

# A VCD-spektroszkópia alkalmazása peptidek, peptidmimetikumok és királis átmenetifém-komplexek térszerkezetének felderítésében

HOLLÓSI Miklós, KNAPP Krisztina, MAJER Zsuzsa, SZILVÁGYI Gábor és VASS Elemér\*

*Eötvös Loránd Tudományegyetem, Kémiai Intézet, Kiroptikai Szerkezetvizsgáló Laboratórium, Pázmány Péter sétány 1/A, 1117 Budapest, Magyarország.*

## 1. Bevezetés

Az ELTE TTK Kémiai Intézet keretében működő Kiroptikai Szerkezetvizsgáló Laboratórium (KSzL) fő kutatási profilja királis molekulák térszerkezetének kiroptikai spektroszkópiai módszerekkel történő vizsgálata, e területen a legnagyobb múltra visszatekintő tudományos műhely Magyarországon. A KSzL legfontosabb eredményei közé sorolható az 1990-es évek eleje és a 2000-es évek közepe között a ECD/FT-IR összetett spektroszkópiai módszer kifejlesztése és sikeres alkalmazása peptidek, fehérjék, ezek fémkomplexei, valamint királis koronaéterek különféle szupramolekuláris komplexei térszerkezetének felderítésében.<sup>1</sup> A 2003-ban beszerzett VCD- és a közelmúltban az ELTE TTK Kémiai Intézetében üzembe helyezett ROA-spektrométerek révén – melyek egyedi műszerek Magyarországon – a laboratóriumban folyó kutatások fókuszpontja egyre inkább a rezgési optikai aktivitáson alapuló spektroszkópia alkalmazására tevődött át.

Jelen cikkünk célja a peptidek, peptidmimetikumok és királis átmenetifém-komplexek VCD-spektroszkópián alapuló szerkezetvizsgálata terén elért főbb eredményeink áttekintése.

## 2. A rezgési optikai aktivitás két formája: VCD és ROA

A rezgési optikai aktivitás (VOA) a királis molekulák rezgéseinek gerjesztése során a balra és jobbra cirkulárisan polarizált elektromágneses sugárzásra adott eltérő mértékű válaszként definiálható. Az alapul szolgáló rezgési spektroszkópiai módszertől függően (infravörös illetve Raman) két fő változata létezik: rezgési cirkuláris dikroizmus (VCD) és a Raman optikai aktivitás (ROA), melyek tulajdonképpen az infravörös- és a Raman-spektroszkópia királis megvalósításának tekinthetők. A rezgési optikai aktivitás elméleti alapjairól és alkalmazási lehetőségeiről részletes áttekintést nyújt Laurence L. Nafie nemrég megjelent kézikönyve.<sup>2</sup>

A VCD-spektroszkópia esetében a vizsgált jelenség a balra ill. jobbra cirkulárisan polarizált infravörös sugárzás differenciált elnyelése, a VCD-spektrum tehát lényegében az (1) képlet szerinti infravörös különbség spektrum, ahol  $A_L(\tilde{\nu})$  a balra,  $A_R(\tilde{\nu})$  a jobbra cirkulárisan polarizált fényben mért infravörös abszorbanancia-spektrum.

$$\text{VCD:} \quad \Delta A(\tilde{\nu}) = A_L(\tilde{\nu}) - A_R(\tilde{\nu}) \quad (1)$$

A ROA lényegében cirkulárisan polarizált fényvel végzett

Raman-spektroszkópia, melynek négyféle kísérleti megvalósítása lehetséges.<sup>2</sup> Ezek közül a legelterjedtebb az ún. SCP-ROA, mely esetében depolarizált lézerral történik a besugárzás és a Raman-szórás során létrejövő jobbra- illetve balra cirkulárisan polarizált komponensek különbségét detektáljuk (2).

$$\text{SCP-ROA:} \quad \Delta I(\tilde{\nu}) = I_R^\alpha(\tilde{\nu}) - I_L^\alpha(\tilde{\nu}) \quad (2)$$

A kereskedelemben jelenleg kapható egyetlen ROA-spektrométer (BioTools ChiralRaman-2x) is ezen az elven működik.

DFT-szintű kvantumkémiai számításokkal kiegészítve mindkét módszer alkalmas a királis molekulák térszerkezetének meghatározására. A VCD szélesebb körű elterjedése részben a kereskedelemben korábban megjelent műszereknek (VCD-spektrométer 1997 óta, ROA-spektrométer csak 2003 óta kapható), részben a spektrumok kiértékeléséhez szükséges egyszerűbb számítástechnikai háttérnek köszönhető.

A VCD legfontosabb alkalmazási területe a királis molekulák abszolút konfigurációjának és konformációjának folyadékfázisban történő meghatározása a mért és kvantumkémiai módszerekkel számított spektrumok összehasonlítása révén, ennek metodikáját több összefoglaló cikk részletesen tárgyalja.<sup>3-5</sup> A rezgési optikai aktivitás kísérleti megvalósításáról és alkalmazásairól részletesebben egy későbbi MKF összefoglaló cikkben fogunk beszámolni.<sup>6</sup>

## 3. $\beta$ -Aminosav egységeket tartalmazó peptidek és peptidmimetikumok szerkezetvizsgálata

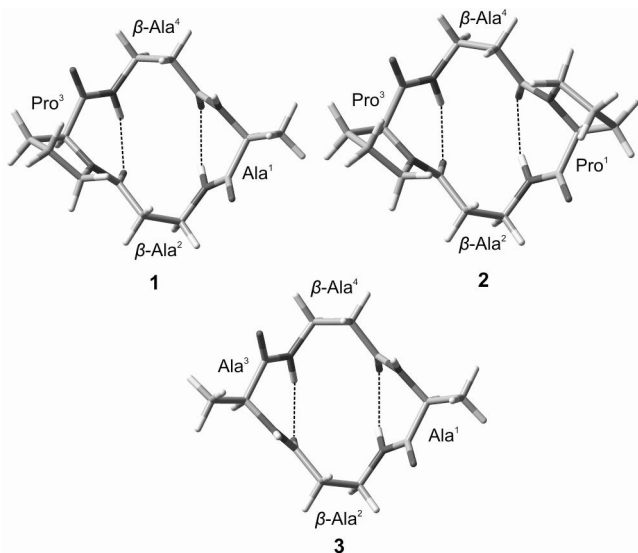
A peptidek és fehérjék oldatfázisban kialakuló térszerkezetének felderítése igen nagy jelentőségű a szerkezet és biológiai funkció közti összefüggések megértéséhez. A KSzL keretében régóta folynak a peptidekben kialakuló kanyarszerkezetek azonosítására és spektroszkópiai jellemzésére irányuló kutatások. Az egyik nagy kihívást a 3 aminosavegység által kialakított,  $C_7$  intramolekuláris H-kötéssel stabilizált  $\gamma$ -kanyarok rezgési és kiroptikai spektroszkópiai jellemzése és a 4 aminosavegység részvételével létrejövő (potenciálisan  $C_{10}$  H-kötéssel stabilizált)  $\beta$ -kanyaroktól való spektroszkópiai megkülönböztetése jelenti.<sup>7</sup> Vizsgálataink tárgyát nem csak természetes,  $\alpha$ -aminosavakból felépülő peptidek képzik,

\* Tel.: +36-1-3722500; fax: +36-1-3722620; e-mail: evass@chem.elte.hu

hanem a szintetikus  $\beta$ -aminosavak speciális térszerkezet-indukáló hatása miatt számos olyan  $\beta$ -aminosav-származék is, mely a peptidmimetikumok közé sorolható.

Az FT-IR- és VCD-spektroszkópia esetén a peptidok gerinckonformációjára leginkább az Amid I ( $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ ) és Amid II ( $1570\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ ) spektrumtartomány informatív. Az Amid I rezgés főleg C=O nyújtási, az Amid II rezgés főleg C-N-H síkban deformációs és kisebb mértékben C-N nyújtási hozzájárulást tartalmaz. Az IR- és VCD-sávok mintázatát végeredményben az amidcsoportok rezgéseinek csatolódása és a létrejövő H-kötések következtében kialakuló frekvencia-eltolódások együttesen határozzák meg.

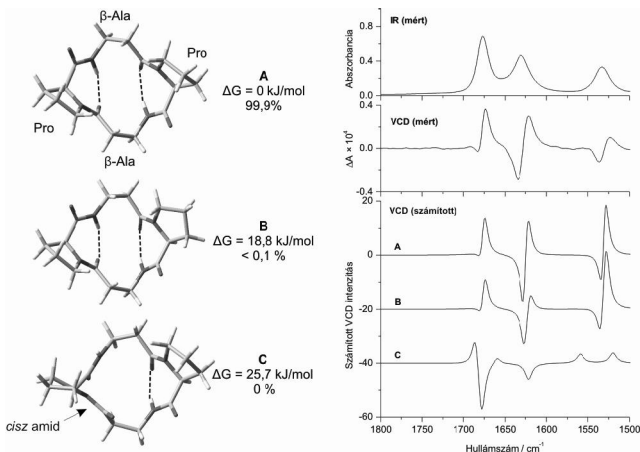
A  $\gamma$ -kanyarok vizsgálatát célzottan megtervezett, kisméretű modellpeptideken célszerű végezni, melyek nem képesek  $\beta$ -kanyarok kialakítására. Erre igen alkalmasnak bizonyultak a két  $\beta$ -alanin egységet tartalmazó ciklo(Ala- $\beta$ -Ala-Pro- $\beta$ -Ala) (**1**), ciklo(Pro- $\beta$ -Ala-Pro- $\beta$ -Ala) (**2**) és ciklo(Ala- $\beta$ -Ala-Ala- $\beta$ -Ala) (**3**) típusú ciklotetrapeptidek, melyek részletes FT-IR- VCD és ECD-spektroszkópiai vizsgálatán alapuló szerkezetét kvantumkémiai számításokkal alátámasztottuk.<sup>8</sup> Megállapítottuk, hogy mindhárom vizsgált ciklotetrapeptid gyakorlatilag egyetlen domináns (>99% populációjú) konformerként van jelen az oldatban (**1** és **2** esetében acetonitril- $d_3$ , **3** esetében TFE- $d_7$  volt az oldószer). Közös vonásuk, hogy két-két  $C_7$  H-kötéses inverz  $\gamma$ -kanyart alakítanak ki az alanin illetve prolin aminosav-egységek körül (1. ábra). A mért VCD-spektrum mindig a legkisebb energiájú konformer számított spektrumával adta a legjobb egyezést.<sup>7</sup>



1. Ábra. Az 1-3 ciklopeptid legkisebb energiájú konformerei.<sup>8</sup>

A VCD-spektroszkópia és a kvantumkémiai módszerek kombinálásán alapuló szerkezetvizsgálat lényegét a **2** ciklotetrapeptid esetében az 2. ábra szemlélteti a három legkisebb energiájú (A-C) konformerrel. A két legalacsonyabb energiájú konformer (A és B) egyaránt két-két  $C_7$  H-kötéses inverz  $\gamma$ -kanyar-szerkezetet tartalmaz a Pro egységek körül, eltérő azonban a  $\beta$ -Ala aminosav-egységük gerinckonformációja, így míg az A konformer  $C_7$  szimmetriájú, a B konformer aszimmetrikus. Nem meglepő, hogy számított VCD-spektrumaik igen hasonlóak és rendkívül jó egyezést adnak a mért spektrummal, a B konformer számított

populációja azonban elhanyagolható. A C konformer már csak egyetlen  $\gamma$ -kanyart tartalmaz, mivel az egyik  $\beta$ -Ala-Pro kötése cisz konfigurációjú. Ez a konformer kizárható mind a mért spektrumtól igen eltérő jellegű számított spektruma, mind pedig igen nagy relatív energiája alapján. A **2** ciklopeptid A konformerének nagyfokú szimmetriája miatt erős az amidcsoportok rezgéseinek csatolása, ami a VCD-spektrumban jellegzetes sávpárokhoz (couplet) vezet. Az alacsonyabb hullámszámú ( $1628\text{ cm}^{-1}$  körüli) pozitív couplet a  $\gamma$ -kanyarban részvevő, H-kötés-akceptor karbonilok, a nagyobb hullámszámú ( $1678\text{ cm}^{-1}$  körüli) aszimmetrikus pozitív couplet a szabad karbonilok antiszimmetrikus ill. szimmetrikus csatolt rezgéséből származik.



2. Ábra. A ciklo(Pro- $\beta$ -Ala-Pro- $\beta$ -Ala) (**2**) peptid három legkisebb energiájú (A-C) konformere, acetonitril- $d_3$  oldatban mért FT-IR- és VCD-spektruma, valamint az A-C konformerek számított VCD-spektruma (Gaussian 03, B3LYP/6-31G(d), IEF-PCM acetonitril oldószermodell).

Olyan ciklotetrapeptidek VCD-spektroszkópiai vizsgálatára is sor került, amely csak egy darab  $\beta$ -aminosav-egységet tartalmaz, mint például a 3. ábrán látható ciklo( $\beta$ -homoAla-Pro-Phe-Gly) (**3**).<sup>9</sup> A  $\beta$ -aminosav jelenléte miatt elvileg  $C_6$  és  $C_8$  H-kötéses (ún. pseudo- $\gamma$ -kanyar) szerkezeteket is kialakulhatnak. E vegyület VCD-spektrumát DMSO- $d_6$  oldószerben vettük fel, így a konformációanalízis és spektrumszámítás során DMSO IEF-PCM oldószermodellt alkalmaztunk. Azt tapasztaltuk, hogy a  $\beta$ -homo-aminosav-egység jelenléte a szomszédos  $\alpha$ -aminosav-egységek körül  $\gamma$ -kanyart ( $C_7$ ) indukált, de a várttal ellentétben nem jöttek létre  $C_6$ ,  $C_8$  H-kötéses ún. pseudo- $\gamma$ -kanyar szerkezetek a  $\beta$ -aminosav-egységek körül. Ez arra utal, hogy a kisméretű, feszült rendszerekben a  $C_7$  H-kötéses  $\gamma$ -kanyar kedvezőbb. Bár itt nem beszélhetünk egyetlen kizárólagos konformerről, a ciklo( $\beta$ -homoAla-Pro-Phe-Gly) (**4**) térszerkezetét sikerült minden kétséget kizáróan felderíteni és a mért VCD-spektrumot a 3. ábrán látható A-C konformerek számított spektrumának populációval súlyozott összegeként értelmezni.

A spektrumban a legkisebb energiájú A konformer hozzájárulása dominál. Ebben a Gly körül jön létre egy klasszikus  $\gamma$ -kanyar, melyet egy további, a Phe aminosav-egységen belüli  $C_7$  típusú H-kötés stabilizál így bifurkált H-kötés jön létre (3. ábra). Ez magyarázatot ad a fenilalanin H-kötés akceptor karboniljához rendelhető igen alacsony Amid I frekvenciára ( $1630\text{ cm}^{-1}$ ) és a szerkezet stabilitására az egyébként H-kötéseket közismerten felszakító DMSO-ban.



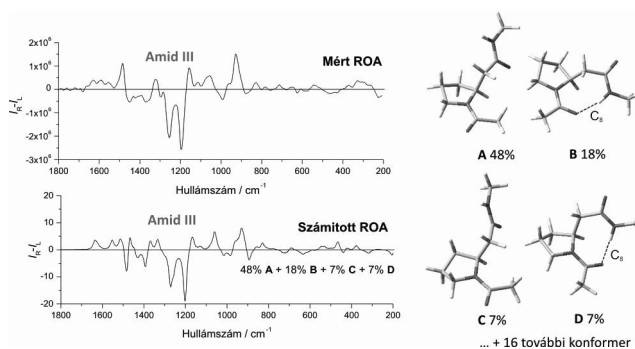
A négy ciklopeptid IR- és VCD-spektruma igen hasonló jellegű (5. ábra), függetlenül a ciklopeptid méretétől és a  $\beta$ -aminosav gyűrűtagszámától, ugyanakkor jó egyezés tapasztalható a mért és számított VCD-spektrumok között. Az eredmények felhívják a figyelmet arra, hogy eltérő szerkezetű peptidek is adhatnak hasonló spektrumot, tehát csupán a VCD-spektrumok kvalitatív összehasonlításán alapuló szerkezetbecslés meglehetősen bizonytalan.

Az eddigi tárgyalt példák mind viszonylag kevésbé flexibilis, kisméretű ciklopeptidok térszerkezetének vizsgálatára vonatkoztak. Az ELTE Kémiai Intézetének Molekulaspektroszkópiái Laboratóriumával együttműködve több konformációsán flexibilis, Ac-Xxx-NHMe (vagy Ac-Xxx-NH<sub>2</sub>) típusú diamid rendszer mátrixizolációs és oldatfázisú IR- és VCD-spektroszkópiái vizsgálatára is sor került.<sup>11-14</sup> E modellvegyületek segítségével jól tanulmányozható az oldallánc és a közeg hatása az aminosavegység lokális konformációs preferenciájára.

Igen meglepő eredményre jutottunk egy  $\beta$ -aminosav-származék, az Ac- $\beta$ -homoPro-NHMe (**9**) esetében,<sup>14</sup> azt vártuk ugyanis, hogy ez a molekula kiváló modellvegyülete lehet a C<sub>8</sub> H-kötéses *pseudo*- $\gamma$ -kanyar szerkezetnek (ahogy az analóg Ac-Pro-NH<sub>2</sub> fő konformere C<sub>7</sub> H-kötéses  $\gamma$ -kanyar szerkezet<sup>11</sup>). Ezzel szemben azt tapasztaltuk, hogy csupán szilárd argonban végzett mátrixizolációs körülmények között alakulnak ki nagy populációval C<sub>8</sub> H-kötéses szerkezetek, oldatban olyan nyitott szerkezetű konformerek dominálnak, melyekben az Ac- $\beta$ -homoPro peptidkötés *cis* konfigurációjú. A *cis* peptidkötéses konformerek még apoláris oldószerben (pl. diklórmétán) meghatározóak voltak, acetonitrilben és DMSO-ban szinte kizárólag ilyen szerkezetet sikerült azonosítani.<sup>14</sup>

Felmerült a kérdés, hogy vajon hogyan viselkedik ez a molekula a biológiai rendszerek natív közegének számító vizes oldatban. A víz – protikus oldószer lévén – jelentősen eltérő solvatációs tulajdonságokkal rendelkezik a VCD-spektroszkópiában leggyakrabban alkalmazott szerves oldószerekhez képest (pl. kloroform, diklórmétán, DMSO, acetonitril, illetve ezek deuterált változatai). Sajnos a víz az igen erős infravörös elnyelése miatt a VCD-spektroszkópiában a lehető legrosszabb oldószer, ráadásul deformációs rezgésének elnyelési sávja átfed a peptidek legjellemzőbb Amid I sávterületével. Az intézetünkben nemrég bevezetett ROA-technika kiváló alternatívát nyújt ebben az esetben, ugyanis az oldószerek közül a víznek van a legkisebb Raman-szórása, így a ROA-spektroszkópiában ideális oldószernek számít.

Az Ac- $\beta$ -homoPro-NHMe (**9**) vizes oldatban felvett ROA-spektrumát és a számított spektrumot a 6. ábrán tüntettük fel. A számításokat Gaussian 09 programmal B3LYP/6-311++G(d,p) elméleti szinten, IEF-PCM oldószermodellrel végeztük és 20 lehetséges konformert találtunk. Ez közül csak az 5%-ot meghaladó populációjú **A-D** szerkezeteket vettük figyelembe az elméleti VCD-spektrum súlyozott összegként való kiszámításakor. Azonnal szembeötlő az igen jó egyezés a mért és a számított spektrum között, elsősorban a ROA-spektroszkópiában a peptidek és fehérjék konformációjára leginkább jellemző, ún. kiterjesztett Amid III (kb. 1230–1350 cm<sup>-1</sup>)<sup>15</sup> tartományban. Vízben a



**6. Ábra.** Az Ac- $\beta$ -homoPro-NHMe (**9**) vizes oldatban felvett ROA-spektruma, valamint az A-D konformerek számított ROA-spektrumának populációval súlyozott összege.

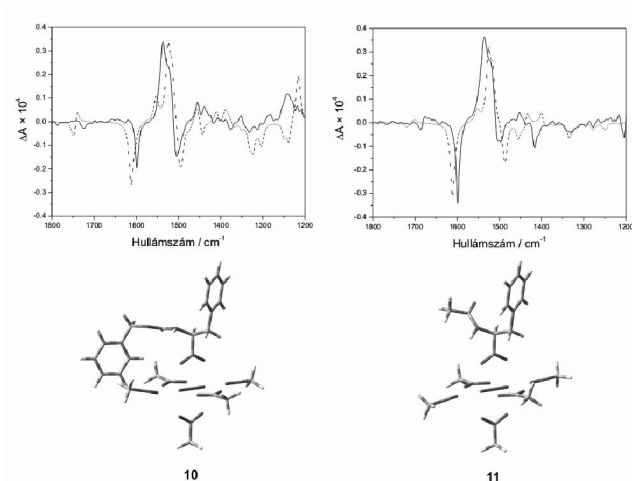
legvalószínűbb konformer (**A**) továbbra is ugyanaz, mint a DMSO-ban kapott domináns konformer<sup>14</sup>, de megnő a C<sub>8</sub> H-kötéses *transz* konfigurációjú Ac- $\beta$ -homoPro amidcsoportot tartalmazó konformerek (**B**, **D**) populációja, melyek DMSO-ban elhanyagolható mennyiségben voltak jelen.

#### 4. Királis ligandumokat tartalmazó kétmagvú Rh(II)-komplexek szerkezetvizsgálata

Az utóbbi évtizedekben nagymértékben megnőtt az érdeklődés a kétmagvú Rh(II) komplexek iránt számos kémiai reakcióban kifejtett katalitikus tulajdonságuk illetve potenciális tumorelles hatások miatt. Jelenleg a KSzL egyik fő kutatási irányát képezi a diródium(II)-tetraacetáttól és különböző védett aminosavakból (pl. Cbz-Phe-OH, Ac-Phe-OH) kiinduló, ligandumcserével lejátszó királis komplexek szintézise, kromatográfias elválasztása és kiroptikai spektroszkópiai módszerekkel történő szerkezetvizsgálata.<sup>16-17</sup> A reakció során különböző királis ligandumtagszámú Rh<sub>2</sub>L<sub>n</sub>(OAc)<sub>4-n</sub> (n=1–4) komplexek keletkeznek, a fő termék összetétele a reakciókörülmények és a reaktánsok arányának célzott megválasztásával szabályozható.<sup>16</sup> Ezek közül VCD-spektroszkópiával legrészletesebben az egy királis ligandumot tartalmazó Rh<sub>2</sub>(O-Phe-Cbz)(OAc)<sub>3</sub> (**10**) és Rh<sub>2</sub>(O-Phe-Ac)(OAc)<sub>3</sub> (**11**) komplexeket jellemeztük (7. ábra) acetonitril oldatban.<sup>17</sup>

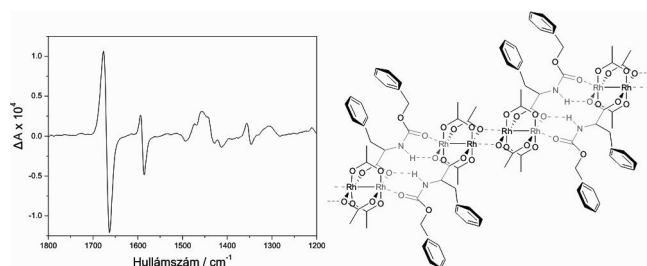
Megállapítottuk, hogy a Cbz-Phe-O<sup>-</sup> és Ac-Phe-O<sup>-</sup> ligandumok karboxilátcsoportjaikon keresztül ekvatoriális pozícióban épülnek be áthidalt bidentát módon (egy-egy acetátligandum helyére), az axiális pozíciókba (a Rh-Rh kötést tekintve a komplex tengelyének) acetonitril oldószermolekulák koordinálnak N-atomjaik nemkötő elektronpárja révén (7. ábra).

Természetesen, a beépülő királis ligandum flexibilis, a 7. ábra a két komplex legkisebb energiájú konformerének szerkezetét mutatja be. A vegyületek egyes konformerei számított VCD-spektrumának populációval súlyozott összege igen jól egyezik a mért spektrummal (7. ábra). A **10** komplex legkisebb energiájú konformerében a karbobenziloxi (Cbz) védőcsoport benzolgyűrűje az egyik koordinált acetonitril molekula C-H kötésének szomszédságában található. Ez arra utal, hogy az acetonitril hidrogénatomja kölcsönhat a benzolgyűrű  $\pi$  elektronrendszerével, tehát a konformert egy  $\sigma$ - $\pi$  kölcsönhatása is stabilizálhatja.



**7. Ábra.** A  $\text{Rh}_2(\text{O-Phe-Cbz})(\text{OAc})_3$  (**10**) és  $\text{Rh}_2(\text{O-Phe-Ac})(\text{OAc})_3$  (**11**) komplexek acetonnitril-*d*<sub>3</sub> oldószerben mért (folytonos vonal) és számított (szaggatott vonal) VCD-spektruma, valamint legkisebb energiájú konformereinek szerkezete.

A 10 komplex VCD-spektruma drasztikusan megváltozik kloroformban (8. ábra). A legszembevetőbb, hogy a Cbz védőcsoport acetonnitrilben 1724 cm<sup>-1</sup>-nél mért igen gyenge uretánsávja kloroformban nagymértékben eltolódik és 1670 cm<sup>-1</sup> körül egy intenzív, szimmetrikus negatív couplet-et ad.



**8. Ábra.** A  $\text{Rh}_2(\text{O-Phe-Cbz})(\text{OAc})_3$  (**10**) komplex kloroform-*d* oldószerben mért VCD-spektruma, valamint a kloroformban kialakuló szupramolekuláris asszociáció lehetséges szerkezete.

Az alacsony frekvencia az uretáncsoport karboniljának koordinálódására, a szimmetrikus couplet erős csatolásra utal, ami a molekulán belül nem képzelhető el. Mindez megmagyarázható, ha feltételezzük, hogy intermolekuláris kölcsönhatás jön létre az uretáncsoport karbonil oxigénje és egy szomszédos komplexmolekula Rh atomja között a betöltetlen axiális pozícióban (a kloroform az acetonnitrillel ellentétben nem koordinálódik a Rh-hoz, ezért axiális pozíciók szabadok), és az így kialakult dimerek végül szupramolekuláris komplexként stabilizálódnak a 8. ábrán bemutatott koordinációs séma szerint.

## 5. Következtetések

A cikkben bemutatott példák alapján egyértelműen kijelenthető, hogy mára a VCD-spektroszkópia kiforrott szerkezetvizsgálati módszerré vált és életképes alternatívát jelent az NMR és röntgenkristallográfia mellett. A peptidek és peptidmimetikumok terén végzett kutatásaink rámutatottak arra, hogy egy térszerkezeti elem különböző kémiai környezetben eltérő spektrumot adhat és különböző

szerkezetek is eredményezhetnek hasonló mintázatot a VCD-spektrumban, így a feltételezett szerkezetet kvantumkémiai számításokkal kell igazolni. A biomolekulák natív közegben történő vizsgálatát nagymértékben meg fogja könnyíteni a nemrég bevezetett ROA-spektroszkópia, mely a KSzL egyik meghatározó kutatási irányát fogja képezni.

## Köszönetnyilvánítás

Kutatásaink pénzügyi támogatását az OTKA K81175, TÁMOP 4.2.1/B-09/KMR-2010-0003, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0030 és KMOP-4.2.1/B-10-2011 projektek biztosították.

## Hivatkozások

- Hollósi, M.; Majer, Zs.; Vass, E. *Magyar Kémiai Folyóirat* **2006**, *112*, 117–122.
- Nafie, L. A. *Vibrational optical activity. Principles and applications*, John Wiley & Sons: Chichester, **2011**.
- Freedman, T. B.; Cao, X.; Dukor R. K.; Nafie, L. A. *Chirality* **2003**, *15*, 743–758.
- Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Pan, J. *Chirality* **2008**, *20*, 643–663.
- Magyarfalvi, G.; Tarczay, G.; Vass, E. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2011**, *1*, 403–425.
- Tarczay, Gy.; Vass E.; Góbi, S.; Magyarfalvi, G. *Magyar Kémiai Folyóirat* **2012**, közlésre beküldve.
- Vass, E.; Hollósi, M.; Besson, F.; Buchet, R. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1917–1954.
- Vass, E.; Majer, Zs.; Köhalmi, K.; Hollósi, M. *Chirality* **2010**, *22*, 762–771.
- Vass, E.; Köhalmi, K.; Majer, Zs.; Hollósi, M. *In Peptides 2004*; Flegel, M.; Fridkin, M.; Gilon, Ch.; Slaninova, J. Eds.; Kenes International: Geneva, **2005**, pp 1037–1038.
- Vass, E.; Strijowski, U.; Wollschläger, K.; Mándity, I. M.; Szilvágyi, G.; Jewgiński, M.; Gaus, K.; Royo, S.; Majer, Zs.; Sewald, M.; Hollósi, M. *J. Peptide Sci.* **2010**, *16*, 613–620.
- Pohl, G.; Perczel, A.; Vass, E.; Magyarfalvi, G.; Tarczay, Gy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 4698–4708.
- Pohl, G.; Perczel, A.; Vass, E.; Magyarfalvi, G.; Tarczay, Gy. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 2126–2133.
- Tarczay, Gy.; Góbi, S.; Vass, E.; Magyarfalvi, G. *Vib. Spectrosc.* **2009**, *50*, 21–28.
- Góbi, S.; Knapp, K.; Vass, E.; Majer, Zs.; Magyarfalvi, G.; Hollósi, M.; Tarczay, Gy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 13603–13615.
- Zhu, F.; Isaacs, N. W.; Hecht, L.; Barron, L. D. *Structure* **2005**, *13*, 1409–1419.
- Szilvágyi, G.; Hollósi, M.; Tölgyesi, L.; Frelek, J.; Majer, Zs. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2594–2599.
- Szilvágyi, G.; Majer, Zs.; Vass, E.; Hollósi, M. *Chirality* **2011**, *23*, 294–299.

## Application of VCD spectroscopy in the structure elucidation of peptides, peptidomimetics and chiral transition metal complexes

The main research profile of the Laboratory for Chiroptical Structure Analysis at the Eötvös Loránd University is the structure investigation of chiral molecules by chiroptical spectroscopic methods. Traditionally, a combination of electronic circular dichroism (ECD), FT-IR, and occasionally NMR was applied and the steric structure of a great number of peptides, proteins, peptidomimetics (and their metal complexes) was determined based on this complex spectroscopic approach. With the purchase

of the first vibrational circular dichroism (VCD) spectrometer in Hungary in 2003 our research became gradually focused on the VCD technique.

VCD is one of the two forms of vibrational optical activity (VOA), and is based on the differential absorption of left- and right circularly polarized radiation by chiral molecules. The other, less widespread form of VOA, known as Raman optical activity (ROA), measures the differential scattering of the right- and left circularly polarized light. The ROA technique has only been recently introduced at our Institute.

This paper gives an overview of our recent results in the field of structure investigation of peptides, peptidomimetics and chiral transition metal complexes based on the VCD technique combined with quantum chemical calculations.

One of the challenges in the structure investigation of peptides is the reliable spectroscopic detection and discrimination of different turn structures. There are two major types of turns,  $\beta$  and  $\gamma$ , out of which the latter, stabilized by  $C_7$  intramolecular H-bonds (IHBs) are less extensively characterized. Cyclic tetrapeptides containing two  $\beta$ -Ala residues, such as cyclo(Xxx- $\beta$ -Ala-Yyy- $\beta$ -Ala) (where Xxx = Ala or Pro), proved to be very good  $\gamma$ -turn model compounds. We demonstrated by VCD spectroscopy and quantum chemical calculations that these peptides are present in solution practically as a single conformer containing two  $\gamma$ -turns centered at Ala or Pro residues. In a cyclic tetrapeptide with only one  $\beta$ -amino acid residue, such as cyclo( $\beta$ -homoAla-Pro-Phe-Gly), also the  $\gamma$ -turns were the most characteristic structural elements but in this case an equilibrium of several conformers was observed. In the major conformer the classic  $\gamma$ -turns centered at Gly was stabilized by an additional  $C_5$  IHB (within the Phe residue) in a bifurcated H-bonding scheme which explained the relatively high stability of the structure even in DMSO. The experimental VCD spectrum was in very good agreement with the population-weighted average of the calculated spectra of individual conformers. Although the  $\beta$ -amino acid residues may form  $C_6$  or  $C_8$  IHBs (the latter known as pseudo- $\gamma$ -turn), we found that they rather induced  $C_7$  H-bonded  $\gamma$ -turns centered at the neighboring  $\alpha$ -amino acids. This suggests that in such small-sized, conformationally restricted cyclic tetrapeptides the  $\gamma$ -turn ( $C_7$ ) is the preferred type of turn structure.

The increasing interest in peptidomimetics of biological relevance prompted us to synthesize and characterize by ECD, VCD and NMR a series of cyclic hexa- and pentapeptides comprising *trans*-2-aminocyclopentane carboxylic acid (*trans*-Acpc) or *trans*-2-aminocyclohexane carboxylic acid (*trans*-Achc) residues (Table 1). The main goal of this work, performed in collaboration with the University of Bielefeld, was to extend our knowledge on the H-bond-forming and turn-stabilizing (e.g.  $C_{11}$  H-bonded *pseudo*- $\beta$ -turn inducing) ability of the above cyclic  $\beta$ -amino acids. This study also offered a comparison between the effectiveness of VCD- and NMR-based structure analysis methods supported by quantum chemical calculations and MD simulations, respectively. The pentapeptides were found to contain a *pseudo*- $\beta$ -turn, the hexapeptides on the other hand showed both a  $\beta$ - and a *pseudo*- $\beta$ -turn (stabilized or not by  $C_{10}$  and  $C_{11}$  H-bonds, respectively). Despite the evident structural differences, the IR and VCD spectra of these peptides were very similar (as predicted by quantum

chemical calculations), suggesting that the VCD spectra of these peptides are primarily determined by the *trans*-configuration of Acpc and Achc residues, respectively, and the local conformation of the *pseudo*- $\beta$ -turns. The structural features derived from the two techniques (VCD and NMR) were in good agreement which underlines the applicability of VCD in studying the conformation of small cyclic peptides.

Beside cyclic peptides, in collaboration with the Laboratory of Molecular Spectroscopy of our Institute we investigated a series of diamide models of type Ac-Xxx-NHMe (or Ac-Xxx-NH<sub>2</sub>) by FT-IR and VCD in organic solvents or under matrix isolation conditions. We obtained rather surprising result in the case of Ac- $\beta$ -homoPro-NHMe. Unlike its  $\alpha$ -amino acid analogue (Ac-Pro-NH<sub>2</sub>) which preferentially adopted a  $C_7$  H-bonded  $\gamma$ -turn conformation, this model was present in organic solvents predominantly in an open form with *cis* configuration of the Ac- $\beta$ -homoPro peptide bond. Large populations of  $C_8$  H-bonded *pseudo*- $\gamma$ -turn structures could only be detected in solid argon matrix. A similar behavior was found in water as in organic solvents (the main conformer was the same as in DMSO) but with somewhat increased populations of  $C_8$  H-bonded structures. Due to the high infrared absorption of water in the spectral region of interest this model compound was studied in aqueous solution by the recently introduced ROA spectroscopy instead of VCD. A very good agreement was found between the theoretical and calculated ROA spectra considering the four most abundant conformers. This study showed the advantage of ROA spectroscopy in the structure investigation of biomolecules in native (aqueous) environment.

Recently there is an increasing interest in dinuclear rhodium(II) complexes because of their catalytic activity in many reactions and potential applications as anticancer agents. Starting from dirhodium(II) tetraacetate and N-protected amino acids a series of chiral dirhodium complexes of type Rh<sub>2</sub>L<sub>n</sub>(OAc)<sub>4-n</sub> (n=1–4) were synthesized, separated and studied by chiroptical spectroscopic methods. Out of these complexes Rh<sub>2</sub>(O-Phe-Cbz)(OAc)<sub>3</sub> and Rh<sub>2</sub>(O-Phe-Ac)(OAc)<sub>3</sub> are the most thoroughly characterized. By VCD spectroscopy and molecular modeling we showed that the chiral ligand is equatorially bound to the dirhodium unit via the carboxylate group in a bridging bidentate manner (replacing an acetate ligand). In acetonitrile solution the two axial positions are blocked by coordinated solvent molecules. The theoretical VCD spectra, obtained as population-weighted sums of the calculated spectra of individual conformers, are in excellent agreement with the experimental ones. This way VCD gave unique information on the steric structure of Rh<sub>2</sub>(O-Phe-Cbz)(OAc)<sub>3</sub> and Rh<sub>2</sub>(O-Phe-Ac)(OAc)<sub>3</sub>. In the lowest energy conformer of the Rh<sub>2</sub>(O-Phe-Cbz)(OAc)<sub>3</sub> complex the phenyl ring of the protecting group is situated in the vicinity of a C-H hydrogen of an axially bound acetonitrile molecule, suggesting a  $\sigma$ - $\pi$  interaction. The drastic spectral change observed in chloroform in the case of Rh<sub>2</sub>(O-Phe-Cbz)(OAc)<sub>3</sub> can be explained by formation of supramolecular associates via the urethane and/or carboxylate oxygen atoms bound to the free axial positions (unblocked by chloroform) of neighboring complex molecules.

One can conclude that VCD developed into a well-established technique providing a viable alternative to NMR and X-ray diffraction in the structure analysis of chiral compounds.