\omega_\beta)_0 + \dots \quad (3.18)$$

A fenti szuszeptibilitás-tenzorok elemeinek mikroszkopikus mennyiségekből való származtatását a lineáris válaszmélet keretein belül a Kubo-formulával tehetjük meg, ami $T \rightarrow 0$ határesetben, amikor az anyag az alapállapotában van a következőre vezet:

$$\begin{aligned} \chi_{pq}(Z) = & -\frac{1}{\hbar} \sum_n \left\{ \frac{\langle 0|p|n\rangle \langle n|q|0\rangle}{\omega_{n0} - Z} + \frac{\langle 0|q|n\rangle \langle n|p|0\rangle}{\omega_{n0} + Z} \right\} = \\ & -\frac{2}{\hbar} \sum_n \left\{ \frac{\omega_{n0} \Re \{ \langle 0|p|n\rangle \langle n|q|0\rangle \} + iZ \Im \{ \langle 0|q|n\rangle \langle n|p|0\rangle \}}{\omega_{n0}^2 - Z^2} \right\} = \\ & -\frac{2}{\hbar} \sum_n \frac{\omega_{n0} \Re \{ \langle 0|p|n\rangle \langle n|q|0\rangle \}}{\omega_{n0}^2 - Z^2} - \frac{2}{\hbar} \sum_n \frac{+iZ \Im \{ \langle 0|q|n\rangle \langle n|p|0\rangle \}}{\omega_{n0}^2 - Z^2} = \chi'_{pq} + i\chi''_{pq} \end{aligned} \quad (3.19)$$

Itt a komplex $Z = \omega + i\delta$ frekvencia képzetes részében szereplő δ egy infinitezimálisan kis pozitív valós szám, mely a kauzalitási feltételből származik és a külső tér adiabatikus bekapcsolását jelenti.

Ebben a felírásban a χ'_{pq} tag jelenti a szuszeptibilitásnak az átmeneti mátrixelem valós részéhez tartozó részét, míg χ''_{pq} a képzetes részt tartalmazó tagot, de maguk a χ'_{pq} és χ''_{pq} elemek komplexek a nevezőjükben található frekvenciafüggés miatt, azaz tovább bonthatók abszorpciós és diszperziós részre.

Ahogy azt a hélix példáján is láttuk, a tapasztalatok szerint a természetes cirkuláris kettőtörést leíró anizotrópia-faktor előjelet vált, ha a hélix menetemelkedésének $(2\pi b)$ előjelét megfordítjuk, ami tulajdonképpen azt jelenti, hogy inverziót hajtunk végre a rendszeren. Ez arra engedhet következtetni, hogy amikor a (3.17) Hamilton-operátorban a cirkuláris kettőtörésért felelős tagokat keressük, az olyan szuszeptibilitással jellemzett folyamatokat tarthatjuk meg, melyek a rendszer inverziójára negatív előjelet kapnak.

Másrészt – szintén összhangban az egyszerű modellel – a CD effektus zérus mágneses térben is megfigyelhető, azaz időtükrözésre invariáns, a külső mágneses térnek, illetve a rendszer mágnesezettségének páros függvénye lehet csak.

Ha a Kubo-formulában szereplő operátorokra kihasználjuk időtükrözéssel szembeni viselkedésüket az általános szuszeptibilitásokra a következő összefüggéseket kapjuk:

$$\begin{aligned}\chi'_{pq}(Z, \mathbf{M}) &= \varepsilon_p \varepsilon_q \chi'_{pq}(Z, -\mathbf{M}), \\ \chi''_{pq}(Z, \mathbf{M}) &= -\varepsilon_p \varepsilon_q \chi''_{pq}(Z, -\mathbf{M}).\end{aligned}\quad (3.20)$$

Itt ε_p a $\hat{p}$ operátor időtükrözés során felvett előjelét jelenti ($\varepsilon_p = \pm 1$, szimmetrikus, ill. antiszimmetrikus esetben), $\mathbf{M}$ pedig az anyag mágnesezettség-sűrűsége.

Ha a fenti szimmetriakritériumok segítségével megvizsgáljuk, hogy az (3.18) kifejezésben mely tagok sértik a térbeli inverziót és invariánsak időtükrözésre, akkor azt kapjuk, hogy a következő szuszeptibilitásokkal jellemzett folyamatok adhatnak CD effektust:

$$\begin{aligned}\chi'_{p_\alpha \Theta_{\delta y}}(Z, \mathbf{M}) &= \frac{2}{\hbar} \sum_n \frac{\omega_{n0}}{\omega_{n0}^2 - Z^2} \Re \{ \langle 0 | p_\alpha | n \rangle \langle n | \Theta_{\delta y} | 0 \rangle \}, \\ \chi''_{p_\alpha m_\theta}(Z, \mathbf{M}) &= \frac{2}{\hbar} \sum_n \frac{Z}{\omega_{n0}^2 - Z^2} \Im \{ \langle 0 | p_\alpha | n \rangle \langle n | m_\theta | 0 \rangle \}.\end{aligned}\quad (3.21)$$

Az inverzióra vonatkozó feltétel alapján $\chi''_{p_\alpha \Theta_{\delta y}}(Z, \mathbf{M})$ és $\chi'_{p_\alpha m_\theta}(Z, \mathbf{M})$ is megfelelő lenne, de ezek a tagok az időtükrözésre előjelet váltanak. A szimmetria vizsgálat alapján tehát a (3.21) tagok járulhatnak hozzá a cirkuláris kettőtörés effektushoz és az anyag által mutatott ellipticitás speciálisan z irányú fényterjedés esetén [19]:

$$\Theta \approx -\frac{1}{2} \omega \mu_0 / N \left[\frac{1}{3} \omega \left(\Im \{ \chi'_{p_x \Theta_{yz}} - \chi'_{p_y \Theta_{xz}} \} \right) + \Im \{ \chi''_{p_x m_x} + \chi''_{p_y m_y} \} \right]. \quad (3.22)$$

A fenti kifejezés megfelel azon elvárásunknak, hogy a szuszeptibilitások abszorpciós részét tartalmazza. Az általam tanulmányozott fehérjeminták esetén további egyszerűsítés tehető, hiszen tudjuk, hogy az oldatban a molekulák irány szerinti eloszlása izotróp és ekkor, az elektromos tér deriváltjához csatolódó $\chi'_{p_\alpha \Theta_{\delta y}}$ elektromos dipól-elektromos kvadrupól mátrixelemek szorzatát tartalmazó tagok kiátlagolódnak, így az oldat ellipticitása:

$$\Theta \approx -\frac{1}{3} \omega \mu_0 / N \Im \{ \chi''_{p_\alpha m_\alpha} \} \quad (3.23)$$

Ha az ellipticitás (3.23) alakját megvizsgáljuk, látható, hogy $\langle 0 | p_\alpha | n \rangle \langle n | m_\alpha | 0 \rangle$ típusú mátrixelemekkel arányos. Mivel az elektromos polarizáció polárvektor, a mágneses dipólmomentum pedig axiálvektor, melyek inverzióval és tükrözéssel szemben eltérő módon transzformálódnak, belátható, hogy a két mátrixelem szorzata a molekula olyan szimmetria csoportjai esetén lehet nullától különböző, melyek tisztán forgatásokat tartalmaznak csak, azaz éppen a királis pontcsoportok (C_n, D_n, O, T és I) esetén tapasztalhatunk CD effektust.

Tekintsük például azt az esetet, amikor a molekula rendelkezik inverziós szimmetriával. Ekkor a hullámfüggvények paritás szerint osztályozhatóak és könnyen látható, hogy $\langle 0 | p_\alpha | n \rangle \langle n | m_\alpha | 0 \rangle$ mindig zérus lesz, hiszen p különböző paritású kezdő és végállapot között adhat nem nulla várható értéket, míg m azonos paritású kezdő és végállapot esetén lehet csak véges.

4. fejezet

A CD spektroszkópia mérés technikája

4.1. A polarizáció-modulációs mérés technika alapjai

Az előző fejezetben láthattuk, hogy szoros kapcsolat van a fehérjék másodlagos szerkezeti elemei és cirkuláris dikroizmus spektruma között. A következő fejezetben azt szeretném bemutatni, hogy milyen technikával lehetséges nagyon kis polarizációs változások detektálása, akár hagyományos optikai laboratóriumban a közeli- és közép-infravörös tartományon, akár szinkrotron forrás mellett a közeli-UV hullámhossztartományon. Méréseimet az utóbbi energiákon a Hirosimai Egyetem szinkrotron forrása mellett végeztem [20]. Emellett belefogtam egy Varian FS670 Fourier-transzformációs infravörös spektrométer átalakításába úgy, hogy a műszer alkalmas legyen fehérjeminták vibrációs CD (VCD) spektrumának felvételére.

Fehérjék - és egyéb biológiai eredetű minták esetén - a cirkuláris dikroizmusnak és kettőstörésnek köszönhető polarizáció-változás olyan kicsi ($10^{-4} - 10^{-3}$ fok), hogy nagyon kifinomult mérési módszert követel meg a detektálása. Ennek egy lehetséges megvalósítása az alábbiakban ismertetett polarizáció-modulációs mérés technika, mely megfelelő optikai anyagok kiválasztásával a teljes általam vizsgált spektrumon (távoli UV és infravörös) alkalmazható.

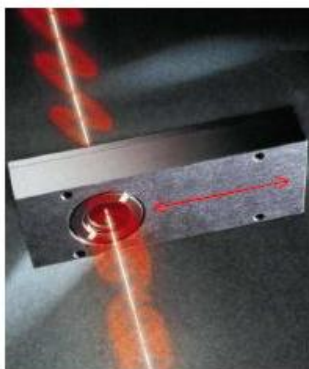
Fehérjék esetén célunk a minta cirkuláris dikroizmusának mérése, vagyis annak a meghatározása, hogy egy minta egy lineárisan polarizált fénynyalábból mennyire eltérő mértékben nyeli el az egyes cirkuláris komponenseket a foton energia függvényében. Ennek legegyszerűbb módja az lenne, ha a minta után a kezdeti polarizációra merőleges polarizációjú analizátort helyeznénk el. Ekkor, ha az elnyelés azonos mértékű a két cirkuláris komponensre, a fény polarizációs állapota ideális esetben nem változna és a detektorba már nem jutna fény. Ha a mintánk megváltoztatja a rajta áthaladó fény polarizációs állapotát, akkor a rajta átmenő elliptikusan polarizált fénynek már lesz az analizátor optikai tengelyével párhuzamos komponense, így a detektor valamilyen véges intenzitást mér. Az analizátor forgatásával meghatározhatnánk a polarizációs ellipszist, így a cirkuláris dikroizmus és

kettőstörés mértékét is. Ezzel a módszerrel azonban nem tudunk különbséget tenni például a cirkuláris és lineáris polarizációs effektusok (kettőstörés és dikroizmus) között, illetve a mérésnek nem lenne kellő érzékenysége.

A megoldást egy olyan modulációs technika alkalmazása jelenti, mellyel a bemenő fény polarizációját nagy frekvenciával ($f=50$ kHz) moduláljuk és megnézzük, hogy ez a frekvencia hogyan jelenik meg cirkulárisan kettőstörő minta esetén a detektor jelében és ebből hogyan tudunk visszakövetkeztetni a minta cirkuláris dikroizmusára [21].

A polarizáció-moduláció általánosan használt eszköze egy fotoelasztikus modulátor (PEM) volt. Ez az eszköz egy izotróp kristály, melyet egy hozzá csatolt piezoelektromos mozgatóval egy kitüntetett irány mentén periodikus rezgésre kényszerítünk a mechanikai sajátfrekvenciáján. Ennek következtében lineárisan kettőstörő lesz, vagyis eltérő lesz a fázistolása a fény két lineárisan polarizált komponensére (az optikai tengelyek a lineáris deformáció irányába és az arra merőleges irányba esnek). Ezzel a módszerrel el tudjuk érni, hogy periodikusan kapcsolgassuk a PEM-ből kilépő fény polarizációs állapotát.

Ha a PEM-re érkező fény polarizációs síkja a deformált kristály optikai tengelyével 45° -os szöget zár be és a fázistolás a két lineáris komponens közt (melyek amplitúdója ilyenkor azonos) pontosan $\pi/2$, akkor éppen a számunkra érdekes két cirkulárisan polarizált komponens váltakozik a modulátor rezgési frekvenciájával (lásd. 4.1.1 ábra).



A PEM

piros nyíl: a kristály rezgési tengelye

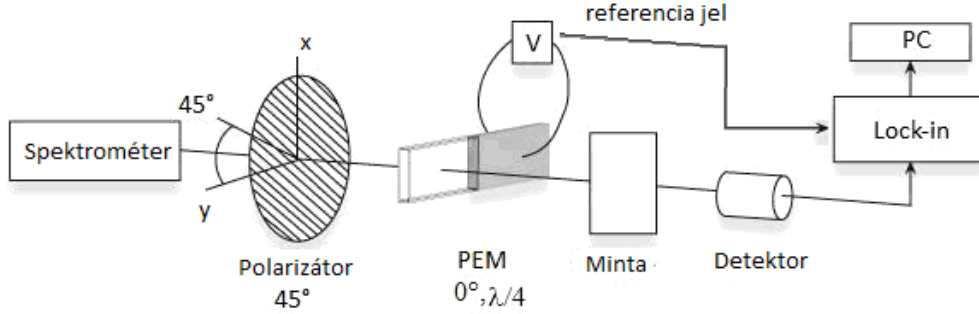


A lineárisan polarizált komponensek fázisviszonyai egy rezgési periódus alatt

4.1.1 Ábra: A fotoelasztikus modulátor és az optikai tengelyekkel párhuzamos lineárisan polarizált komponensek fázisviszonyai egy rezgési periódus alatt (középső ábra), illetve a fény polarizációs állapotának időbeli változása (jobb oldali ábra)

A minta abszorpciós tényezője a két cirkuláris komponensre különböző, így azt várjuk, hogy a detektált intenzitásban a moduláció f frekvenciájának megfelelő komponens

arányos lesz a mérni kívánt cirkuláris dikroizmussal. Ezen állításunkat könnyen igazolhatjuk, ha végigkövetjük a fény polarizációját az alábbi, az UV mérések során használt fényúton (4.1.2 ábra).



4.1.2 Ábra: Polarizáció modulációs elven működő cirkuláris kettőstörés mérésére alkalmas mérési elrendezés vázlata

Az ábrán látható polarizátor után az elektromos térerősség vektora a modulátor deformációs tengelyével (y-tengely a 4.1.2 ábrán) 45°-os szöget zár be.

A PEM által létrehozott polarizáció-változás mátrixos alakja a fény terjedési irányára merőleges polarizációk bázisában:

$$\begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & e^{i\varphi(t)} \end{pmatrix}. \quad (4.1)$$

A minta által okozott polarizáció változást leíró mátrix cirkuláris bázisban felírva, majd áttanszformálva lineáris bázisba:

$$S = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ i & -i \end{pmatrix} \begin{pmatrix} t_+ e^{i\varphi_+} & 0 \\ 0 & t_- e^{i\varphi_-} \end{pmatrix} \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} 1 & -i \\ 1 & i \end{pmatrix}. \quad (4.2)$$

Így a detektorra eső térerősség vektor a következőképpen adható meg:

$$\mathbf{E} = E_0 \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ i & -i \end{pmatrix} \begin{pmatrix} t_+ e^{i\varphi_+} & 0 \\ 0 & t_- e^{i\varphi_-} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & -i \\ 1 & i \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & e^{i\varphi(t)} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix}. \quad (4.3)$$

A detektor által mért intenzitás a térerősség abszolútérték-négyzet időátlagának kiszámításával kapjuk meg, hiszen a detektor nem tudja követni a fény frekvenciáját, ami a másodrendben kis mennyiségeket elhanyagolva a következő:

$$I \propto \overline{\mathbf{E}^* \mathbf{E}} = 4T \left[1 + \frac{\Delta T}{2T} \sin(\varphi(t)) \right], \text{ ahol} \quad (4.4)$$

$$T = \frac{1}{2} (|t_+|^2 + |t_-|^2) \text{ és } \Delta T = (|t_+|^2 - |t_-|^2) \quad (4.5)$$

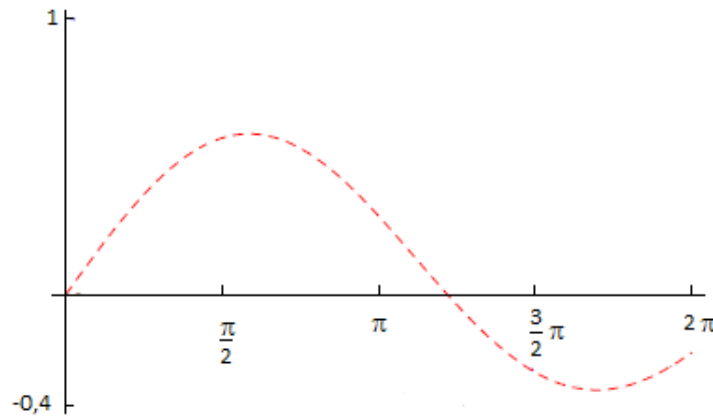
a teljes transzmisszió és a két cirkuláris transzmisszió különbsége.

Ha a kapott kifejezésbe beírjuk, hogy a PEM fázistolása az időnek $\varphi(t) = \varphi_0 \sin(2\pi ft)$ harmonikus függvénye, akkor a következő alakot kapjuk:

$$I = 4T \left[1 + 2 \frac{\Delta T}{T} \sin(\varphi_0 \sin(2\pi ft)) \right], \quad (4.6)$$

melyet a J_{2n+1} páratlan indexű Bessel-függvények szerint Fourier-sorba tudunk fejteni:

$$\sin(\varphi_0 \sin(2\pi ft)) = 2J_1(\varphi_0) \sin(2\pi ft) + \dots \quad (4.7)$$



4.1.3 Ábra: A J_1 Bessel-függvény a $[0; 2\pi]$ intervallumon

Ennek megfelelően az intenzitásban megjelenő $I(0) = I_0 T$ lesz az egyenáramú komponens, míg

az első harmonikus a amplitúdója $I(f) = I_0 T \left[\frac{\Delta T}{T} J_1(\varphi_0) \right]$.

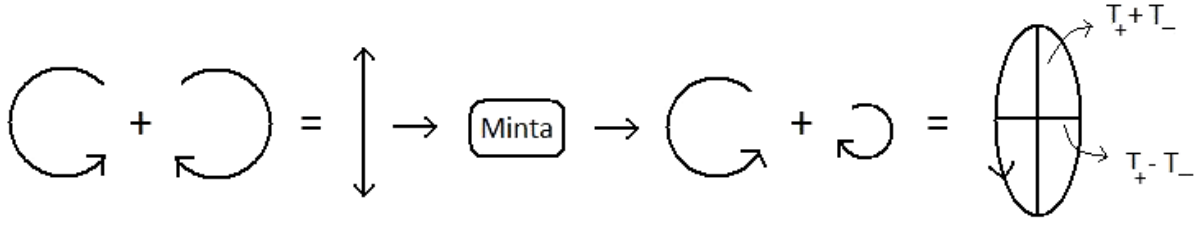
Ha a mérőrendszer érzékenysége az egyes komponensekre a c_0 és c_f faktorokkal jellemezhető, akkor a detektor jelének megfelelő tagjai a következők lesznek:

$$I_{dc} = I_0 T c_0 \quad \text{és} \quad I_f = I_0 T \left[\frac{\Delta T}{T} J_1(\varphi_0) \right] c_f. \quad (4.8)$$

A CD spektroszkópiában fontos paramétert, az ellipticitást a két komponens hányadosa alapján határozhatjuk meg:

$$\frac{I_f}{I_{dc}} = \frac{c_f}{c_0} J_1(\varphi_0) \frac{\Delta T}{T}. \quad (4.9)$$

A $\frac{\Delta T}{T}$ mennyiség a két cirkuláris komponens különböző arányú transzmissziójára vonatkozik. Ahhoz, hogy a mérni kívánt ellipticitással való kapcsolatát megértsük, tekintsük a következő, 4.1.4-es ábrát.



4.1.4 Ábra: A fény polarizációs állapota cirkuláris dikroizmust mutató minta előtt és után

A kezdetben lineárisan polarizált nyaláb felbontható két azonos amplitúdójú cirkulárisan polarizált komponensre. Áthaladva a cirkuláris dikroizmust mutató mintán, a minta eltérő elnyelése miatt az egyes cirkuláris komponensek amplitúdója eltérő lesz, melyek összege elliptikusan polarizált kilépő nyalábot eredményez. Ezen polarizációs ellipszis kis- és nagytekvéyeinek arányát nevezzük ellipticitásnak. (Amennyiben a két cirkuláris komponens fázisa is eltérő mértékben változik, úgy az ellipszis nagytekvéye elfordul.)

Ha a komplex transzmisszió amplitúdóját a két cirkuláris polarizációra t_+ -al és t_- -al jelöljük, akkor a polarizációs ellipszis tekvéyeinek aránya, azaz az ellipticitás:

$$\Theta = \frac{t_+ - t_-}{t_+ + t_-} = \frac{t_+^2 - t_-^2}{t_+^2 + t_-^2 + 2t_+t_-} \approx_{t_+ \approx t_-} \frac{T_+ - T_-}{4T}. \quad (4.10)$$

A fényintenzitás (4.8)-ban definiált komponenseinek hányadosa valóban egyenesen arányos lesz az ellipticitással, azaz a CD effektussal.

A $\frac{c_f}{c_0} J_1(\varphi_0)$ szorzótényező meghatározása a tényleges mérés előtt elvégezendő

kalibráció feladata. A kalibrációt a teljes spektrumon célszerű elvégezni, hiszen a c_f és c_0 faktorok, melyek a műszerek érzékenységére jellemzőek, változhatnak a hullámhossz függvényében. Ennek egy lehetséges módja, hogy a fényútba a PEM után egy $\lambda/4$ -es fázistoló lemezt és egy analízátort helyezünk. Ekkor az analízátornak köszönhetően a mérési elrendezés nem csak a két cirkuláris komponens eltérő abszorpciójára lesz érzékeny, hanem a rendszeren való áthaladás során a köztük fellépő teljes fázistolásra is (a polarizációs ellipszis nagytekvéjének elfordulása). Ha először csak az analízátor szerepét vizsgáljuk, akkor a (4.3)-as egyenletben egy újabb tényező jelenik meg, ami a függőlegeshez képest Φ szögben elforgatott analízátor transzmissziós mátrixának felel meg. Így a teljes átmenő intenzitásra a következő kifejezést kapjuk:

$$I \propto \overline{\mathbf{E}^* \mathbf{E}} = 4T \left[1 + \frac{\Delta T}{2T} \sin(\varphi(t)) + \sin(2 \cdot \Delta\Theta + 2 \cdot \Phi) \cos(\varphi(t)) \right], \quad (4.11)$$

ahol $\Delta\Theta=(\Theta_+-\Theta_-)$ a rendszer fázistolása a két cirkuláris komponens között, Φ pedig az analizátor általunk választott szöge. Ilyenkor a PEM időfüggő fázistolása $(\varphi(t))$ egy koszinusz függvény argumentumában is megjelenik, így a Fourier-sorfejtésben első rendben egy kétszeres frekvenciájú komponenst is kapunk. A teljes átmenő intenzitás ekkor

$$I=I_{dc}+I_f \sin(2\pi f \cdot t)+I_{2f} \sin(4\pi f \cdot t)+... \quad (4.12)$$

alakú, ahol továbbra is igaz, hogy:

$$\frac{I_f}{I_{dc}}=\frac{c_f}{c_0}J_1(\varphi_0)\frac{\Delta T}{T} \quad \text{és} \quad \frac{I_{2f}}{I_{dc}}=\frac{c_{2f}}{c_0}J_2(\varphi_0)\cdot(\Delta\Theta+\Phi) \quad (4.13 \text{ és } 4.14)$$

A második összefüggés alakjából már látható a fázistolásra vonatkozó kalibráció alapelve, 4.14-ben ugyanis az analizátor Φ szöge azonos szereppel bír, mint a vizsgált minta $\Delta\Theta$ fázistolása. Ha tehát egy lock-in erősítővel megmérjük a detektor jelének azon komponensét, mely a PEM frekvenciájának kétszeresével oszcillál az analizátor kicsi $\pm\Phi_0$ állásánál, az alábbi képlet alapján kiszámítható a $\frac{c_{2f}}{c_0}J_2(\varphi_0)$ kalibrációs konstans:

$$\frac{c_{2f}}{c_0}J_2(\varphi_0)=\frac{1}{2\Phi_0}\left[\left(\frac{I_{2f}}{I_{dc}}\right)_{+\Phi_0}-\left(\frac{I_{2f}}{I_{dc}}\right)_{-\Phi_0}\right] \quad (4.15)$$

Nekünk ugyanakkor az ellipticitás kalibrációjára, vagyis a $\frac{c_f}{c_0}J_1(\varphi_0)$ faktorra van szükségünk. A következő lépésnél emlékezzünk vissza, hogy a kalibráció során nem csak az eddig figyelembe vett analizátorral kell kiegészíteni az elrendezést, hanem a PEM után egy $\lambda/4$ -es fázistoló lemezt is a fényútba kell helyezni úgy, hogy a lemez optikai tengelyei a 4.1.2.-es ábrán jelzett x és y tengelyekkel essenek egybe. Ekkor a lemez a bejövő fény x és y síkban polarizált komponensei közt $\pi/2$ fázistolást hoz létre, aminek következtében a 4.11 kifejezésben szereplő $\sin(\varphi(t))$ és $\cos(\varphi(t))$ szerepet cserél, és így az analizátor $\pm\Phi_0$ forgatásával az előzővel azonos módon, már a $\frac{c_f}{c_0}J_1(\varphi_0)$ konstans kalibrálható.

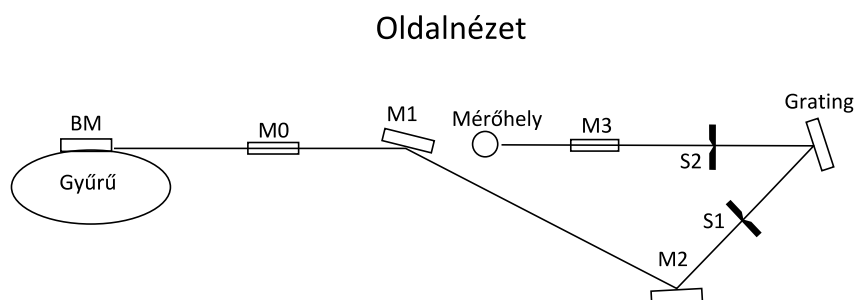
A valóságban persze nem tudunk minden hullámhosszhoz ideális $\lambda/4$ -es fázistoló lemezt választani, de erre nincs is szükség. Elég ugyanis egy olyan nem abszorbeáló lemezt használni, mely fázistolása a hullámhosszak sokszorososa az adott spektrális tartományban és a fény frekvenciájának függvényében a lemez fázistolása $\pi/2$ és $-\pi/2$ között oszcillál. Ekkor egy adott analizátorállásnál a foton frekvencia függvényében az intenzitás is oszcillál [22]. Ha

ezen görbe minimum- és maximumhelyeit megkeressük, a szélsőértékek abszolútértékének burkolója adja a keresett kalibrációs konstans frekvenciafüggését [22].

4.2. CD spektroszkópia a távoli-UV hullámhossztartományon

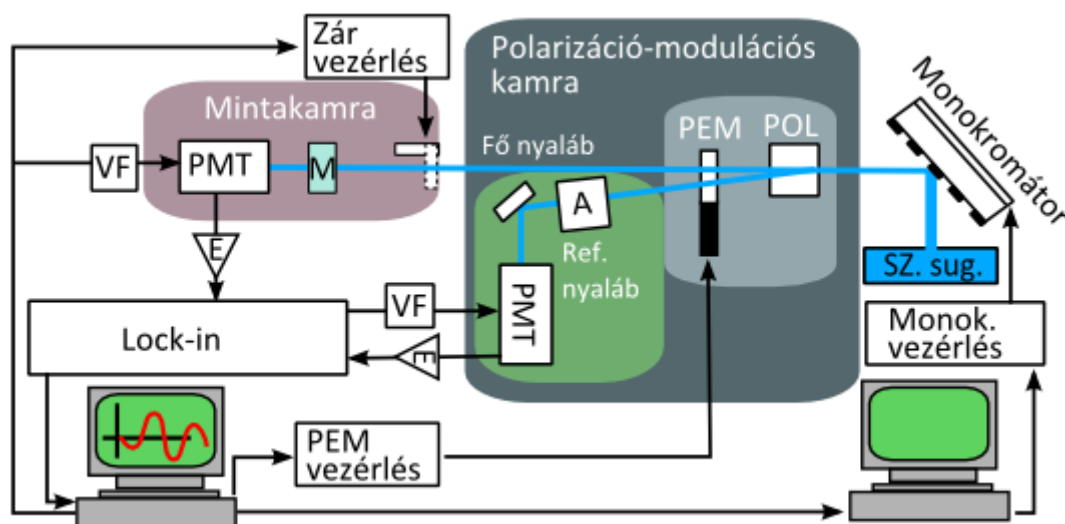
Ahogy az előzőekben említettem az UDE és fragmenseinek elektronikus CD spektrumát a Hirosimai Egyetem szinkrotronforrásánál vettem fel, ugyanis a ma kereskedelemben kapható spektrométerekkel ~200 nm-ig végezhető CD mérések, ezen hullámhossz alatt viszont már erősen csökken a fényforrások fényessége és a víz abszorpciója rohamosan nő. Ahogy az a későbbiekben látni fogjuk ugyanakkor, a 160-200 nm közti hullámhossztartományról származó spektrális információ nagy mértékben javítja a kiértékelés során a másodlagos szerkezetre kapott eredmények pontosságát, így érdemes a méréseket kiterjeszteni erre a régióra. Ennek megfelelően az 1980-as évektől kezdve több szinkrotronforrásnál is létrehoztak olyan mérőhelyet (beamline), mely biológiai minták CD spektrumának felvételére alkalmas a távoli-UV tartományban [20]. A Hirosimai Egyetem szinkrotronforrása (HiSOR) mellett kialakított CD spektrométer különlegessége, hogy a korábban nitrogén atmoszférában végzett mérések helyett itt a polarizáció-modulációs optikai elemek és a mintatartó is egy-egy vákuumkamrában kaptak helyet, aminek következtében a vízgőz, oxigén és nitrogén fényelnyelésének kiküszöbölésével a CD spektrumok felvétele ideális esetben egészen 140 nm-ig lehetséges.

A 4.2.1-es ábrán a szinkrotron 15-ös mérőhelyének sematikus ábrája látható. A gyűrűből a dipólsugárzás tangenciális irányú, kevésbé széttartó fénynyalábként lép ki, mely átlagos fluxusa 10^{10} foton/s. Ez az érték ugyanakkor egy mérés időskáláján belül is ingadozik, néhány órán belül pedig felére esik a fényintenzitás. Emiatt naponta kétszer újra kell elekttronokat löni a szinkrotrongoyűrűbe.



4.2.1 Ábra: A HiSOR 15-ös mérőhelyének sematikus rajza, M0,M1,M2,M3: tükör, S1,S2: rés

A fénynyaláb mintához vezető útját a 4.2.1-es ábrának megfelelően négy tükörrel ($M0$, $M1$, $M2$, $M3$) alakítják ki. Az elektronok által, az eltérítő mágneseken (BM) való áthaladás után kibocsájtott fénynyalábot az $M0$ hengertükörrel eltérítik, majd az $M1$ parabola- és $M2$ gömbtükör segítségével egy McPherson-típusú monokromátor (*Grating*) $S1$ belépő részére fókuszálják. A monokromátor két diffrakciós rács alkalmazásával a 31-310 nm hullámhossztartományban képes biztosítani a 0,02 nm-es felbontást. Az $S2$ résen kilépő, monokromatikus nyalábot az $M3$ toroidális tükör 2000 mm távolságban egy közelítőleg 3 mm átmérőjű foltta fókuszálja, mely kijelöli a minta helyét. A mintatartót tartalmazó vákuumkamra előtt, az alábbi, 4.2.2-es ábrának megfelelően egy külön vákuumkamrában helyezték el a polarizáció-modulációhoz szükséges optikai elemeket, illetve a monokromátort, így a minták cseréjekor nem kell az egész rendszert fellevegőzni majd újra kiszivattyúzni. Emellett természetesen a fénynyaláb is egy folytonos vákuumcsőben halad.



4.2.2 Ábra: A távoli-UV cirkuláris dikroizmus spektrométer blokkvázlata

A: analízátor, E: erősítő, M: minta, POL: polarizátor, PMT: fotoelektron-sokszorozó, Sz. sug.: szinkrotronsugárzás, VF: vezérlőfeszültség

Az ábrán látható mérőrendszer valamelyest bonyolultabb az előző szakaszban bemutatott optikai elrendezésnél (4.1.2-es ábra), de a polarizációváltozást itt is a korábban ismertetett polarizáció-modulációs elven detektáltuk.

A monokromátorból kilépő fény a polarizáció-modulációs kamrában először egy Karl Lambrecht Rochon-prizmán halad át, mely egy olyan kettőstörő optikai elem, ami a bejövő fényt két merőleges polarizációjú, egymástól néhány fokos szögben eltávolodó nyalábra osztja: fő nyalábnak nevezzük azt, amelyik az eredeti egyenesen halad tovább, míg a második

nyaláb néhány fokban eltérül. A prizmához nagyon közel elhelyezett PEM-en mindkét lineárisan polarizált nyaláb áthalad, így mindkettő polarizációs állapota ugyan úgy modulálódik. A fő nyaláb ezután a mintát tartalmazó vákuumkamrán halad keresztül, ahol a minta cirkuláris dikroizmusának következtében elliptikusan polarizálttá válik. A mintán áthaladt nyaláb intenzitását végül egy fotoelektron-sokszorozóval detektálják (photomultiplier - PMT). A vezérlőfeszültség optimalizálására használják a második, referencianyalábot, mely intenzitását egy, az előzővel azonos PMT-vel mérik. Ezen detektor vezérlőfeszültségét úgy változtatják, hogy a szinkrotronsugárzás intenzitásának ingadozása ellenére a kimenő fotoáram közelítőleg állandó legyen, majd ugyanezt a vezérlőfeszültséget kapcsolják a CD jelet mérő detektor vezérlőbemenetére is. Az eltérített nyaláb másik fontos feladata, hogy PEM modulációs amplitúdójának hullámhosszfüggését kiküszöböljék.

A mérés során a lock-in erősítőt, a detektorok vezérlőfeszültségét, a PEM vezérlőegységét és a monokromátort egy mérőkártyákkal kiegészített személyi számítógép hangolja össze, így maga a mérés teljesen automatizált. A mért és normált feszültségelet szintén a mérőprogram számolja át milifokban mért ellipticitássá egy korábbi, jól ismert CD spektrumú mintaszterddel elvégzett kalibráció alapján. A kalibráció tehát ennél az elrendezésnél nem a korábban ismertetett fázistoló lemezes módszerrel történt.

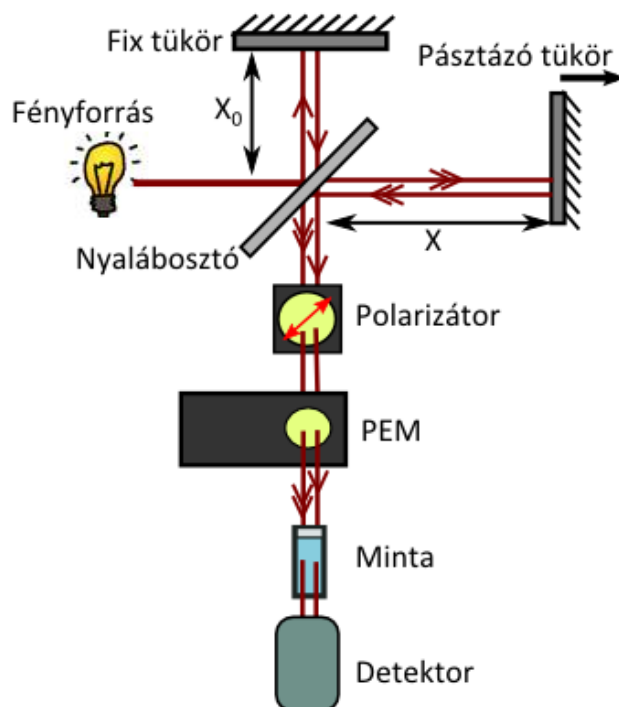
A mintatartó egy henger alakú rozsdamentes acél befogóból és két, 20 mm átmérőjű, 1 mm vastag MgF_2 ablakból áll. Folyadékminták esetén az optikai úthossz a két ablak közé helyezett, ismert vastagságú teflongyűrűvel szabályozható: a befogóra helyezett alsó mintaablakra rácsúsztatjuk a teflongyűrűt, majd az ablak közepére annyi mintát csöppentünk, hogy a másik ablakot rácsúsztatva buborékmentes folyadékfilm keletkezzen a két ablak között a gyűrűben. Ezzel a módszerrel 1,3 μm (teflongyűrű nélkül, a befogó csavarját jól meghatározott pozícióig behúzva) minimális és 50 μm maximális úthosszt érhetünk el.

Az általam vizsgált fehérjeminták spektrumát is néhány tíz mg/ml-es koncentrációjú vizes oldatukban vettük fel. A víz abszorpciója miatt viszonylag rövid, néhány 10 μm -es úthosszakat alkalmaztunk, a kiértékeléshez használt spektrumokat pedig mintától függően 8-10 felvett spektrum átlagolásával kaptuk meg a fehérjemintát nem tartalmazó tiszta oldószer CD alapvonalának kivonása után.

4.3. VCD spektroszkópia Fourier-transzformációs mérés technikával

A fent vázolt polarizáció modulációs mérés technika megfelelő optikai anyagból készült polarizátor és PEM alkalmazásával elviekben megszorítások nélkül kiterjeszthető az infravörös hullámhossztartományra. Mérés technikai nehézséget jelent azonban, hogy nincs olyan szélessávú fényforrás, amely intenzitása nagyságrendekkel meghaladja a környezetből származó termikus zaj mértékét. Ez komoly hátrányt jelent diszperziós elven működő spektrométereknél, melyek működési elvükből fakadóan a forrásból származó teljes fényintenzitásnak csak egy töredékét engedik tovább a minta felé. Az alábbiakban bemutatott Fourier-transzformációs spektroszkópia előnye ezzel szemben, hogy a forrás teljes fényintenzitásával világítunk át a mintán és a spektrométer a teljes spektrumot „egyszerre” méri majd inverz Fourier-transzformációval alakítja át a hullámhossz függvényében mért teljesítményspektrummá.

A Fourier-transzformációs spektrométerek legfontosabb optikai eleme egy interferométer (4.3.1. ábra).



4.3.1 Ábra: Fourier-transzformációs infravörös cirkuláris dikroizmus spektrométer blokkvázlata. Az egy nyílas nyaláb a fix tükörről verődik vissza, a két nyílas pedig a pásztázó tükörről.

Az interferométerben a kilépő nyalábot egy nyalábosztó két részre osztja, az egyik egy mozgó, ún. pásztázó tükörrre esik, a másik pedig egy álló tükörrre esik merőlegesen. A

nyalábok a tükrokről visszaverődve újra egyesülnek a nyalábosztó mögött. Ideális nyalábosztó esetén a nyalábokkal a megtett úthosszak különbségétől eltekintve ugyan az történik: egyszer keresztülmennek és visszaverődnek a nyalábosztón, valamint visszaverődnek a tükorről. Ennek megfelelően a két nyaláb által létrehozott interferenciaképben csak a megtett úthosszak különbsége számít, mely a pásztázó tükör mozgása miatt időben változik. Ez az „interferenciakép” halad át a mintán és leképeződik a detektorra (A polarizátor és a PEM szerepétől egyelőre tekintsünk el és foglalkozzunk egyszerű abszorpciós spektroszkópiával.) Az intenzitást tehát a megtett úthosszak különbsége, vagyis a pásztázó tükör pozíciójának függvényében rögzítjük, az így kapott görbét pedig interferogramnak nevezzük.

Vizsgáljuk meg, hogy minta nélkül mit érzékel a detektor: legyen $\mathbf{E}(t)$ a rögzített tükorről érkező nyaláb térerősségének időfüggése, $\mathbf{E}(t+\tau)$ pedig a pásztázó tükorről érkező nyaláb térerőssége, ahol $\tau = 2 \cdot (x - x_0)/c$, hiszen ha x_0 az álló, x pedig a mozgó tükör pozíciója, akkor a mozgó éppen τ időközben van. A detektor ezen két nyaláb interferenciájának időátlagát méri, hiszen a fény oszcillációjának időskáláján nem tudja követni a bejövő jel fény frekvenciája szerinti ingadozását:

$$I(\tau) = \left\langle \frac{1}{2} |\mathbf{E}(t) + \mathbf{E}(t+\tau)|^2 \right\rangle_t = \frac{1}{2} \left\langle |\mathbf{E}(t)|^2 \right\rangle_t + \frac{1}{2} \left\langle |\mathbf{E}(t+\tau)|^2 \right\rangle_t + \left\langle \Re[\mathbf{E}(t) \cdot \mathbf{E}^*(t+\tau)] \right\rangle_t, \quad (4.16)$$

itt $\langle \rangle_t$ jelenti a T ideig tartó mérés alatti időátlagolást. Kifejtve az átlagolást:

$$I(\tau) = \langle I_0 \rangle_t + \Re \left[\lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \mathbf{E}_{\omega'} e^{i\omega' t} \mathbf{E}_{\omega''}^* e^{-i\omega''(t+\tau)} d\omega' d\omega'' dt \right] \quad (4.17)$$

Az így kapott interferogramot Fourier-transzformálva kapjuk meg a keresett, frekvencia szerinti spektrumot:

$$\begin{aligned} I(\omega) &= \langle I_0 \rangle_t \int_{-\infty}^{\infty} e^{-i\omega\tau} d\tau + \Re \left[\lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \mathbf{E}_{\omega'} e^{i(\omega' - \omega'')t} \mathbf{E}_{\omega''}^* e^{-i(\omega + \omega'')(t+\tau)} d\omega' d\omega'' d\tau dt \right] \\ &= \langle I_0 \rangle_t \delta(\omega) + \Re \left[\int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \mathbf{E}_{\omega'} \mathbf{E}_{\omega''}^* \delta(\omega' - \omega'') \delta(\omega + \omega'') d\omega' d\omega'' \right] \\ &= \langle I_0 \rangle_t \delta(\omega) + \Re \left[\mathbf{E}_{-\omega} \mathbf{E}_{-\omega}^* \right] = \langle I_0 \rangle_t \delta(\omega) + \mathbf{E}_{\omega} \mathbf{E}_{\omega}^* \end{aligned} \quad (4.18)$$

Látható tehát, hogy az $I(\omega)$ teljesítményspektrum a térerősség autokorrelációs függvényének Fourier-transzformáltja. Az interferogramból a τ független alapvonalat levonva a $\langle I_0 \rangle_t \delta(\omega)$ járuléktól megszabadulhatunk.

Ha a fényútban egy általános, t_{ω} transzmissziós tényezővel jellemezhető minta is van és mi épp ezen együttható spektrumát akarjuk meghatározni, a kifejezések így módosulnak:

$$\mathbf{E}_{\text{minta}}(t) = \int t_{\omega} \mathbf{E}_{\text{beeső}, \omega} e^{i\omega t} d\omega \quad \text{és} \quad \mathbf{E}_{\text{minta}}^*(t + \tau) = \int t_{\omega}^* \mathbf{E}_{\text{beeső}, \omega}^* e^{-i\omega(t + \tau)} d\omega \quad (4.19) \text{ és } (4.20)$$

ami alapján a fenti lépéseket felírva az átmenő intenzitás:

$$I_{\text{minta}}(\omega) = (t_{\omega} \mathbf{E}_{\omega})(t_{\omega}^* \mathbf{E}_{\omega}^*), \quad (4.21)$$

amely polarizálatlan esetben:

$$I_{\text{minta}}(\omega) \approx T(\omega) \mathbf{E}_{\omega} \mathbf{E}_{\omega}^* \quad (4.22)$$

Itt $T(\omega)$ a teljes fényintenzitás ω frekvenciájú komponensének átengedett hányadát jelenti. Ahhoz, hogy a mérés során a mintára jellemző transzmissziós spektrumot kapjunk meg, a mért teljesítményspektrumot egy referencia anyaghoz kell viszonyítani, ugyanis a mért teljesítményspektrum erősen függ a lámpa fényességének spektrális eloszlásától, az egyes optikai elemek diszperziójától és a detektor érzékenységének hullámhosszfüggésétől. Oldat minták esetén az UV mérésekhez hasonlóan a tiszta oldószerrel végzett mérések spektrumát érdemes referenciának használni, hiszen így az oldószer esetleges elnyelése miatti jeltől is megszabadulunk. Ezek alapján a minta frekvenciafüggő transzmissziója, kihasználva a Fourier-transzformáció linearitását:

$$T(\omega) = \frac{I_{\text{minta}}(\omega)}{I_{\text{referencia}}(\omega)} \quad (4.23)$$

Ahhoz, hogy Fourier-transzformált interferogram egzaktul megadja a teljesítményspektrumot, a tükörnek végtelen hosszú utat kellene bejárni, ami persze kísérletileg kivitelezhetetlen. Nézzük meg a véges elmozdulás hatását egy monokromatikus komponensre. Ekkor $\mathbf{E}(t) = \mathbf{E}_0 \cos(\omega_0 t)$ alakú és a spektrum csak a $\pm\omega_0$ frekvenciás komponenseket tartalmazza:

$$I_{\text{elméleti}}(\omega) = \frac{|\mathbf{E}_{\omega_0}|^2}{2} [\delta(\omega_0 + \omega) + \delta(\omega_0 - \omega)] \quad (4.24)$$

Ha a tükör maximális elmozdulása T_{max} idő alatt következik be, akkor a valóságos spektrum egy kiszélesedett, negatív mellékcsúcsokat is tartalmazó jel lesz:

$$I_{\text{mért}}(\omega) = \frac{|\mathbf{E}_{\omega_0}|^2}{2} \left[\frac{\sin((\omega_0 + \omega)T_{\text{max}})}{\omega_0 + \omega} + \frac{\sin((\omega_0 - \omega)T_{\text{max}})}{\omega_0 - \omega} \right] \quad (4.25)$$

A negatív értékek megfelelő ablakfüggvénnyel (ezzel konvolváljuk az interferogramot és úgy Fourier-transzformálunk) kiküszöbölhetők (apodizáció), de a csúcskiszélesedés nem kezelhető. A véges úthosszból fakadó kiszélesedés limitálja a felbontást, mely fordítottan arányos T_{max} értékével.

További gyakorlati korlát, hogy a pásztázó tükör mozgatása során csak véges, $T_{\min}$ időközönként tudunk mintavételezni, ami a legnagyobb mérhető frekvencia értékét szabja meg. Mivel a tükör pozíciójának precíz meghatározása fontos elem a teljes mérés pontossága szempontjából, ezért ezt egy, a fehér fényű nyalábbal párhuzamosan haladó referencia lézer interferogramjának minimumhelyei alapján mérjük. A kísérletben kapott teljes interferogramot numerikus Fourier-transzformációval számíthatjuk át spektrummá az apodizációt és a zero-fillinget³ követően [23]. Ezeket a lépéseket a spektrométerhez mellékelt szoftver automatikusan elvégzi.

Nézzük meg, hogy mi változik a fentiekhez képest abban az esetben, ha a minta abszorpcióján túl annak CD jelét is detektálni szeretnénk. A 4.3.1 ábrának megfelelően ekkor a fényútban egy polarizátor és egy PEM is helyet kap. Diszperzív spektrométerrel végzett méréseknél a PEM retardációját az éppen mérendő hullámhosszhoz tudtuk igazítani, a Fourier-transzformációs spektrométernél azonban nem egy jól definiált hullámhosszúságú fény halad át a PEM-en egy adott mérési pont felvételekor, így a retardációt nem tudjuk folyamatosan optimalizálni. Ezen nehézség ellenére a polarizáció-modulációs technika alkalmazható marad, hiszen ez formálisan csak a $\frac{c_f}{c_0} J_1(\varphi_0)$ kalibrációs konstans hullámhosszfüggésében jelenik meg, amit a 4.1. fejezetben leírt kalibrációval ki tudunk küszöbölni.

Kihasználva a Fourier-transzformáció linearitását, a modulált jel felharmonikusainak mérésével az ellipticitás a már ismert módon határozható meg:

$$\Theta(\omega) \sim \frac{I_f(\omega)}{I_{dc}(\omega)} \sim \frac{\int I_f(\tau) e^{-i\omega\tau} d\tau}{\int I_{dc}(\tau) e^{-i\omega\tau} d\tau}, \quad (4.26)$$

ahol $I_f(\tau)$ az intenzitás első harmonikusához tartozó interferogram, míg $I_{dc}(\tau)$ a teljes detektált intenzitáshoz tartozó interferogram.

A polarizáció-modulációs és Fourier-transzformációs mérés technikák együttes alkalmazhatóságának feltételeit az egyes eszközöket jellemző időskálák vizsgálatával kaphatjuk meg. Keressük meg ezeket a feltételeket az általam fejlesztett konkrét elrendezés esetén. A PEM-ben található kristály sajátfrekvenciája $f = 50 \text{ kHz}$, ez az érték nem változtatható, így ez fogja meghatározni a többi elektronikai eszköz időállandóját. Ehhez a

³ Az interferogram x intervallumát n-szeresére növeljük, a hiányzó y értékekt pedig 0-nak definiáljuk. Ezáltal hatékonyabban simítjuk a spektrumot, mintha a transzformáció után tennénk. Természetesen a felbontást ezzel a módszerrel nem tudjuk javítani, de a spektrum alakja szebb lesz.

frekvenciához $T_{\text{mod}} = 20\mu\text{s}$ -os periódusidő tartozik, ennél mindenképpen gyorsabb detektort kell választani. Az általam beépíteni tervezett MCT detektor $T_{\text{det}} \approx 1\mu\text{s}$ -os periódusidővel rendelkezik, így még a kalibrációhoz szükséges $2f$ -es modulált komponenst is elég sokszor tudja mintavételezni.

A következő fontos időskála a spektrométer térbeli mintavételezési gyakorisága, mely a legnagyobb detektálható energia értékét szabja meg. Fehérjék és polipeptidek esetén, ha olyan tartományon szeretnénk meghatározni a spektrumot, mely a másodlagos szerkezetre vonatkozó információt tartalmaz, akkor a maximálisan detektálandó hullámszámot közelítőleg 4000cm^{-1} -nek érdemes választani, hiszen az amid csoport legnagyobb energiájú gerjesztésének, az amid A módusnak az (az N-H kötés vibrációs gerjesztése) energiája 3300cm^{-1} körül található. Ha a tükör mozgási sebessége v , akkor a következő összefüggést kapjuk a mintavételezési idő és a maximális energia kapcsolatára:

$$T_{\text{min}} = \frac{c \cdot h}{v \cdot E_{\text{max}}} \quad (4.27)$$

Ha a Varian 670-es spektrométer vezérlőprogramjában egy elég kicsi tükörsebességet választunk $\left(v = 0,15 \frac{\text{cm}}{\text{s}}\right)$, ami természetesen hosszú mérést jelent, akkor a $E_{\text{max}} = 4000\text{cm}^{-1}$ -es energiaválasztással $T_{\text{min}} = 1600\mu\text{s}$ -os lépési időközt kapunk.

A következő lépésben a lock-in időállandóját kell megválasztani, amit két tényező befolyásol: egyrészt a lock-in a jel $f = 50\text{kHz}$ frekvenciájú komponensének amplitúdóját akkor tudja jól meghatározni, ha lehetősége van több periódus összeátlagolására, másrészt fontos, hogy ezalatt a tükör ne sokat mozduljon el, vagyis ne változzon számottevően a detektált jel összintenzitása. Ennek megfelelően ha a lock-in időállandóját a $T_{\text{lock-in}} = 100 - 300\mu\text{s}$ -os értékek közül választjuk, akkor legalább 5-15 periódust ki tud átlagolni és a tükör elmozdulása sem lesz számottevő. Ha a nagyobb időállandót tekintjük, a mért jel kevésbé zajos, de az interferogramban a gyorsan oszcilláló komponensek jobban kiátlagolódnak, aminek az lesz a következménye, hogy a számított spektrumban magasabb energiák felé a mért jel amplitúdója csökken. Mindez addig nem jelent gondot, amíg a $T_{\text{lock-in}}$ jóval kisebb, mint T_{min} . Ha azonban más minták mérésekor szeretnénk növelni a maximálisan elérhető energiát, az egyre szűkülő $T_{\text{lock-in}} - T_{\text{mod}}$ időablakra figyelni kell.

Korábban már említettem, hogy a pásztázó tükör által megtett maximális úthossz szabja meg a felbontás felső korlátját. Ha például a biológiai minták esetén levárható $\delta E = 4\text{cm}^{-1}$ -es felbontást szeretnénk elérni, akkor a tükör mozgásának teljes ideje:

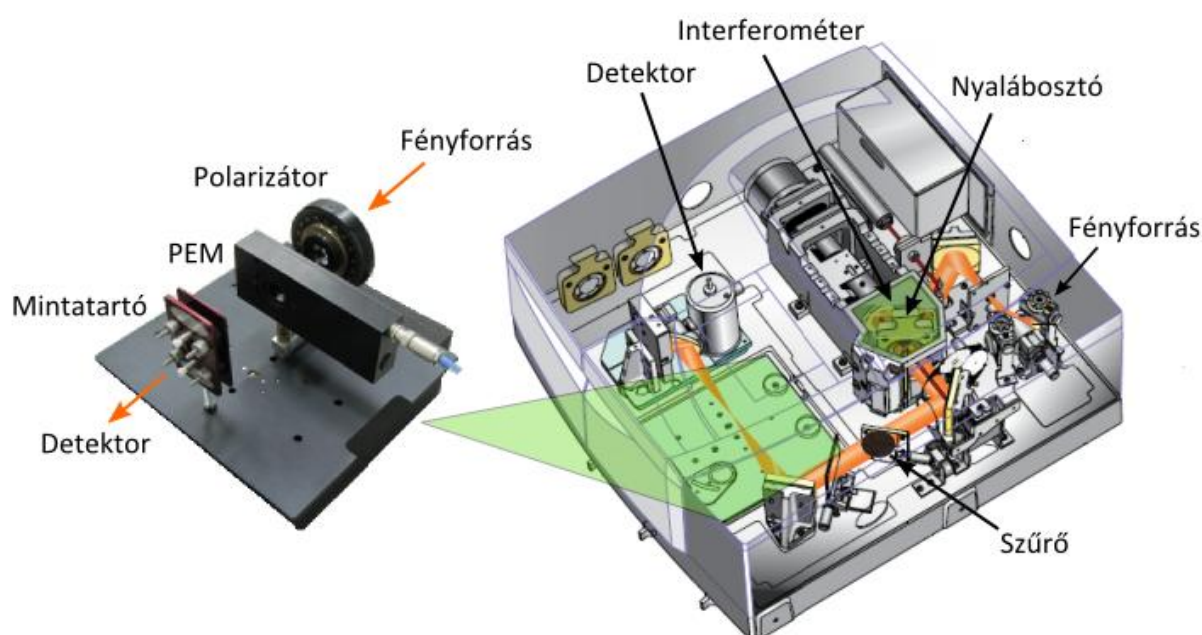
$$T_{\max} = \frac{c \cdot h}{v \cdot \delta E} \approx 840 \text{ms} \quad (4.28)$$

Ezalatt a tükör $x_{\max} = 1,26 \text{mm}$ utat tesz meg. Ilyen feltételek mellett 1 perc alatt ~ 35 interferogramot átlagolhatunk össze.

A mérést gyorsítani lehet, ha nagyobb tükörsebességet választunk, ekkor viszont a mintavételezés időköze $T_{\min} = 800 \mu\text{s}$ -ra csökken, vagyis a lock-in időállandóját szintén csökkenteni kell. Ezek alapján két lehetőség közül választhatunk ha adott időtartamot tudunk szánni a minta spektrumának felvételére: nagyobb tükörsebességgel, kisebb lock-in időállandóval több, de zajosabb CD spektrumot átlagolunk össze, vagy a modulált interferogramok felvételénél több periódust átlagolunk össze a lock-in erősítővel, viszont adott idő alatt kevesebb spektrumot tudunk felvenni. A paraméterek ideális értékeit mindig az adott minta spektrumának felvétele előtt, a mérési körülményeknek megfelelően érdemes megválasztani.

4.3.1. VCD spektrométer fejlesztése a közép-infravörös (MIR) tartományon

A távoli UV mérések elvégzése után a BME Fizika Tanszék optikai laboratóriumában belefogtam egy Varian FS670 típusú, Fourier-transzformációs elven működő infravörös spektrométer átalakításába úgy, hogy az a későbbiekben alkalmas legyen az UDE és egyéb biológiai eredetű minták CD spektrumának felvételére. A műszer érdekessége, – annyiban eltér a hagyományos Fourier-transzformációs spektrométerektől – hogy 2 kimenő A/D csatornája van. Ez teszi lehetővé a polarizáció-modulációs technikához szükséges két interferogram egyidejű rögzítését. A spektrométer és a benne elhelyezett polarizáció-modulációs elemek, illetve a mintatartó láthatók az alábbi (4.3.2) ábrán.



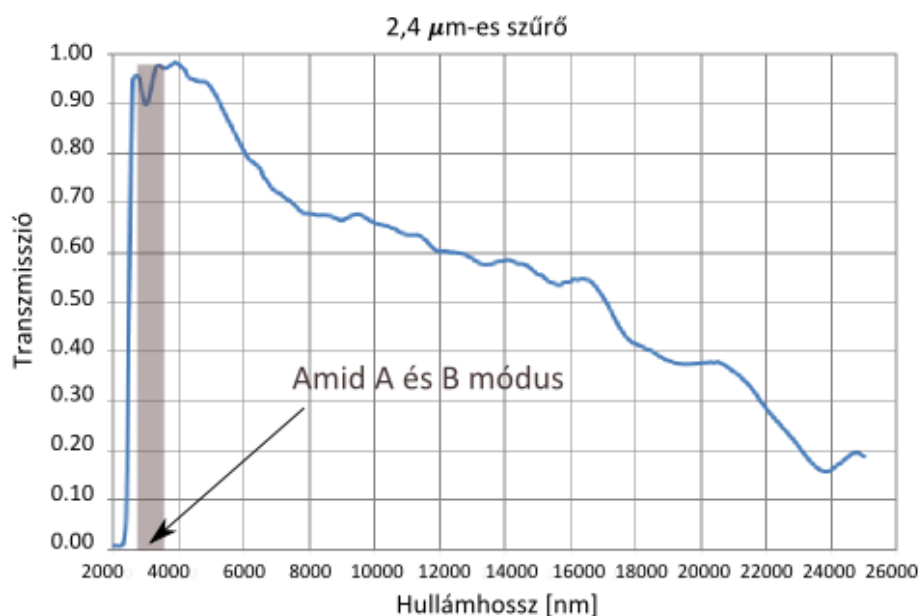
4.3.2 Ábra: Varian FS670 spektrométer és a benne kialakított polarizáció-modulációs elrendezés

A spektrométerben a fényforrás egy izzó szilícium-karbid rúd (Globar), amely kellő fényességet a $9600\text{--}50\text{ cm}^{-1}$ ($1040\text{ nm} - 200\text{ }\mu\text{m}$) energiatartományban biztosít. A készülékben egy Michelson-interferométer található KBr nyalábosztóval, amely transzmissziója a $7500\text{--}375\text{ cm}^{-1}$ ($1333 - 26667\text{ nm}$) tartományban ideális.

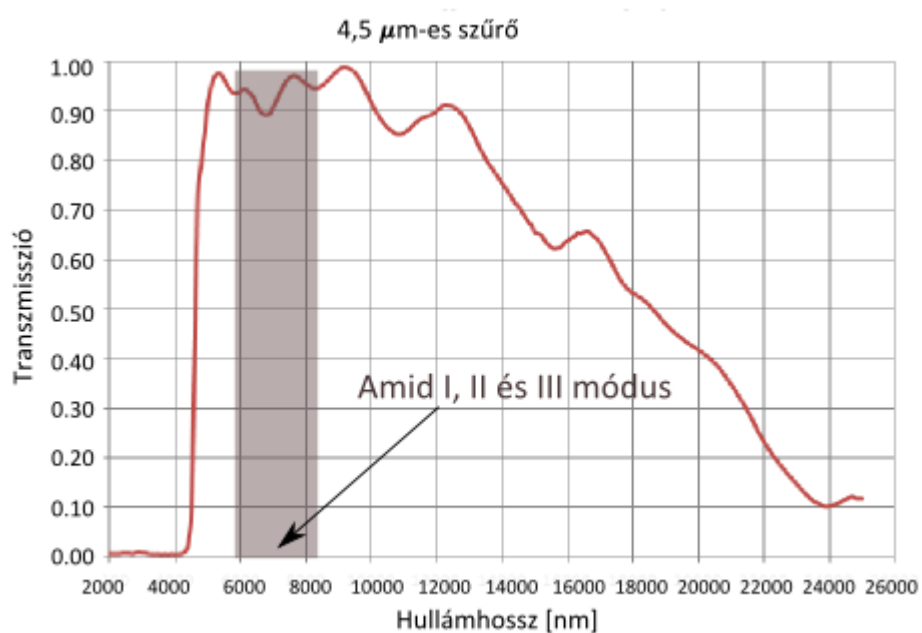
A CD spektroszkópiához ZnSe hordozóra párologtatott fémrácsos polarizátort (wire-grid), valamint egy ZnSe kristályból és egy PEM-100-as (Hinds Instruments) moduláló egységből álló fotoelasztikus modulátort illesztettem a spektrométer házában erre a célra szabadon hagyott mintatérbe. Az eszközökkel elérhető mérési tartományt a ZnSe transzmissziója határozza meg. Ennek megfelelően az $5000\text{--}555\text{ cm}^{-1}$ ($2000 - 18\text{ 000 nm}$) energiaablakban használhatók.

Az optikai útban soron következő elem a mintatartó, mely egy speciálisan folyadékminták mérésére kialakított eszköz. Felépítése hasonló a vákuum-UV méréseknél ismertetett mintatartóhoz: egy csavarokkal rögzíthető ház szorít össze két BaF₂ ablakot, melyek közt egy mylar gyűrű található, ami megszabja a minta vastagságát. Biológiai minták közép-infravörös CD spektroszkópiájának legnagyobb technikai nehézsége a víz egyre erősebb abszorpciója a kérdéses tartományon. Emiatt nagyon rövid úthosszak és nagy fehérjekoncentrációk szükségesek. A meglévő mintatartóval feltehetően akár már néhány μm -es úthossz is elérhető, így remélhetőleg nem lesz szükség arra, hogy nehézvíz környezetben mérjünk. Detektorként a már említett nitrogénhűtéses MCT detektort fogom alkalmazni, mely kellő érzékenységet az 7140-555 cm^{-1} energiatartományban biztosít.

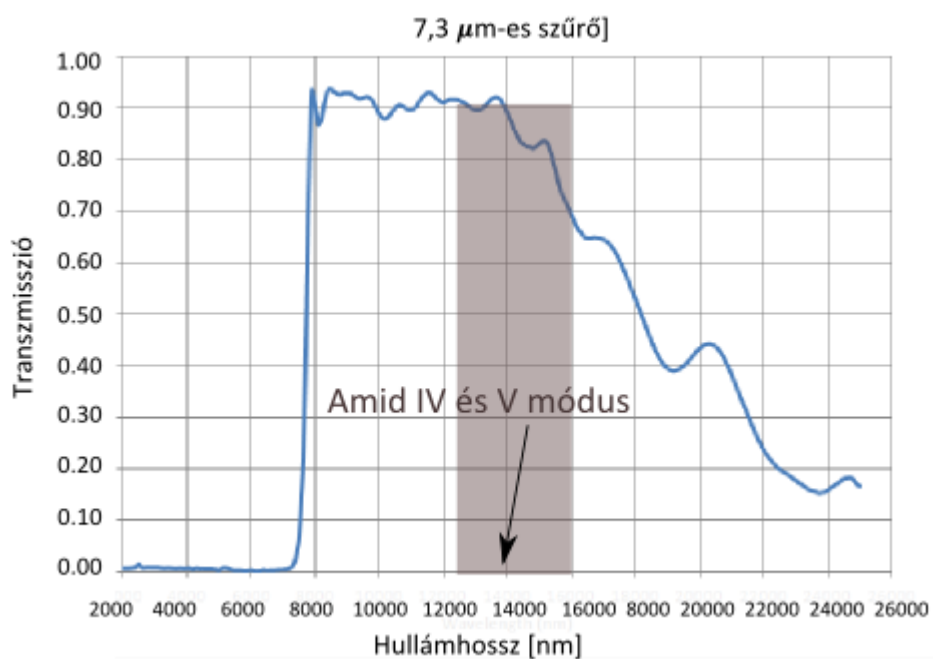
A spektrométer érzékenységének további növelése érdekében ki lehet használni, hogy a fehérjék és peptidek CD spektruma az elég jól definiált energiájú amid módusok környékén érdekes, vagyis nem kell a teljes elérhető energiatartományt kihasználni. Ezért megtehetjük, hogy olyan szűrőket alkalmazunk a fényútban a polarizátor előtt (4.3.2. ábra), melyek egy jól meghatározott energiaérték fölött szinte alig transzmittálnak. Mindez azért előnyös, mert a fényforrás intenzitását anélkül lehet növelni, hogy a detektort fölöslegesen telíténénk olyan energiatartományból származó fotonokkal, melyek nem hordoznak számunkra érdekes spektrális információt. Három ilyen szűrő transzmissziós spektruma látható a 4.3.3 - 4.3.5 ábrákon, jelölve azokat az amid módusokat, amiket az adott szűrő alkalmazásával tervezek mérni.



4.3.3 Ábra: A 2400 nm alatt nem transzmittáló intenzitásszűrő transzmissziós spektruma és a mérendő amid módusok



4.3.4 Ábra: A 4500 nm alatt nem transzmittáló intenzitásszűrő transzmissziós spektruma és a mérendő amid módusok



4.3.5 Ábra: A 7300 nm alatt nem transzmittáló intenzitásszűrő transzmissziós spektruma és a mérendő amid módusok

5. fejezet

A mérési eredmények kiértékelése és értelmezése

5.1. A fehérjeminták CD spektrumai és kiértékelésük

A következő fejezetben ismertetem eredményeimet az UDE fehérjeminta és fragmenseinek vákuum-UV CD spektroszkópiás vizsgálata terén.

A szakasz első részében arról írok, hogyan lehet egy mért CD spektrumból megállapítani, hogy a fehérje teljes aminosav számának hány százaléka van jelen az egyes másodlagos szerkezeti elemek formájában. Ezután bemutatom, hogy az aminosav-szekvencia és a főnti adatok ismeretében hogyan tudunk becslést adni arra nézve, hogy a peptidlánc mentén hogyan követik egymást ezek a másodlagos szerkezeti elemek. A módszer [24] alapfeltevései a következők. A fehérje távoli-UV CD spektruma a másodlagos szerkezeti elemektől származik, mert dominánsan a peptidkötések gerjesztéseiből adódik, melyek cirkuláris dikroizmusát a szomszédos peptidegységek relatív orientációja határozza meg. Ahogyan azt az első fejezetben kifejtettem, az egyes másodlagos szerkezeti elemeken belül (α -hélixek, β -redők, kanyarok) ezen orientációs paraméterek azonosak, így egy adott szerkezet peptidkötéseinek gerjesztései azonos CD spektrumot eredményeznek. Mivel a peptidkötések gerjesztéseit döntően a lokális konformáció és kölcsönhatások befolyásolják, így a gerjesztések jó közelítéssel egymástól függetlenek és egy adott fehérjeminta esetén összeadódnak. Továbbá, el kell fogadnunk azt a feltételt, hogy az egyéb kötések kialakító elektronkonfigurációk gerjesztéseinek CD járuléka kicsi a peptidgerjesztésekéhez képest. A tapasztalatok alapján ez teljesül a távoli-UV tartományban néhány olyan kivételtől eltekintve, amikor sok aromás oldalláncot tartalmaz a makromolekula [24], de az általunk tanulmányozott fehérje aminosav-szekvenciájának ismeretében ezt a lehetőséget kizárhatjuk.

A CD spektroszkópia egyik legsikeresebb alkalmazási területe, a fehérjék másodlagos szerkezetének meghatározása tehát, a távoli-UV CD spektroszkópia másodlagos szerkezeti elemekre vonatkozó jelentős érzékenysége miatt fejlődhetett ki.

A fehérjén belül a spektrumok szuperpozíciójának elve alapján: $C(\lambda) = \sum_k f_k B_k(\lambda)$, ahol $C(\lambda)$ az adott fehérje CD spektruma, $B_k(\lambda)$ egy másodlagos szerkezeti komponensre (α -hélix, β -redő stb.) jellemző CD spektrum, f_k pedig az egyes komponensekben részt vevő aminosavak részaránya a fehérje teljes aminosav-tartalmához képest. Ennek megfelelően, ha ismerjük a $B_k(\lambda)$ spektrumokat, az f_k faktorokat megadhatjuk a minta mért spektruma alapján. A komponensek spektrumait korábban a másodlagos szerkezeti elemekre jellemző geometriai paraméterek ismeretében elméleti számítások útján próbálták meghatározni [25], de a manapság használatos módszerek már nem ezt az utat követik. Egyrészt, mert a számítások bonyolultsága miatt nem mindig sikerült megfelelő pontosságú modelleket alkotni, másrészt a valós fehérjékben a másodlagos szerkezeti elemek mindig mutatnak valamilyen eltérést az ideálisnak tekintett konformációktól. Ehelyett nagy számú ismert másodlagos szerkezettel rendelkező fehérje (itt jellemzően kristályosított fehérjék röntgenszórással meghatározott szerkezeti információját használják) CD spektruma alapján határozzák meg a másodlagos szerkezetekre jellemző $B_k(\lambda)$ spektrumokat. A számításhoz alkalmazott, ismert szerkezetű fehérjéket nevezzük referencia-készletnek.

Az eljárás során az N darab fehérjéből álló referencia-készlet esetén a következő N lineáris egyenletet tudjuk felírni:

$$[C(\lambda)]_N = [\sum_k f_k B_k(\lambda)]_N, \quad (5.1)$$

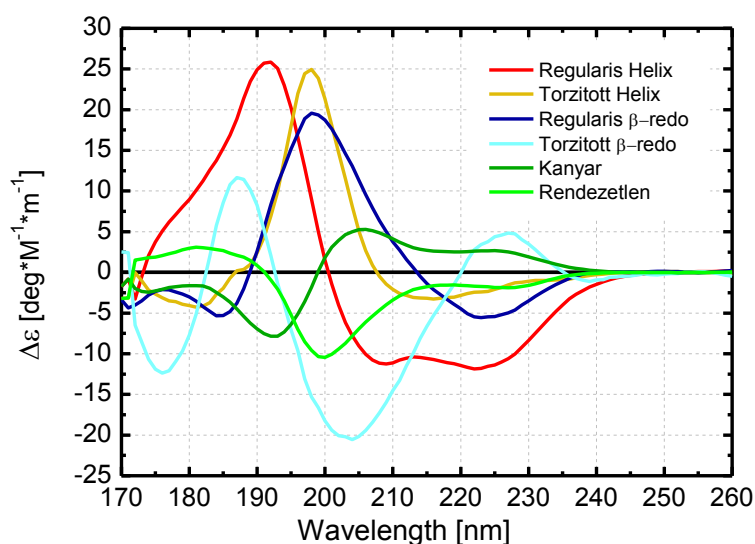
melyekben az ismeretlenek a $B_k(\lambda)$ komponens spektrumok, hiszen az f_k értékek a krisztallográfiai mérésekből ismertek és $C(\lambda)$ a referencia fehérjék CD spektruma. A $B_k(\lambda)$ spektrumokat megkapjuk, ha a teljes egyenletrendszerre a legkisebb négyzetek módszerével egyszerre minimalizáljuk az eltérést az (5.1) egyenletek jobb és bal oldala között. Hasonló optimalizációs eljárással kapjuk meg az új fehérje CD spektrumából a referencia-készlet esetén meghatározott $B_k(\lambda)$ spektrumokat használva, az f_k faktorokat. Minden esetben teljesülnie kell a $\sum_k f_k = 1$ feltételnek.

Munkám során a kiértékel-programot olyan módon használtuk, mely összesen 6-féle másodlagos szerkezeti elemmel dolgozott ($k=6$), melyek a következők voltak: reguláris α -hélix, reguláris β -redő (β -strand), kanyar (turn), rendezetlen struktúra (unordered), torzult α -hélix (distorted helix) és torzult β -redő (distorted strand). Az első három elem CD spektruma különböző referencia-készletek alapján számolva csak kis mértékben tér el egymástól, míg a rendezetlen struktúrát változékonysága miatt csak egy erősen átlagolt spektrummal tudjuk

közelíteni. Az utolsó két elem használatának oka az a feltevés, hogy a periodikus elemek (hélix és redő) peptidkötései valamelyest eltorzulnak a szerkezetek kezdeti és végső régiókban, így a középső régióktól eltérő spektrumot adnak.

A módszer jellegéből adódóan a mért spektrumok hullámhossztól való függése mellett az abszolút érték pontos ismerete is fontos, mivel a $B_k(\lambda)$ „bázisfüggvények” a vizsgált tartományon belül egyes régiókban a kísérleti hibán belül nem lineárisan függetlenek, azaz bizonyos arányban keverve az adott régióban nullát adhatnak. Hasonló okból célszerű a vizsgált fehérje CD spektrumát minél szélesebb hullámhossztartományon megmérni.

A kiértékelés során a fokokban mért ellipticitás értéket elosztjuk a minta tömegszázalékban kifejezett koncentrációjával, ill. a m-ben mért úthosszal és beszorozzuk egy átlagos aminosav moláris tömegével. Ezzel a módszerrel végül a fehérje egy aminosavára vonatkozó CD értéket kapjuk meg, melyet az irodalomban szokásosan $\Delta\epsilon$ -al jelölnek. Az általunk az illesztésekhez használt $B_k(\lambda)$ bázisfüggvényeket az 5.1.1 ábra mutatja:



5.1.1 Ábra: Az egyes másodlagos szerkezeti elemek CD spektrumai

A grafikonon megfigyelhetők, az egyes $B_k(\lambda)$ spektrumok jellegzetességei. Az α -hélix spektrumának jellemzői az nagy intenzitású pozitív csúcs 192 nm-nél, és a két kisebb negatív csúcs 208 és 222 nm-nél, valamint a 175 nm-nél megjelenő váll. További karakterisztikus csúcsok jelennek meg 140 és 160 nm-nél, de ezek vizes oldatban végzett mérések esetén már nem láthatók a víz nagy abszorpciója miatt.

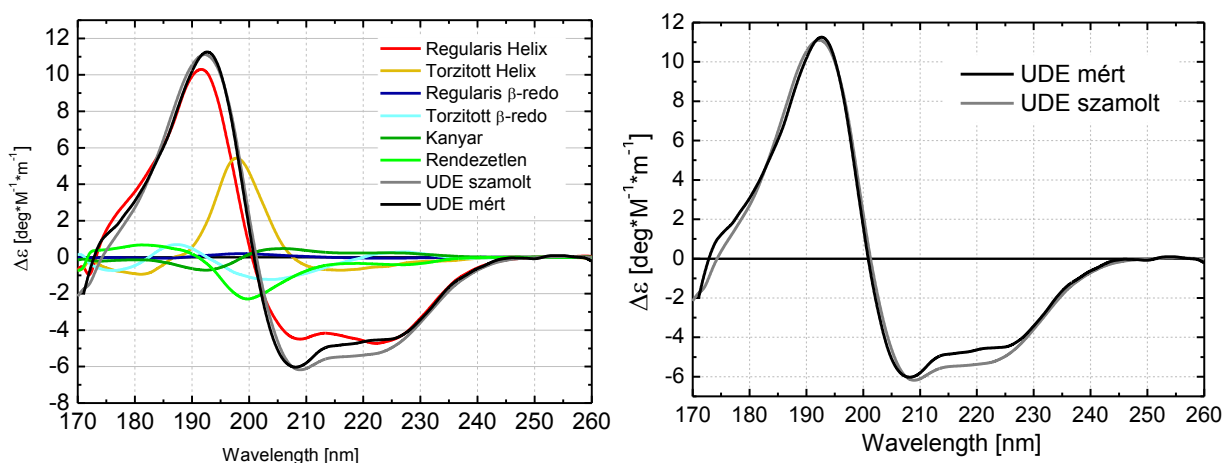
Az elméleti úton számolt α -hélix spektrumok jó egyezést mutatnak a mérések alapján számolt spektrumokkal, melyek összehasonlításából kiderült, hogy a CD jel intenzitása nő a hélix hosszának növelésével de rövid hélixek esetén nem egyenesen arányos vele, amit a

$V_r = V_\infty \frac{(r-k)}{r}$ empirikus formulával lehet kifejezni. Itt V_r egy r darab aminosavból álló hélix

CD jele, V_∞ egy végtelen hosszú hélix CD effektusa, k pedig egy empirikus paraméter, amely a jel láncosszótól való függését jellemzi. Jelentése a széleffektusok miatt „hiányzó” aminosavak száma [26]. Elméleti számítások alapján k értéke valamelyest nő a hélix hosszának növekedésével kis hélixek esetén, de átlagosan 4-nek tekinthető. Ez azt jelenti, hogy átlagosan minden hélix-szegmens elején és végén 2-2 aminosav alkotja a torzított régiót, melyek becsült spektruma szintén látható az 5.1.1-es ábrán.

A β -redő régiók spektrumának jellegzetes pontjai a negatív csúcs 215 nm-nél, a pozitív csúcs 198 nm közelében valamint két rövid hullámhosszú csúcs 175 és 168 nm-nél. A β -redők esetében is igaz, hogy vannak határregiók, melyek spektruma eltér a reguláris szakaszok okozta CD jeltől. Ezen régiókat átlagosan 1-1 aminosav alkotja a szálak két szélén [27], spektrumuk szintén látható az 5.1.1-es ábrán. A kanyarok és rendezetlen régiók esetén még nehezebb a spektrumot számítással meghatározni, ezért ezen bázisfüggvényeknél csak az ismert szerkezetű fehérjék referencia-készletére hagyatkozhatunk, a rájuk vonatkozó becslések bizonytalansága a legjelentősebb.

Az 5.1.1-es ábrán látható bázisfüggvények felhasználásával a másodlagos szerkezetek f_k arányát meghatároztam az UDE esetén :

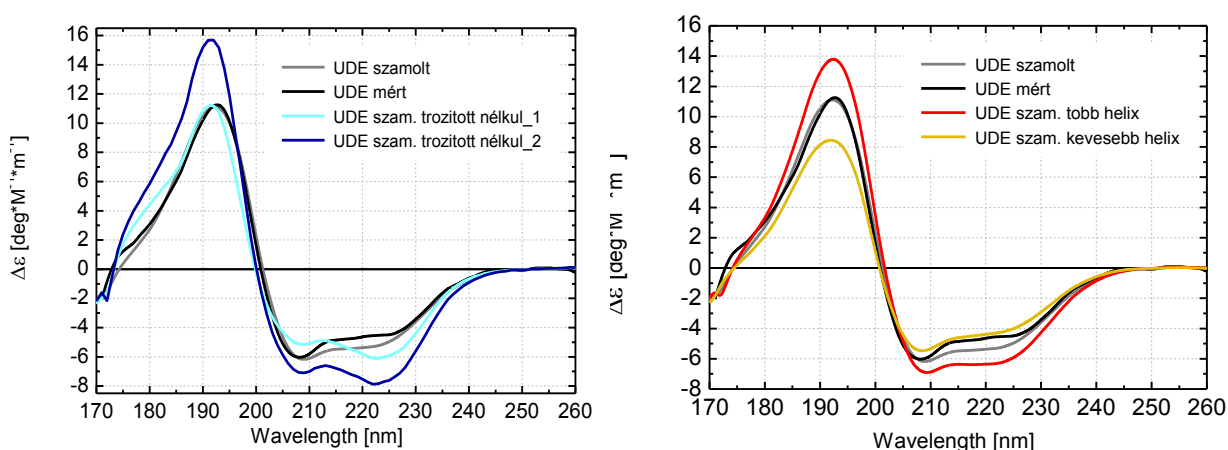


5.1.2 Ábra: Jobb oldal: az UDE mért és „illesztett” spektruma valamint az f_k tényezőkkel szorzott $B_k(\lambda)$ bázisfüggvények. Bal oldal: az UDE mért (fekete) és számolt (szürke) spektruma külön kiemelve.

Ahogy azt pusztán az UDE spektrumának alakjából várnánk is, a minta nagyarányú rendezett α -helikális tartalommal rendelkezik, hiszen megjelenik benne a nagy intenzitású pozitív csúcs 192 nm környékén hasonló abszolút-értékkel, mint az α -hélix spektrum esetén. A spektrum 200-240 nm közti része árulkodik arról, hogy az α -helikális elemek mellett a

polipeptidlánc viszonylag nagy hányada rendezetlen konformációt vesz fel, mert a nagy intenzitású negatív csúcsot 207 nm esetén nem tudjuk tisztán az α -hélix bázisfüggvénnyel leírni, mert annak intenzitása az α -hélix spektrumban kisebb, mint az UDE spektrumban, negatív értéket pedig csak a rendezetlen és a torzított β -spektrum vesz fel ezen a tartományon. Azt szintén megfigyelhetjük, hogy a torzított β -redők spektrumának nagy járuléka elrontaná a 192 nm-es csúcs lefedését.

Az illesztés paraméterekre való érzékenységet az 5.1.3 ábra két grafikonján szeretném szemléltetni.



5.1.3 Ábra: Bal oldal: az UDE mért (fekete) és számolt (szürke) spektruma, valamint azon számolt spektrumok, amikor a torzított α -hélixhez és β -redőhöz tartozó bázisfüggvényeket kihagytuk az „illesztésből”. Először a torzított régiók számát hozzáadtuk a megfelelő reguláris szerkezetekéhez (sötétkék), majd a fennmaradó 4 bázisfüggvénnyel elvégeztük újra az illesztést (világoskék). Jobb oldal: az UDE mért (fekete) és számolt (szürke) spektruma, valamint a helikális tartalom a rendezetlen régiók rovására történt 10%-os növelésével és csökkentésével számolt spektrumok

Az 5.1.3-as ábrán két olyan grafikont látatunk, melyeken az általunk legjobbnak talált illesztés mellett kicsit megváltoztattam bizonyos f_k paramétereket, hogy meggyőződjek az illesztés érzékenységről. Az ábra bal oldali grafikonján két olyan spektrum található, melyeknél a torzított α -hélix és β -redő hányadát beleolvasztottam a rendezett részekébe (tehát úgy tekintettem, mintha a teljes szerkezet azonos spektrumot adna, vagyis nem különbözik a torzult részek járuléka a belső α -hélix és β -redő régiók járulékától). A sötétkék spektrum ezáltal láthatóan túl nagy α -helikális tartalomról árulkodik. Ez az eltérés természetesen csökkenthető, ha a maradék négy $B_k(\lambda)$ bázisfüggvénnyel az illesztést újra elvégezzük. Jól látható azonban, hogy a 200-240 nm közti hullámhossz-tartomány leírása nem közelítette meg a mért spektrumot. A sötétkék és világoskék spektrumok jellege nagyon hasonló ebben a tartományban, csupán intenzitásuk különbözik, így várhatóan a rendezett α -helikális

tartalomnak a többi javára történő csökkentése nem fog jobb illesztést szolgáltatni erre a régióra. A fenti példával azt demonstráltam, hogy az illesztés során mindenképpen szükség van a rendezett és torzított régiók megkülönböztetésére, mert bizonyos hullámhossz-tartományokban a spektrum nem írható le jól nélkülük.

A jobb oldali grafikonon azt mutatom be, hogy az illesztés jósága nagyon érzékeny az f_k súlyok csekély (10%-os) változására is. A közel 40%-os rendezett hélixtartalmat csökkentettem/növeltem 10%-kal a rendezetlen régiók rovására. Az illesztett spektrumok a várakozásaimnak megfelelően erőteljesen megváltoztak: az α -hélix részarány változtatásával szinte egyenes arányban változott a 192 nm-es csúcs intenzitása, a 200-240 nm-es tartomány illesztése pedig a rendezetlen régiók súlyának növelésével javult. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy ha kis négyzetes eltérést szeretnénk elérni a számított és a mért spektrum között, akkor az α -hélix tartalom jól meghatározott.

A másodlagos szerkezeti elemek százalékos arányát az illesztés alapján ismerve és felhasználva, hogy a minta aminosavainak száma 370, azt is ki tudjuk számolni, hogy összesen hány aminosav vesz részt az egyes másodlagos szerkezeti elemek kialakításában. A százalékok és az egyes elemeket felépítő aminosavak száma az 5.1.1-es táblázatban olvasható:

Minta	$f(\alpha\text{-reguláris})$	$f(\alpha\text{-torzított})$	$f(\beta\text{-reg.})$	$f(\beta\text{-torz.})$	$f(\text{kanyar})$	$f(\text{rendezetlen})$
UDE	0,41	0,22	0,01	0,06	0,09	0,22
Aminosavak száma	$370 \cdot 0,41$ ≈ 152	$370 \cdot 0,22$ ≈ 81	$370 \cdot 0,01$ ≈ 4	$370 \cdot 0$ ≈ 22	$370 \cdot 0,09$ ≈ 33	$370 \cdot 0,22$ ≈ 81

5.1.1 Táblázat: UDE becsült f_k tényezői és az ezek alapján az egyes másodlagos szerkezeti elemekbe rendeződő aminosavak száma

Az 5.1.1-es táblázatból kiolvasható, hogy az UDE fehérje összes aminosava közül 152 α -hélix szerkezet belső tartományában, míg 88 a hélixek szélén helyezkedik el, a teljes α -helikális tartalom tehát 233 aminosav. A kanyarok és a rendezetlen formában található aminosavak száma viszonylag nagy. A β -redőben található aminosavak száma mindössze 26, és ezek közül is csak 4 található belső régióban. Ha összeadjuk az így becsült aminosavak számát, 373-at kapunk, ami 3-mal több, mint a minta lánchossza. Az eltérés a kerekítések miatt jelenik meg.

Kihasználva azt az állítást, hogy az α -hélix konformációk torzított régiója 2-2 aminosavat jelent az egyes hélixek elején és végén (tehát minden hélixhez 4 torzított konformációt jelentő aminosav tartozik), azt is meg tudjuk becsülni, hogy összesen $81/4 \approx 20$

α -hélixbe rendeződik a 240 aminosav. A β -redők száma hasonló megfontolások alapján $22/2=11$, viszont mindössze 26 aminosavat kellene szétosztani 11 különálló struktúrába, ami nem túl reális.

Láthatóan a spektrumok elemzéséből meg tudjuk adni az egyes konformációkat alkotó aminosavak részarányát és a fehérjében előforduló α -hélix, ill. β -redő szerkezetek számát (átlagos hosszát). Ez, az általam használt módszerrel, pusztán a CD spektroszkópia eredményeiből kinyerhető maximális információ a fehérjék másodlagos szerkezetére vonatkozóan.

A spektrumok kiértékelésének bizonytalanságát több tényező is okozhatja. Egyrészt a víznek a vizsgált hullámhossztartományon való nagy abszorpciója miatt néhányszor tíz mikrométeres úthosszal dolgoztunk, melynek pontatlansága akár néhány mikrométer is lehet, így az ebből a normálás során adódó hiba $\sim 10\%$. Másrészt, a spektrumokat a minta koncentrációjával is normálni kell, melynek mérési hibája fehérjeoldatok esetén szintén megközelítheti az 5-10%-ot.

5.2. A másodlagos szerkezeti elemek elhelyezkedése a szekvenciában

Az általam alkalmazott szerkezetvizsgálat második lépése egy neurális hálózati elven működő program [28] (NN) használata volt, mely bemeneti információként – alap esetben – a fehérje, vagy fehérje fragmens aminosav-szekvenciáját felhasználva becslést ad arról, hogy a szekvencia egyes szakaszai milyen másodlagos szerkezetekbe rendeződnek.

A neurális hálózati elven működő programok általános működési elve, hogy először a tanulási folyamat során egy adott mintázatban képesek a lokális kapcsolatokat felismerni és valószínűségi súlyokat rendelni az egyes elempárokhoz aszerint, hogy mennyire erős az egymásra gyakorolt hatásuk az adott tulajdonságok kialakításában, majd ezen súlyokat felhasználva ki tudják értékelni egy új elemhalmaz esetén az elemek által kialakított mintázat megfelelő tulajdonságait.

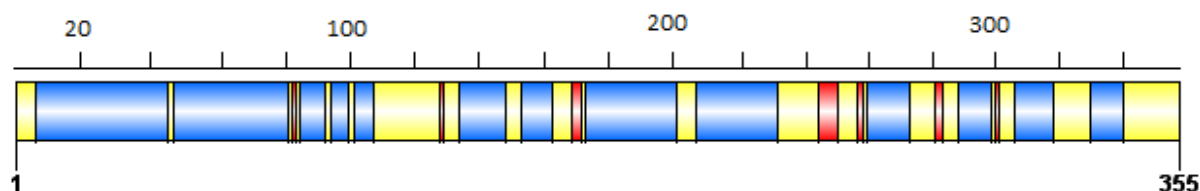
A fehérjeszerkezet-vizsgálat esetében ez azt jelenti, hogy a neurális hálózati elven működő programok a tanulási folyamat során ismert másodlagos szerkezetű fehérjék aminosav-szekvenciájában képesek felismerni, hogy mely szekvencia-részletek milyen másodlagos szerkezetbe „rendeződnek szívesen”, ami alapján több lépésben valószínűségi súlyokat rendelnek az első szomszéd, másodsomszéd, stb. kapcsolatokhoz, majd ezen

súlyokat felhasználva kiértékelik a vizsgált fehérje aminosav szekvenciáját. A program a fehérje egyes aminosavaihoz a végső lépésben két 0 és 1 közötti számot rendel, melyek közül az első az α -hélixben való részvétel valószínűsége, míg a másik a β -redőben való részvétel valószínűsége. Ebből már látszik, hogy a program tulajdonképpen arra tud becslést adni, hogy az adott aminosav α -hélix vagy β -redő szerkezet kialakításában vesz-e részt vagy egyikben sem. Ha az első szám nagyobb, mint a második és nagyobb, mint egy, a tanulási folyamatban megállapított küszöbérték, akkor az adott aminosav α -hélixben vesz részt, ha a második a nagyobb (és szintén nagyobb, mint a küszöbérték), akkor β -redőben. Ha egyik valószínűség sem haladja meg a küszöbértéket, akkor a program az egyéb kategóriába rendeli, ami lehet kanyar vagy rendezetlen struktúra.

Az általam alkalmazott program [28] a tanulási folyamatban 48 olyan fehérjeszekvenciát használ, melyek másodlagos szerkezetét röntgenszórással alkotott szórási képekből számították ki [29] és a mintázat-felismerés során a legközelebbi 8-8 szomszéd aminosav típusát veszi figyelembe. A figyelembe veendő szomszédok száma elsőre önkényesnek tűnhet, de összhangban van azzal, hogy a másodlagos szerkezeti elemek kialakulását alapvetően lokális kölcsönhatások határozzák meg és csak a környező aminosavak oldalláncai (melyek megadják az adott aminosav típusát) befolyásolják, hogy az adott aminosav környezetében milyen konformáció alakul ki.

A program használata ott kapcsolódik a CD spektroszkópiai mérésekhez, hogy japán fizikusok az utóbbi években továbbfejlesztették úgy, hogy bemeneti adatként nem csak a fehérje aminosav-szekvenciáját használja a kiértékelési fázisban, hanem megadhatjuk a CD spektrumok kiértékelésével kapott α -hélixet és β -redőt alkotó aminosavak, illetve az α -hélix és β -redő szegmensek számát is [30]. A CD információval kibővített mintázat felismerő program így több számítási ciklust végez, melyek során folyamatosan finomítja a kiosztott súlyokat annak függvényében, hogy az előző ciklusban becsült másodlagos szerkezet mennyire felel meg a CD mérés eredményeinek. Ezzel a módosítással a korábbi átlagosan 60%-os pontosság helyett (a tesztfehérjékre adott becslés egyezése a röntgenszórás eredményeivel) 75%-os pontosságot is lehet érni [30]. Az UDE minta a CD spektrumok alapján nagyarányú helikális szerkezettel rendelkezik és az erre a konformációra vonatkozó számítások pontossága a legnagyobb.

A kiegészített neurális hálózati programmal az UDE másodlagos szerkezetére vonatkozó eredményemet az 5.2.1 ábra mutatja.

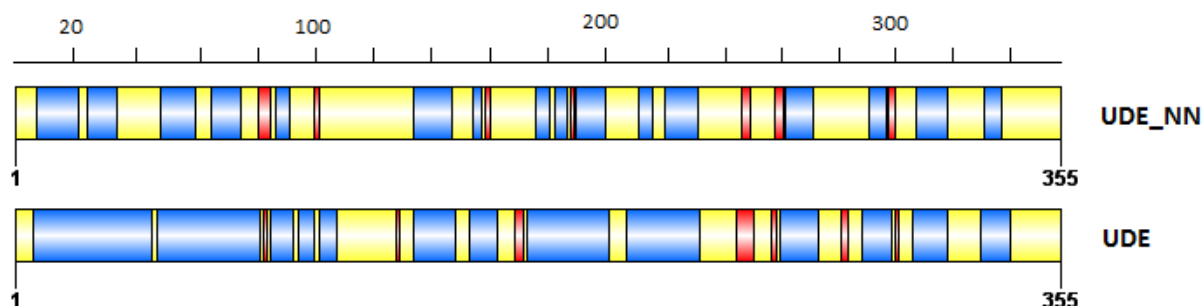


5.2.1 Ábra: Az UDE fehérje CD információval kiegészített neurális hálózati elven becsült másodlagos szerkezete, kék: α -hélix, piros: β -redő, sárga: kanyar vagy rendezetlen szerkezet

Láthatóan ez az eredmény is alátámasztja, hogy a fehérje sok α -hélixbe rendeződött aminosavat tartalmaz, melyeket hosszabb-rövidebb rendezetlen vagy kanyarrégiók kötnek össze. Ha összeszámoljuk, hogy a fenti ábra alapján hány aminosav tartozik összesen az egyes másodlagos szerkezetekhez, csak minimális eltérést kapunk a CD spektrumok kiértékelése alapján számolt darabszámoktól. Nevezetesen az α -aminosavak száma a spektrumok alapján 233, a második módszerrel 228, a β -aminosavaké 27, ill 26 és végül korábban a kanyar és rendezetlen régiókban található aminosavak számának összege 114 volt, most 115. Ez az egyezés arra enged következtetni, hogy a neurális hálózati program jól tudta egyeztetni a feltételül szabott CD eredményeket az egyébként általa becsült szerkezettel, ami alapján megbízhatónak tarthatjuk az eredményeket.

A kapott szegmensszám már nem mutat ilyen jó egyezést (CD alapján 20 α -szegmens és 11 β -szegmens, míg az NN alapján 13 α -szegmens és 7 β -szegmens) aminek két magyarázata is lehetséges: egyrészt a program számára a szegmensek számának egyeztetése nem olyan erős feltétel, mint a teljes részarányok egyezése, másrészt hajlamos az egymáshoz közeli (1-2 aminosavval elválasztott) azonos típusú szegmenseket összeolvasztani.

Az 5.2.2. ábrán bemutatom, hogy szignifikáns különbséget eredményezett, amikor a neurális hálózati programnak csak a szekvenciát adtuk meg bemeneti paraméterként, és nem használtuk a CD mérés alapján becsült f_k arányokat (UDE_NN).



5.2.2 Ábra: Felül az UDE neurális hálózati elven becsült spektruma a CD eredmények felhasználása nélkül, Alul: az UDE kiegészített neurális hálózati elven becsült spektruma a CD eredmények felhasználásával, kék: α -hélix, piros: β -redő, sárga: kanyar vagy rendezetlen szerkezet

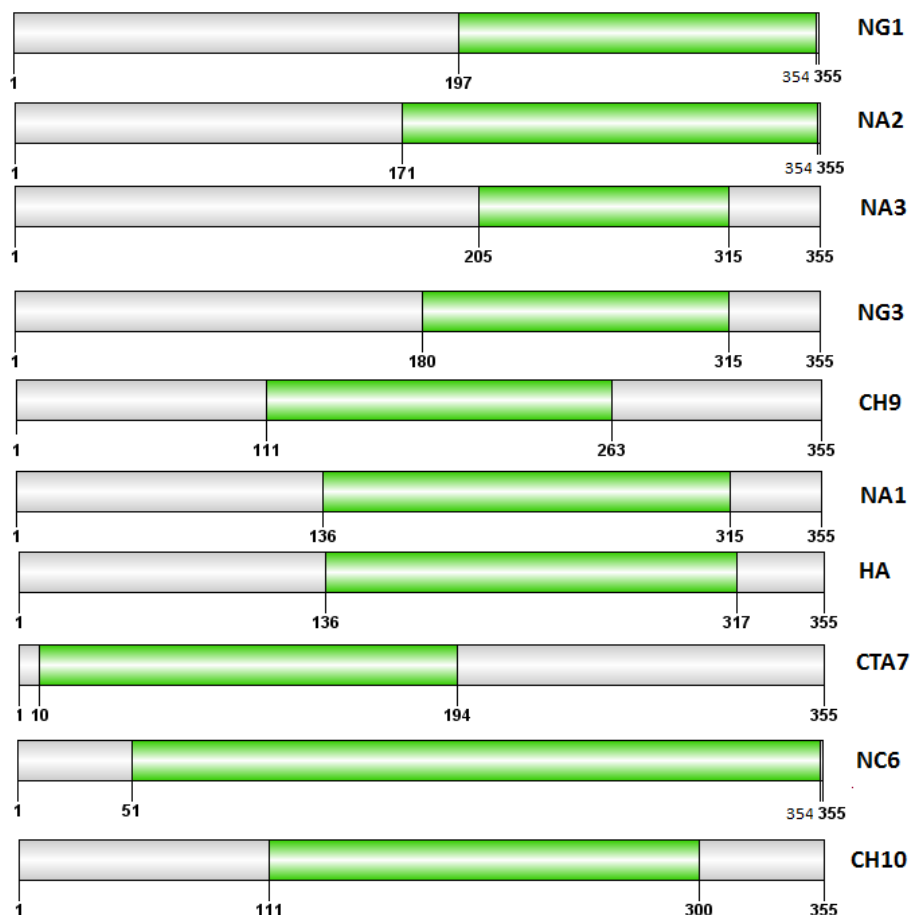
A két eredményt összehasonlítva látható, hogy a csak szekvencia alapján becsült szerkezet jóval kevesebb α -hélixet tartalmaz, mint a részarányok figyelembe vételével kapott eredmény. Ez megfelel a várakozásainknak, hiszen a CD spektrum nagy α -hélix tartalmat jósolt. Az egyes szerkezeti elemek magja ugyanakkor mindkét szekvenciában ugyan ott található, ami szintén érthető, ha elfogadjuk, hogy a néhány szomszéd aminosavra kiterjedő környezet határozza meg egy adott szakasz másodlagos szerkezetbe való rendeződését. A β -redők helyzete már nagyobb eltérést mutat, de kis részarányuk miatt a rájuk vonatkozó CD spektrumból kapott eredmény pontatlansága is nagyobb.

Azt, hogy a cirkuláris dikroizmus spektrumok felhasználásával kapott eredmény közelíti meg inkább a tényleges másodlagos szerkezetet, csak a teljes fehérjeszerkezet krisztallográfiai meghatározása bizonyíthatná. De önmagában az a tény, hogy az aminosav szekvencián túl egy független mérési módszer adatait is felhasználjuk a szerkezet meghatározására, az eredmény megbízhatóságát növeli. Ezt a szakirodalom erőteljesen alátámasztja.

5.3. Az UDE fragmenseinek spektrumai és másodlagos szerkezetük

A teljes fehérje szerkezetére vonatkozó eredményeinket pontosítani tudjuk azáltal, hogy szekvenciáját feldarabolva rövidebb fragmenseket készítünk, melyek cirkuláris dikroizmus spektruma – amennyiben stabil térszerkezetet vesznek fel – független információt szolgáltat az adott szakasz másodlagos szerkezetére vonatkozóan. Ha két, részben átfedő fragmens spektrumát összehasonlítjuk, a spektrumok eltérése arról árulkodik, hogy azok az aminosavak, melyek csak az egyikbe tartoznak bele, milyen másodlagos szerkezetet alakítanak ki, azaz ezen rész CD spektrumából kapott információ már pozíció specifikus, pontosan tudjuk, hogy a peptid lánc mely szakaszától származik. A következő szakaszban célunk tehát a korábban vázolt módszerek alkalmazása a fragmens fehérjékre is, melyek becsült másodlagos szerkezete alapján szeretnénk visszakövetkeztetni a teljes hosszú fehérje szerkezetére, illetve szeretnénk ellenőrizni korábbi eredményünk helyességét.

Az egyes fragmensek szekvenciái a teljes fehérjéhez viszonyítva az 5.3.1 ábrán láthatók.

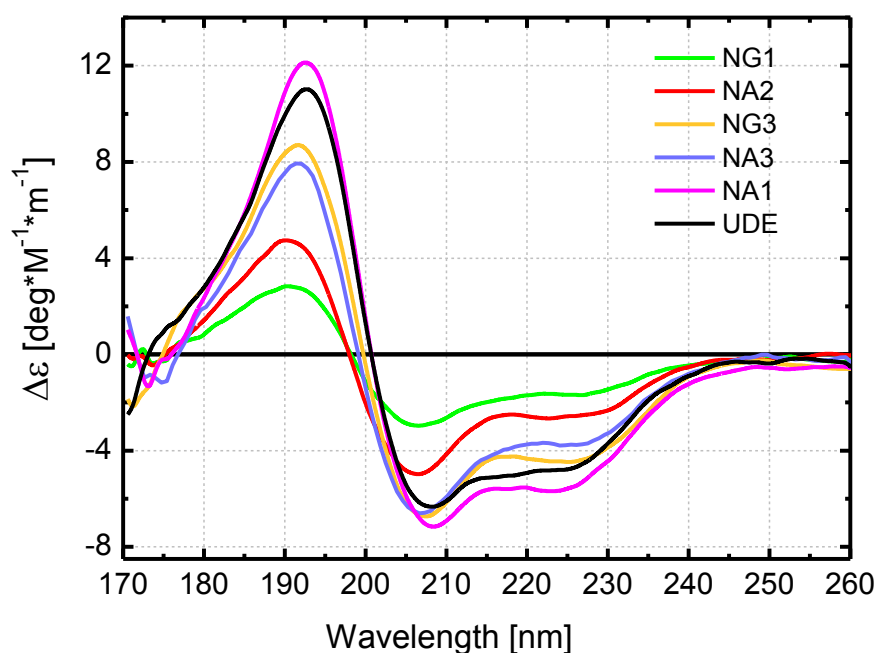


5.3.1 Ábra: A fehérje fragmensek elhelyezkedése a teljes fehérje szekvenciájában

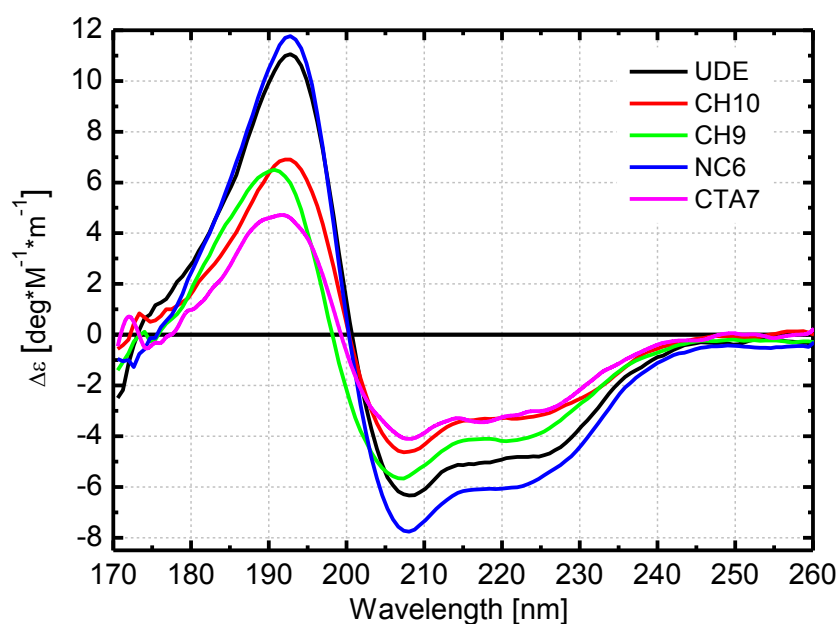
A fragmensek többsége a peptidlánc N terminális részéhez (az ábrán jobb oldal) esik közel, ráadásul legtöbbjük tartalmazza a szekvencia 200. és 300. aminosava közti szakaszát. A C terminális (bal oldal) közeléből csupán egy stabil mintát sikerült szintetizálni, melynek tisztasága alig haladta meg az elvárt küszöbértéket, így elképzelhetőnek tűnik, hogy a fehérje ezen szakasza önmagában nem rendelkezik stabil struktúrával.

Ahhoz, hogy a fragmensek számolt struktúrája alapján becslést adjunk a teljes hosszúságú fehérje másodlagos szerkezetére, feltételeznünk kell, hogy a szekvencia egyes szakaszai jól meghatározott másodlagos szerkezetet vesznek fel attól függetlenül, hogy a tőlük távol eső láncrészek jelen vannak-e. Az a tény, hogy bizonyos szakaszokról sikerült megfelelő koncentrációjú fragmens-oldatokat előállítani, már önmagában arra enged következtetni, hogy a fehérje ezen szakaszai önmagukban is képesek stabil térszerkezet kialakítására, így feltehetőleg a teljes fehérjekörnyezetben is megőrzik másodlagos szerkezetüket annak ellenére, hogy az egész makromolekula harmadlagos térszerkezete mindenképpen megváltozik.

A fragmensek mért CD spektrumait az 5.3.2 és 5.3.3 ábrák mutatják.



5.3.2 Ábra: A fehérje N-terminális széléhez közel eső fragmenseinek spektrumai

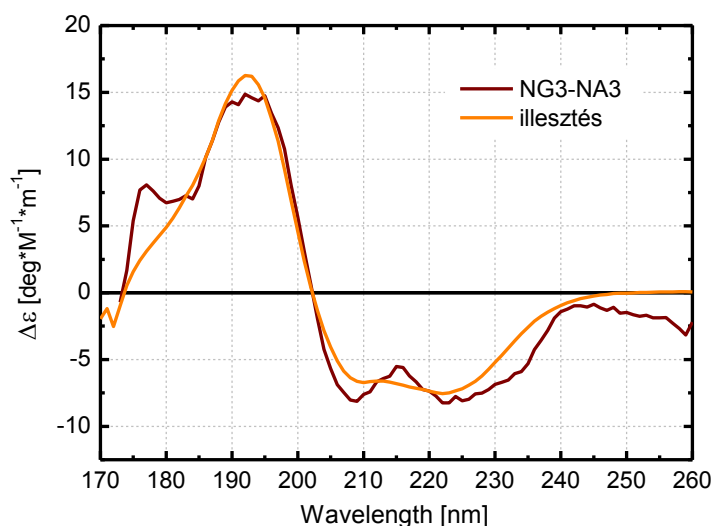


5.3.3 Ábra: A fehérje C-terminális széléhez közel eső fragmenseinek spektrumai

Az első ábrán azon fragmensek spektrumai láthatók, melyek – az NG1-től eltekintve – a szekvencia 315-ik aminosavánál végződnek és elég nagy az a tartomány, melyből mindannyian tartalmaznak közös szakaszt. Már egyszerű kvalitatív analízissel is megállapítható, hogy az NA1 fragmens nagyon hasonló összetételű, mint a teljes UDE, a 192

nm-es csúcs nagy intenzitása alapján pedig még valamivel nagyobb arányú α -helikális tartalmat várunk, mint az UDE esetén. A következő két jól összehasonlítható minta az NG3 és az NA3, melyek spektruma nagyon hasonló, szekvenciájuk pedig csak az NG3 kezdeti, 25 aminosavat tartalmazó szakaszában különbözik. A spektrumaik alapján azt várjuk, hogy az NG3 néhány százalékkal több α -helikális aminosavat tartalmaz, mint az NA3, amiből arra lehet következtetni, hogy a szekvenciájuk különbségét adó, 180-tól 205-ig terjedő láncszakasz α -hélixbe rendeződött. Ezt a sejtésünket a CD információt felhasználó neurális hálózati számítások igazolják (lásd. 5.3.4 ábra).

Ha a fenti kijelentést csak a spektrumokat felhasználva, kvantitatív módszerrel is alá akarjuk támasztani, egy kézenfekvő lehetőség, hogy kivonjuk egymásból a két fragmens spektrumát és – továbbra is feltételezve, hogy az átfedő szakaszok másodlagos szerkezete nagyrészt megegyezik a két mintában – a kapott különbségi spektrumra végezzük el a bázisfüggvényekkel való illesztést. Ezen spektrumok láthatók az 5.3.4-es ábrán.



5.3.4 Ábra: Az NG3 és NA3 fragmensek spektrumainak különbsége és az így kapott különbségi spektrum illesztése a bázisfüggvények lineárkombinációjával

A különbségi spektrum láthatóan jóval zajosabb az egyes fragmensek spektrumainál, hiszen a kivonásnál ezek hibái összeadódnak. A mérés során sajnos ezt nem láttuk előre, de ha a továbbiakban ilyen, viszonylag rövid szakaszok különbségi spektrumait szeretnénk tovább elemezni, érdemes a fragmensek spektrumait eleve töményebb mintával, nagyobb (amíg nem zavaró a víz elnyelése) és pontosabban lemért úthosszal, valamint több átlagolással felvenni. A fenti illesztésből kapott részarányok a következők: $f(\alpha\text{-reguláris})=65\%$, $f(\alpha\text{-torzított})=15\%$,

$f(kanyar)=20\%$, a többi struktúra nem szerepel az illesztésben. Látható, hogy a különbségi szakasz alapvetően tényleg α -hélix szerkezetű, a hélixeket pedig kanyarok kötik össze.

Ezzel a különbségi spektrumokat elemző módszerrel tehát, a fehérje fragmenseinek és nem túl zajos spektrumoknak a birtokában, a cirkuláris dikroizmus spektroszkópia önmagában is (NN program vagy egyéb numerikus módszer felhasználása nélkül) alkalmas helyspecifikus másodlagos szerkezeti információ meghatározására.

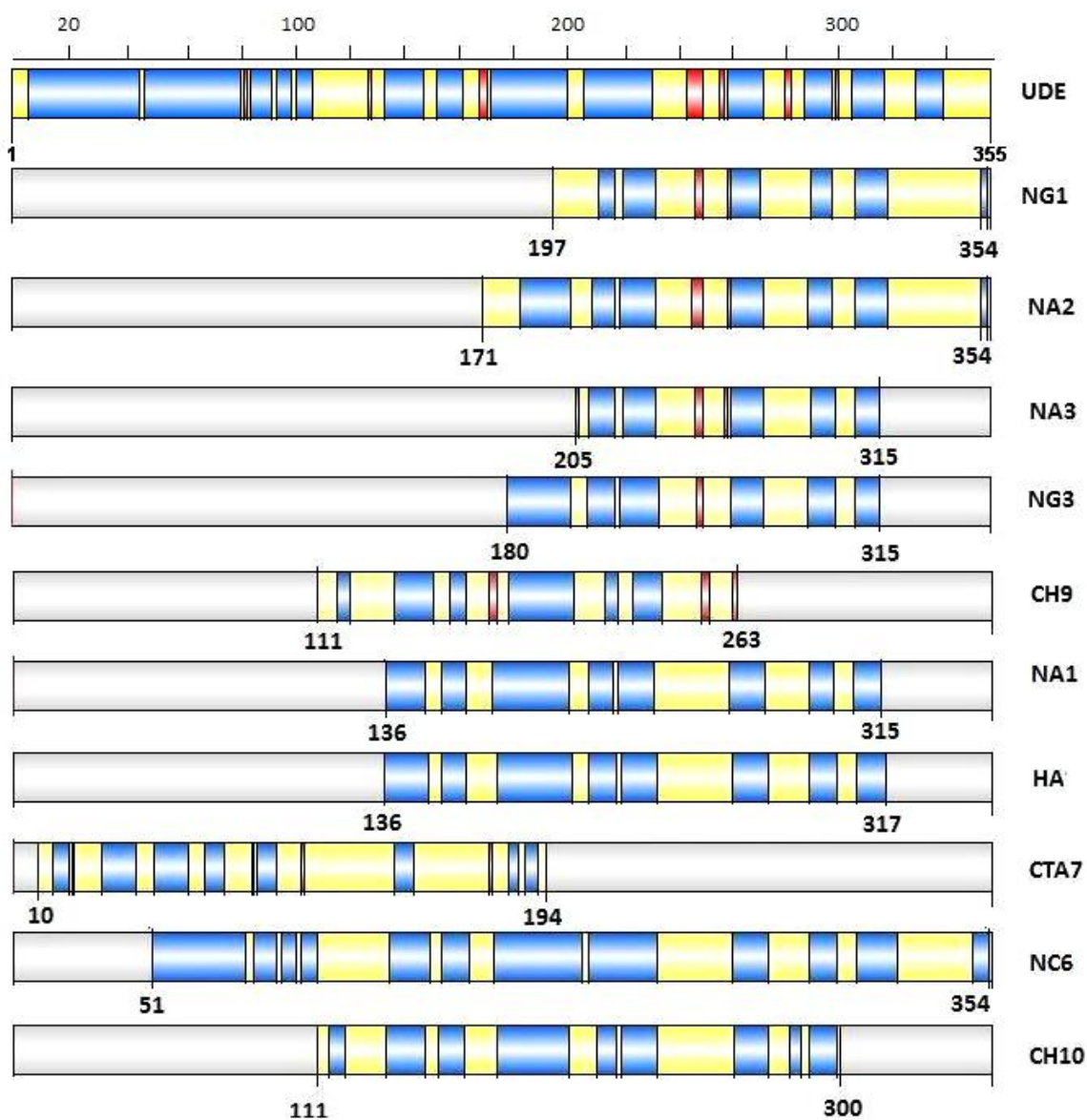
Spektrumaik alapján az NG1 és NA2 fragmensek bírnak a legkisebb α -helikális tartalommal, közülük is az NG1-ben van arányaiban a legkevesebb aminosav α -hélix szerkezetben. Ha az NA2 fragmens spektrumát hasonlítjuk az NA3 és NG3 spektrumához úgy, hogy elfogadjuk az utóbbi kettő alapján levont következtetést, miszerint a 180-205 közti szakasz inkább helikális, akkor azt láthatjuk, hogy a szekvenciáik másik eltérő szakasza, a 315-354 aminosavak alkotta rész okozza a különbséget, vagyis ez a tartomány döntően rendezetlen vagy kanyar struktúrájú. A későbbiekben látni fogjuk, hogy ezt a sejtésünket is alátámasztják a neurális hálózati programmal a CD spektrum és az aminosav szekvencia alapján számolt eredmények.

A második grafikonon (5.3.3 ábra) a fehérje eltérő szakaszaiból származó fragmensek spektrumai szerepelnek. A kvalitatív analízishez itt is adódik egy kézenfekvő csoportosítás: az NC6 fragmens spektrumát az UDE-val összehasonlítva azt találjuk, hogy valamivel nagyobb százalékban kell helikális tartalommal rendelkeznie, ami mellett az egyéb összetevők aránya viszonylag kicsi. A CH9 és CH10 fragmensek spektrumát összehasonlítva az első szembetűnő különbség az, hogy a CH9 spektrumban az általában 192 nm-nél megjelenő intenzív pozitív csúcs maximumhelye kissé balra tolódott. A változást a bázisfüggvények alapján torzított β -redő okozhatja, amivel együtt kell, hogy járjon valamekkora reguláris β -tartalom is. Mivel ez az egyik legrövidebb fragmens, így ha a teljes fehérje ezen szakaszán található β -redő (ami feltehetőleg a többi fragmensben is megjelenik), akkor a CH9 spektrumában lesz a legnagyobb arányú változás az UDE-éhez képest. Ezért láthatjuk β -redő jelenlétét ebben a spektrumban. A spektrumok szisztematikus kiértékelése ezt a feltevésünket is alátámasztotta.

A CTA7 fehérje fragmens spektruma kissé különbözik az összes többitől, ami feltehetőleg egyrészt annak az eredménye, hogy részben a szekvencia olyan szakaszából áll, ami nem jelenik meg a többi fragmensben, másrészt ennek a mintának a tisztasága és stabilitása bizonytalanabb, mint a többié. A kis intenzitású 192 nm-es csúcs alapján azt várjuk, hogy arányaiban kicsi az α -hélix tartalma, ami viszont ellentmond az UDE szerkezetére kapott korábbi becslésünknek, ott ugyanis a kezdeti szakasz (10.-100. aminosav

közi rész) szinte kizárólag α -hélixből áll. Ezen kérdés pontosabb megválaszolására a fejezet végén még visszatérek.

A spektrumok kvantitatív analízise során kapott részarányok a függelék 1. táblázatában olvashatók. A fragmenesek szekvenciáit és a kapott másodlagos szerkezeti arányokat felhasználva a neurális hálózati elven működő programmal a fragmensek másodlagos szerkezetére kapott eredményeket az 5.3.4 ábra összegzi.

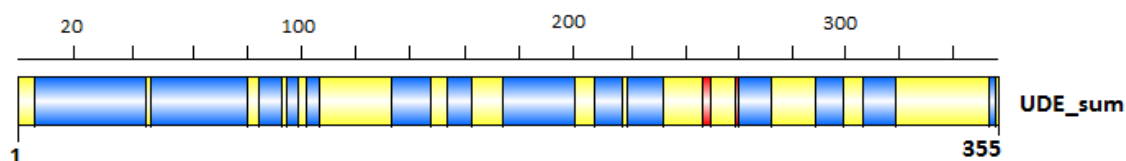


5.3.4 Ábra: Az UDE és fragmenseinek másodlagos szerkezete; kék: α -hélix, piros: β -redő, sárga: kanyar vagy rendezetlen szerkezet

Látható, hogy az átfedő tartományok jó egyezést mutatnak, a fehérje stabil fragmensei feltehetőleg megőrzik a másodlagos szerkezetüket. A 200. és 355. aminosavak közötti fehérjeszakasz másodlagos szerkezete – a (248, 251) β -redő tartománytól eltekintve – minden

fragmens esetén megegyezik. A szekvencia kezdeti szakaszára kapott eredmények az UDE és az NC6 fragmens esetén megegyeznek, míg a CTA7 fragmens megfelelő szakaszának szerkezete eltér ettől. Mivel a CTA7 minta tisztasága és stabilitása a legkevésbé megbízható a fenti sorozatból, ezen szakasz szerkezetét illetően az UDE-ra és az NC6-ra kapott eredményekre hagyatkozunk. A (248, 251) szakasz β -redő tartományának CD spektruma a rövidebb fragmensek esetén nagyobb súllyal szerepel a felbontásban, ami az NN program végeredményében is megjelenik.

Az UDE és fragmensei másodlagos szerkezetére vonatkozó eredmények alapján a nagyobb biztonsággal adhatjuk meg a teljes fehérje másodlagos szerkezetét.

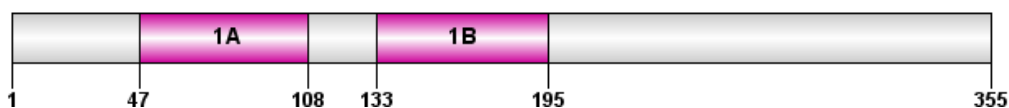


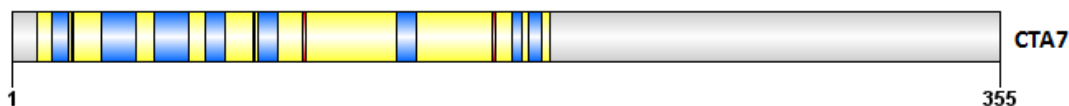
5.3.5 Ábra: Az UDE másodlagos szerkezetére adott legbiztosabb jóslatom, amelynél felhasználtam a teljes hosszúságú fehérjére és fragmensekre kapott eredményeket is.

Az erre vonatkozó, 5.3.5-ös ábrán látható eredményt úgy kaptam, hogy összesítettem az egyes szakaszokra vonatkozó másodlagos szerkezeti eredményeket és úgy tekintettem, hogy a legtöbbször előforduló másodlagos szerkezetet veszi fel az adott szakasz. Ezt tekintem az UDE másodlagos szerkezetére adott legbiztosabb eredményemnek.

Ahogy azt már korábban említettem, a kapott másodlagos szerkezeti eredmények pontosságát teljes biztonsággal csak a fehérje teljes térszerkezetének krisztallográfiai meghatározása bizonyíthatná. Ugyanakkor a már elvégzett, részben a fehérje szerkezetére, részben a funkciójára vonatkozó mérési és számítási eredmények [31] összhangban állnak az általam javasolt másodlagos szerkezettel. A következőkben ezek közül emelek ki néhányat.

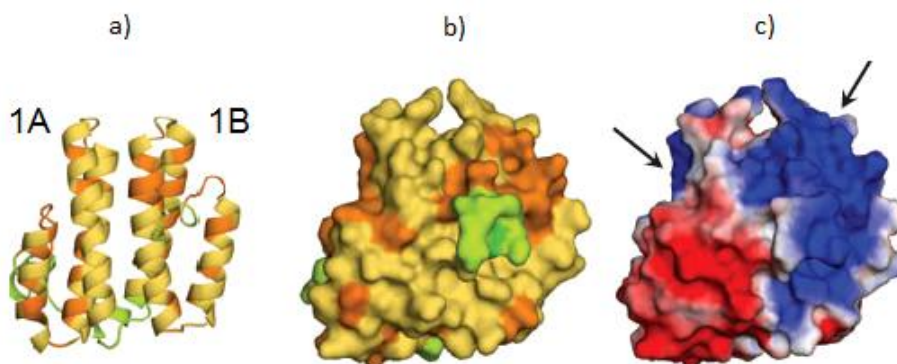
Limitált emésztési kísérletekben a fehérjét megfelelően kiválasztott enzimekkel hozzák kapcsolatba, mely reakció során az adott enzim felemésztí a fehérje aminosavainak nagy részét. A kísérletet a rovar DNS-ének jelenlétében és jelenléte nélkül elvégezve valószínűsíteni lehet a DNS-kötő szakaszok helyét a szekvenciában, hiszen e szakaszok megőrződnek a DNS jelenlétében elvégzett emésztési reakció során a DNS-sel kialakított kötéseknél köszönhetően. A mérések eredménye alapján döntően az 5.3.6-os ábrán látható, 1A-val és 1B-vel jelölt részek tartalmaznak DNS-kötő helyeket [31].





5.3.6 Ábra: Az 1A és 1B szakaszok elhelyezkedése a fehérje aminosav szekvenciájában és az ezen szakaszokat is tartalmazó CTA7 fragmens másodlagos szerkezete

Ezekről a szakaszokról a ROSETTA elnevezésű, ab initio elven működő modellező programmal háromdimenziós szerkezeti modellek készültek, ezek láthatók az 5.3.7-es ábrán.



5.3.7 Ábra: a) Az 1A és 1B szakaszok ROSETTA-val számolt szalagmodellje, b) UDE Az 1A és 1B szakaszok ROSETTA-val számolt felületi modellje, narancssárgával jelölve a konzervált motívumokat, c) a felületi modell a molekula elektrosztatikus töltése szerint színezve (kék - pozitívan töltött részek, piros - negatívan töltött részek) [31]

Az a) panel a szakaszok szalagmodelljét mutatja, mellyen narancssárgával vannak színezve azon aminosav szekvenciák, melyek az UDE fehérjecsalád (különböző rovarok UDE fehérjéi) minden fehérjében ugyan úgy megtalálhatók (konzervált motívumok). A hosszabb 1A és 1B szakaszokon belül feltehetőleg a konzervált motívumok azok, melyek a tényleges DNS-kötések kialakításáért felelősek. Ezt a feltevést támasztja alá az is, hogy a fehérje c) panelen modellezett felületi töltéseloszlása alapján a konzervált motívumoknak megfelelő részek pozitívan töltöttek (nyíllal jelölt kék régiók), így vonzzák egymást a negatív felületi töltéssel rendelkező DNS molekulával.

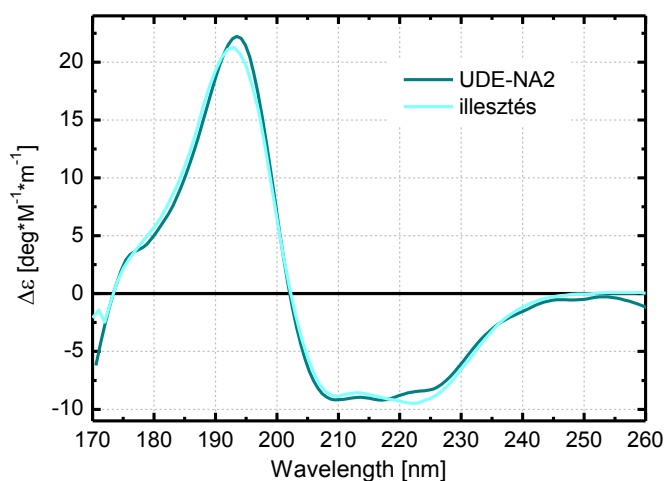
A méréseim során felhasznált fehérje fragmensek szekvenciáit megvizsgálva feltűnő, hogy főleg az N-terminális szakaszból sikerült stabil mintákat szintetizálni, míg az 1A és 1B szakaszokat is tartalmazó C-terminális részt csupán a CTA7 fragmens fedi le teljes egészében (5.3.6 ábra).

A fenti eredmények tükrében azt várjuk, hogy a szekvencia 1A és 1B szakaszai felelősek a fehérje funkciójának betöltéséért, míg feltehetőleg a többi szakasz a teljes

molekulaszerkezet stabilitását biztosítja, mely részek kivágva a teljes fehérje-környezetből önmagukban is képesek a stabil, natív térszerkezetüket kialakítani.

Ezt támasztják alá az általam javasolt másodlagos szerkezetre vonatkozó eredmények is, hiszen ahogyan az 5.3.4-es ábrán is látható, az N-terminális fragmensek másodlagos szerkezete jó egyezést mutat az átfedő szakaszokon, míg a CTA7 fragmens becsült másodlagos szerkezete eltér az UDE és az NC6 megfelelő szakaszaire kapott becsléstől, ami arra enged következtetni, hogy önmagában ez a fragmens nem olyan szerkezetbe rendeződik, mint a fehérje többi részének jelenlétében.

Az UDE-ra vonatkozó másodlagos szerkezet szintén visszaadja az elméleti modell azon eredményét, hogy az 1A és 1B szakaszok másodlagos szerkezete alapvetően α -helikális. Erről a korábban már említett, a részben átfedő fragmensek különbségi spektrumait felhasználó módszerrel még inkább meggyőződhetünk. Vegyük ugyanis az teljes hosszú UDE spektrumát és vonjuk ki belőle az N-terminálishoz tartozó, a fehérje-szekvencia közel felét lefedő NA2 fragmens spektrumát. Ekkor a kapott különbségi spektrum jó közelítése a fehérje C-terminálishoz eső fele CD spektrumának a natív környezetben (ha feltesszük, hogy az NA2 megőrzi a natív, teljes fehérjében megvalósuló másodlagos szerkezetét). Az így kapott különbségi spektrum és a rá illesztett spektrum látható az 5.3.8-as ábrán.



5.3.8 Ábra: Az UDE fehérjeminta és az NA2 fragmens CD spektrumainak különbsége sötétkéssel és a reguláris és torzított α -hélix bázisspektrumokat $f(\alpha\text{-reguláris})=0,75$ és $f(\alpha\text{-torzított})=0,25$ arányban tartalmazó illesztett spektrum világoskéssel.

Az illesztés során csak a reguláris és torzított α -hélix bázisspektrumokat használva ($f(\alpha\text{-reguláris})=0,75$ és $f(\alpha\text{-torzított})=0,25$) láthatóan nagyon jó egyezést lehet elérni az eredeti és az illesztett spektrum között, ami szintén megerősíti – az ab initio számításokkal összhangban

–, hogy a fehérje ezen szakasza stabil formában, a teljes fehérjén belül α -helikális. A CTA7 fragmens spektrumának a fenti különbségi spektrumtól való eltérése pedig szintén arra a korábbi megállapításra utal, hogy a fragmens kiszakítva az eredeti környezetből nem tartja meg az eredeti másodlagos szerkezetét, ami szintén funkcionálisát bizonyítja. A későbbiekben szeretnék további, a szerkezet stabilitására vonatkozó információt nyerni a VCD spektrumok alapján.

A fentieknek megfelelően tehát kijelenthetjük, hogy a CD spektroszkópiai mérések és a neurális hálózati programmal végzett számítások alapján az UDE-ra és fragmenseire vonatkozó másodlagos szerkezeti eredményeket független kísérleti és számítási módszerek is alátámasztják.

Összefoglalás

Dolgozatomban bemutattam a fehérjék cirkuláris dikroizmus spektroszkópiájának (CD) elméleti alapjait, a CD spektroszkópia egy nagy érzékenységű méréstechnikáját és a mért spektrumok kiértékelési módszereit. Ahhoz, hogy rámutassak az optikailag aktív fehérjemolekulák cirkuláris dikroizmusa és másodlagos szerkezete közti kapcsolatra, készítettem egy rövid összefoglalót a fehérjék szerkezeti sajátosságairól, az egyes jól elkülönülő szerkezeti szintek bemutatásával, majd elvégeztem egy egyszerű, α -helikális modellszerkezet cirkuláris dikroizmusára vonatkozó számítást.

A lineáris válaszelméletnek a fény-anyag kölcsönhatásra való alkalmazásával általánosan bemutattam a cirkuláris dikroizmus mikroszkopikus eredetét és ezen polarizációs effektust mutató rendszerekre vonatkozó szimmetria-megszorításokat, többek között azt, hogy miért csak királis objektumok mutatják ezt a jelenséget.

Kutatómunkám fő célkitűzése az volt, hogy a cirkuláris dikroizmus spektroszkópia módszerét alkalmazva meghatározzam egy napjainkban szintetizált, még ismeretlen térszerkezetű fehérjemolekula (UDE) másodlagos szerkezetét. Ehhez a Hiroshimai Egyetem szinkrotronforrásánál megmértem az UDE fehérje és számos fragmensének CD spektrumát a vákuum UV tartományban, majd ezen spektrumokat felhasználva számításokat végeztem az fehérjemintákban megjelenő egyes másodlagos szerkezeti elemek részarányaira vonatkozóan. Az így kapott eredményeket felhasználtam egy olyan neurális hálózati elven működő programmal végzett számítások során, mellyel az aminosav szekvencia és a mért másodlagos szerkezeti elemekre vonatkozó részarányok alapján pontosabban adhattam meg a másodlagos szerkezetet.

A fentiekén túl a BME Fizika Tanszék optikai laboratóriumában belefogtam egy vibrációs cirkuláris dikroizmus spektrométer megépítésébe, mellyel a fehérjéket alkotó atomok vibrációs módusain keresztül kaphatunk információt a másodlagos szerkezetéről. Ennek megfelelően a dolgozatban röviden ismertettem a Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia elméleti alapjait kiegészítve a cirkuláris dikroizmus méréstechnikájára vonatkozó megjegyzésekkel. Bemutattam továbbá a fejlesztés alatt álló spektrométer legfontosabb optikai elemeit is.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőimnek az elmélet feldolgozásában, a kísérleti munkában és a dolgozat elkészítésében nyújtott fáradhatatlan segítségükért.

Köszönöm Pukáncsik Máriának, hogy rendelkezésemre bocsátotta az általa elkészített fehérjemintákat valamint az UDE működésének megértésében nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom továbbá Koichi Matsuonak és Kunihiko Gekko professzornak, amiért lehetőséget biztosítottak a CD spektroszkópiai mérések elvégzésére a Hiroshimai Egyetem szinkrotronforrása mellett, valamint a kísérletek elvégzése és az eredmények kiértékelése során nyújtott segítségükért.

Függelék

Minta	$f(\alpha\text{-reguláris})$	$F(\alpha\text{-torzított})$	$f(\beta\text{-reg.})$	$f(\beta\text{-torz.})$	$f(\text{kanyar})$	$f(\text{rendezetlen})$
NA3	0,311	0,173	0,007	0,035	0,188	0,318
NG3	0,360	0,195	-0,020	0,013	0,203	0,285
CH9	0,249	0,147	0,076	0,053	0,195	0,271
NG1	0,115	0,087	0,132	0,084	0,217	0,344
NA1	0,410	0,230	-0,014	0,008	0,134	0,251
NA2	0,167	0,241	0,004	0,030	0,156	0,411
CTA7	0,203	0,140	0,048	0,052	0,226	0,346
CH10	0,247	0,219	-0,004	0,016	0,185	0,352
NC6	0,417	0,191	0,006	0,014	0,148	0,240
UDE	0,40	0,22	0,01	0,06	0,09	0,22
HA	0,339	0,238	-0,023	0,001	0,150	0,299

1. Táblázat: Az UDE-ban és fragmenseiben – CD spektrumaik alapján számolt – jelenlévő másodlagos szerkezeti elemek részaránya

Minta	α -hélix aminosavak	β -redő aminosavak	Kanyar aminosavak	Rendezetlen aminosavak	α -szegmensek	β -szegmensek
NA3	76	6	30	50	7	1
NG3	101	2	37	52	9	0
CH9	79	26	39	54	7	3
NG1	47	24	44	89	5	2
NA1	145	2	71	57	13	0
NA2	93	8	36	95	14	3
CTA7	79	23	52	80	8	3
CH10	134	5	53	101	16	1
NC6	187	6	46	74	15	1
UDE	229	26	33	81	20	5
HA	148	0	38	77	15	0

2. Táblázat: Az UDE-ban és fragmenseiben – CD spektrumaik alapján számolt – előforduló másodlagos szerkezeti elemeket alkotó aminosavak száma és az α -hélix és β -redő szegmensek száma.

Irodalomjegyzék

- [1] J. S. Murday, R. W. Siegel, J. Stein, J. F. Wright: Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine **5**: 251-273 (2009)
- [2] Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation, szerk. G. D. Fasman, Plenum Press (1989), kötet Principles and Patterns of Protein Conformation c. fejezete
- [3] J. Drenth: Principles of Protein X-ray crystallography, 2. kiadás, Springer-Verlag (1999), kötet 1. fejezete
- [4] M. P. Williamson, T. F. Havel, K. Wüthrich: J. Mol. Biol. **182**, 295-315 (1985)
- [5] Hongtao Yu: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **96** (2): 332-334 (1999)
- [6] M. Salzmann, K. Pervushin, G. Wider, H. Senn, K. Wüthrich: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **95** (23): 13585-90 (1998)
- [7] L. D. Barron, A. D. Buckingham: Chem. Phys. Letters **492**, 199-213 (2010)
- [8] V. Baumruk, P. Pancoska, T. A. Keiderling: J. Mol. Biol. **259**, 774-791 (1996)
- [9] T.A. Keiderling, R. A. Silva, G. Yoder, R. K. Dukor: Bioorganic & Medicinal Chemistry **7**, 133-141 (1999)
- [10] P. L. Polavarapu, C. Zhao: Fresenius J. Anal. Chem. **366**, 727-734 (2000)
- [11] T. A. Keiderling: Current Opinion in Chemical Biology. **6**, 682-688 (2002)
- [12] . Aravind, D. R. Walker, E. V. Koonin: Nucleic Acids Res. **27**: 1223-1242 (1999)
- [13] A. Bekesi, M. Pukancsik, V. Muha, I. Zagyva, I. Leveles, E. Hunyadi-Gulyas, E. Klement, K. F. Kele, A. Erdei, F. Felföldi, E. Konya, B. G. Vertessy: Biochem. Biophys. Res. Commun. **355**: 643-648 (2007)

- [14] H. Yumerefendi, F. Tarendeau, P. J. Mas, D. J. Hart: Journal of structural biology **172** (1): 66-74 (2010)
- [15] G. H. Wagniere, G. L. J. A. Rikken: Chemical Physics Letters **481**: 166-168 (2009)
- [16] I. Tinoco Jr., R. W. Woody: J. Chem. Phys. **40**: 160-165 (1964)
- [17] L. Barron: Molecular Light Scattering and Optical Activity, 2. kiadás, Cambridge (2004) kötet 2.5 fejezete
- [18] L. Barron: Molecular Light Scattering and Optical Activity, 2. kiadás, Cambridge (2004) kötet 5.4.3 fejezete
- [19] L. Barron: Molecular Light Scattering and Optical Activity, 2. kiadás, Cambridge (2004) kötet 3.4.1 és 5.2.1 fejezetei
- [20] N. Ojima, K. Sakai, K. Matsuo, T. Matsui, T. Fukazawa, H. Namatame, M. Taniguchi, K. Gekko: Chemistry Letters **30**: 522-523 (2001)
- [21] K. Sato: Japanese Journal of Applied Physics **20**: 2403-2409 (1981)
- [22] K. Sato et al.: Japanese Journal of Applied Physics **32**: 989-995 (1993)
- [23] J. Kauppinen, J. Partanen: Fourier Transforms in Spectroscopy, Springer-Verlag, Berlin (2001)
- [24] N. Sreerama, R. W. Woody: Methods in Enzymology **383**: 318-351 (2004)
- [25] Circular Dichroism: principles and Applications, szerk. N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody, 2. kiadás, Wiley (2000), kötet 21. fejezete
- [26] D-H. Chin, R.W. Woody, C.A. Rohl, R.L. Baldwin: Proc. Natl. Acad. Sci. **99**: 15416-21 (2002)
- [27] N. Sreerama, S. YU, Venyaminov, R. W. Woody: Protein Science **8**: 370-380 (1999)
- [28] L. H. Holley, M. Karplus: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 152-156 (1989)

- [29] W. Kabsch, C. Sander: *Biopolymers* **22**: 2577-2637 (1983)
- [30] K. Matsuo, H. Watanabe, K. Gekko: *Proteins* **73**: 104-112 (2008)
- [31] M. Pukancsik, A. Bekesi, E. Klement, E. Hunyadi-Gulyas, K. F. Medzihradszky, J. Kosinski, J. M. Bujnicki, C. Alfonso, G. Rivas, B. G. Vertessy: *FEBS Journal* **277**: 1245-1259 (2010)