

LOSCHMIDT
LABORATORIES



SPEKTROSKOPIE CIRKULÁRNÍHO DICHROISMU PROTEINŮ

RADKA CHALOUPKOVÁ

Loschmidtovy laboratoře
Ústav experimentální biologie
Masarykova Universita, Brno

- ❑ struktura proteinů
- ❑ analýza sekundární s terciární struktury proteinů
- ❑ chiroptické techniky
- ❑ **spektroskopie cirkulárního dichroismu**
 - fyzikální podstata
 - spektra cirkulárního dichroismu proteinů
 - příprava vzorku proteinu pro měření
 - příklady využití
 - výhody a limitace

Struktura proteinů



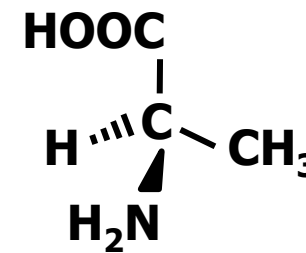
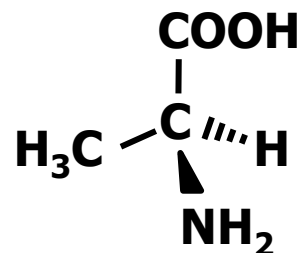
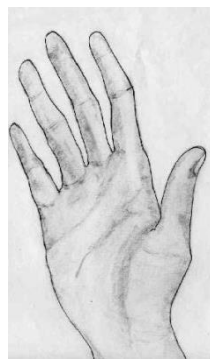
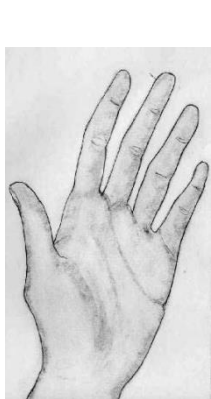
- ❑ **spektroskopie cirkulárního dichroismu**
- ❑ infračervená spektroskopie
- ❑ Ramanova spektroskopie
- ❑ fluorescenční spektroskopie
- ❑ NMR spektroskopie
- ❑ rentgenová krystalografie
- ❑ neutronová krystalografie

Chiroptické techniky

Metoda	Definice	Vlnové délky
Optická rotační disperse ORD	Závislost úhlu stočení roviny lineárně polarizovaného světla na vlnové délce procházejícího záření.	180-800 nm
Cirkulární dichroismus CD	Závislost rozdílu absorpance pro vlevo a vpravo kruhově polarizované světlo na vlnové délce absorbovaného záření.	180-1000 nm

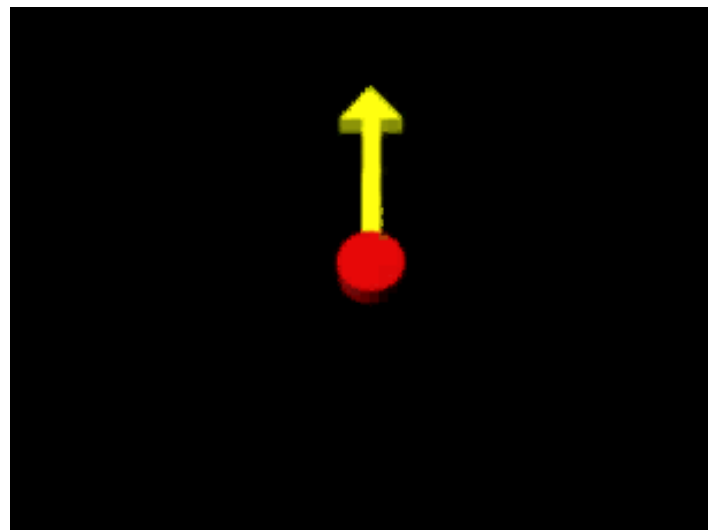
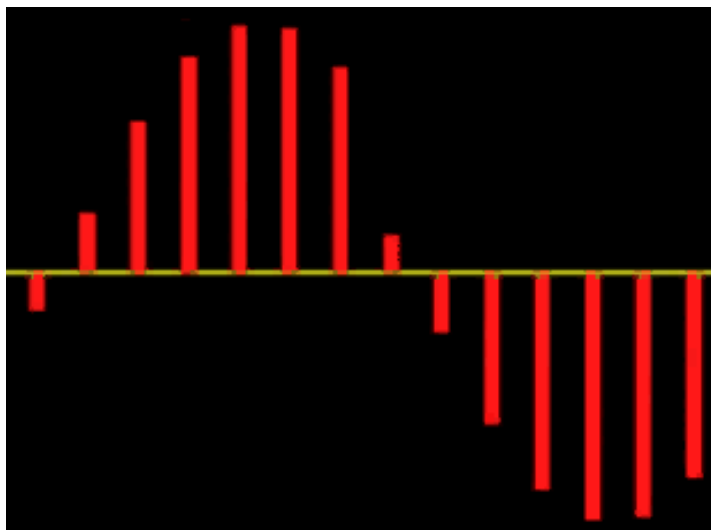
Chirální molekuly

- ❑ neztotožnitelné se svým zrcadlovým obrazem
- ❑ příčiny chirality
 - přítomnost stereogenního centra – vnitřní chiralita
 - kovalentní interakce achirální molekuly s chirální molekulou
 - inherentní chiralita struktury celé molekuly



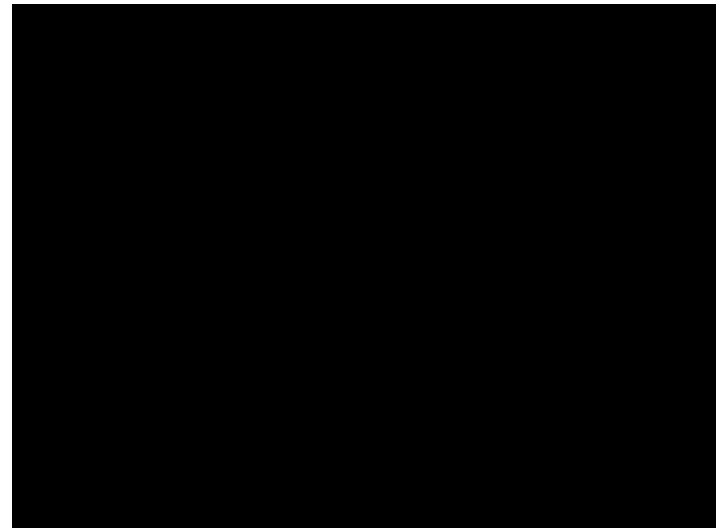
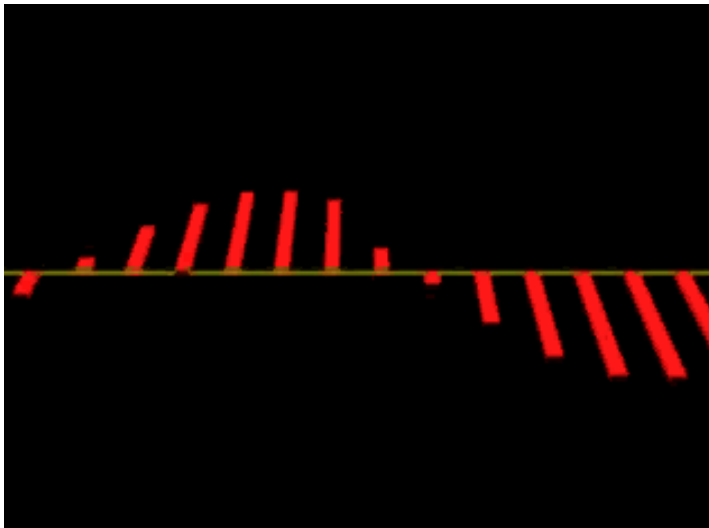
Lineárně polarizované světlo

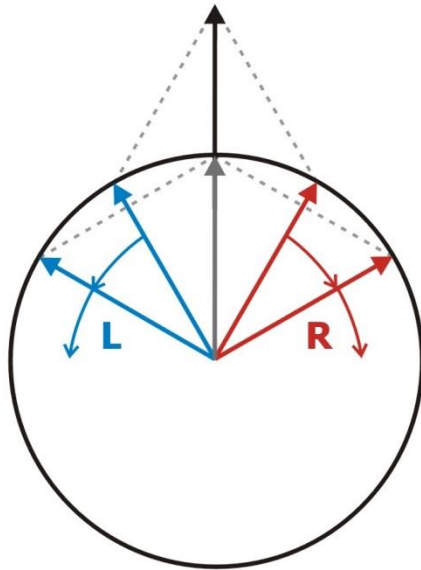
- ❑ konstantní směr (orientace), modulovaná amplituda
- ❑ úsečka o délce $2A_{\max}$

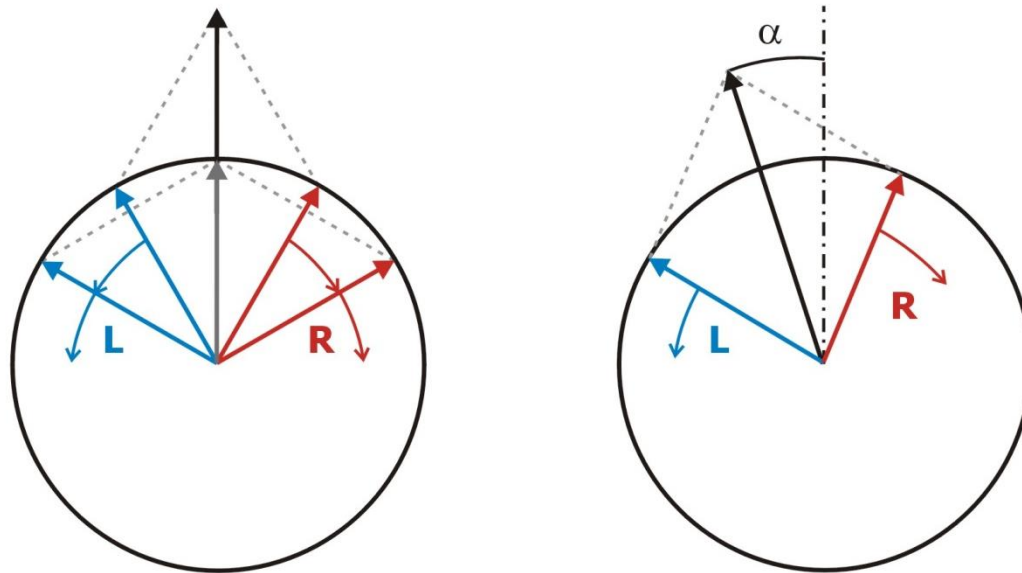


Kruhově polarizované světlo

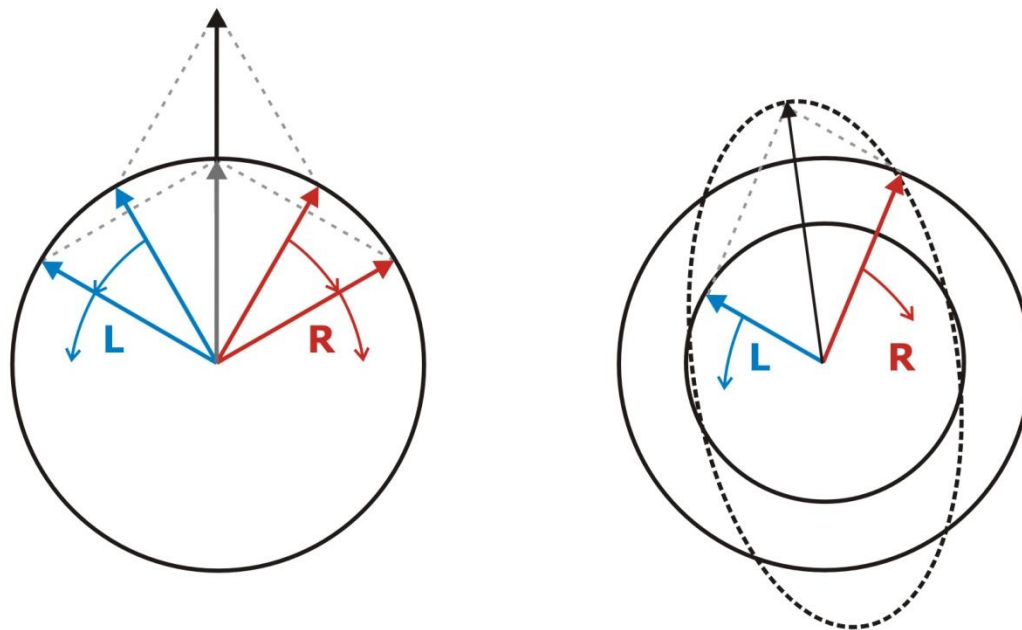
- ❑ konstantní amplituda, modulovaná orientace
- ❑ kruh s průměrem $2A_{\max}$



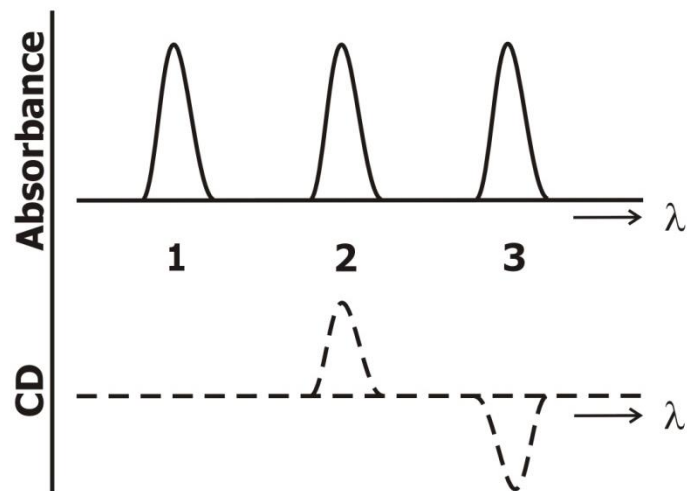
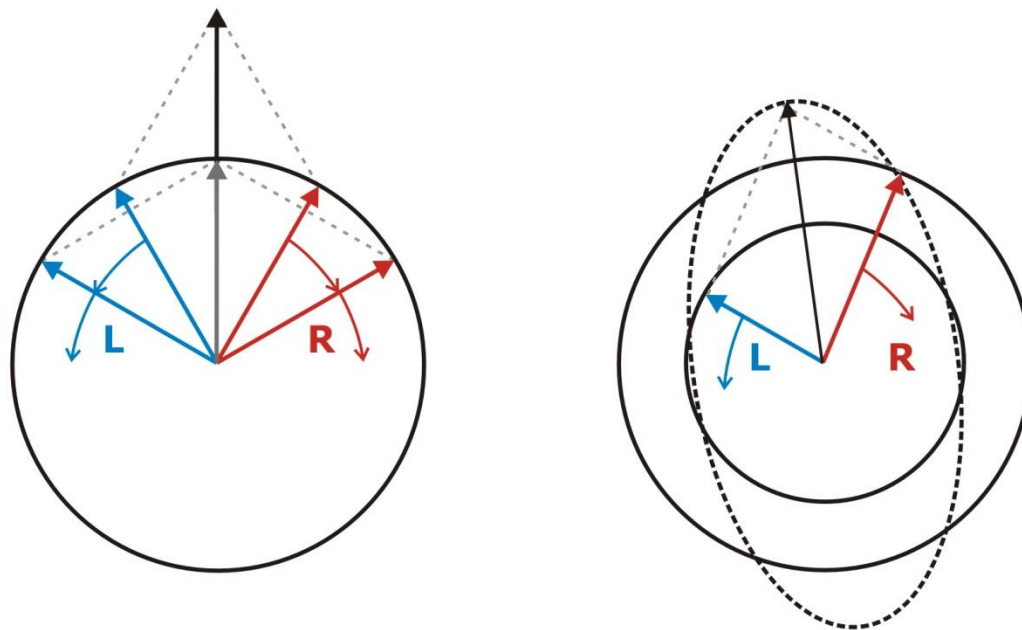




Fyzikální podstata



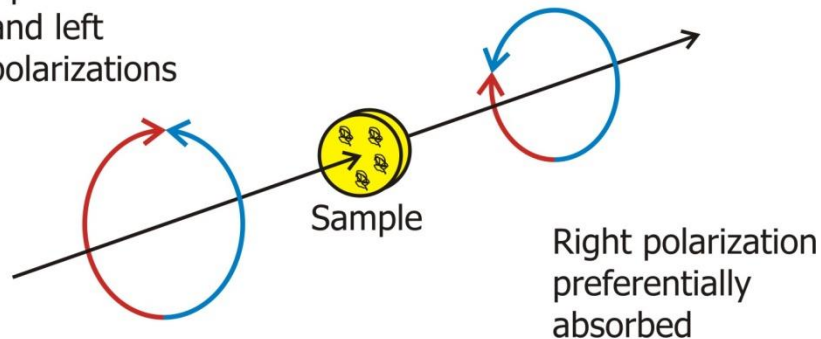
Fyzikální podstata



Fyzikální podstata - shrnutí

- ❑ lineárně polarizovaný paprsek je vektorovým součtem dvou opačných kruhově polarizovaných paprsků (R a L)
- ❑ při průchodu opticky aktivním chromoforem jsou **R a L** paprsky **rozdílně absorbovány**
- ❑ **výsledné záření je elipticky polarizované**

Equal proportions
of right and left
circular polarizations



Jednotky cirkulárního dichroismu

- ❑ CD data prezentována elipticitou nebo absorbancí
- ❑ CD data normalizována na molární koncentraci chromoforu a počet opakujících se jednotek (peptidová vazba)

Název	Symbol	Definice	Jednotka
rozdíl molárních extinčních koeficientů	$\Delta \varepsilon$	$\Delta \varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R = \frac{\Delta A}{l \cdot c}$	$M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
elipticita	θ_{obs}	$\tan \theta_{\text{obs}} = \frac{b}{a} = \frac{E_L - E_R}{E_L + E_R}$	deg
molární elipticita	θ_m	$\theta_m = \frac{(\theta_{\text{obs}} \cdot 100)}{c \cdot l}$	$\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$
molární reziduální elipticita	θ_{MRE}	$\theta_{\text{MRE}} = \frac{(\theta_{\text{obs}} \cdot M_W \cdot 100)}{n \cdot c \cdot l}$	$\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$

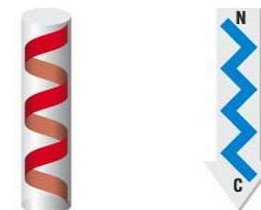
Proteinové chromofory

□ daleká UV oblast

180-250 nm

chromoforem je peptidová vazba

informace o sekundární struktuře proteinu

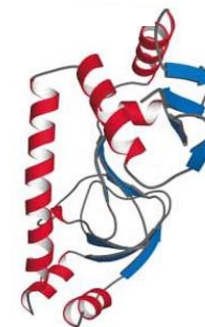


□ blízká UV oblast

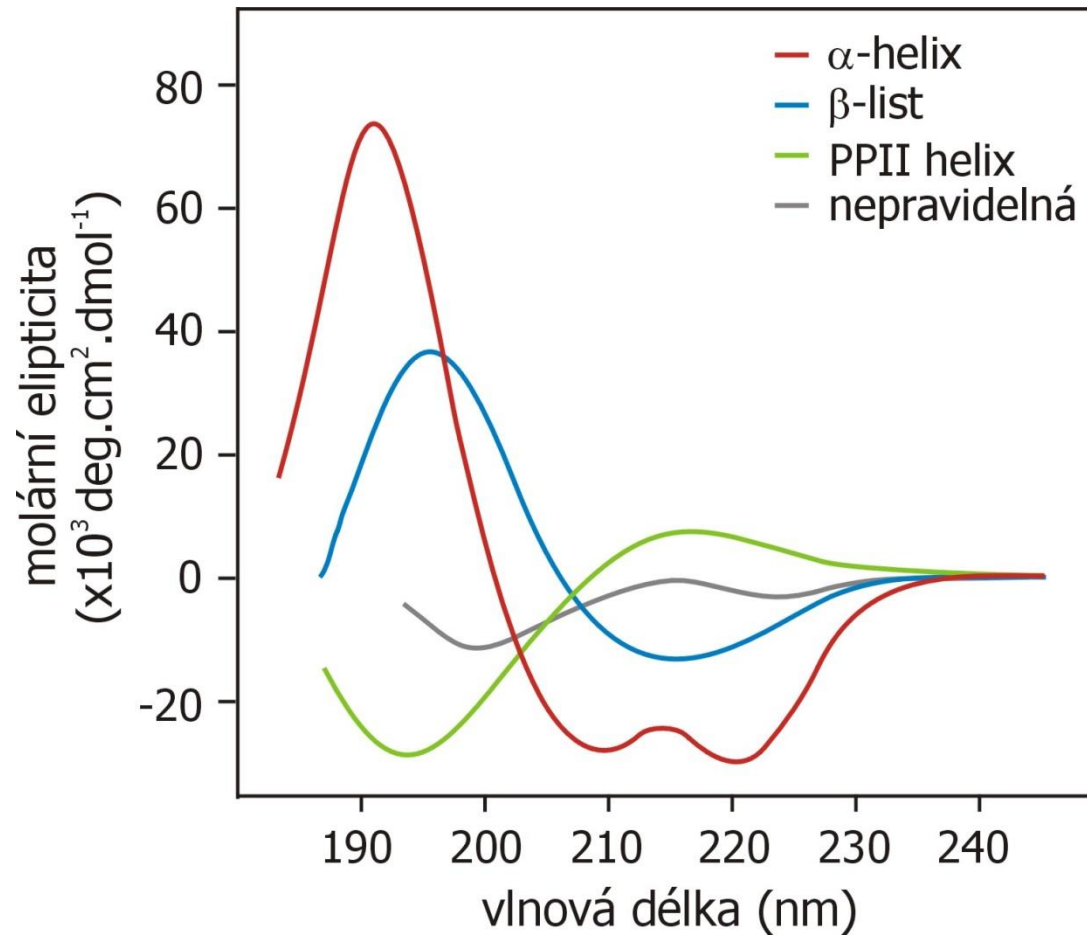
260-320 nm

chromofory jsou aromatické aminokyseliny a disulfidické můstky

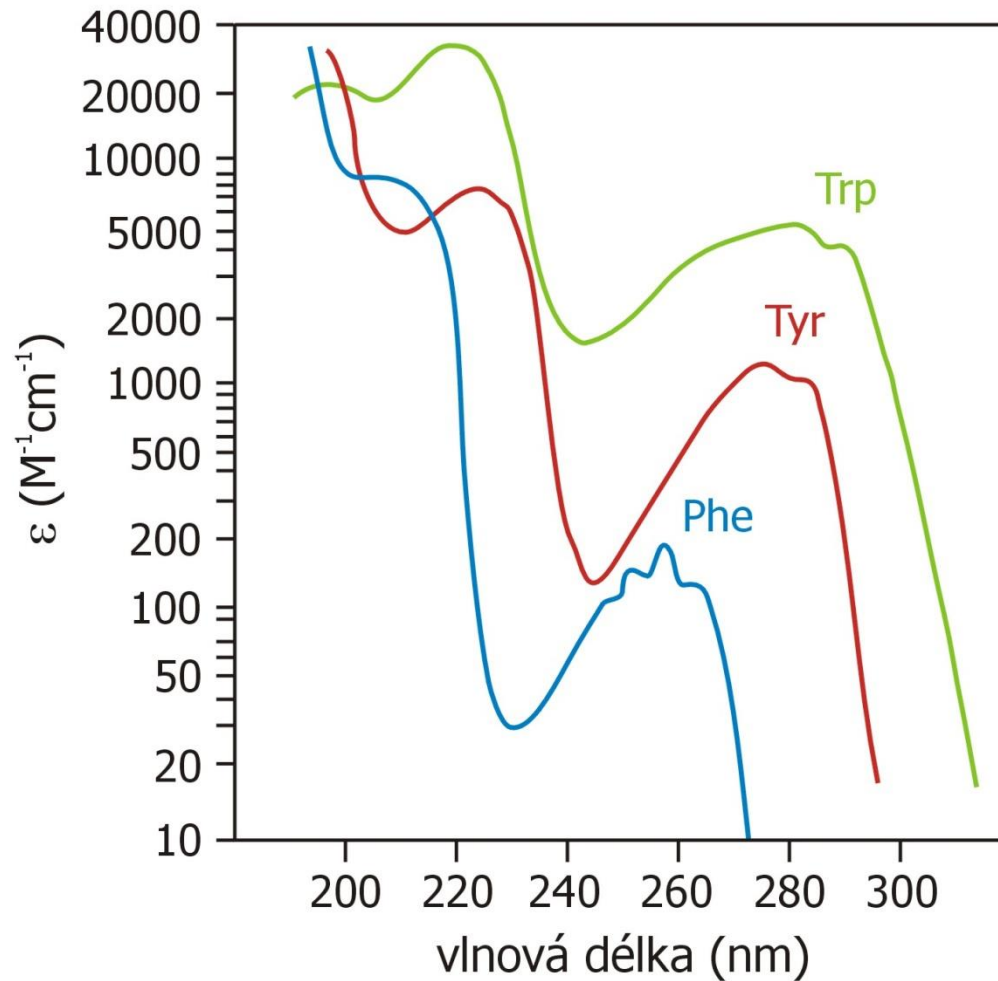
informace o průměrných změnách v terciální struktuře proteinů



Daleká UV oblast



Blízká UV oblast



Příprava vzorků pro CD měření

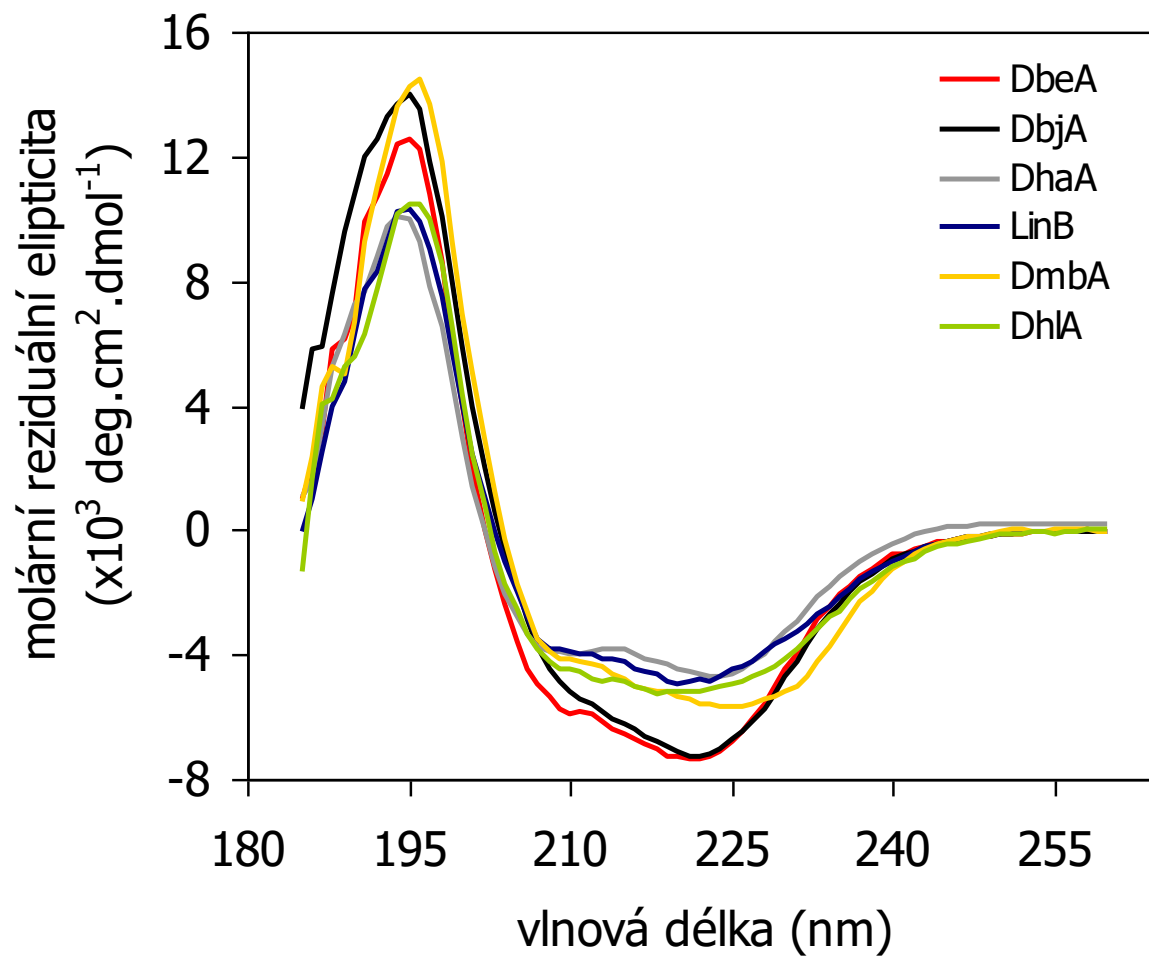
- ❑ vysoká čistota ~ 95% (kontrola na SDS gelu)
- ❑ homogenní vzorek bez proteinových agregátů (filtrace proteinu)
- ❑ odstranění oligonukleotidových fragmentů (přídavek nukleasy před purifikací proteinu)
- ❑ odstranění imidazolu/NaCl po purifikaci (dialýza, gelová filtrace)
- ❑ odstranění stabilizačních látek (EDTA, dithiothieitol)
- ❑ **volba vhodného pufru pro měření v daleké UV oblasti**
- ❑ množství proteinu pro měření v daleké UV oblasti 50-500 μg

Volba pufru pro CD měření

Složka pufru	Nulová absorbance nad:	Absorbance (10 mM roztok v 0.1 cm kyvetě)			
		210 nm	200 nm	190 nm	180 nm
NaCl	205 nm	0	0.02	> 0.5	> 0.5
NaF, KF	170 nm	0	0	0	0
NaClO ₄	170 nm	0	0	0	0
Na ₂ HPO ₄	210 nm	0	0.05	0.3	> 0.5
NaH ₂ PO ₄	195 nm	0	0	0.01	0.15
NaOH	230 nm	≥ 0.5	> 2	> 2	> 2
Boric acid	180 nm	0	0	0	0
Borate/Na ⁺ (pH 9)	200 nm	0	0	0.09	0.3
Glycine	220 nm	0.03	0.1	> 0.5	> 0.5
Tris/H ₂ SO ₄ (pH 8)	220 nm	0.02	0.13	0.24	> 0.5
Acetate/Na ⁺	220 nm	0.03	0.17	> 0.5	> 0.5

- ❑ **analýza sekundární struktury proteinů**
- ❑ **sledování konformačních změn**
 - teplotní a pH stabilita, stabilita vůči denaturačním činidlům
 - porovnání struktury mutantních variant s divokým typem
 - vliv aditiv (solventy, soli) na strukturu a stabilitu proteinů
- ❑ kinetika „foldingu“ a „refoldingu“ proteinů
- ❑ design nových peptidů a proteinů
- ❑ studium protein-ligandových interakcí, design léčiv (inhibitorů)
- ❑ studium protein-proteinových a protein-DNA interakcí

Příklady využití CD spektroskopie



Příklady využití CD spektroskopie



On-line analysis for protein Circular Dichroism spectra

[Home](#)

[Input Data](#)

[User Guide](#)

[Background Information](#)

[FAQ](#)

[References](#)

[Links](#)

[Contact Us](#)

[Terms and Conditions](#)

[Cookies](#)

[Apply for a user-account](#)

[Analyse data](#) (registered users only)

Citing DichroWeb:

If you use DichroWeb for your analysis you agree to cite the publications detailing the original methods and reference data used, as well as one of the specific DichroWeb papers:

Whitmore, L. and Wallace, B.A. (2008) *Biopolymers* 89: 392-400. [\(PDF\)](#)

Whitmore, L. and Wallace, B.A. (2004) *Nucleic Acids Research* 32: W668-673. [\(PDF\)](#)

DichroWeb News

Analyses now possible using Membrane Protein data set SMP180. Abdul-Gader A, Miles AJ, Wallace BA. *Bioinformatics* (2011) 27: 1630-6.

[Video guide for Cleaning and Loading Circular Dichroism Cells](#)

Related Projects [2Struc: The Secondary Structure Server](#) and the [Protein Circular Dichroism Data Bank](#) are now open for use.

Stats

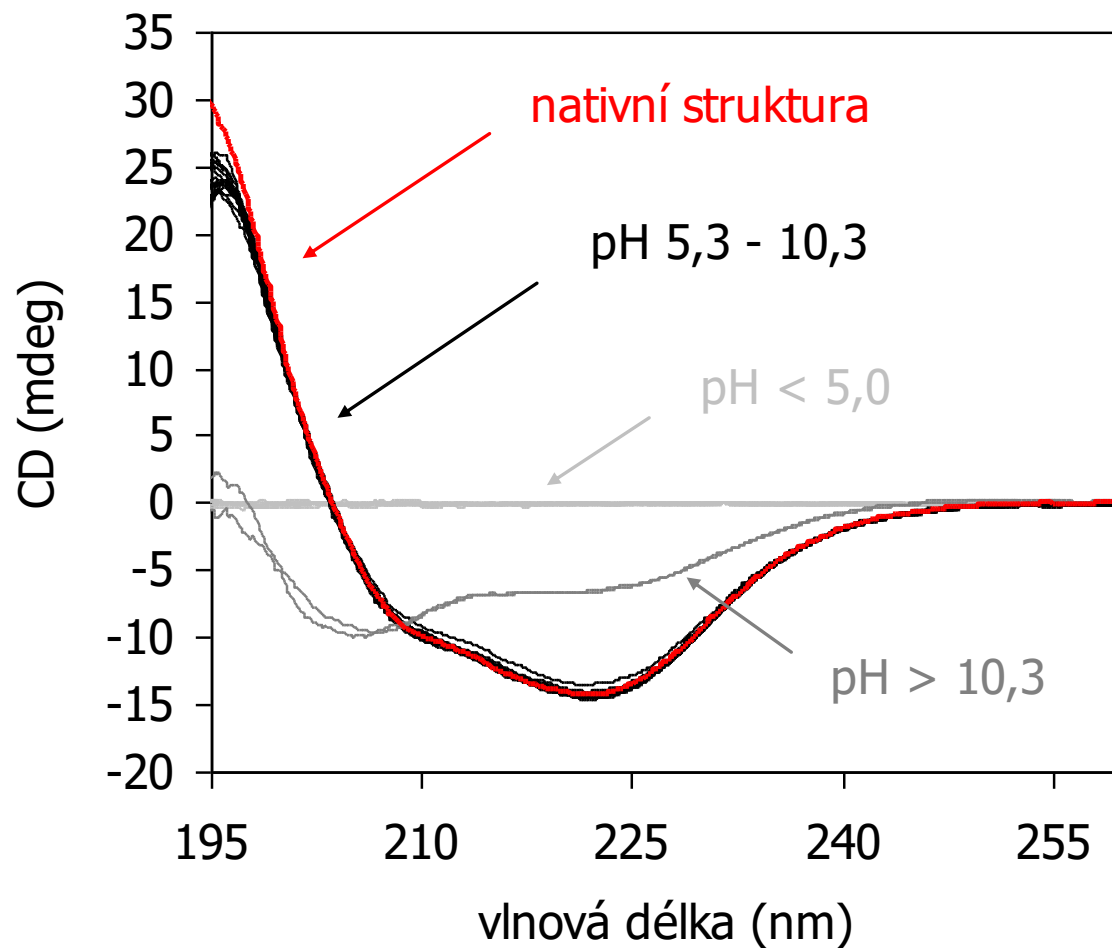
DichroWeb currently has 3600+ registered users and has performed over 375,000 deconvolutions.

DichroWeb is produced by Dr. L. Whitmore, in the lab of Professor B.A. Wallace at the Department of Crystallography, Institute of Structural and Molecular Biology, Birkbeck College, University of London, UK. © 2012. We are supported by a grant from the [BBSRC](#).

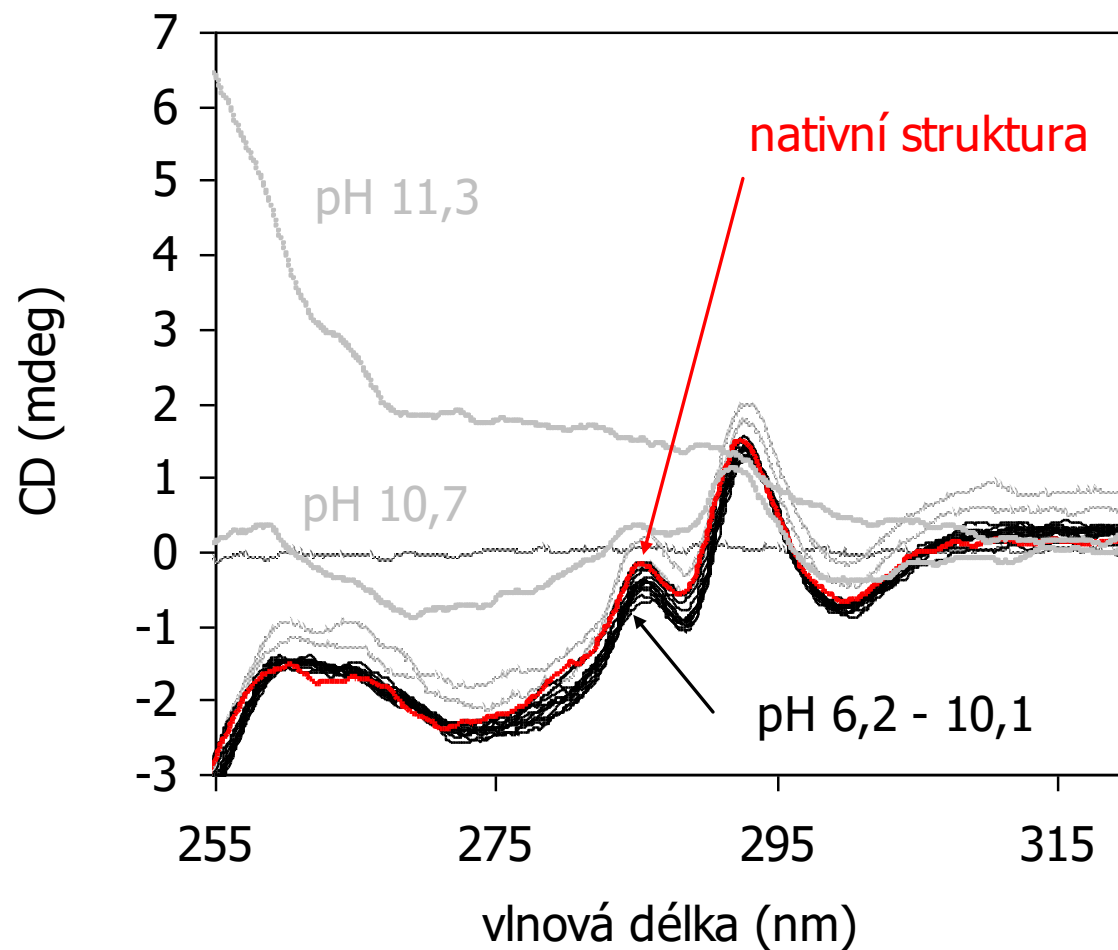
Příklady využití CD spektroskopie

Protein	α -helix (%)	β -list (%)	smyčky(%)	nepravidelná (%)
DbeA	49	13	11	27
DbjA	48	13	10	29
DhaA	39	16	16	39
LinB	40	14	15	31
DmbA	42	15	12	31
DhIA	41	15	14	30

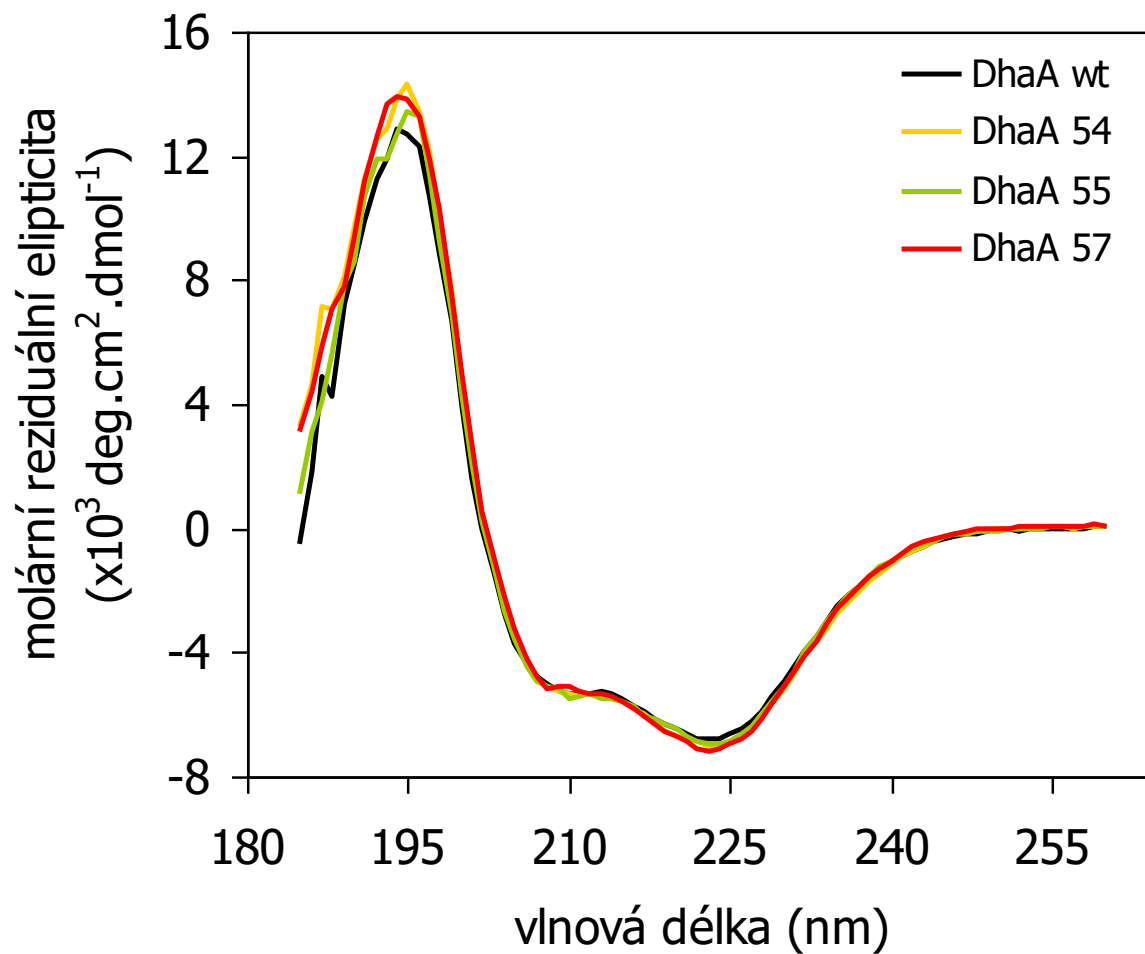
Příklady využití CD spektroskopie



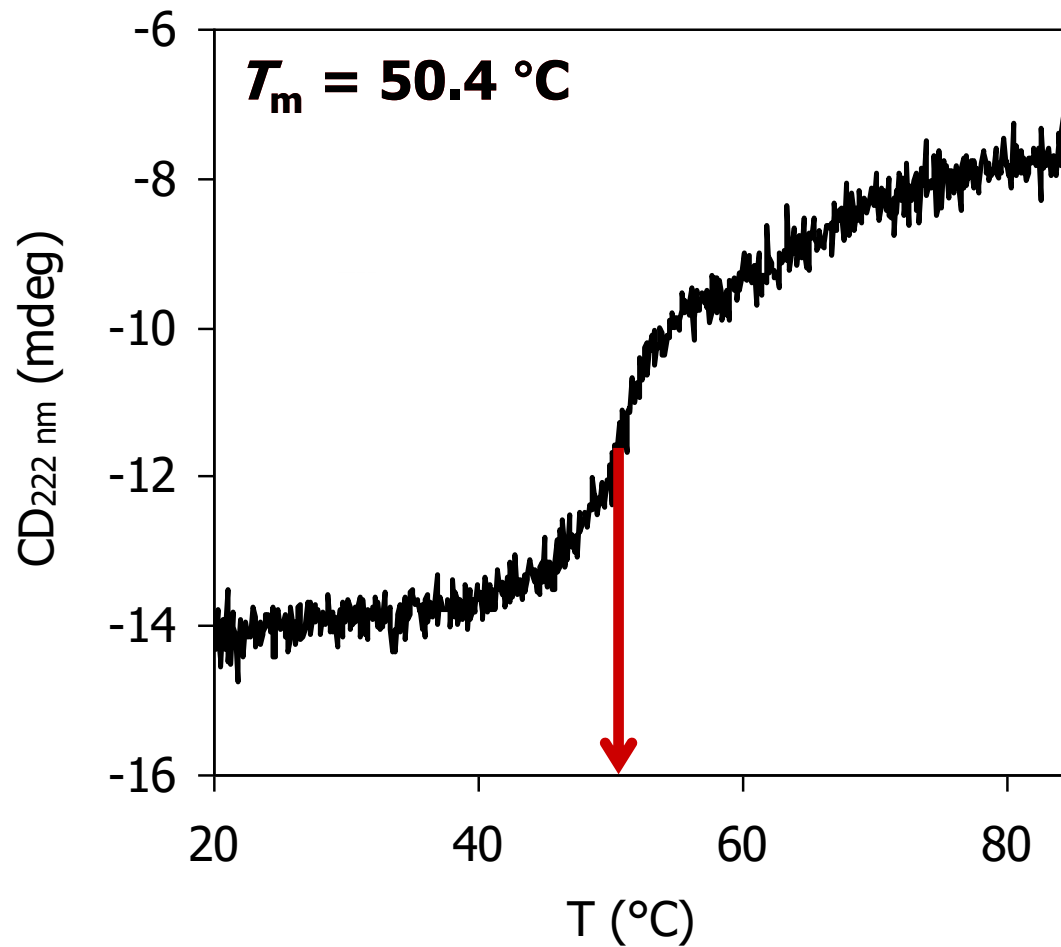
Příklady využití CD spektroskopie



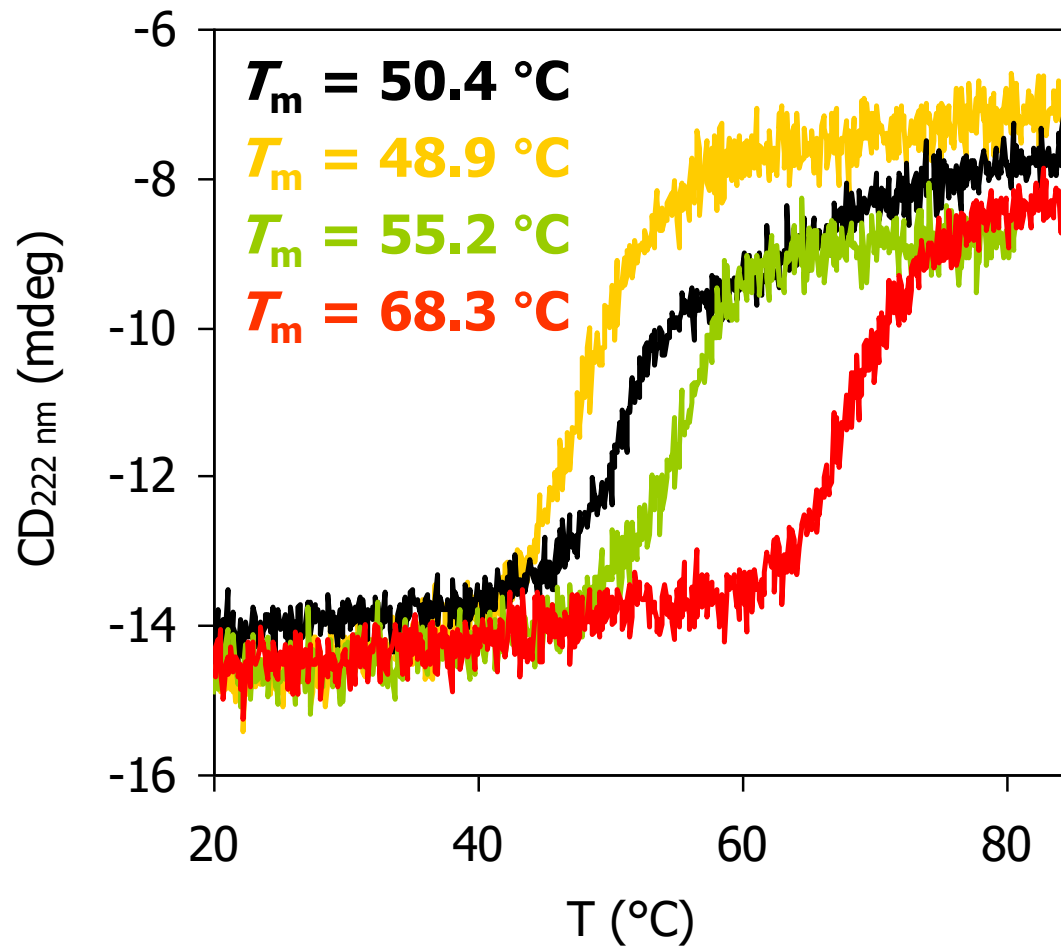
Příklady využití CD spektroskopie



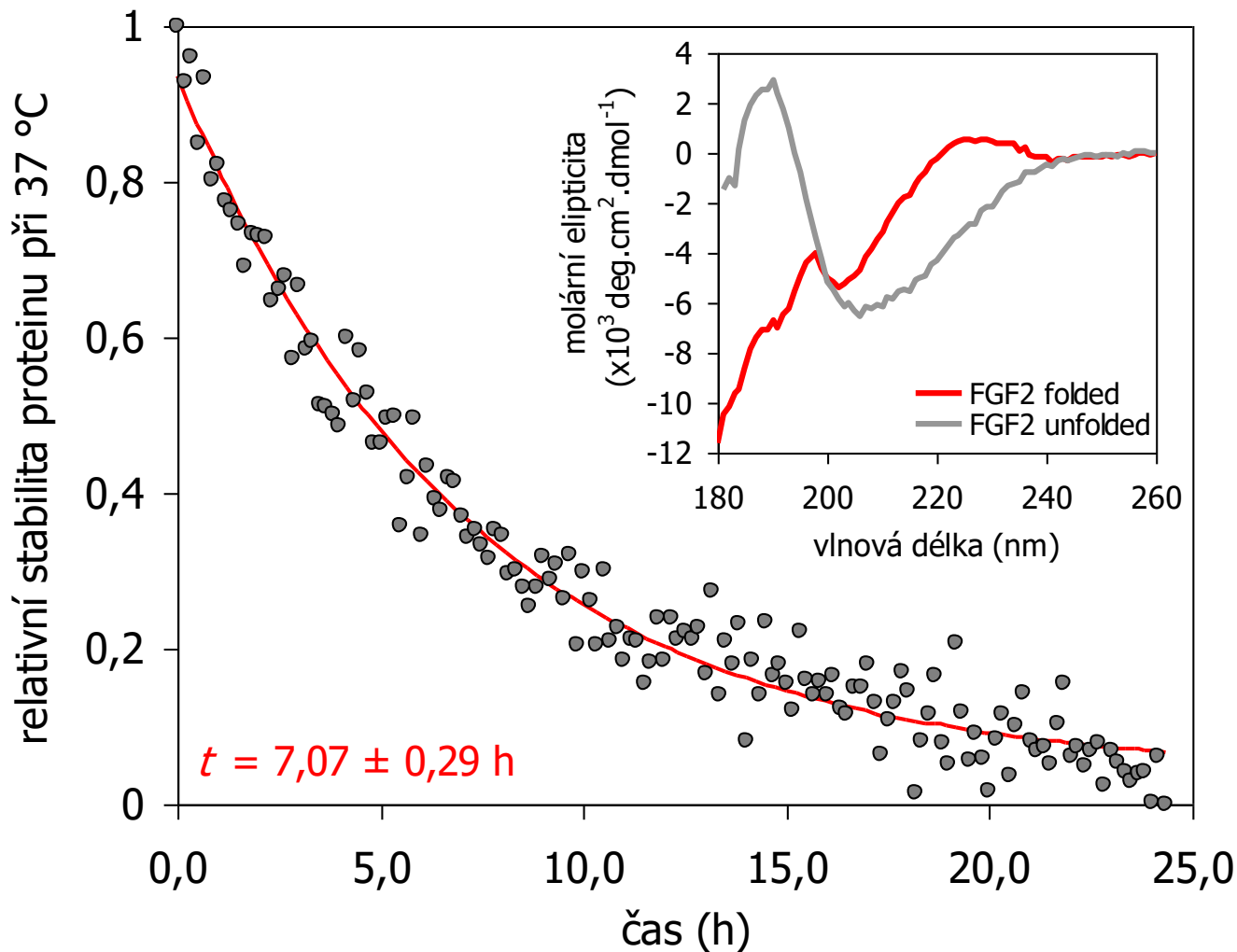
Příklady využití CD spektroskopie



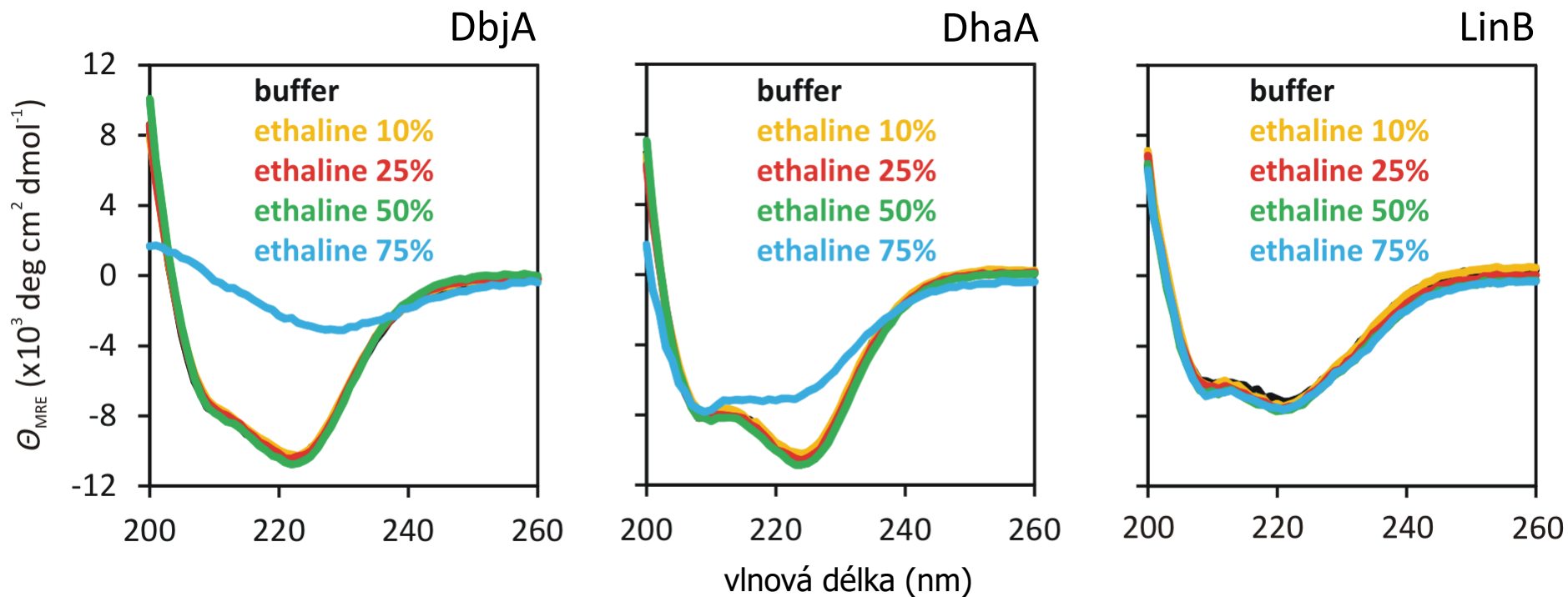
Příklady využití CD spektroskopie

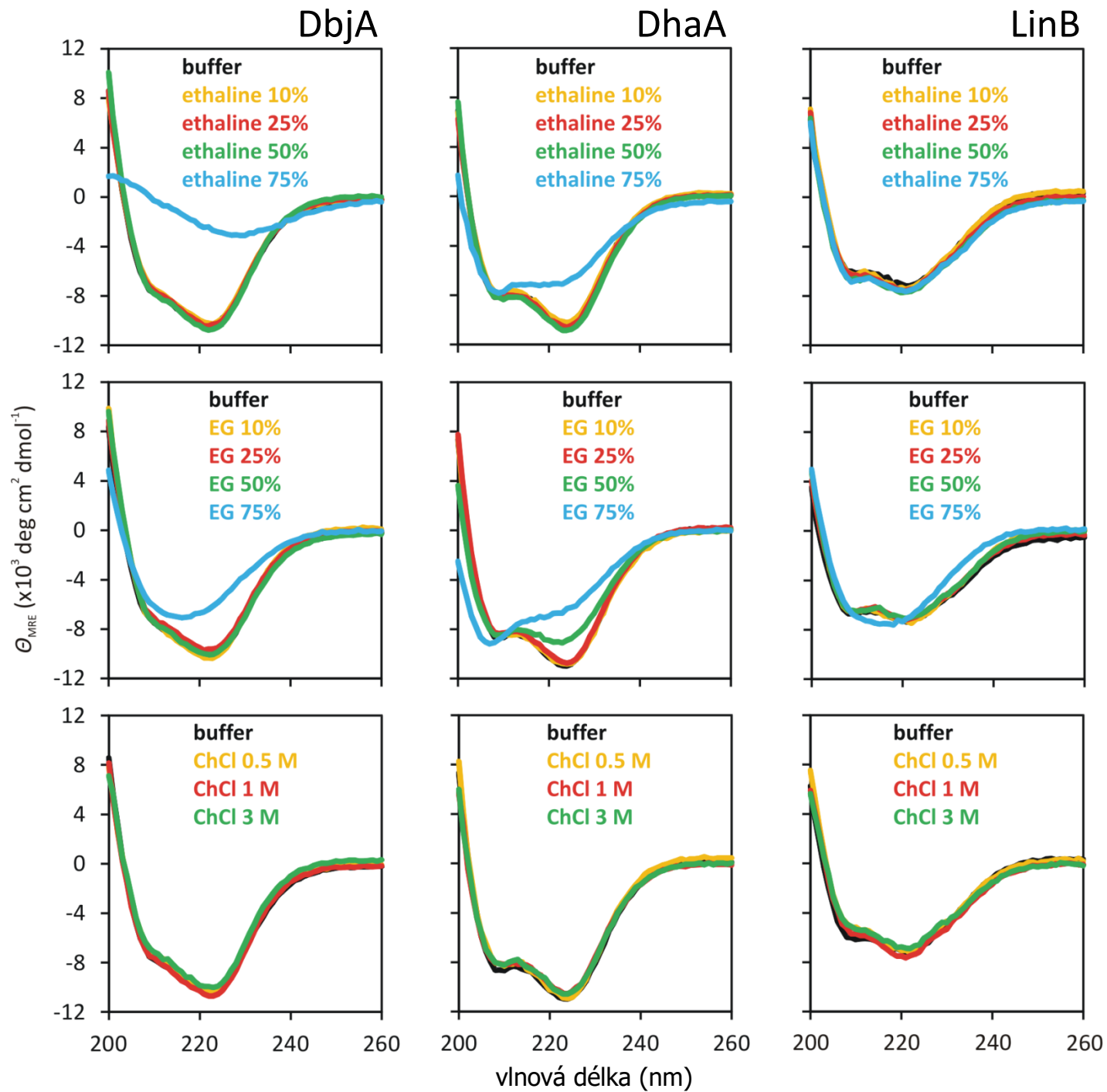


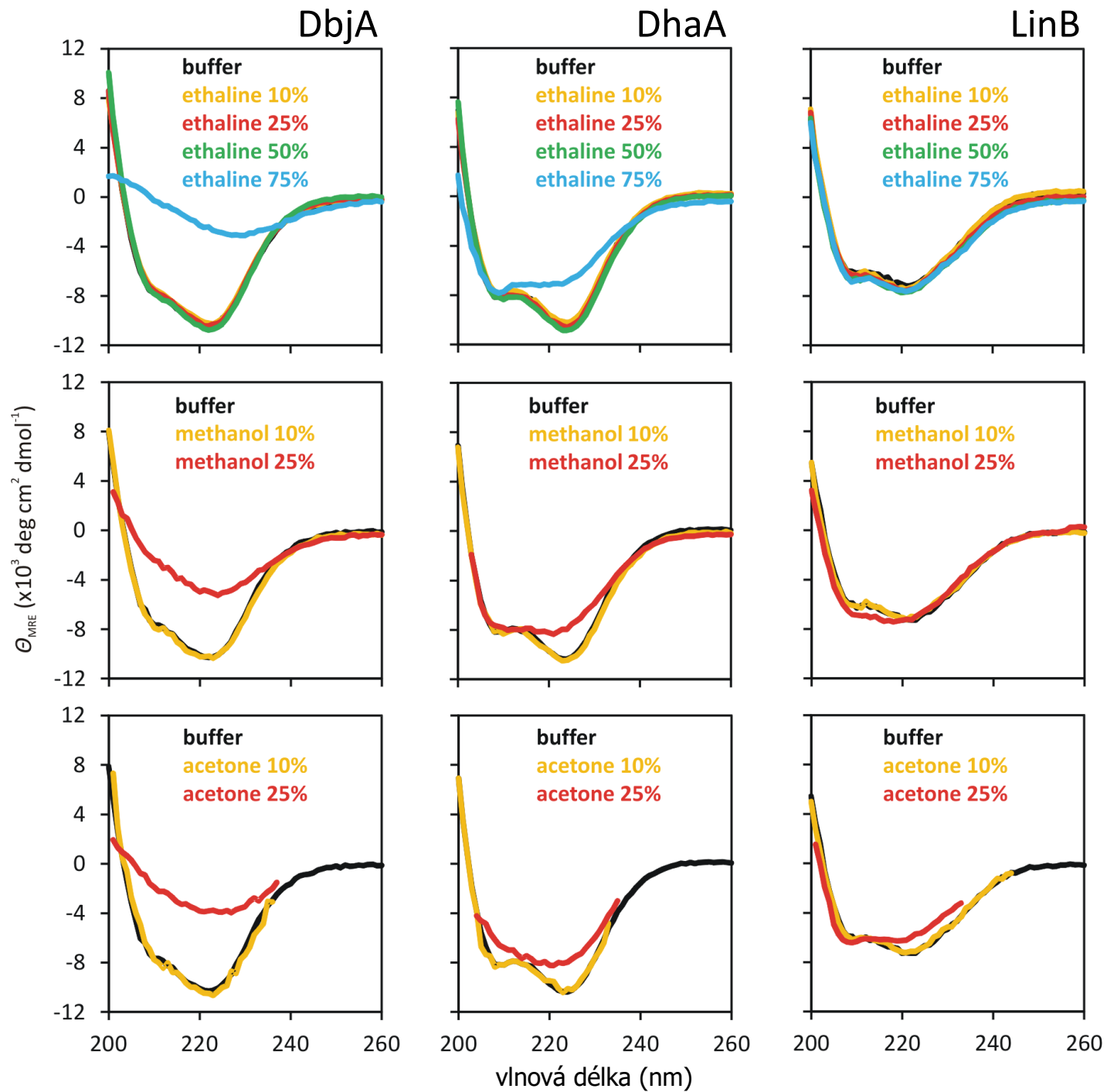
Příklady využití CD spektroskopie



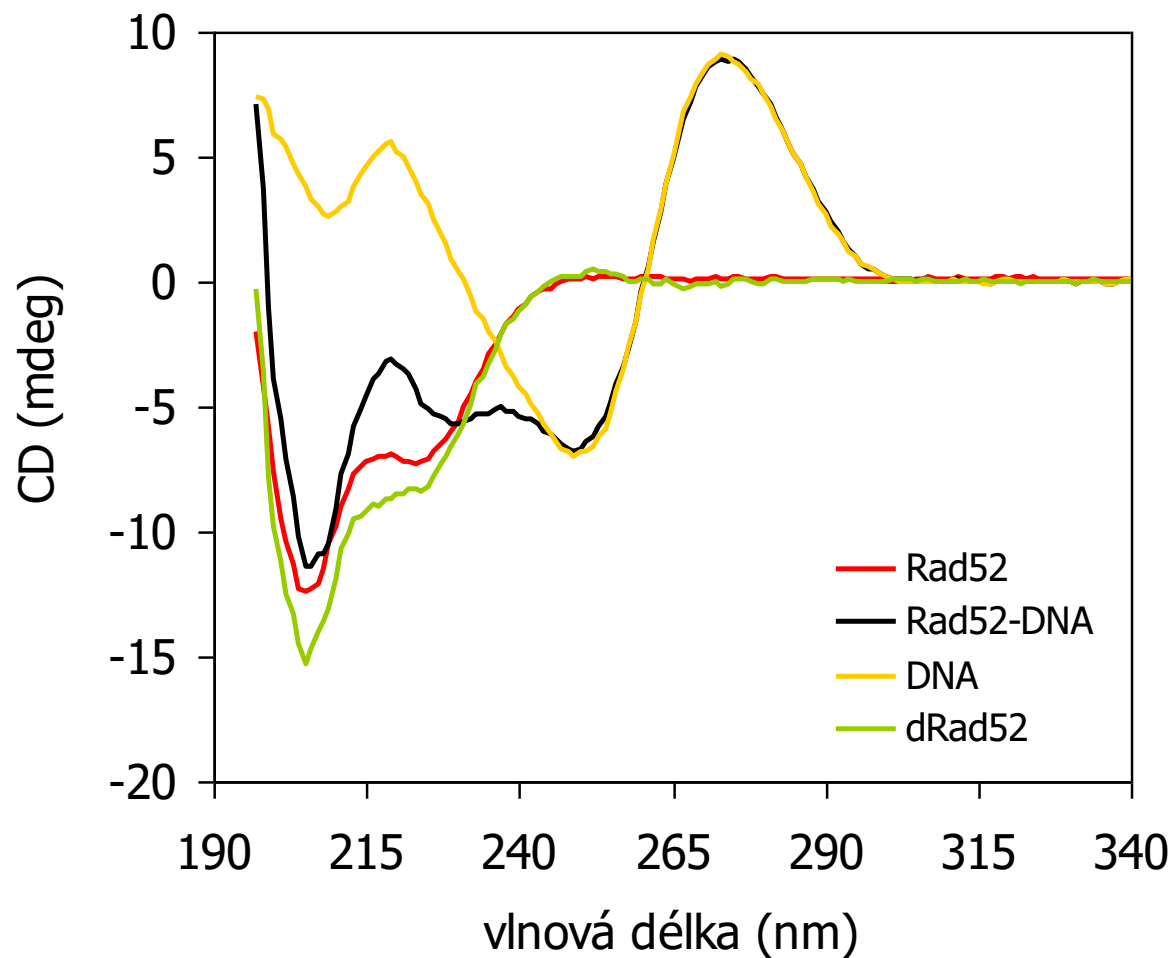
Příklady využití CD spektroskopie



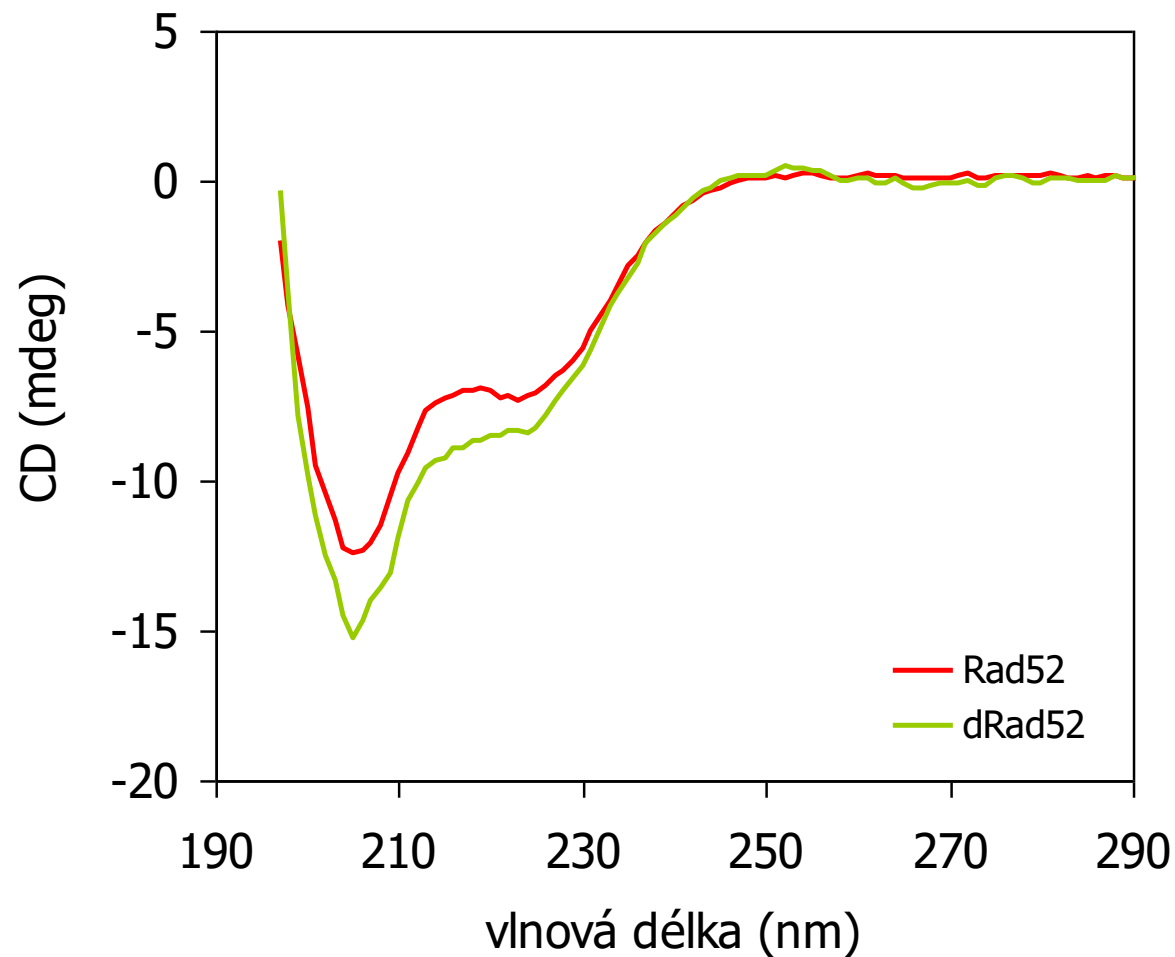




Příklady využití CD spektroskopie



Příklady využití CD spektroskopie



Výhody a limitace CD spektroskopie

- ❑ snadnost a rychlost měření
- ❑ malé množství a nízká koncentrace vzorku
- ❑ nevyžaduje přítomnost značených molekul
- ❑ komplementární strukturní informace z různých oblastí spektra
- ❑ nedestruktivní technika

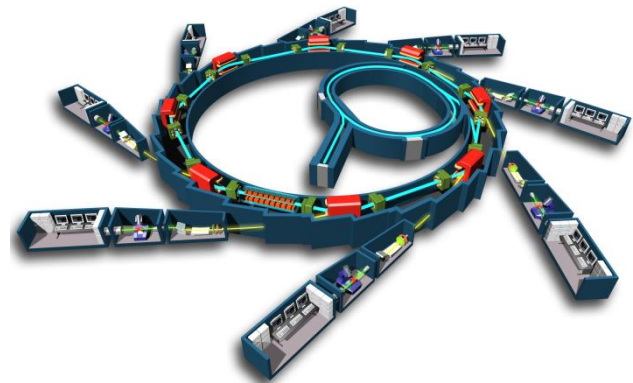
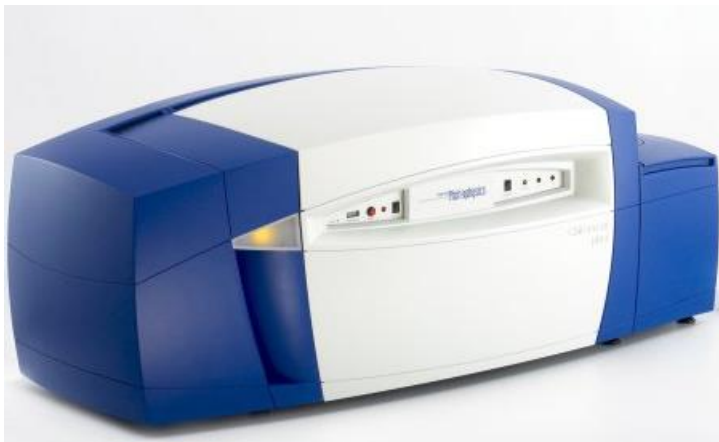
- ❑ strukturní informace s relativně nízkým rozlišením
- ❑ žádná informace o kvartérní struktuře proteinů

Výhody a limitace CD spektroskopie

Spektroskopická technika	Požadavky na vzorek		Měřící čas	Analýza dat	Strukturní informace
	c [mg/ml]	need			
daleká-UV CD	0.1-1.0	-	15-50 min	1-2 dny	2D struktura, konformační změny
blízká-UV CD	0.5-5.0	-	15-50 min	2-4 hod	3D „otisk prstu“
IR, Raman	10-20	^2H	10-20 hod	1-2 dny	2D struktura
fluorescence	0.005-0.5	-	10-30 min	2-4 hod	změny ve 3D
NMR	10-40	^{13}C , ^{15}N	1-3 týdny	2-6 měsíců	3D atomární úroveň, dynamika
rentgenová krystalografie	5-50	krystal	10-30 min	měsíce-roky	3D atomární úroveň, statická struktura
neutronová krystalografie	5-50	krystal, ^2H	1-4 týdny	měsíce-roky	3D atomární úroveň, protonové interakce

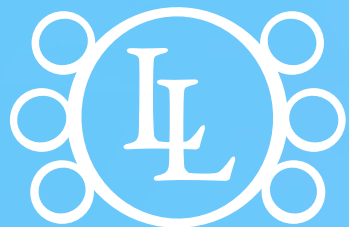
Výhody a limitace CD spektroskopie

- ❑ CD spektropolarimetr x synchrotron



- ❑ Fasman, G.D. (1996) Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules, Springer US
- ❑ Kelly, S.M. et al. (2005) How to Study Proteins by Circular Dichroism, Biochim. Biophys. Acta 1751: 119-139
- ❑ Harding, S.E., Chowdhry, B.Z. (2001) Protein-Ligand Interactions: Structure and Spectroscopy, Oxford University Press

❑ **DOTAZY?**



LOSCHMIDT
LABORATORIES



kontakt: radka@chemi.muni.cz