

# INFRAČERVENÁ A RAMANOVA SPEKTROSKOPIE

aneb

## CO NÁM MOHOU VIBRACE ŘÍCI O (BIO)MOLEKULÁCH

Vladimír Baumruk



## vibrační spektroskopie

- infračervená spektroskopie (IČ)
- Ramanova spektroskopie (RS)

## vibrační optická aktivita (VOA)

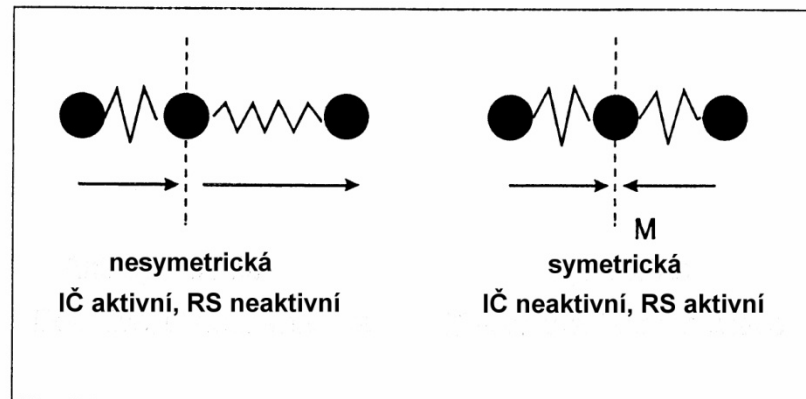
- vibrační cirkulární dichroismus (VCD)
- Ramanova optická aktivita (ROA)

$\text{CO}_2$  - lineární molekula ( $\text{O}=\text{C}=\text{O}$ ) se středem symetrie

$n = 3 \Rightarrow 3n - 5 = 4 \Rightarrow$  2 valenční vibrace  $\Rightarrow$  nesymetrická  $\Rightarrow$  **aktivní v IČ**  
 $\Rightarrow$  symetrická  $\Rightarrow$  **aktivní v RS**  
 $\Rightarrow$  2 deformační vibrace (degenerované)  $\Rightarrow$  **aktivní v IČ**

střed symetrie  $\Rightarrow$  alternativní zákaz

vibrace aktivní v IČ spektru nejsou aktivní v Ramanově spektru a vice versa (tedy **komplementarita IČ a Ramana**)

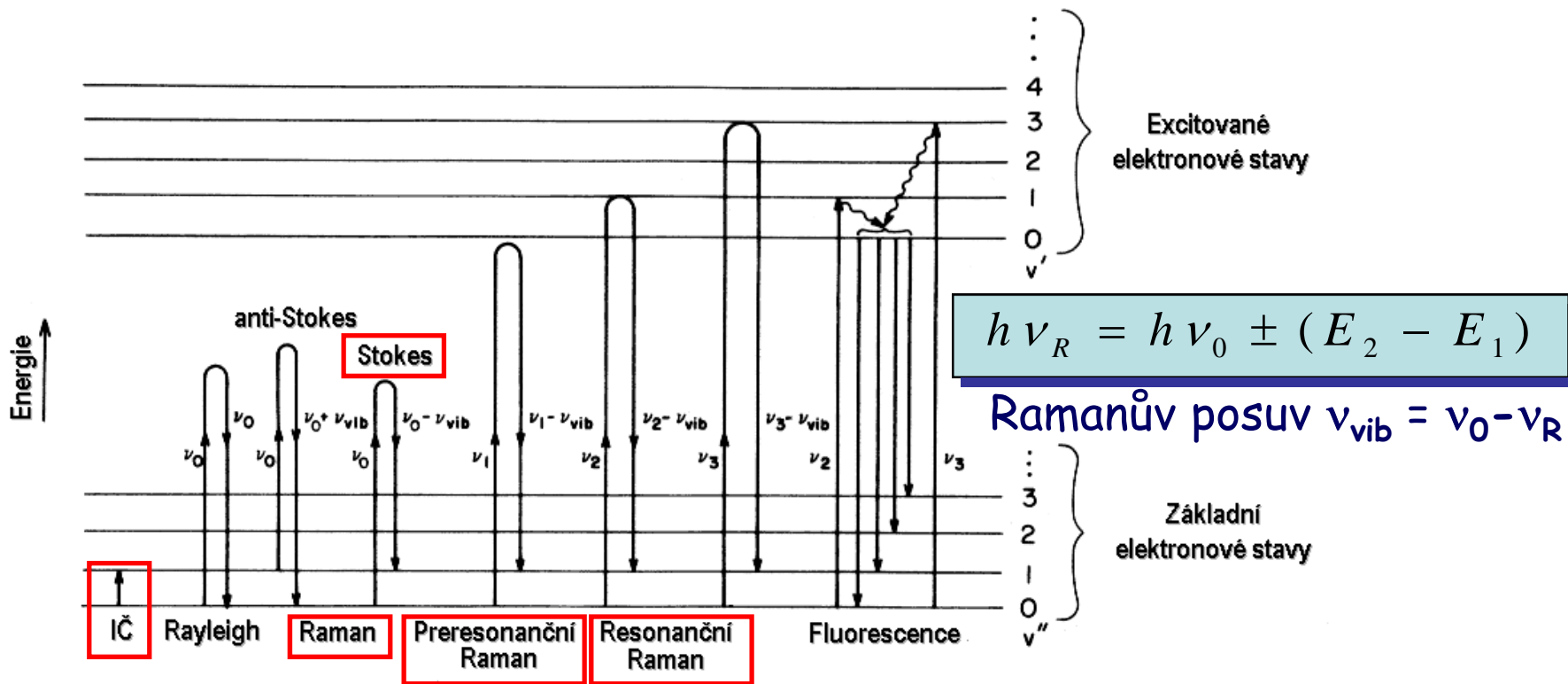


frekvence vibrace

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{f}{\mu}} \quad \mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

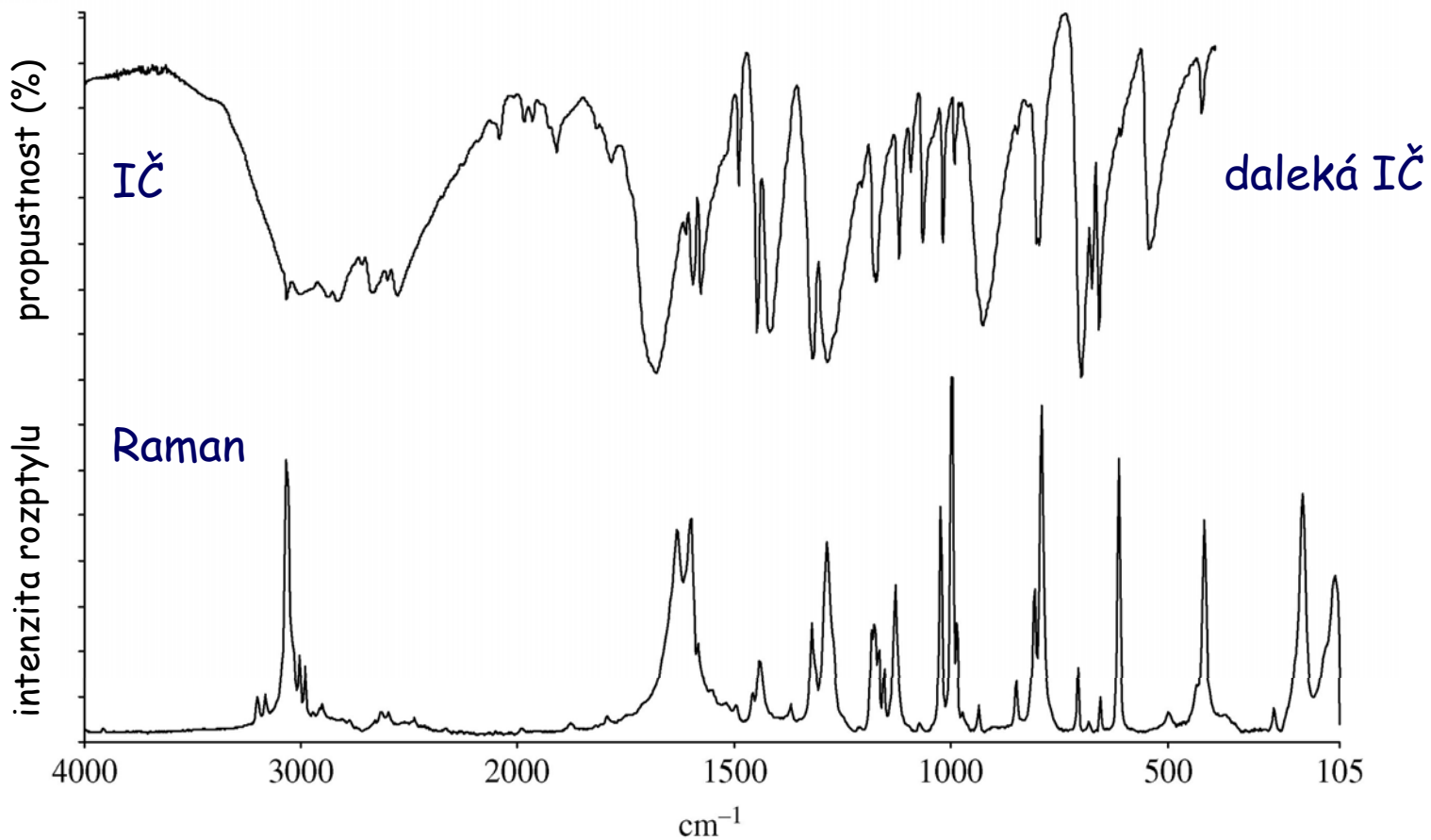
$f$  - silová konstanta (síla vazby)  
 $\mu$  - redukovaná hmotnost

(průměrně velký protein má přibližně 20 000 vibračních stupňů volnosti !!!)



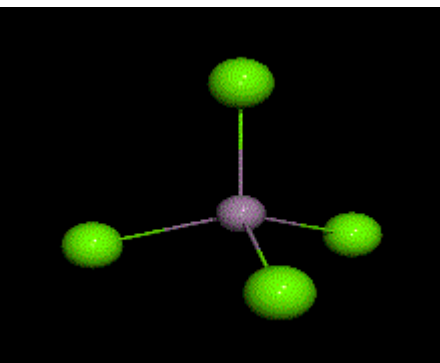
$$\left( \frac{\partial \bar{\mu}}{\partial Q_k} \right) \neq 0 \Rightarrow \text{vibrace aktivní v IČ spektru (změna dipólového momentu)}$$

$$\left( \frac{\partial \bar{\alpha}}{\partial Q_k} \right) \neq 0 \Rightarrow \text{vibrace aktivní v Ramanově spektru (změna polarizovatelnosti)}$$

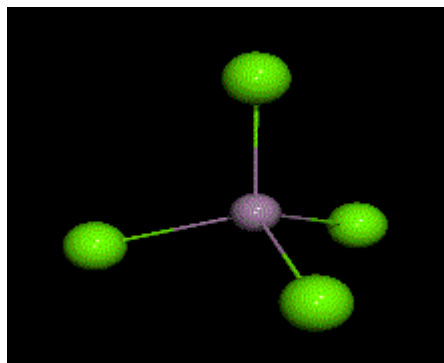


Infračervené absorpční a Ramanovo spektrum kyseliny benzoové

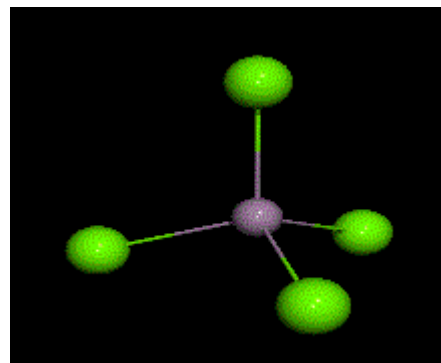
# Jednoduché molekuly - symetrie a vibrace (příklad $\text{CCl}_4$ )



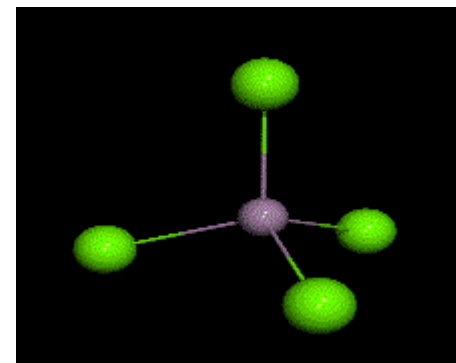
$\nu_2$  214  $\text{cm}^{-1}$   
2x degenerovaná



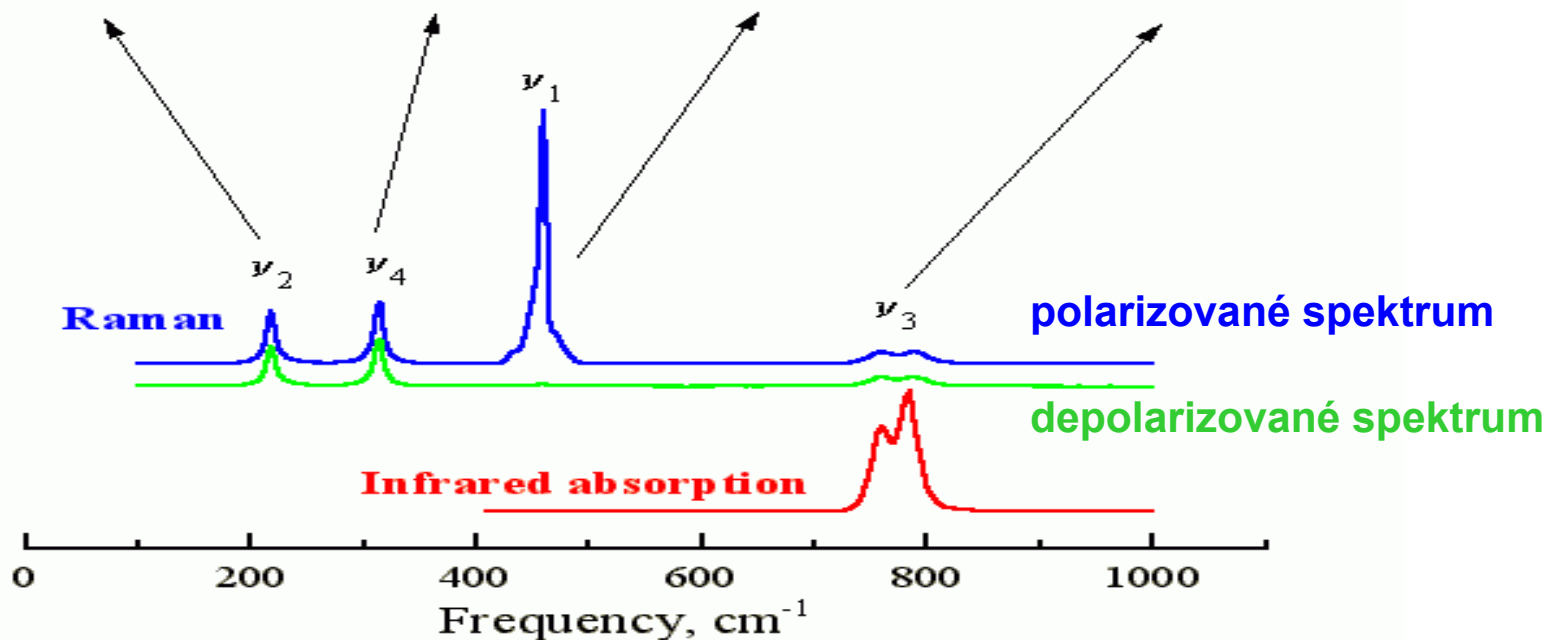
$\nu_4$  313  $\text{cm}^{-1}$   
3x degenerovaná

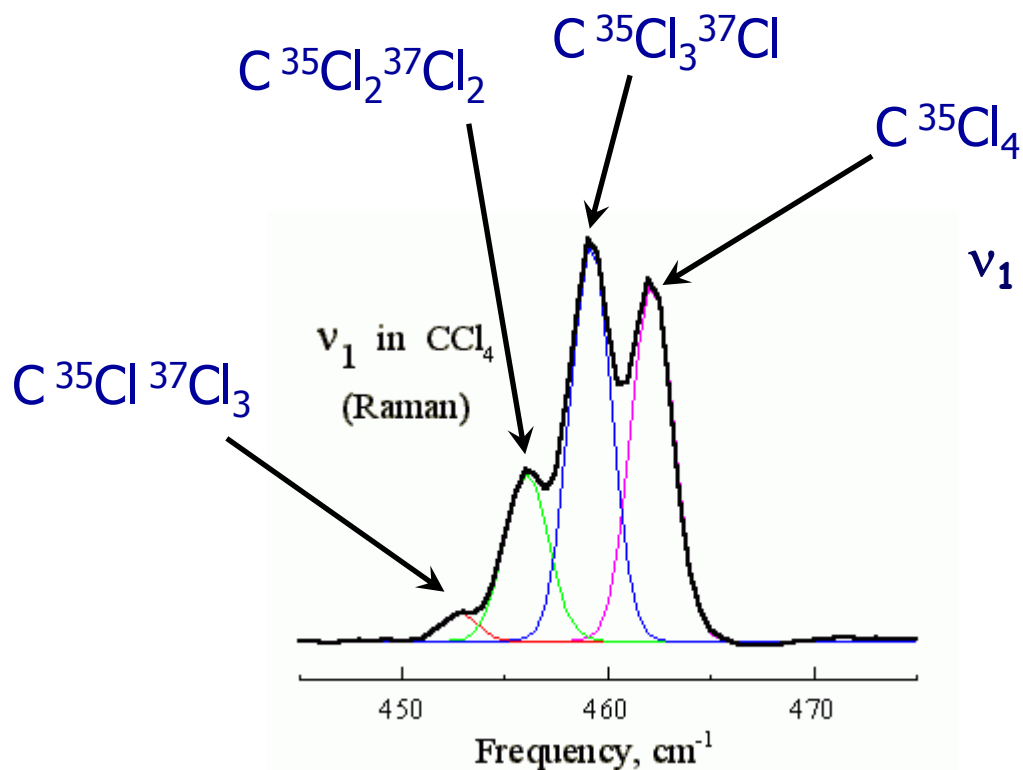


$\nu_1$  460  $\text{cm}^{-1}$   
plně symetrická

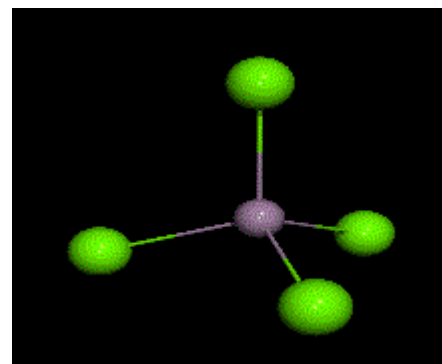


$\nu_3$  780  $\text{cm}^{-1}$   
3x degenerovaná





$\nu_1$  - symetrická valenční vibrace



Izotopické štěpení díky existenci dvou stabilních izotopů  $^{35}\text{Cl}$  a  $^{37}\text{Cl}$  (jednotlivé komponenty odpovídají různému zastoupení těchto dvou izotopů v molekule  $\text{CCl}_4$ )

- ✓ strukturní informaci lze získat v relativně krátkém čase (proto nachází využití například v proteomice)
- ✓ neomezuje se pouze na statický obrázek (citlivost ke změnám, možnost dynamických studií)
- ✓ velikost studovaných molekul a povaha okolního prostředí nepředstavují žádné omezení (a nebo jen výjimečně)
- ✓ je to mimořádně vhodná metoda pro zkoumání vztahu mezi **strukturou a funkcí biomolekul**



- **RS a IČ jsou nedestruktivní metody** (možnost testování biologické aktivity po skončení měření).
- **Aplikovatelné na vzorky libovolné morfologie** (roztoky vodné i nevodné, suspenze, precipitáty, gely, vrstvy, vlákna, prášky, monokrystaly, ...). Pro biomolekuly lze tak ověřit nakolik se shoduje či naopak odlišuje jejich struktura v krystalu a v roztoku.
- **Nenáročné na objem vzorku** (cca 10  $\mu\text{l}$  pro konvenční RS, 20  $\mu\text{l}$  pro IČ).
- **Rychlá časová škála absorpce i rozptylu ( $\approx 10^{-15}$  s)** - využití vibrační spektroskopie pro časově rozlišené studie procesů, které nejsou přístupné pomocí fluorescence či NMR.
- **Existence rozsáhlé databáze IČ a Ramanových spekter** (včetně přiřazení pásů jednotlivým vibracím a známých strukturně-spektrálních korelací).

- Voda představuje ideální rozpouštědlo pro Ramanovu spektroskopii (na rozdíl od IČ).
- Intenzivní pásy v Ramanových spektrech pocházejí od vibrací, při kterých dochází k velké změně polarizovatelnosti (např. aromatické molekuly).
- Relativně snadné měření i v oblasti nízkých vlnočtů (pod  $400\text{ cm}^{-1}$ , daleká IČ oblast)
- Selektivní rezonanční zesílení (tzv. rezonanční Ramanův jev).
- Povrchem zesílený Ramanův rozptyl (SERS)

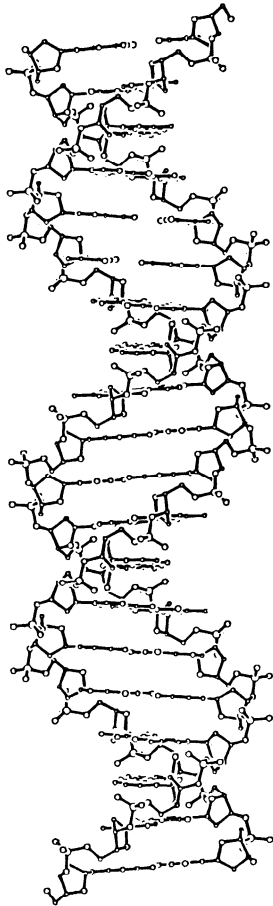
- Spektrální rozlišení je sice vyšší než v elektronových spektrech, ale nižší ve srovnání s NMR. Nedostatečné rozlišení může být částečně kompenzováno chemickou (izotopická záměna) nebo biologickou (bodová mutace) modifikací.
- Jsou potřeba relativně vysoké koncentrace vzorku ( $\approx 10\text{-}100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) byť v malých objemech.
- Jak  $\text{H}_2\text{O}$  tak i  $\text{D}_2\text{O}$  nejsou ideálním rozpouštědlem pro IČ spektroskopii (na rozdíl od Ramanova rozptylu).
- Ramanův jev (nepružný rozptyl světla) je ze své podstaty slabý jev (ve srovnání s absorpcí nebo emisí světla). Je tedy nutná značná čistota vzorků a péče při manipulaci s nimi (velmi vadí fluorescence příměsí).

- ◆ Pásky ve vibračním spektru představují detailní a jedinečný „otisk prstu“ dané molekuly.
- ◆ Složité molekuly  $\Rightarrow$  vibrační módy a jim příslušející spektrální pásky nemohou být přímo přiřazeny souřadnicím výchylek atomů ani z nich jednoduše vypočítány.
  - $\Rightarrow$  vibrační spektrum nelze použít pro výpočet struktury.
  - $\Rightarrow$  Vibrační spektrum daného strukturního motivu nemůže sloužit jako „otisk prstu“ této struktury dokud s ní není korelováno pomocí nezávislé metody.
  - $\Rightarrow$  Jako základ pro stanovení takové korelace zpravidla slouží struktury určené pomocí difrakčních nebo NMR metod.
  - $\Rightarrow$  Každý pás ve spektru odpovídá vibraci specifické skupiny atomů (tzv. normální vibrační mód) s dobře definovanými geometrickými charakteristikami (délka vazby, vazebné úhly, atd.)  $\Rightarrow$  správně přiřazený pás může sloužit jako jednoznačný indikátor (strukturní marker) tohoto strukturního rysu.

Ve vibračních spektrech nukleových kyselin rozlišujeme dva základní typy strukturních markerů:

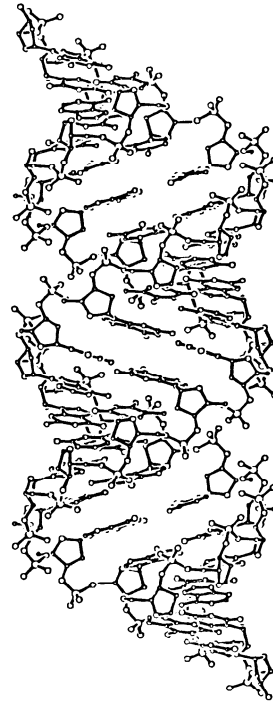
- **nukleosidové konformační markery** jako indikátory konformace cukru a torze glykosylu citlivé k torzním úhlům  $\delta$  ( $C2'$ -endo nebo  $C3'$ -endo konformace cukru) a  $\chi$  (*anti* nebo *syn* orientace báze)
- **páteřní konformační markery** jako indikátory fosfodiesterové torze citlivé k torzním úhlům  $\alpha$  a  $\xi$  popisujícím rotaci kolem esterových vazeb 5' O-P a 3' O-P)

Ve vibračních spektrech proteinů rozlišujeme řadu strukturních markerů, které jsou citlivými indikátory **bezprostředního okolí** postranních řetězců, jejich **interakce** s ním a **konformace** (Trp, Tyr, Cys). Pásky amidu I, II a III jsou citlivými indikátory **sekundární struktury**.



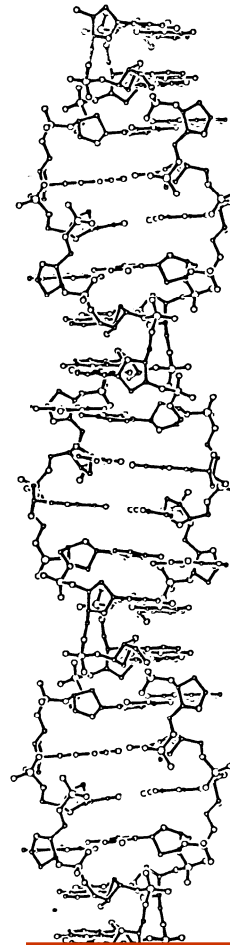
B-DNA

C2' endo/anti



A-DNA

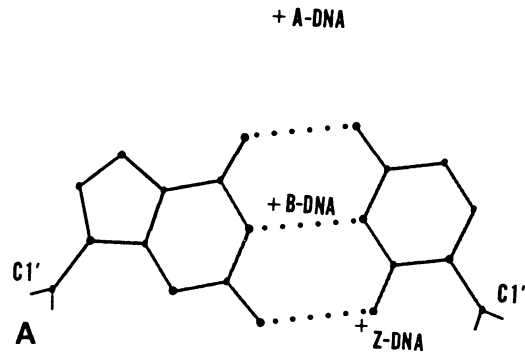
C3' endo/anti



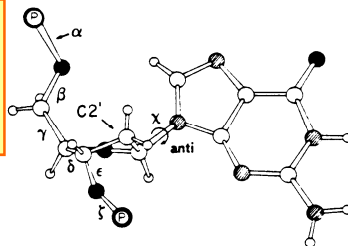
Z-DNA

C2' endo/anti (pyrimidiny)  
C3' endo/syn (puriny)

Obrázky skeletu B-DNA, A-DNA, a Z-DNA. Každé vlákno B-DNA a A-DNA obsahuje 20 nukleotidů stejné sekvence. Z-DNA je tvořena alternujícími GC páry.

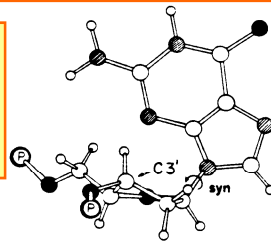


Deoxyguanosine  
v  
B-DNA



C2' endo Sugar Pucker

Deoxyguanosine  
v  
Z-DNA

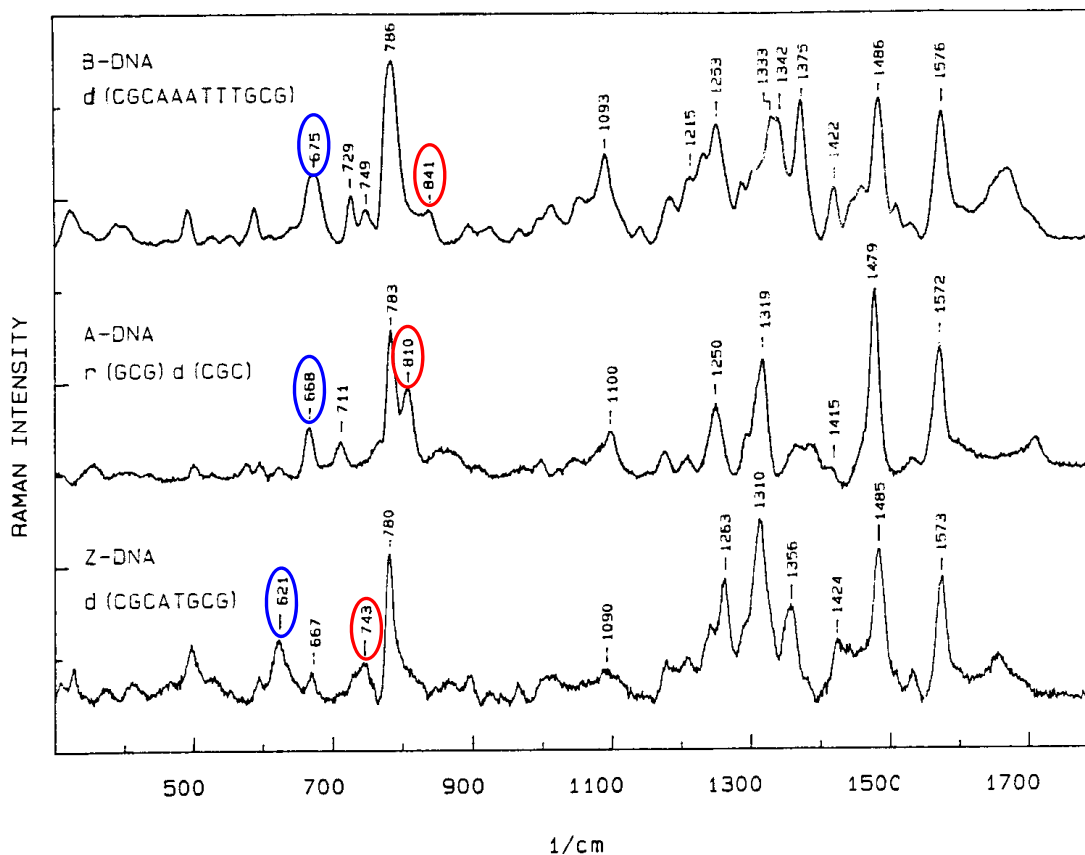


C3' endo Sugar Pucker

B

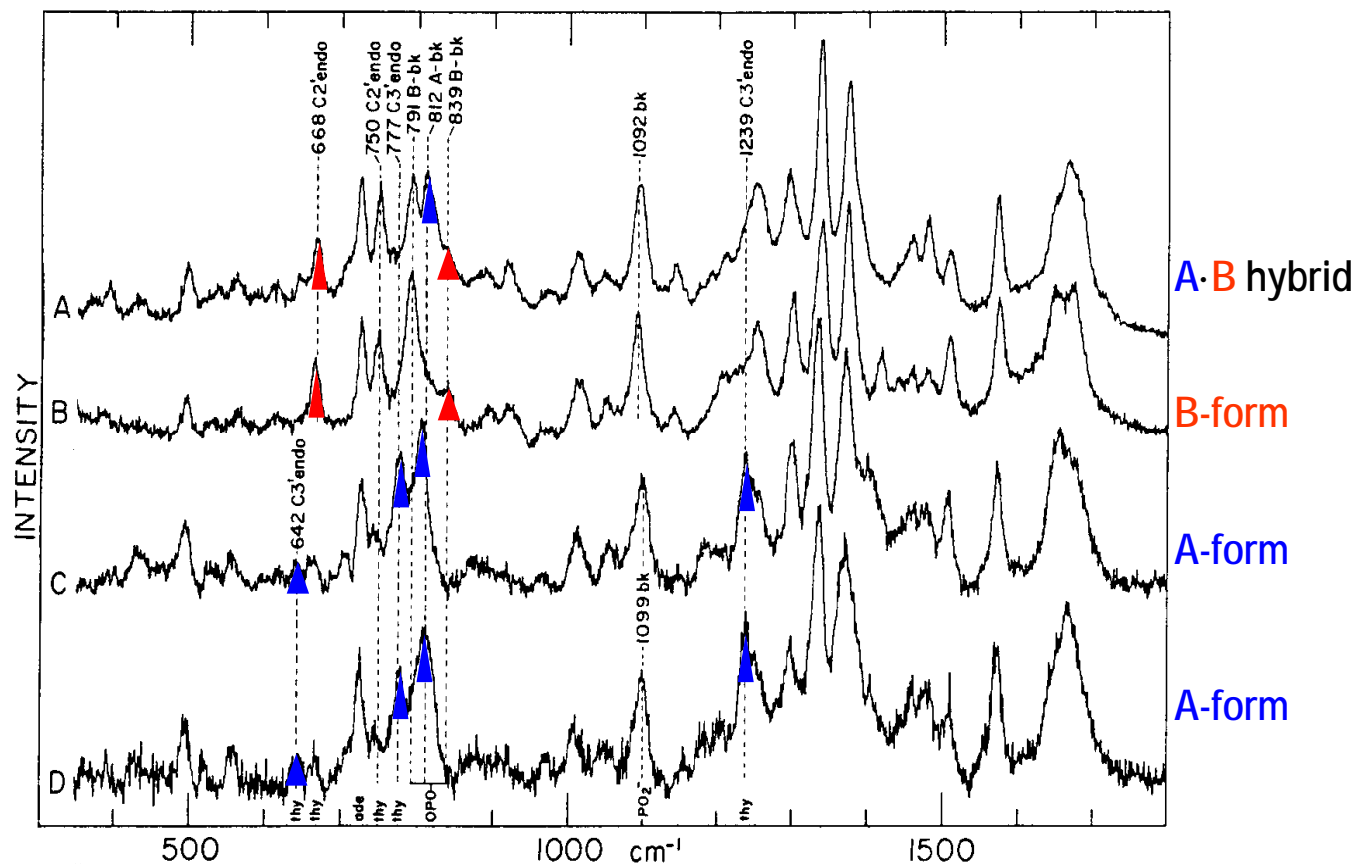
**A. Poloha osy helixu (+)** v rovině páru bází pro **B-DNA**, **A-DNA** a **Z-DNA**.

**B. Konformace nukleosidů** v kanonických DNA strukturách. **Nahoře:** **C2' endo** pucker s **anti** torzí glykosylu vyskytující se u všech reziduí v B-DNA a u pyrimidinových reziduí v Z-DNA. Diagram také ilustruje páteřní ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ) a glykosylové torzní úhly ( $\chi$ ). **Dole:** **C3' endo/syn** vyskytující se v purinových reziduích v Z-DNA. V A-DNA všechna rezidua zaujímají **C3' endo** sugar pucker s **anti** glykosylovou torzí.



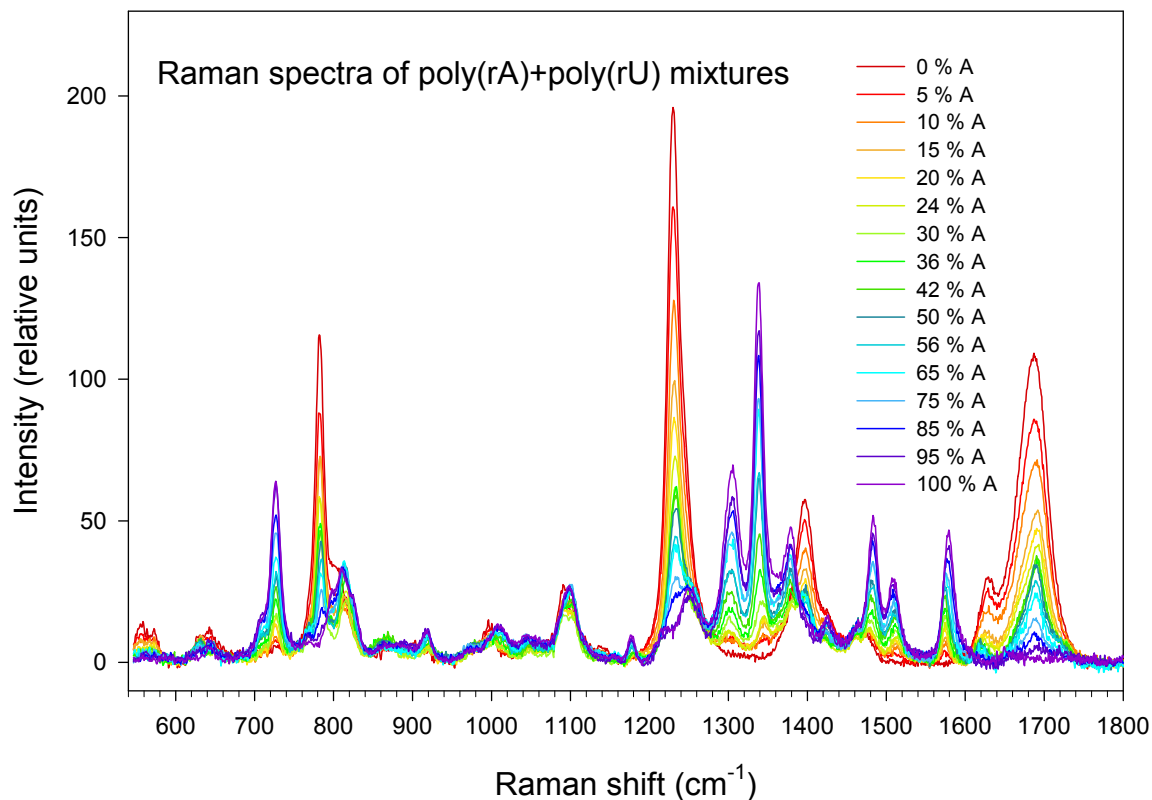
Ramanova spektra **krystalů A-, B-, a Z-DNA**. Označeny jsou nukleosidové a **páteřní** konformační markery.





## Ramanova spektra

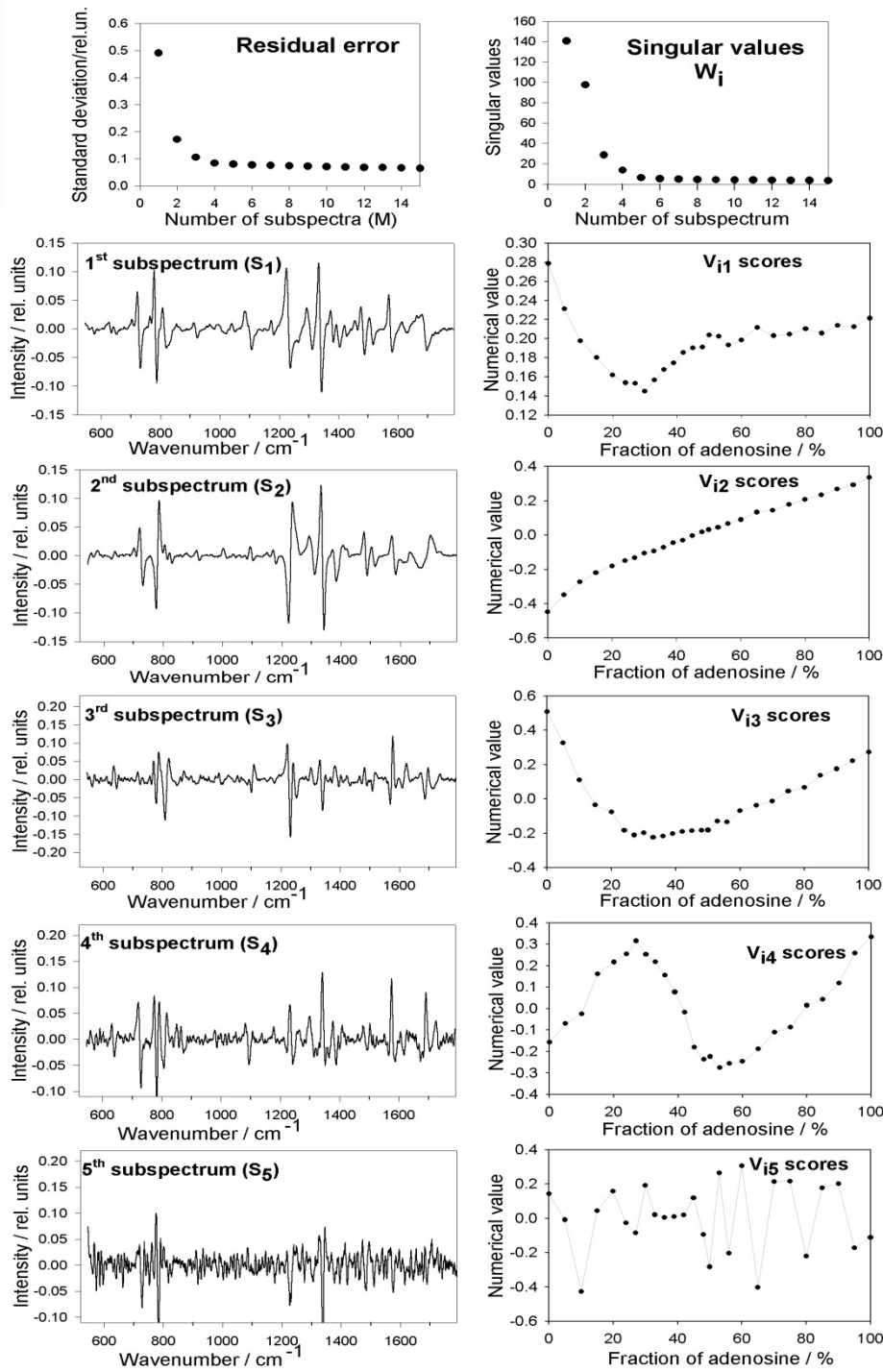
- A. poly(rA).poly(dT), pH 7.5 v 0.1 M NaCl (A·B hybridní struktura)
- B. poly(dA-dT).poly(dA-dT), pH 7.5 v 0.1 M NaCl (B-form)
- C. poly(dA-dT).poly(dA-dT) fiber při 75% RH (A-form)
- D. poly(rA).poly(dT) fiber při 75% RH (A-form)



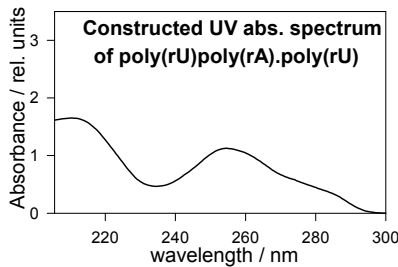
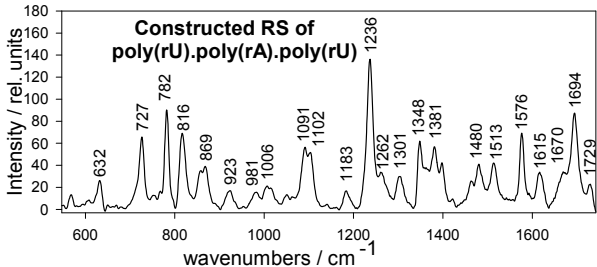
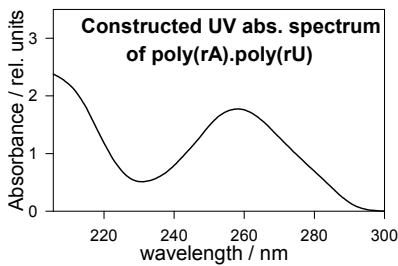
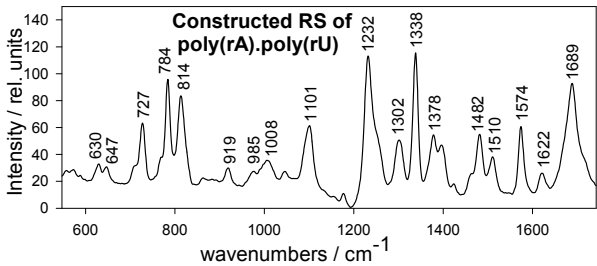
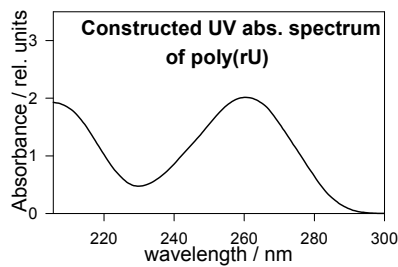
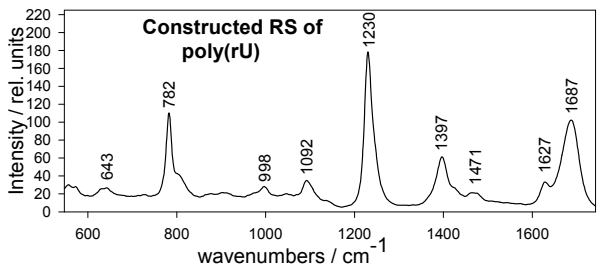
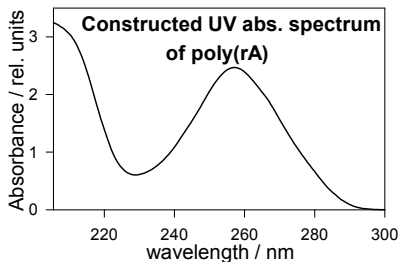
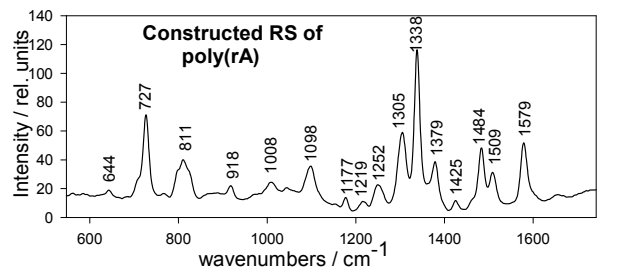
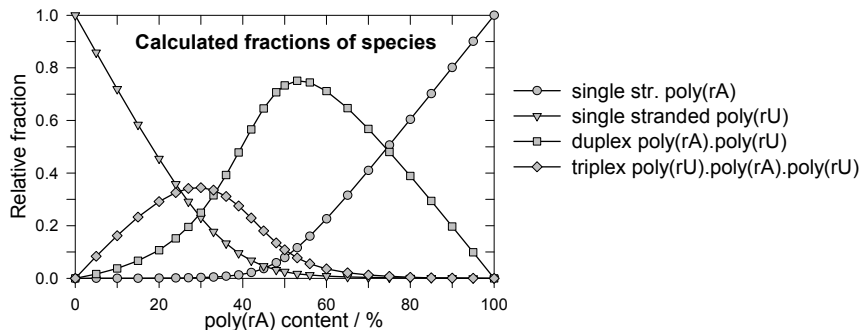
Soubor Ramanových spekter série vzorků poly(rA) a poly(rU) s postupně se měnícím poměrem A:U od čistého poly(rU) (červené) k čistému poly(rA) (fialové). Spektra byla normalizována a signál rozpouštědla byl odečten.

# Interakce poly(rA) s poly(rU)

Výsledky faktorové analýzy aplikované na první derivaci souboru Ramanových spekter směsi poly(rA) s poly(rU) s měnícím se poměrem A:U.

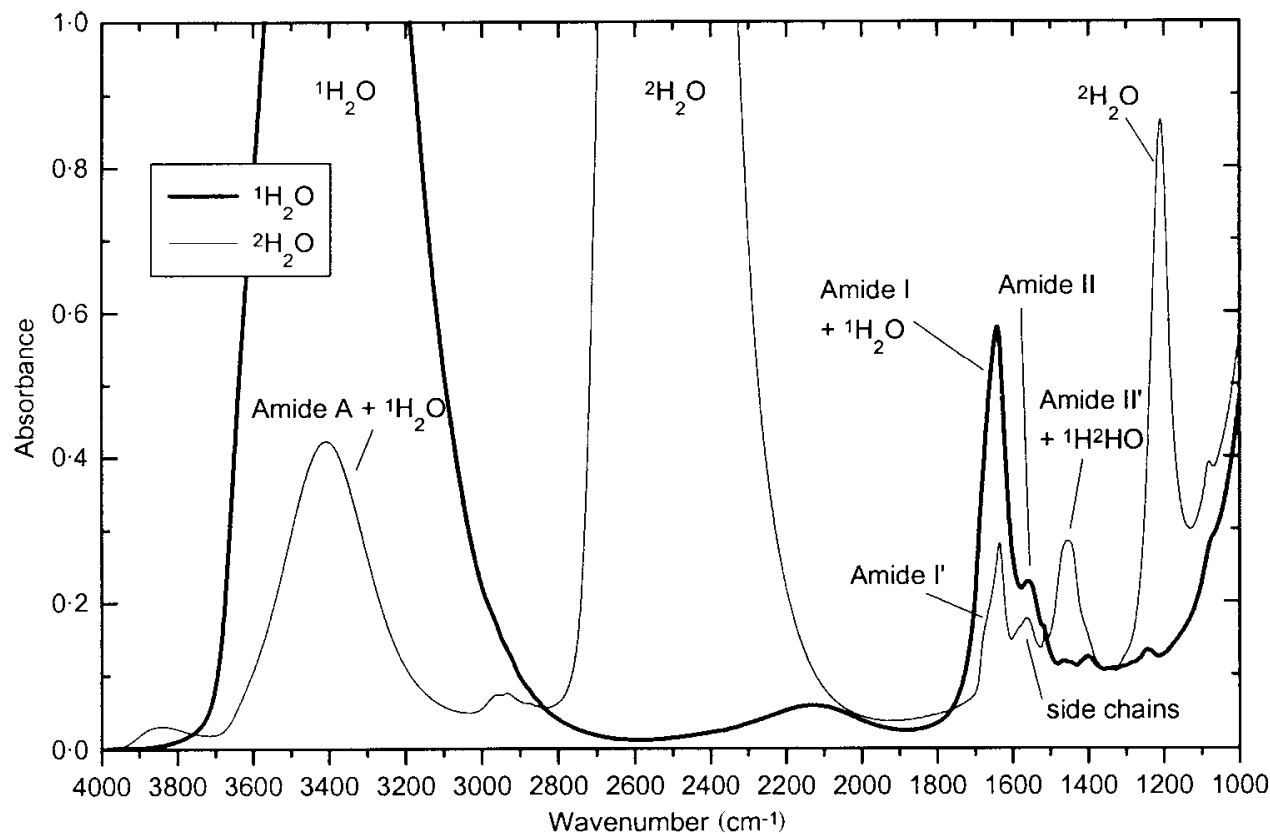


# Interakce poly(rA) s poly(rU)



Byly identifikovány 4 složky:  
jednovláknová poly(rU),  
jednovláknová poly(rA)  
poly(rA).poly(rU) duplex a  
poly(rU):poly(rA)\*poly(rU) triplex.

Byla izolována spektra čistých  
komponent

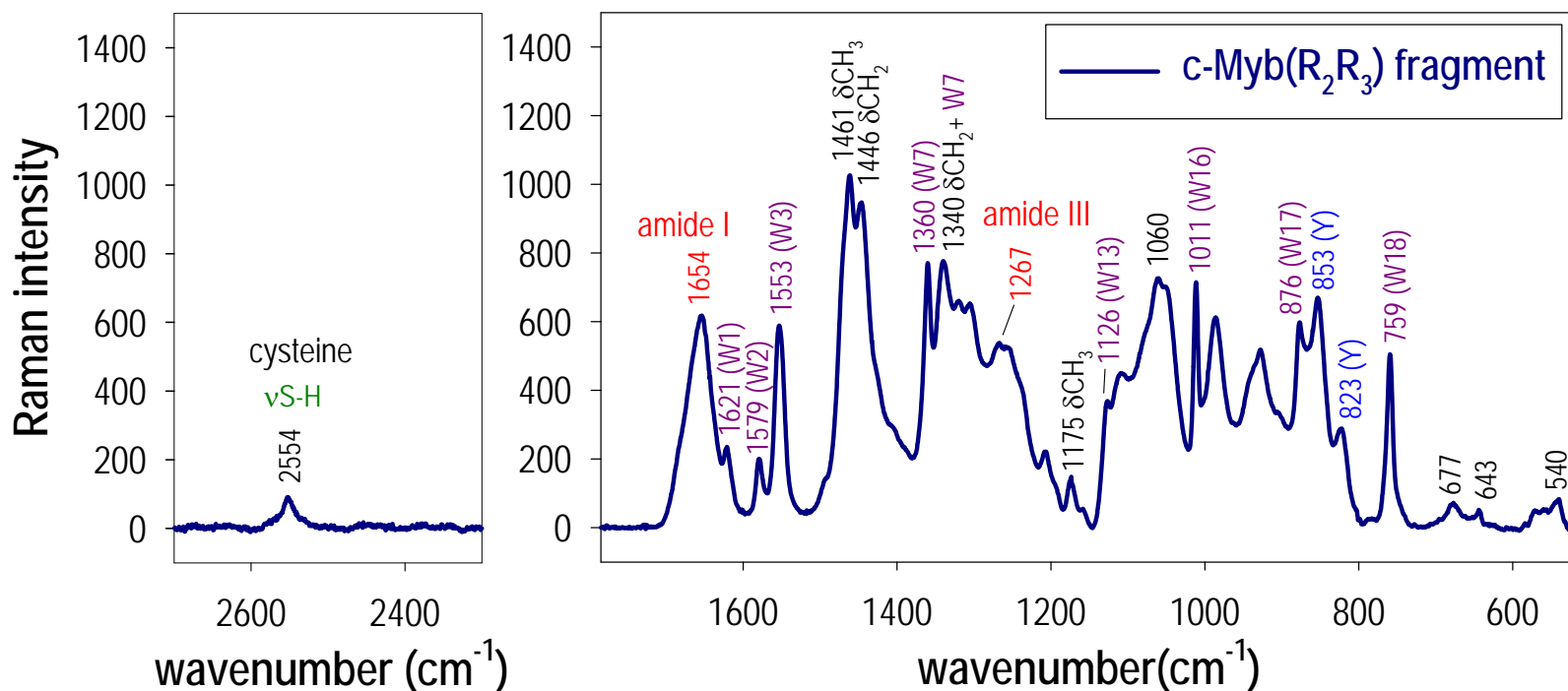


IČ spektrum proteinu v  $\text{H}_2\text{O}$  (tučně) a  $\text{D}_2\text{O}$  (slabě).

Tloušťka kyvety byla cca  $6 \mu\text{m}$  ( $\text{H}_2\text{O}$ ) respektive  $20 \mu\text{m}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ).

## Ramanovo spektrum ( $R_2R_3$ ) fragmentu proteinu c-Myb

(minimální sekvence pro specifickou vazbu k cílové sekvenci DNA)



Fragment c-Myb( $R_2R_3$ ) obsahuje 6 tryptofanů (3 v  $R_2$  i  $R_3$ ), 2 tyrosiny (1 v  $R_2$  i  $R_3$ ), a 1 cystein (v  $R_2$ ). Jejich pásy v Ramanově spektru dominují.

# Ramanova a rezonanční Ramanova spektroskopie

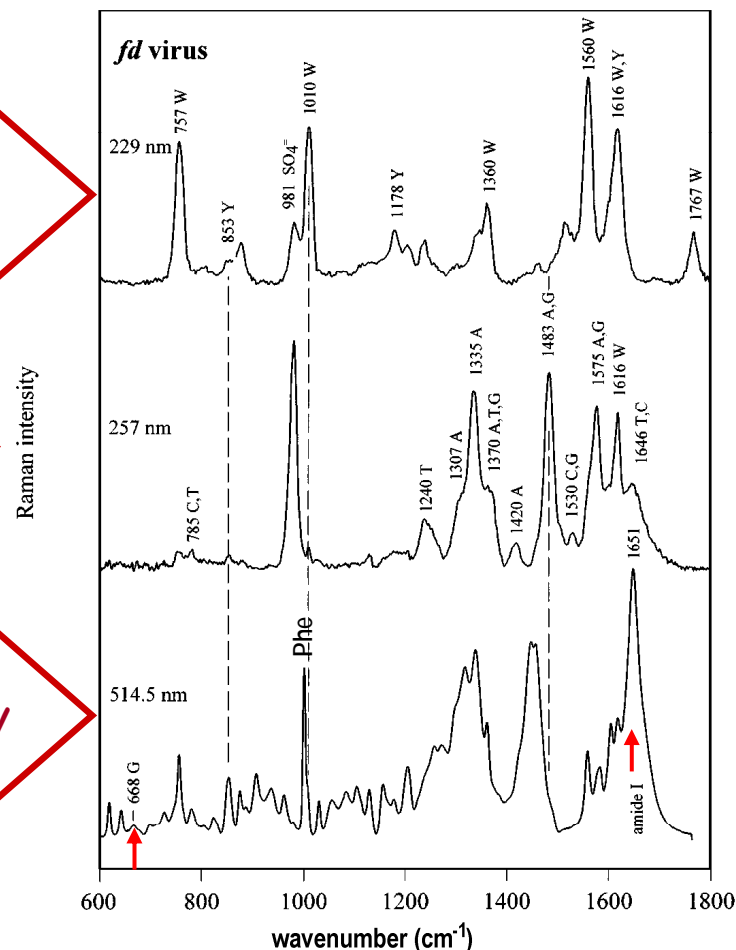
## Volba excitace $\Rightarrow$ selektivita !!!

**Rezonance s aromatickými zbytky (229 nm)** - spektru dominují pásy Trp (W) a Tyr (Y) proteinových podjednotek

**Rezonance s virovou DNA (257 nm)** - spektru dominují pásy bazí jednovláknové DNA (A,G,T,C)

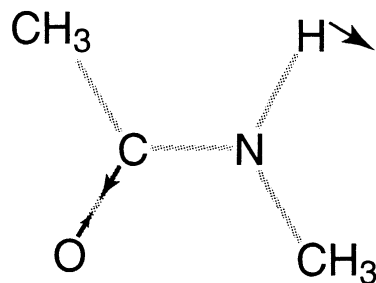
**Nerezonanční excitace (514,5 nm)** - spektru dominují pásy proteinových podjednotek obálky viru (tvoří cca 88% hmotnosti viru)

G @  $668\text{ cm}^{-1} \Rightarrow$  3' endo/anti (A marker)  
amid I @  $1651\text{ cm}^{-1} \Rightarrow$   $\alpha$  helix

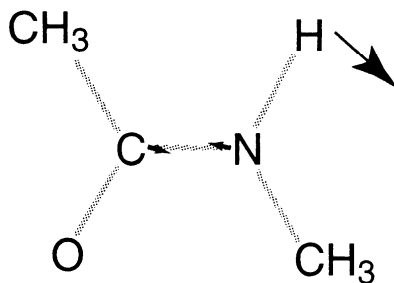


Ramanova spektra ( $600\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ ) fd viru excitovaná **514.5 nm** (dole,  $50\text{ mg/mL}$ ), **257 nm** (uprostřed,  $0.5\text{ mg/mL}$ ) a **229 nm** (nahore,  $0.5\text{ mg/mL}$ ).

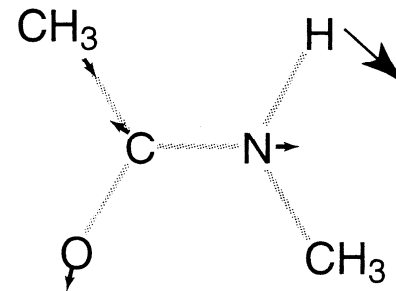
# Vibrační spektroskopie a struktura peptidů a proteinů



Amid I



Amid II



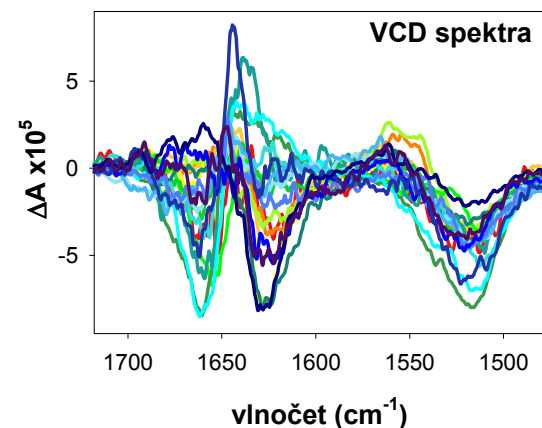
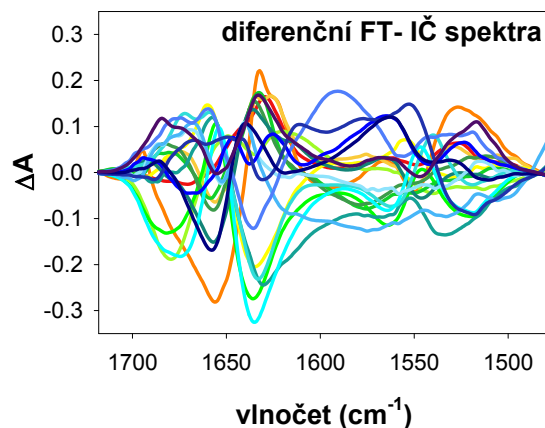
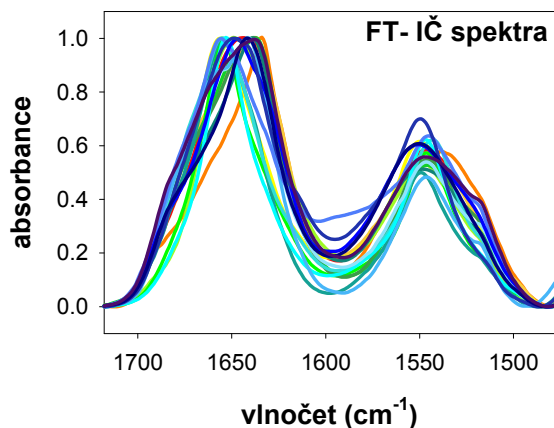
Amid III

Schematické znázornění vibračních módů **amid I**, **amid II** a **amid III** v molekule *N*-methylacetamidu, modelu peptidové skupiny v **trans** konformaci. Jejich frekvence odrážejí strukturu polypeptidového řetězce ( $\text{NH}_2\text{-C}_\alpha\text{HR}_1\text{-CO-NH-C}_\alpha\text{HR}_2\text{-CO-}$ ) nezávisle na typu postranního řetězce ( $\text{R}_1, \text{R}_2, \dots$ ).

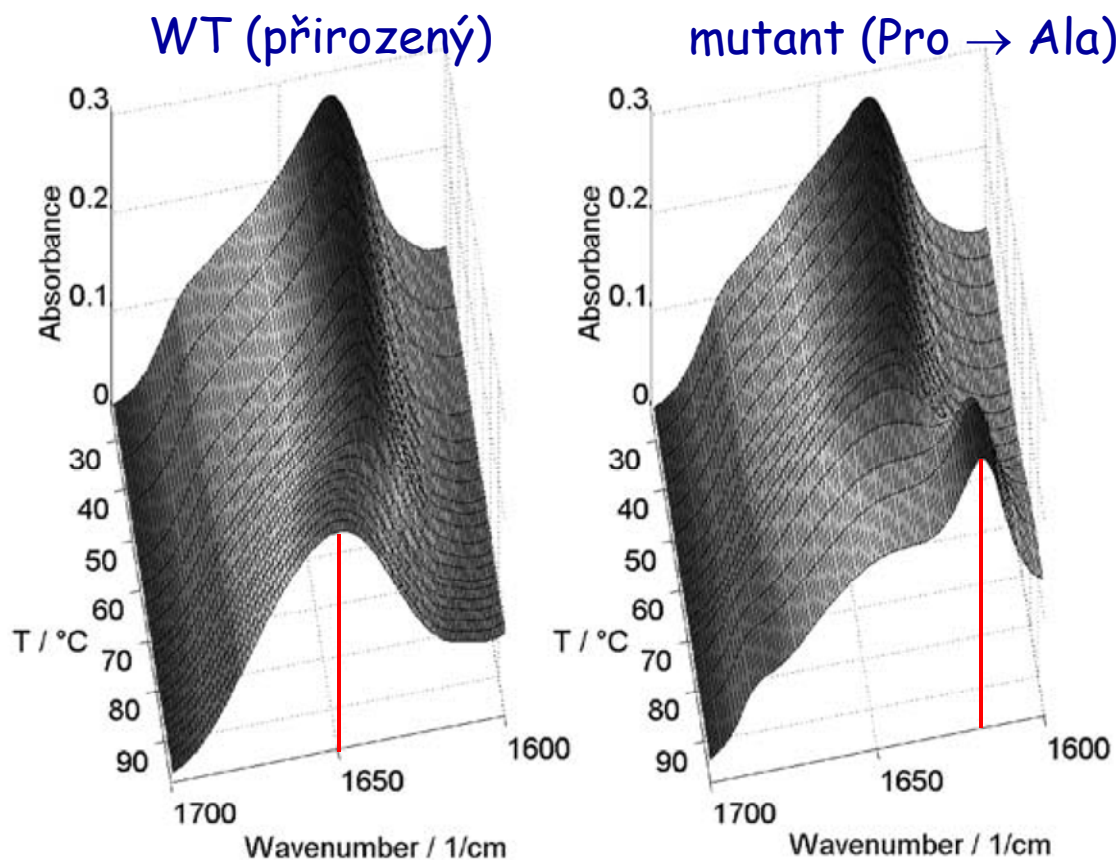


Distribuce sekundárních struktur v referenčním souboru 19 proteinů  
(v % zastoupení jednotlivých konformací).

sekundární struktura	Kabsch a Sander				
	helix	$\beta$ -struktura	obrátka	ohyb	ostatní
minimum	0	0	6,9	1,9	11,1
maximum	77,1	47,7	20,9	20,5	33,0
střední hodnota	26,7	23,1	12,8	13,7	23,7
směrodatná odchylka	20,4	14,5	3,8	4,8	5,9

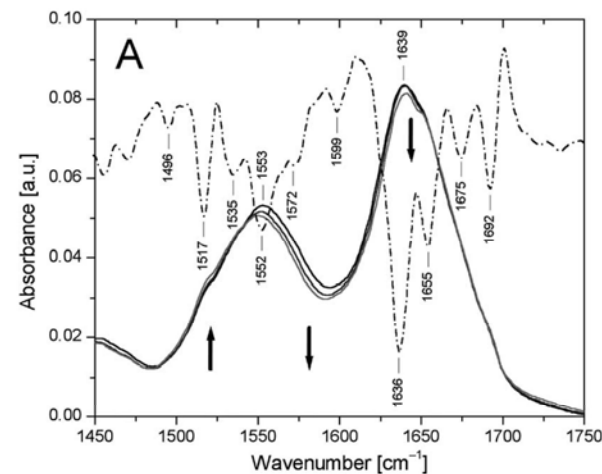
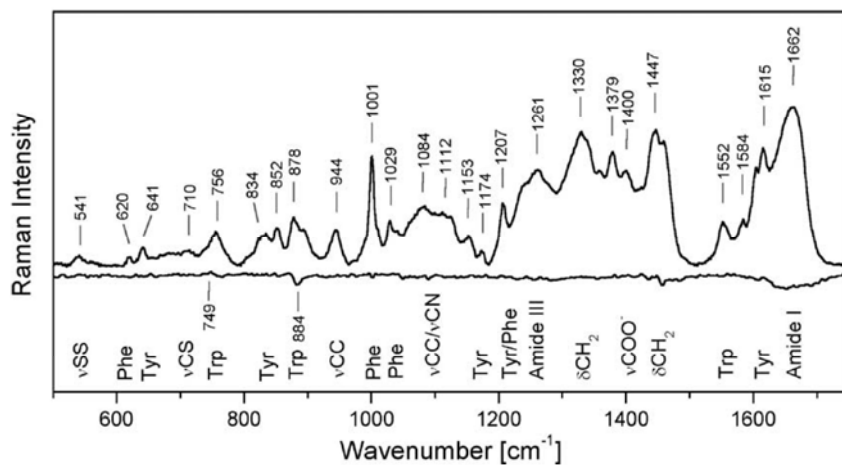
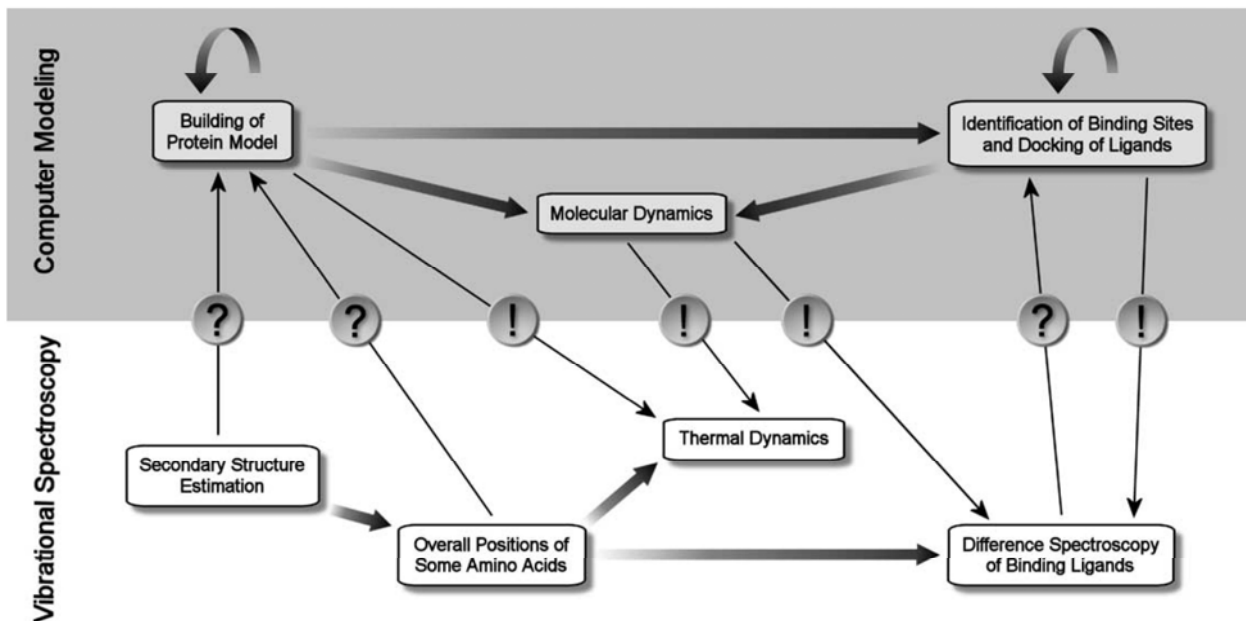


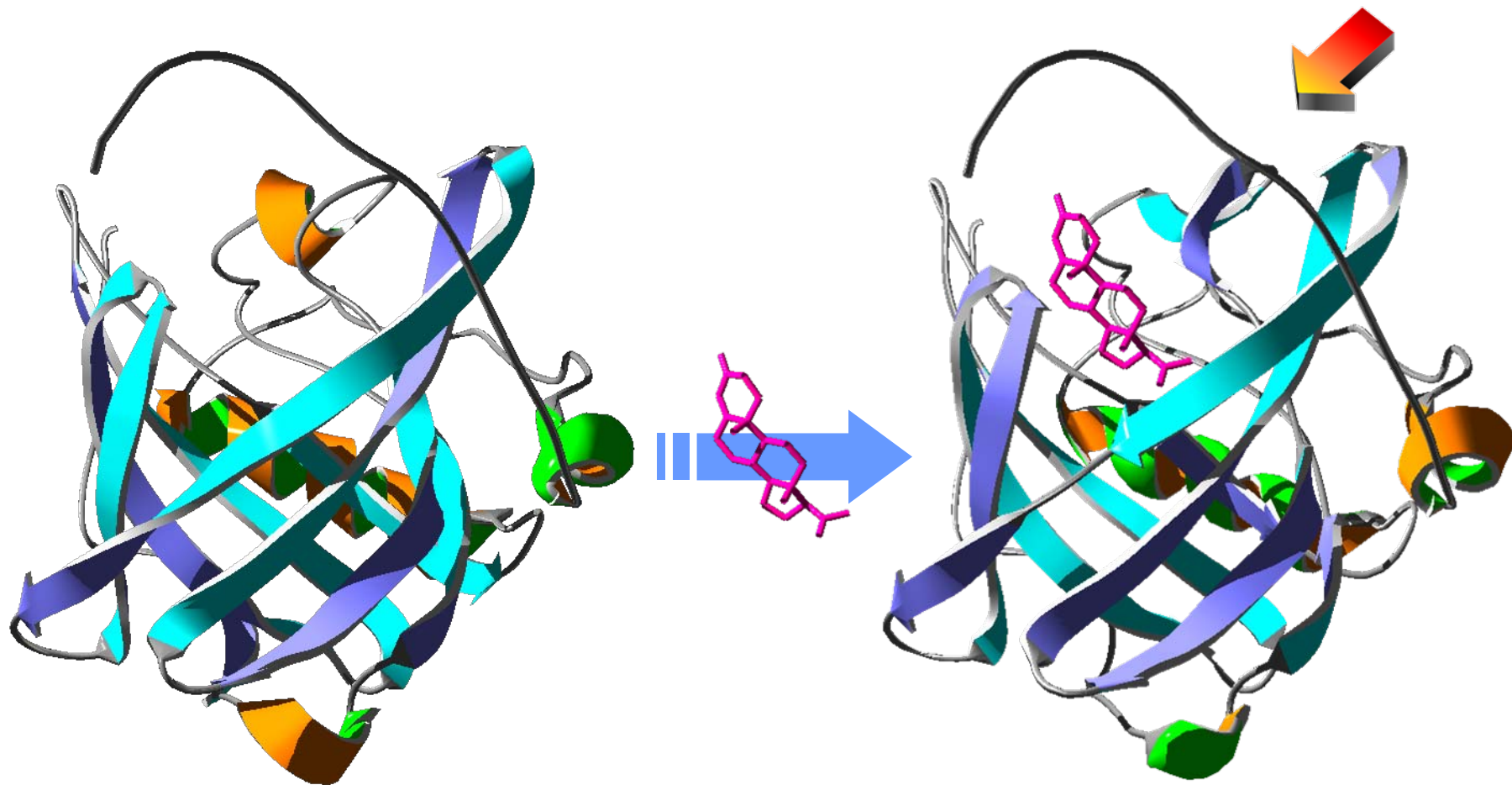
Tvarová variabilita **FT-IČ** (vlevo), **diferenčních FT-IČ** (uprostřed) a **VCD** (vpravo) spekter referenčního souboru 19 proteinů v H<sub>2</sub>O v oblasti amidu I a II. FT-IČ spektra jsou normalizována na  $A_{\max} = 1$  amidu I. Diferenční spektra byla získána odečtením průměrného FT-IČ spektra referenčního souboru od jednotlivých spekter.



**Fig. 13.** Temperature-dependent IR spectra of the  $\alpha$ -amylase inhibitor tendamistat, a small  $\beta$ -sheet protein. With a midpoint temperature of 82 °C, the wild-type protein unfolds and adopts an irregular structure. This leads to a broad amide I band centred at 1650  $\text{cm}^{-1}$  (left). Mutation of the three Pro residues to Ala does not significantly alter the amide I band at room temperature (right). However, heating the Pro-free protein results in a downshift of the amide I maximum indicating aggregation of the sample. Moreover, the transition is already observed at 67 °C (C. Zscherp, H. Aygün, J. W. Engels & W. Mäntele, unpublished observations).

# Vibrační spektroskopie a počítačové modelování proteinů





**Vlevo:** kyselý  $\alpha_1$ -glykoprotein (orosomukoid) v nativním stavu.

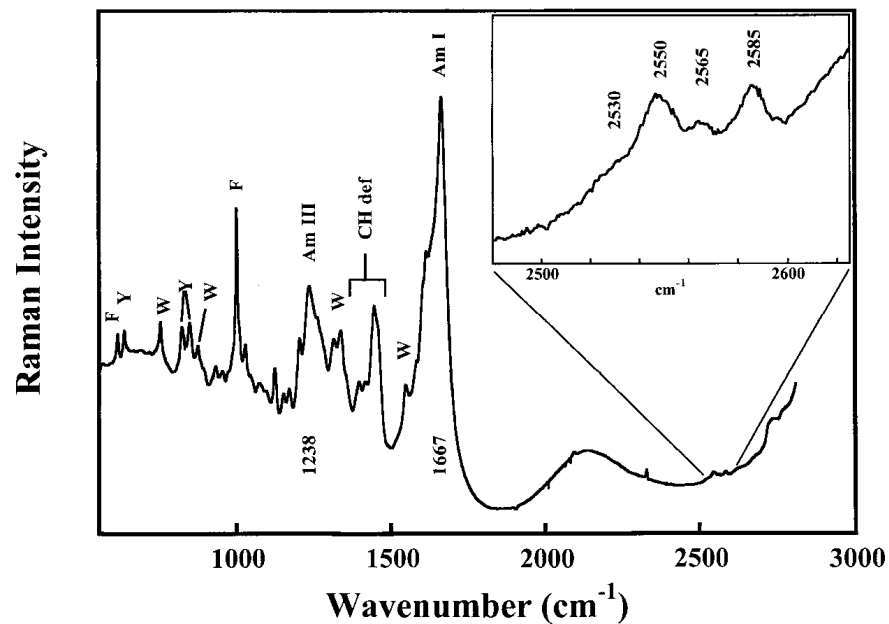
**Vpravo:** vazba progesteronu vede k transformaci  $\alpha$ -helikálního segmentu ve smyčce nad  $\beta$ -barelem na antiparalelní  $\beta$ -strukturu (označeno šipkou).

# Side-Chain Conformations and Local Environments

## Cysteine S-H stretching vibration (2500 - 2600 $\text{cm}^{-1}$ )

### Dependence of the Raman S-H frequency and bandwidth on hydrogen bonding

Hydrogen-bonding state of S-H group	S-H frequency ( $\text{cm}^{-1}$ )	Band width ( $\text{cm}^{-1}$ )	Examples
No hydrogen bond	2581–2589	12–17	Thiols in $\text{CCl}_4$ (dilute)
S acceptor	2590–2595	12–17	Thiols in $\text{CHCl}_3$
Weak S-H donor	2575–2580	20–25	Thiol neat liquids; thiols in thioethers
Moderate S-H donor	2560–2575	25–30	Thiols in acetone; crystal structures
Strong S-H donor	2525–2560	35–60	Thiols in dimethylacetamide; crystal structures
S-H donor and S acceptor	2565–2575	30–40	Thiols in $\text{H}_2\text{O}$

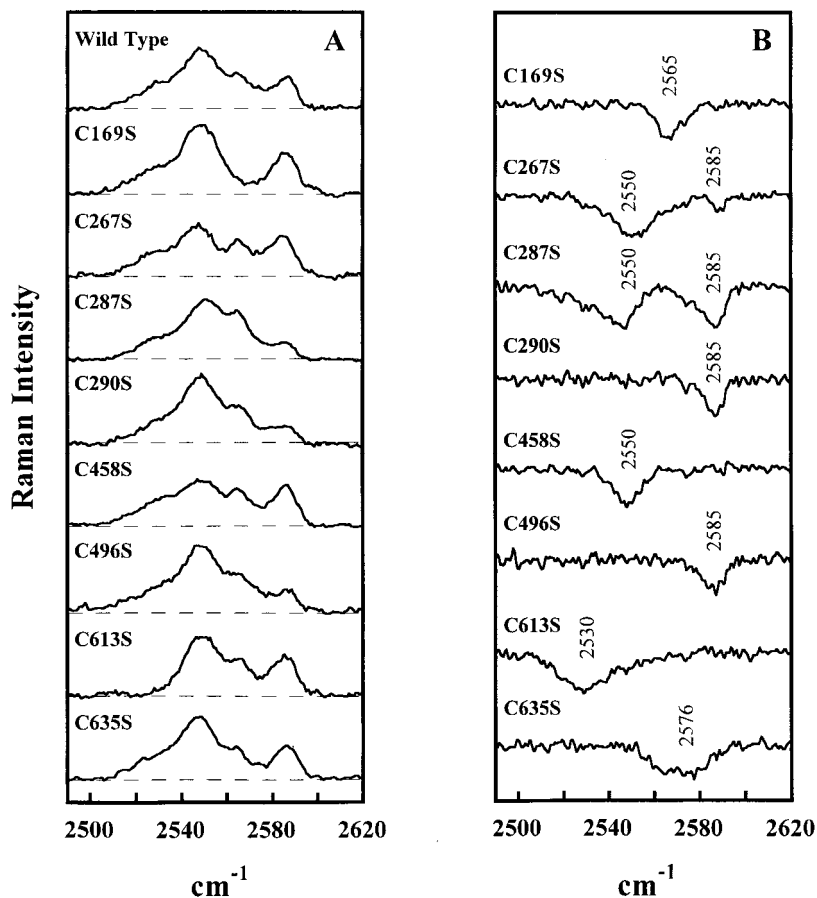


Raman spectrum (670–2800  $\text{cm}^{-1}$ ) of the P22 trimeric tailspike protein at 10°C. The inset at upper right, which shows an amplification of the spectral interval 2480–2620  $\text{cm}^{-1}$ , exhibits the composite S-H stretching profile (bands at 2530, 2550, 2565 and 2585  $\text{cm}^{-1}$ ) of the eight cysteine residues per unit. The data are not corrected for solvent contribution. From Raso et al. *J. Mol. Biol.* 307 (2001) 899.

# Side-Chain Conformations and Local Environments

## Cysteine

S-H Raman signatures (2480-2630  $\text{cm}^{-1}$ )  
of tailspike cysteine residues

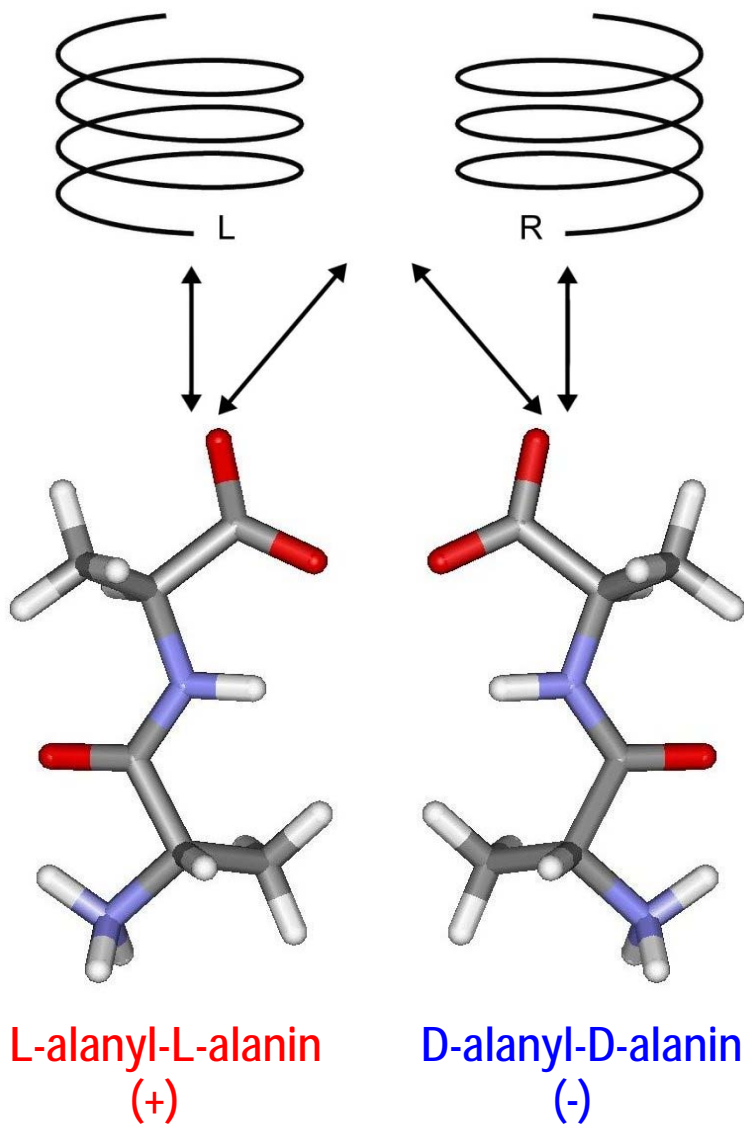


Spectral contributions and hydrogen-bond strengths of cysteine sulfhydryl groups of the native P22 tailspike protein

Residue	Raman S-H band <sup>a</sup>	Hydrogen-bond strength <sup>b</sup>
Cys169	2565	Moderate
Cys267	2550 (90%) 2585 (10%)	Strong
Cys287	2550 (63%) 2585 (37%)	Very weak
Cys290	2585	Very weak
Cys458	2550	Strong
Cys496	2585	Very weak
Cys613	2530	Very strong
Cys635	2576	Weak

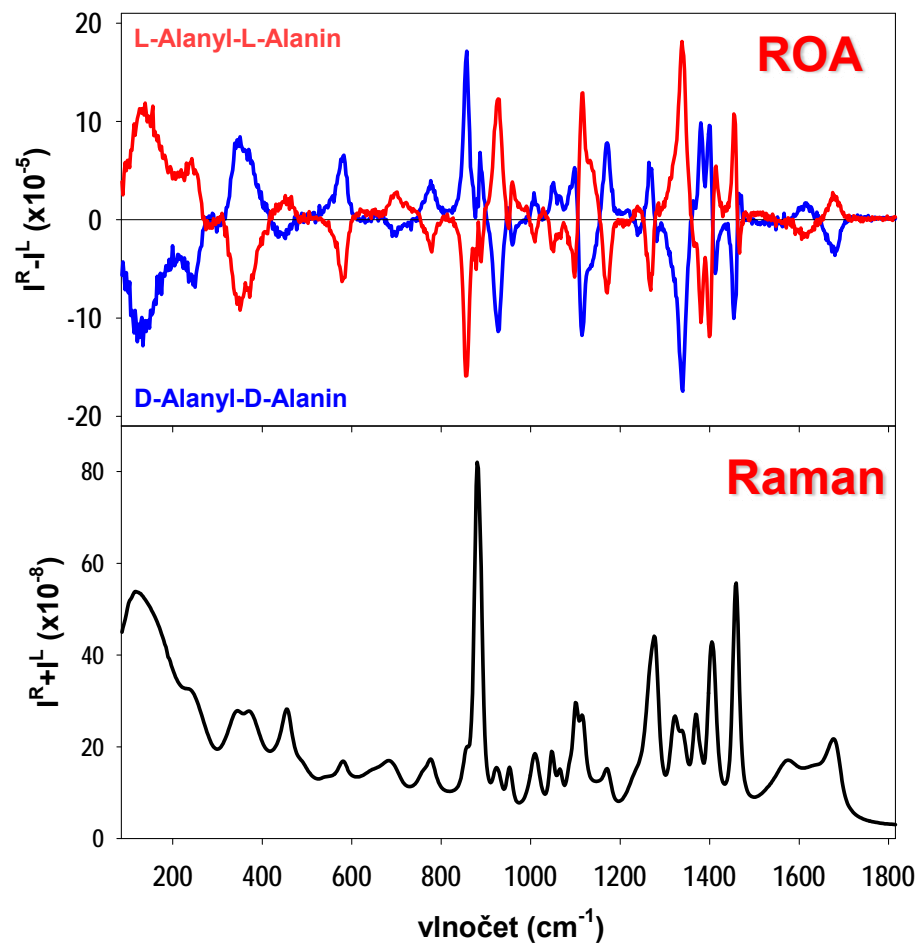
<sup>a</sup> Raman band center (in  $\text{cm}^{-1}$  units). Numbers in parentheses are the percentages of total intensity contributed by the specified cysteine sulfhydryl at the indicated  $\text{cm}^{-1}$  value.  
<sup>b</sup> Based upon the results reported by Li & Thomas.<sup>11</sup>

- A. The Raman S-H profiles observed for the wild-type tailspike and for each of eight Cys  $\rightarrow$  Ser mutants, as labeled.
- B. Raman difference spectra computed as mutant minus wild-type, for each of the eight Cys  $\rightarrow$  Ser mutants. In each trace, the S-H Raman signature of the mutated Cys site is revealed as a negative band.



pro molekulu (+)  $\Delta I = I_R(+)-I_L(+)$

pro molekulu (-)  $-\Delta I = I_R(-)-I_L(-)$

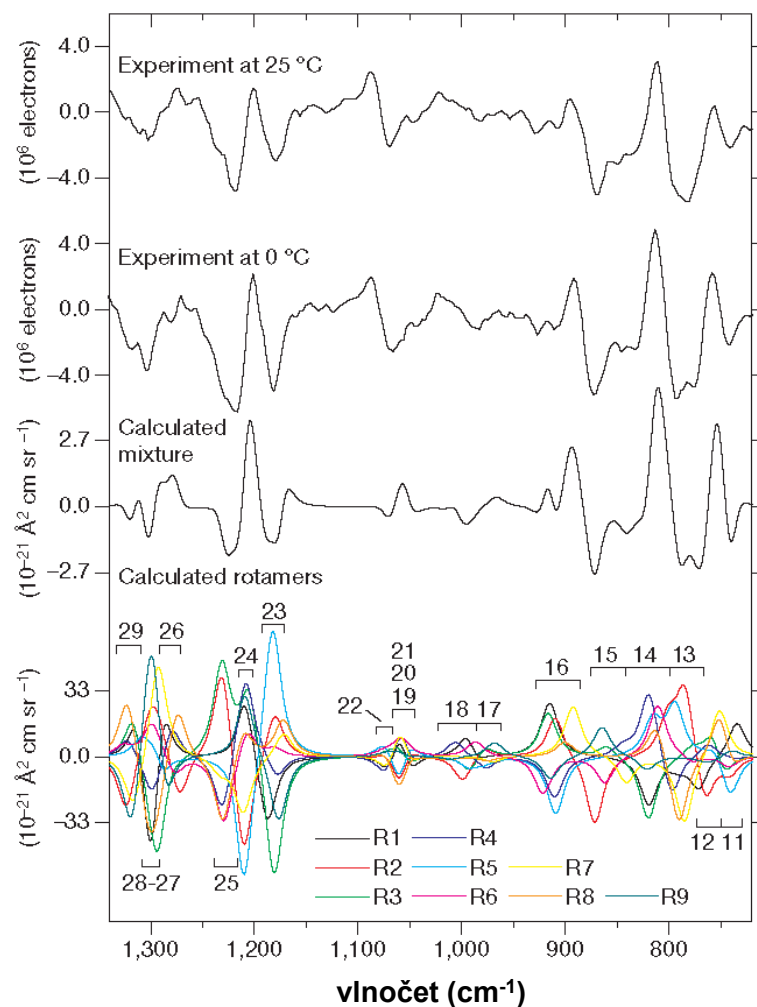
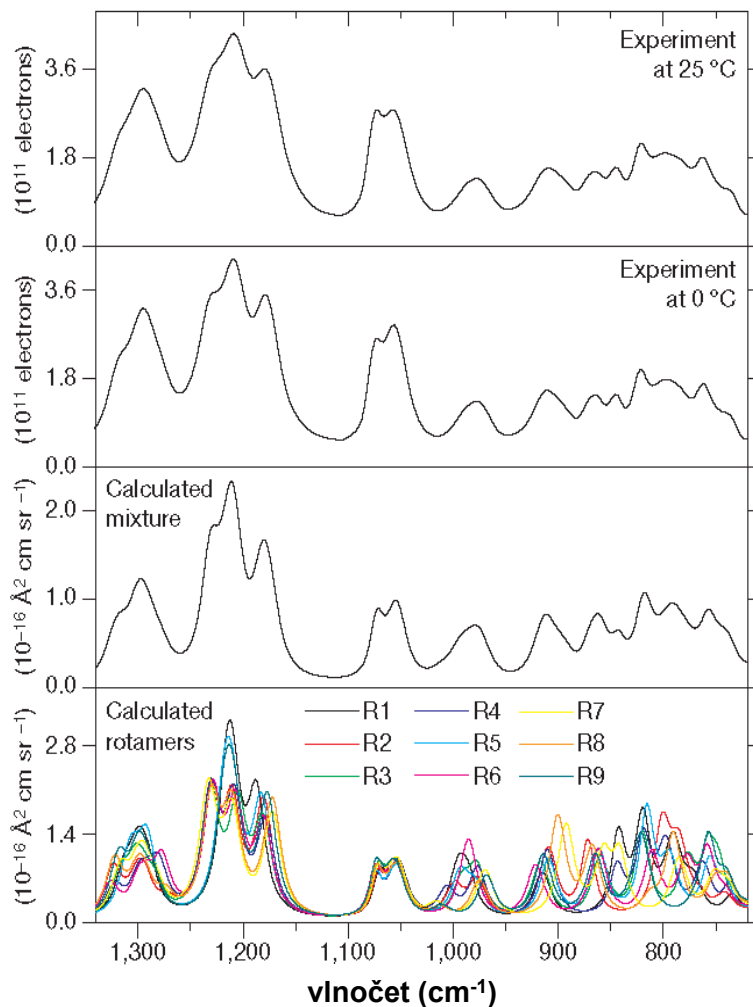
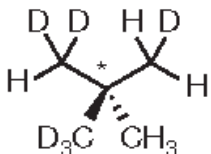


- diferenční metoda - měříme rozdílnou odezvu *chirální molekuly* vůči *pravo- a levotočivě kruhově polarizovanému záření*,
- spojuje *stereochemickou citlivost* konvenční optické aktivity *s vyšším rozlišením* a tudíž i bohatším strukturním obsahem a konformační citlivostí vibrační spektroskopie,
- v případě konformačně flexibilních molekul můžeme pomocí VOA rozlišit konformace, jež jsou stabilní z hlediska časové škály vibračních pohybů (na rozdíl od NMR, kde díky pomalejší časové škále (v porovnání s konformační konverzí) může dojít k vyrušení strukturních rysů, je vibrační spektrum váženým průměrem spekter jednotlivých konformerů).
  - **vibrační cirkulární dichroismus (VCD)**
  - **Ramanova optická aktivita (ROA)**



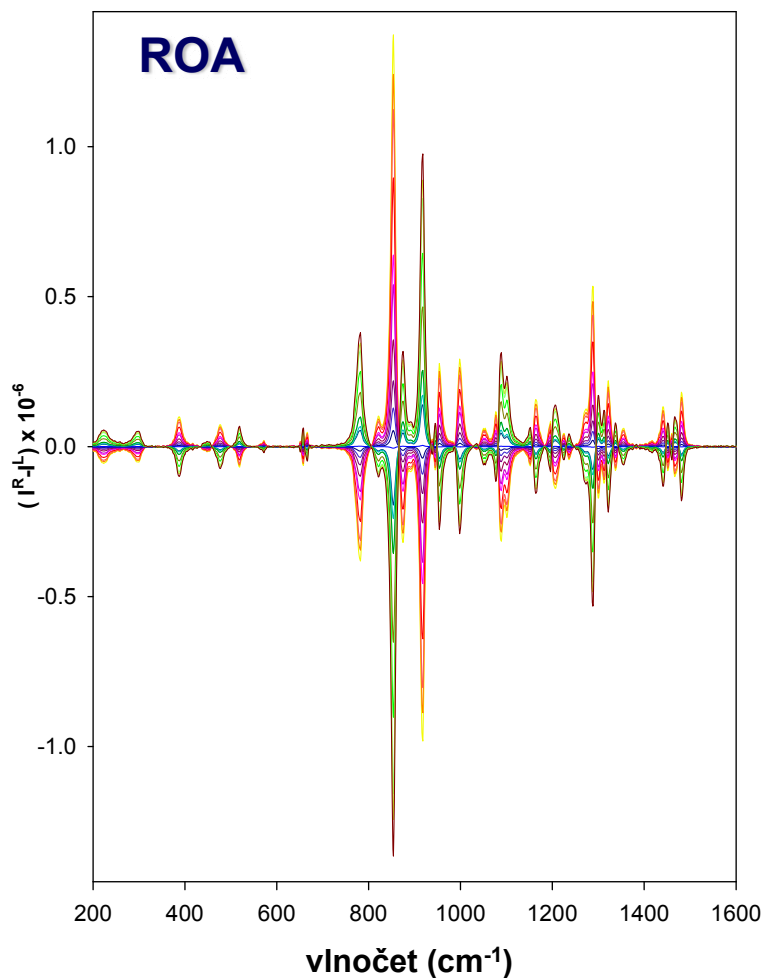
- stanovení absolutní konfigurace bez krystalizace

## Chirálně deuterovaný neopentan (R)-[<sup>2</sup>H<sub>1</sub>, <sup>2</sup>H<sub>2</sub>, <sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-neopentan



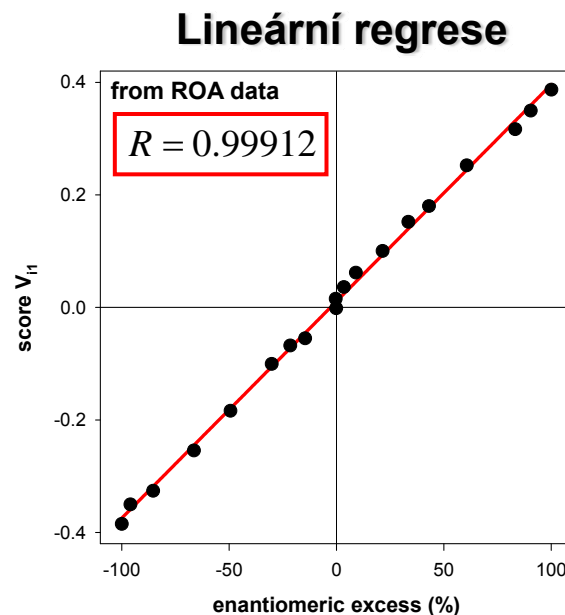
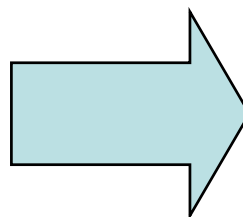
Ramanova a ROA spektra (R)-[<sup>2</sup>H<sub>1</sub>, <sup>2</sup>H<sub>2</sub>, <sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-neopentanu. Dvě horní křivky ukazují změřená spektra. Spodní křivky ukazují jednotlivá vypočítaná spektra devíti rotamerů R1 to R9 a zprůměrované spektrum směsi všech rotamerů.

- stanovení absolutní konfigurace bez krystalizace
- přímé měření enantiomerního přebytku bez nutnosti separace enantiomerů



enantiomerní čistota

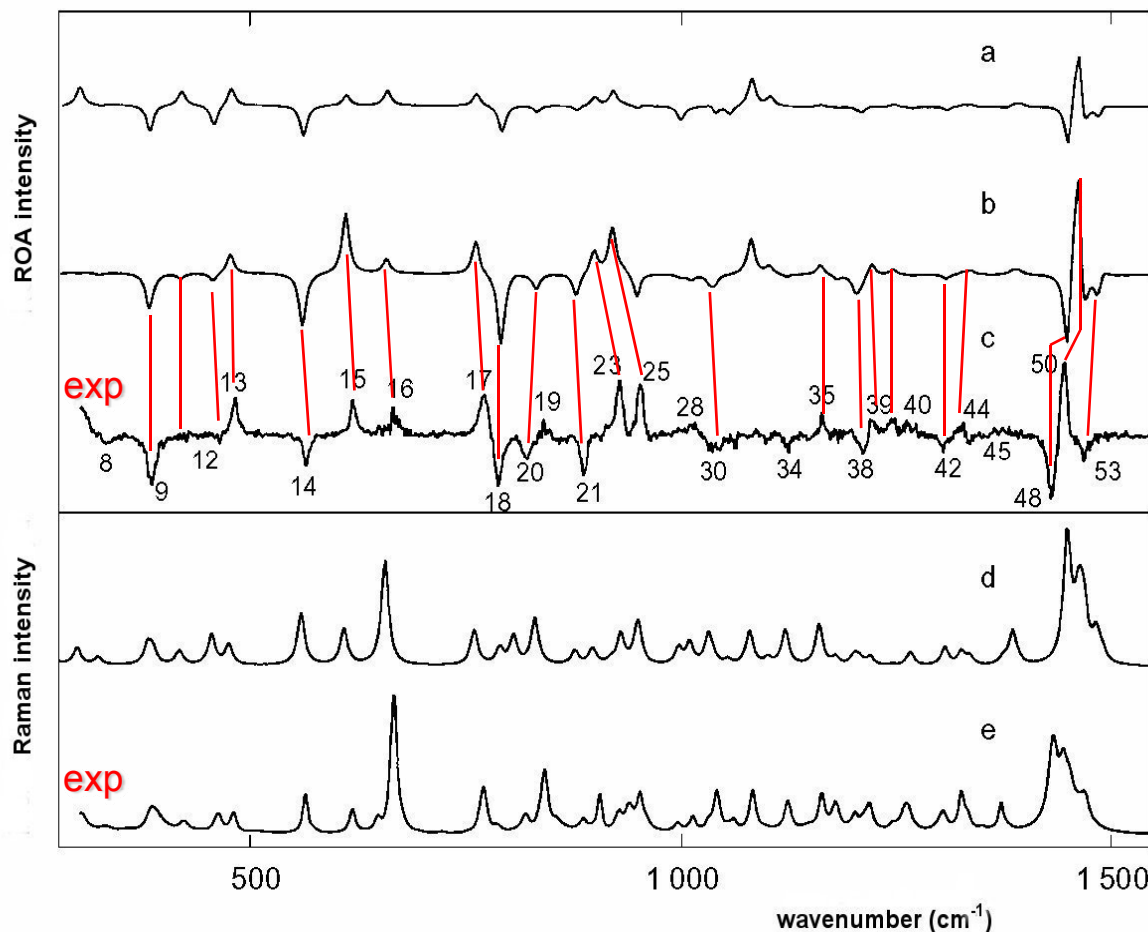
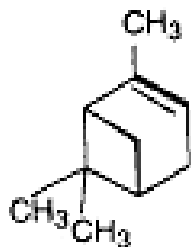
$$f_{EE} = \frac{C_R - C_S}{C_R + C_S} \quad [\%]$$



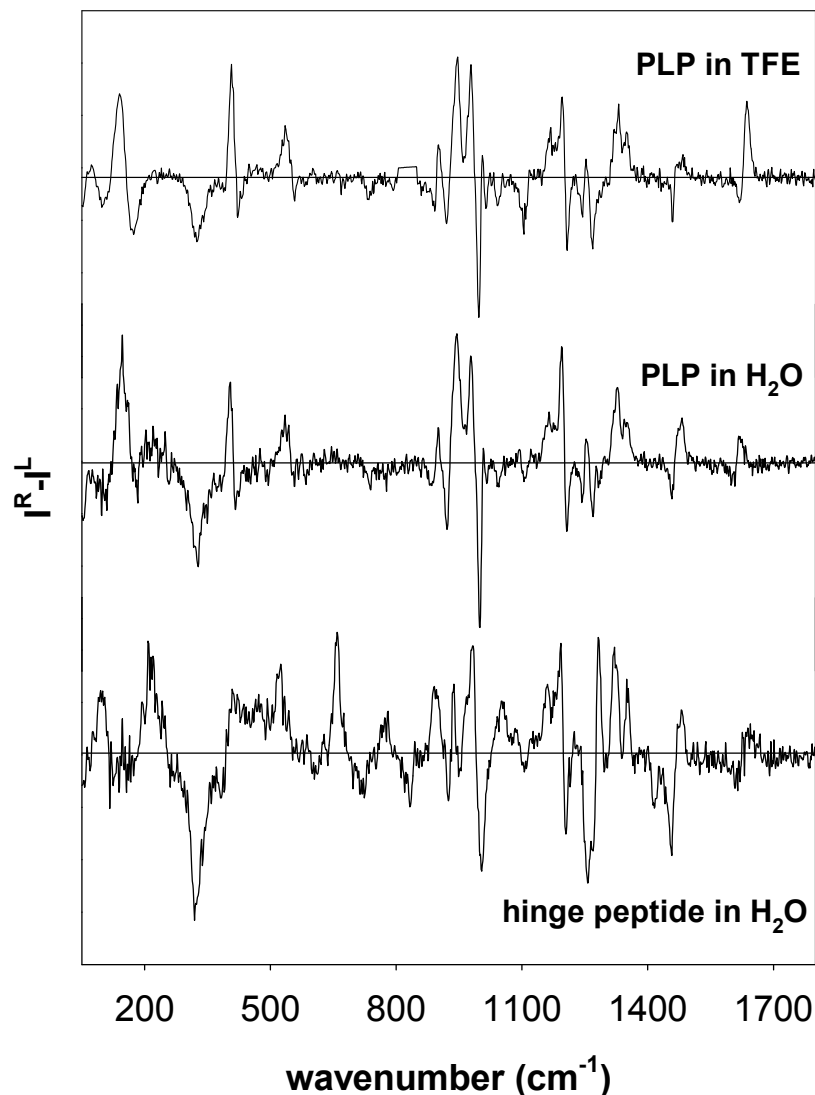
Soubor ROA spekter 19 vzorků *trans*-pinanu o různé enantiomerní čistotě.

- stanovení absolutní konfigurace bez krystalizace
- přímé měření enantiomerního přebytku bez nutnosti separace enantiomerů
- určení konformace biologických molekul v roztoku (proteinů, nukleových kyselin, cukrů, virů ...)

## (1S)-(-)- $\alpha$ -pinene



**ROA a Ramanova spektra (1S)-(-)- $\alpha$ -pinenu:** (a) zjednodušený (tzv. polární) a (b) konvenční model výpočtu ROA intenzit, (c) experimentální ROA spektrum, (d) simulované a (e) experimentální Ramanovo spektrum.



ROA spektra poly-L-prolinu v TFE

ROA spektra poly-L-prolinu ve vodě

ROA spektra hinge peptidu,  
paralelního dimeru oktapeptidu  
Thr-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-Ala-Pro  
ve vodě

# ROA proteinů

## ❖ valenční vibrace skeletu

( $\nu C_{\alpha}-C$ ,  $\nu C_{\alpha}-C_{\beta}$ ,  $\nu C_{\alpha}-N$ )

$\sim 870 - 1150 \text{ cm}^{-1}$

## ❖ rozšířená oblast amidu III

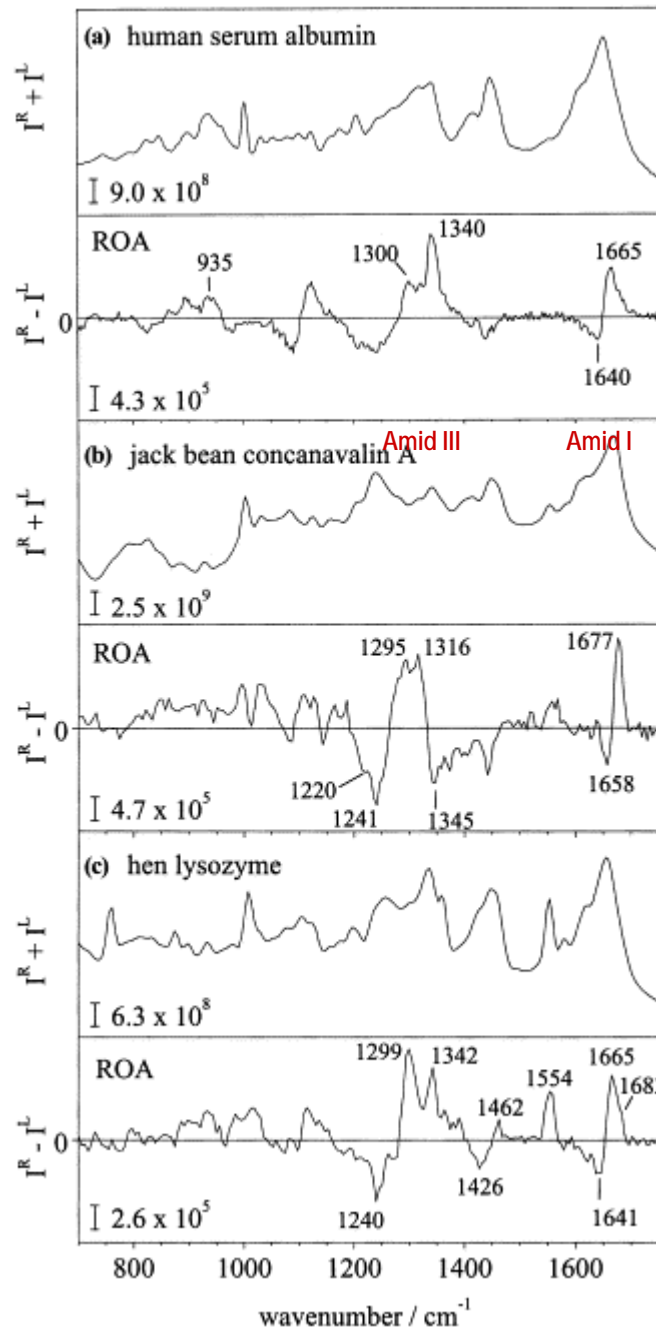
( $\nu C_{\alpha}-N$ , +  $\delta N-H$  a  $\delta C_{\alpha}-H$ )

$\sim 1230 - 1340 \text{ cm}^{-1}$

## ❖ oblast amidu I

( $\nu C=O$ )

$\sim 1630 - 1700 \text{ cm}^{-1}$



**X-ray PDB:**

69,2%  $\alpha$ -helix

1,7%  $3_{10}$ -helix



43,5%  $\beta$ -list

1,7%  $\alpha$ -helix

1.3%  $3_{10}$ -helix



28,7%  $\alpha$ -helix

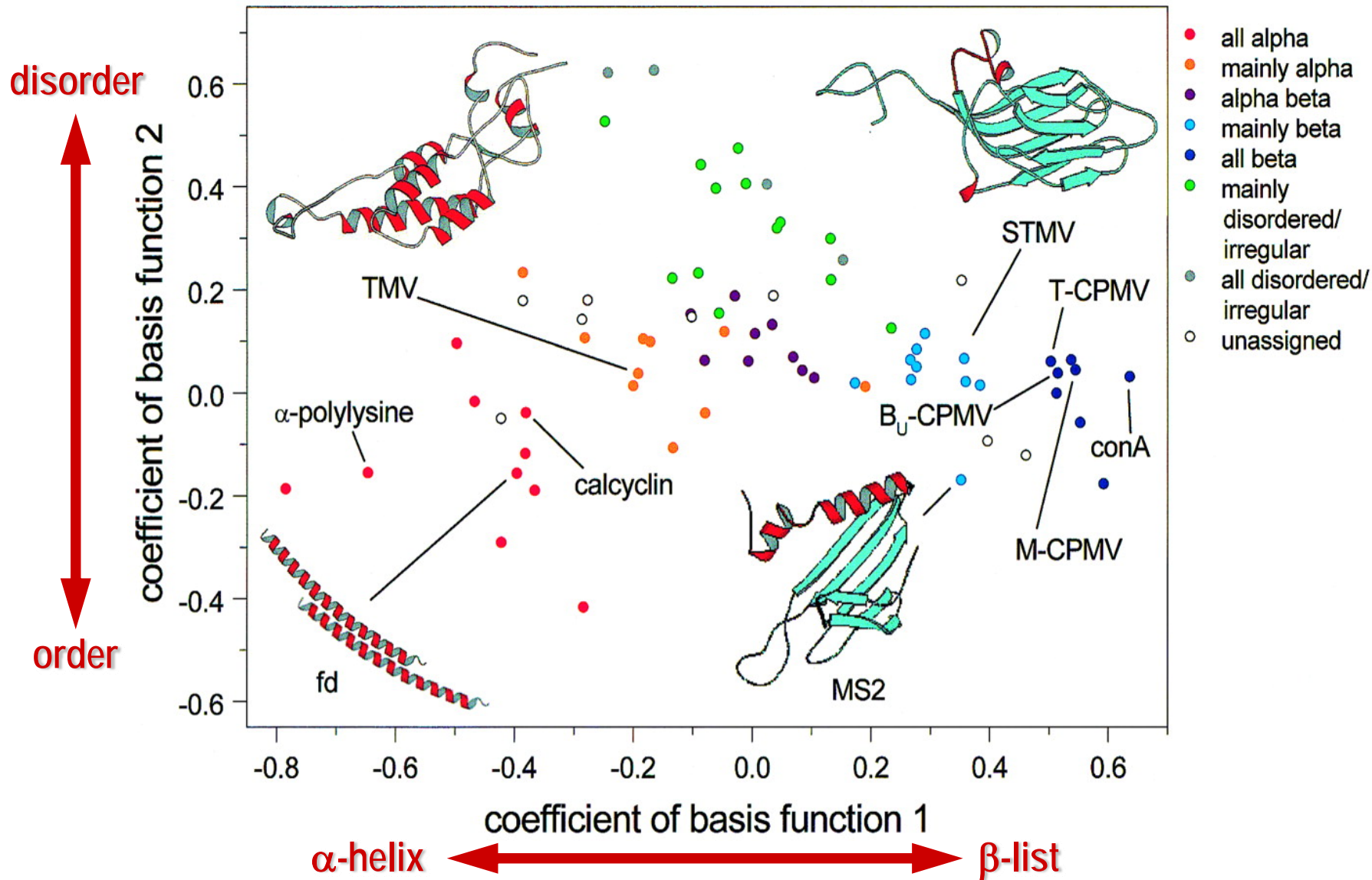
10,9%  $3_{10}$ -helix

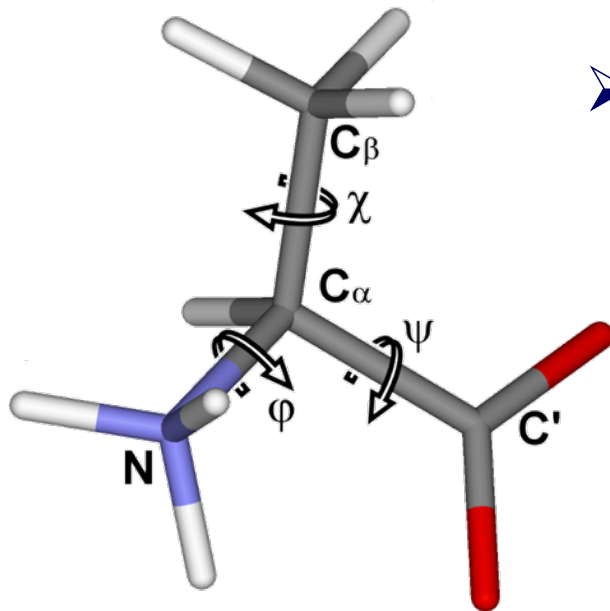
6,2%  $\beta$ -list





# ROA proteinů - PCA (Principal Component Analysis)



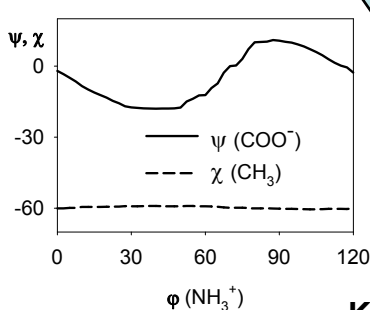
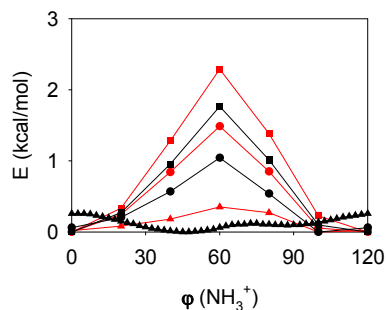
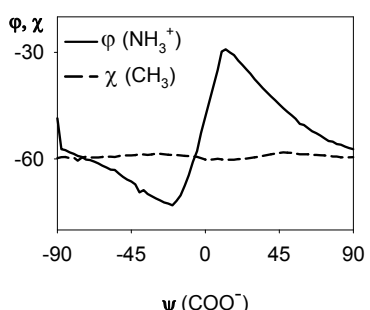
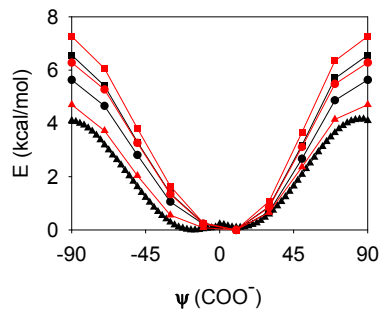
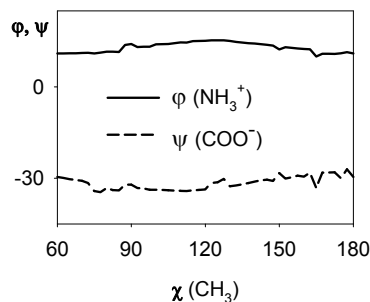
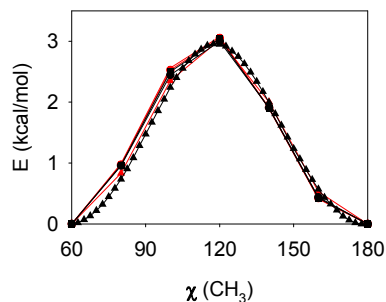


- the simplest amino acid
- ideal benchmark system for studying:

- conformational behavior
- interaction with solvent

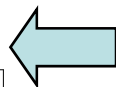
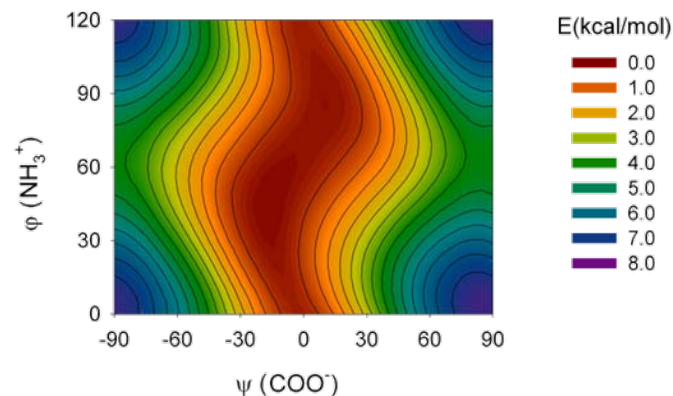
## 1D scan

- B3LYP/6-31G\*\*      —■— B3P86/6-31G\*\*
- B3LYP/6-311G\*\*    —●— B3P86/6-311G\*\*
- ▲— B3LYP/6-31++G\*\*    —▲— B3P86/6-31++G\*\*



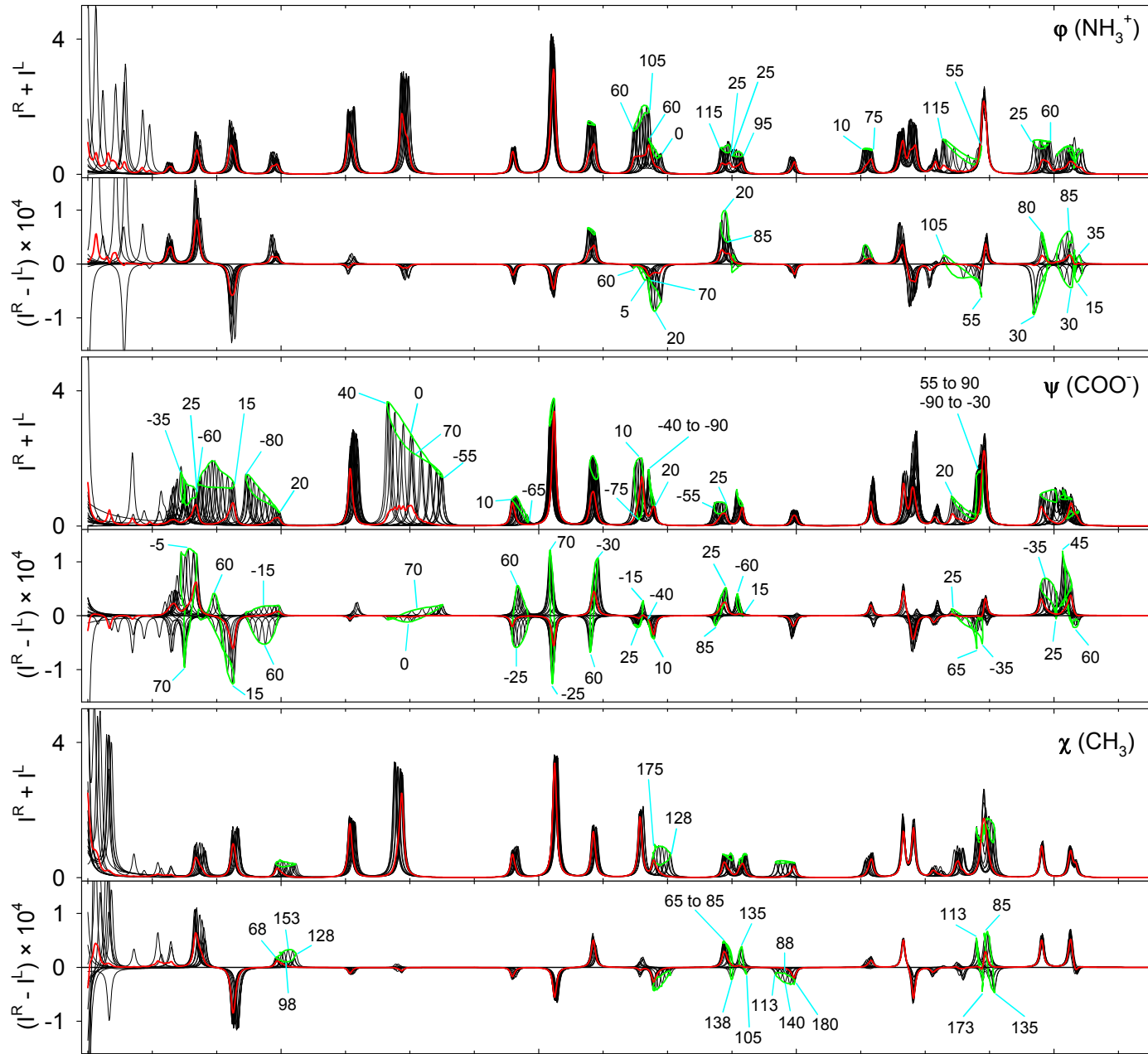
## 2D scan

B3LYP/COSMO/6-31++G\*\*



Dependencies of molecular energy ( $E$ , left) and dihedral angles (right) on the angles  $\phi$ ,  $\psi$ , and  $\chi$ . The remaining coordinates in the one-dimensional scans were allowed to fully relax.

Mode number: 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12,13 14,15 16 17 18,19 20,21 22,23 24 25,26

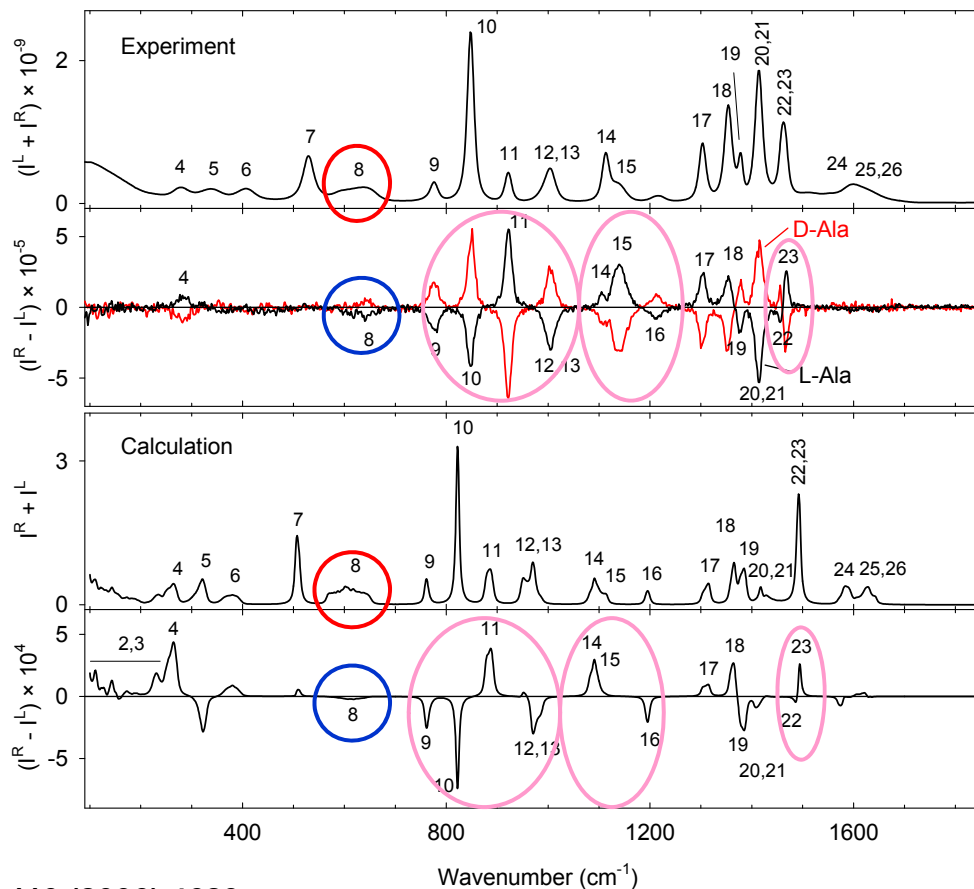


$\text{NH}_3^+$

$\text{COO}^-$

$\text{CH}_3$

- Raman and ROA spectra can be reliably interpreted if the movement of flexible molecular parts is considered



**Raman**

**ROA**

There is a significant difference between

Ala-Pro x Pro-Ala

Gly-Pro x Pro-Gly

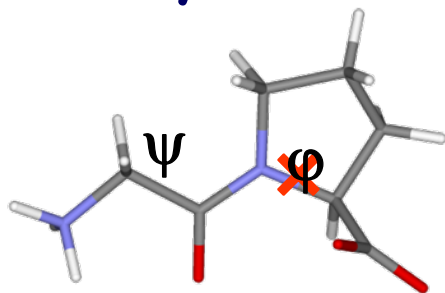
ROA (Raman) can directly reflect flexibility of the molecule

**rigidity**

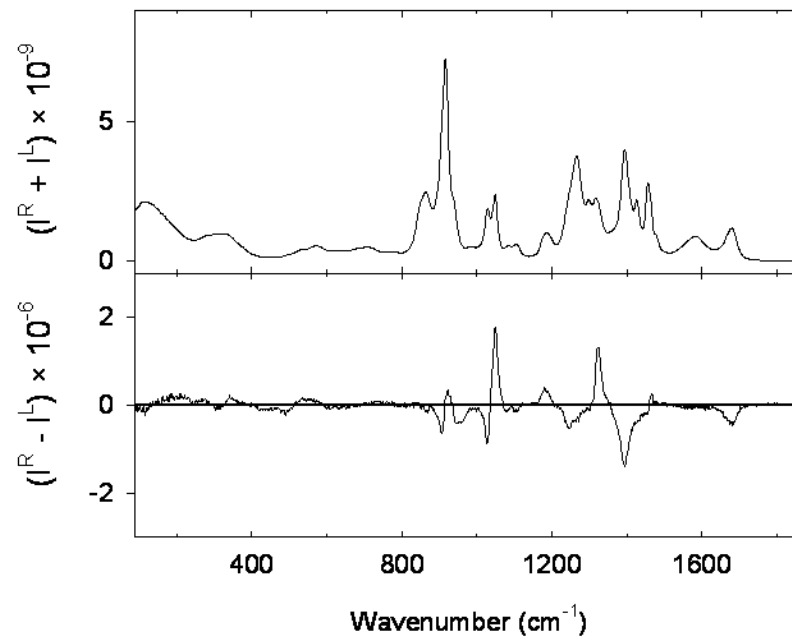
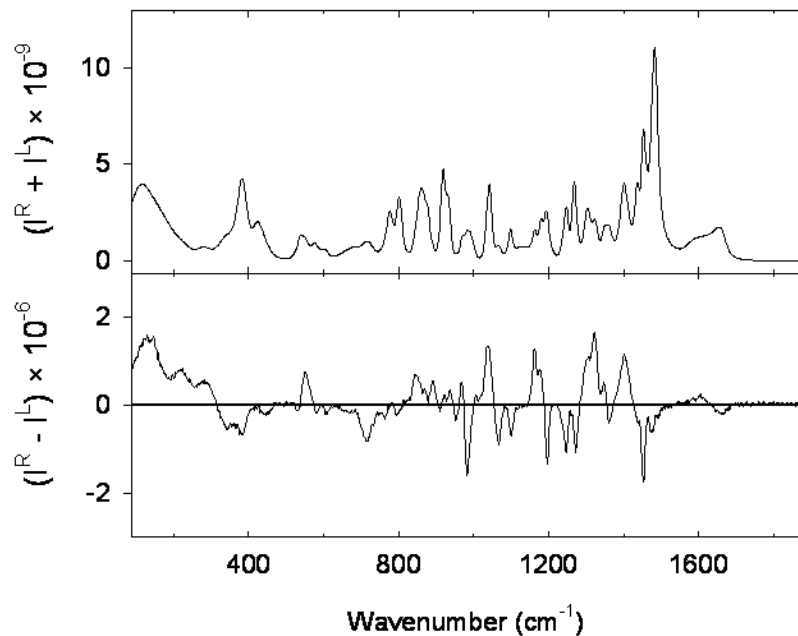
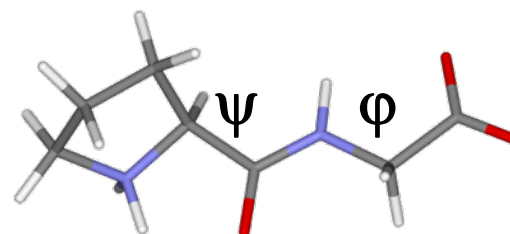
×

*flexibility*

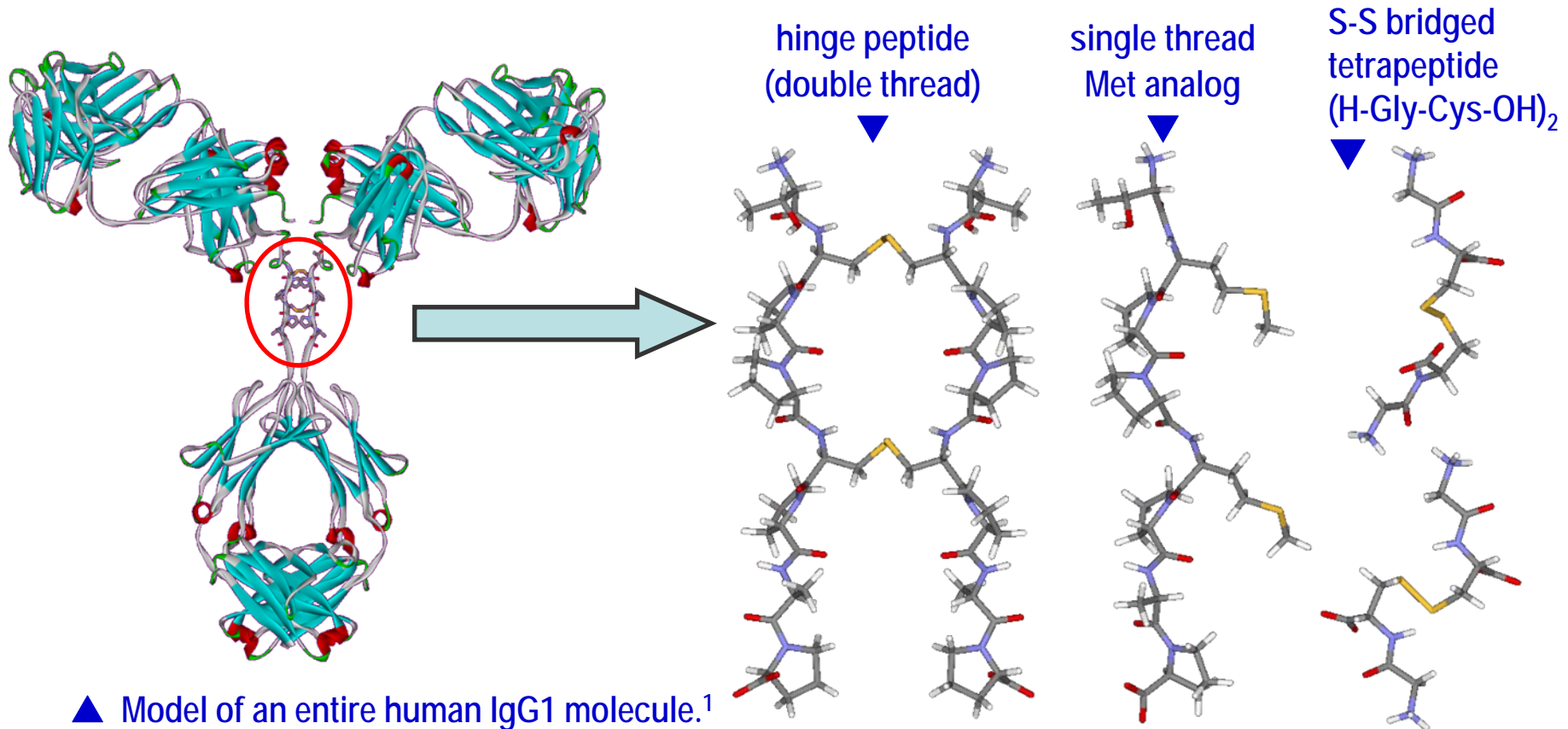
**Gly-Pro**



**Pro-Gly**



**HINGE** peptide is a fragment 225-232/225'-232' from the core of human immunoglobulin IgG1. It acts in this parent molecule as a swivel point crosslinking two rather heavy peptide chains. Being a parallel dimer of the octapeptide **H-Thr-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-OH** ( $C_2$  symmetry). The sequence is rich in proline residues and is expected to be quite rigid also due to a presence of two disulphide bridges. The peptide offers several advantages for use as a universal carrier of various active sequences (immunologically neutral, possesses six independent terminal groups: -NH and -OH on Thr residues and C-terminal carboxyl).



<sup>1</sup>Padlan E.A, *Mol. Immunol.* **31** (1994) 169.



