

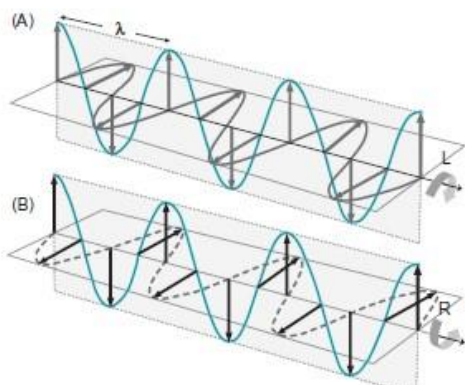
## Spektroskopie cirkulárního dichroismu aminokyselin a proteinů

Začátkem 19. století francouzský fyzik Jean Baptista Biot pozoroval, že roztoky některých organických molekul stáčí rovinu polarizovaného světla. Tento jev je důsledkem skutečnosti, že každý enantiomer opticky aktivní látky interaguje jinak s levotočivou a pravotočivou složkou kruhově polarizovaného světla, což vede ke dvěma souvisejícím jevům známým jako optická rotační disperze (ORD) a cirkulární dichroismus (CD).

Světlo procházející roztokem chromoforu může se vzorkem interagovat dvěma způsoby: může se buď lámat, nebo absorbovat. Lom lze kvantifikovat pomocí indexu lomu  $n$ , absorpce je kvantifikována pomocí molárního extinkčního koeficientu  $\epsilon$ . Pokud je světlo lineárně polarizované (elektrická a magnetická složka jsou navzájem kolmé a elektrická složka kmitá jen v jednom směru, tedy v jedné rovině) a vzorek je opticky aktivní, může každý enantiomer interagovat jinak s levotočivou a pravotočivou složkou kruhově polarizovaného světla (elektrický i magnetický vektor vykonává rotační pohyb buď doprava, nebo doleva ve směru šíření paprsku).

### ***Kruhově polarizované světlo***

Kruhově polarizované světlo vzniká součtem dvou elektromagnetických vln, které svírají pravý úhel a jsou navzájem fázově posunuté. Z obrázků 1 a 2 je zřejmé, že lineárně polarizované světlo je ekvivalentní sumě dvou kruhově polarizovaných paprsků rotujících v opačných směrech L a R.



Obr. 1: L a R kruhově polarizované světlo je generováno jako suma dvou navzájem kolmých elektromagnetických vln



Obr. 2: Ilustrace dvou kruhově polarizovaných paprsků stejné amplitudy, kde vektory  $E$  rotují v pravém (R) a levém směru (L). Vektorovým součtem těchto dvou složek vzniká lineárně polarizovaná vlna (na obr. azurová).

ORD je založena na faktu, že levotočivá a pravotočivá složka kruhově polarizovaného světla mají specifický index lomu ( $n_L$  a  $n_R$ ,  $n_L \neq n_R$ ). Rozdíl v indexu lomu při určité vlnové délce lze vyjádřit jako  $\Delta n$ . Platí vztah  $[\alpha]_\lambda = \alpha_{\text{obs}}/(c \cdot l)$ , kde  $[\alpha]_\lambda$  je specifická otáčivost při vlnové délce  $\lambda$ ,  $\alpha_{\text{obs}}$  je pozorovaný úhel stočení,  $c$  je koncentrace látky ve vzorku a  $l$  je délka optické dráhy.

Podobně mohou mít opticky aktivní látky odlišný i molární absorpční koeficient pro levotočivou a pravotočivou složku kruhově polarizovaného světla ( $\epsilon_L$  a  $\epsilon_R$ ,  $\epsilon_L \neq \epsilon_R$ ). Tento jev je označován jako cirkulární dichroismus. A podobně jako výše i rozdíl mezi  $\epsilon_L$  a  $\epsilon_R$  lze vyjádřit

jako  $\Delta\varepsilon$ . Kombinace nerovnosti  $\varepsilon_L \neq \varepsilon_R$  a Lambert – Beerova zákona ukazuje rozdíl v absorpenci levotočivé a pravotočivé složky kruhově polarizovaného světla ( $\Delta A$ ):  $\Delta A = \Delta\varepsilon \cdot c \cdot l$ .

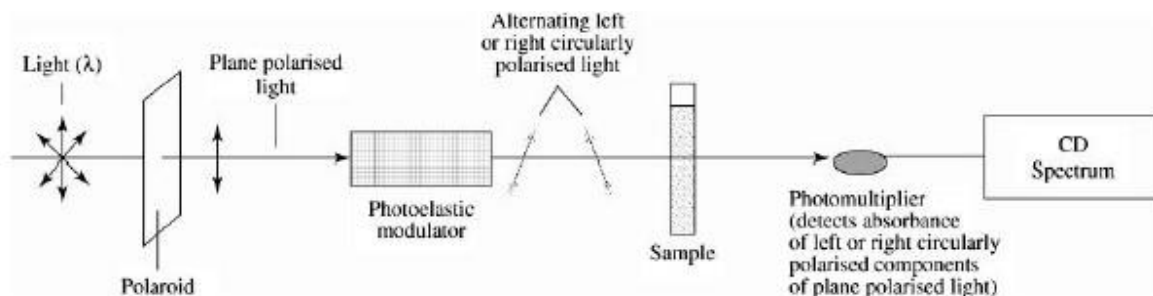
Pokud je  $\Delta\varepsilon$ ,  $\Delta A$  nebo elipticita  $\Theta$  vynesena v závislosti na  $\lambda$ , získáme CD spektrum zkoumané látky.

### Měření CD spekter

CD spektra se měří pomocí speciálního typu spektrofotometru nazývaného CD spektropolarimetr. Jelikož CD je založen na rozdílné absorpenci, musí být přístroj vybaven zařízením pro selektivní vystavení vzorku levotočivé a pravotočivé složce kruhově polarizovaného světla. Za tímto účelem se využívá fotoelastický modulátor, což je vlastně krystal křemene vystavený oscilujícímu elektrickému poli. Paprsek rovinně polarizovaného světla prochází tímto modulátorem střídavě zleva doprava s frekvencí asi 50 kHz při zachování konstantní intenzity světla a výsledkem je změna kruhové polarizace paprsku.

Rozdílná absorpce levotočivé a pravotočivé složky kruhově polarizovaného světla je detekována fotonásobičem a převedena na elipticitu  $\Theta$  v jednotkách milidegrees. Tento termín vychází ze skutečnosti, že selektivní absorpce jedné z kruhově polarizovaných složek rovinně polarizovaného světla má za následek, že výsledný elektrický vektor sleduje eliptickou dráhu kolem osy paprsku, což se označuje jako eliptická polarizace.

V CD spektropolarimetru nejsou ve skutečnosti dva světelné paprsky odlišeny, ale fotonásobič převádí intenzitu dopadajícího světla na elektrický proud složený částečně ze střídavé (AC) a částečně ze stejnosměrné (DC) složky. DC složka souvisí s celkovou absorpcí světla vzorkem, zatímco složka AC je přímým měřítkem CD. Toto uspořádání usnadňuje oddělené měření absorpce pravotočivé a levotočivé kruhově polarizované složky rovinně polarizovaného světla.



Obr. 3: Uspořádání CD spektropolarimetru



Obr. 4: CD spektropolarimetr Jasco J-810

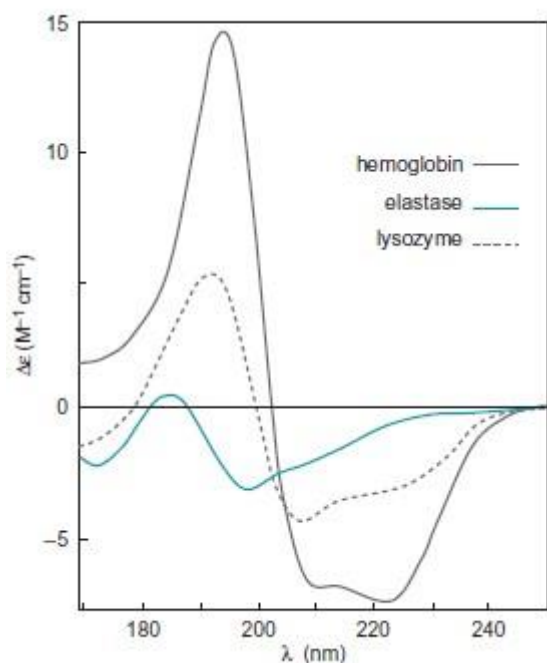
Elipticita pak může být převedena na jednotky absorbance s využitím rovnice

$$\Delta A = \frac{\Theta}{32,982}$$

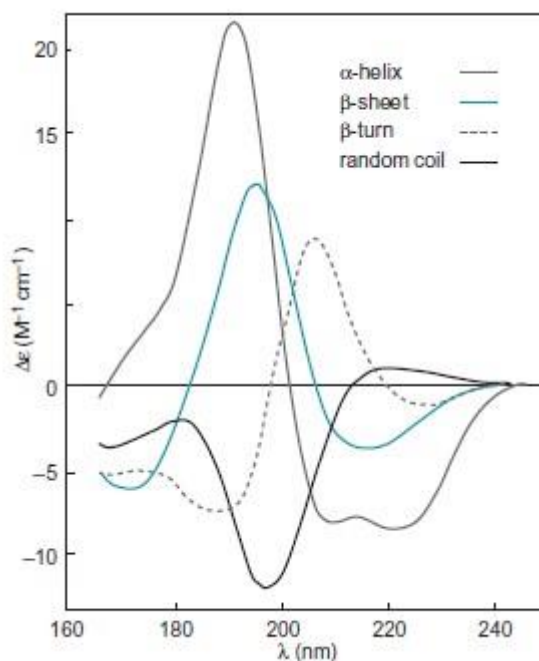
ORD i CD spektra jsou důkazem optické aktivity ve vzorku a obě odrážejí strukturu molekul ve vzorku, zejména chirálních biopolymerů, jako jsou proteiny a nukleové kyseliny. V praxi byla v současnosti ORD spektra z velké části nahrazena CD spektry.

### ***Cirkulární dichroismus aminokyselin a proteinů***

V případě proteinů jsou hlavním předmětem zájmu tyto chromofory: peptidová vazba, aromatické postranní řetězce a některé prostetické skupiny. Existují dva hlavní pozorované přechody peptidových vazeb:  $\pi - \pi^*$  a  $n - \pi^*$ . Vzdálená UV oblast (170–250 nm), v níž je hlavním chromoforem peptidová vazba, je velmi zajímavá, jelikož odpovídající spektra mohou poskytnout informace o sekundární struktuře proteinu. CD spektra získaná ve vzdálené UV oblasti jsou odlišná pro proteiny s rozdílnou strukturou (Obr. 5); tato spektra pro různé typy sekundární struktury jsou ukázána na Obr. 6.



Obr. 5: CD spektra tří reprezentativních proteinů: hemoglobin, elastáza a lysozym

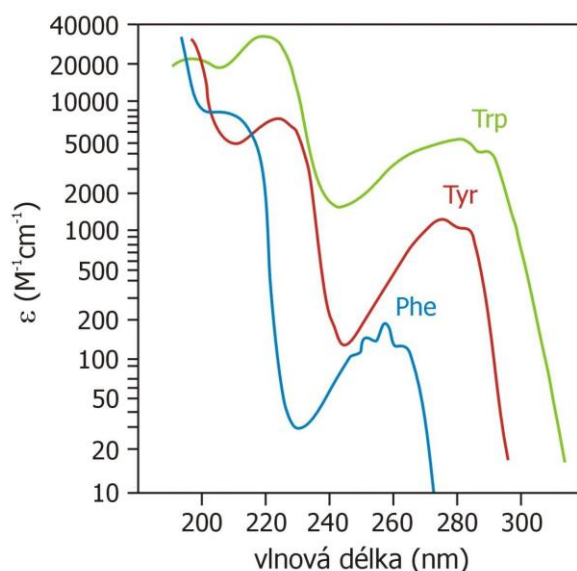


Obr. 6: CD spektra reprezentativní sekundární struktury proteinů

Jedním ze způsobů, jak interpretovat získané CD spektrum, je lineární kombinace různých typů sekundární struktury – vícesložková analýza. Frakce sekundární struktury ( $\alpha$ ,  $\beta$ , atd.) se mění, dokud jejich součet nedává nejlepší shodu s experimentální křivkou v celém rozsahu vlnových délek. Problémem vícesložkové analýzy je, že referenční spektra pro různé typy sekundární struktury nejsou dokonalá. Ve snaze obejít tento problém byly vyvinuty metody, které analyzují experimentální CD spektra pomocí databází referenčních CD spekter proteinů. Byly nastaveny servery pro analýzu experimentálních dat z hlediska podílu sekundární struktury a proteinů se známou strukturou. CD je zvláště spolehlivý pro predikci podílu  $\alpha$ -helixu (97% přesnost ve srovnání se známou X-ray strukturou), méně spolehlivý je však pro predikci podílu  $\beta$  – skládaného listu (asi 75%) a  $\beta$  – ohybů (asi 50%). Pro úspěšnost

strukturní analýzy těmito technikami je nutné, aby CD spektra byla zaznamenána při nízké vlnové délce (do 170 nm) a aby byly známy přesné koncentrace bílkovin.

CD spektra zaznamenaná v blízké UV oblasti (260–320 nm), kde chromoforem jsou aromatické aminokyseliny (Tyr, Trp, Phe) (Obr. 7) a disulfidické můstky, poskytují užitečné informace o změnách v terciární struktuře proteinů.



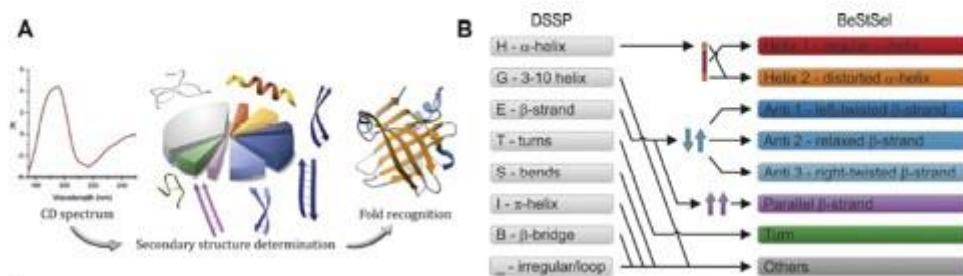
Obr. 7: Charakteristická CD spektra aromatických aminokyselin

### ***BeStSel (Beta Structure Selection)***

Spektroskopie cirkulárního dichroismu je široce využívanou metodou pro studium sekundární struktury proteinů. Po mnoho desetiletí panoval názor, že správný odhad zastoupení  $\beta$ -listů je velmi náročný kvůli jejich velké spektrální a strukturní rozmanitosti. Nedávno se však ukázalo, že orientace a stáčení  $\beta$ -listů zodpovídá za pozorovanou spektrální diverzitu, a byla proto vyvinuta nová metoda umožňující přesný odhad sekundární struktury. Webový server BeStSel poskytuje pro analýzu CD spekter metodu výběru beta struktury (Beta Structure Selection). Normalizovaná nebo naměřená data lze na server nahrát jako jediné spektrum nebo sérii spekter. Originalita BeStSelu spočívá v tom, že provádí podrobnou analýzu sekundární struktury, poskytující informace o osmi komponentách sekundární struktury, včetně paralelní  $\beta$  struktury a antiparalelních  $\beta$  - listů se třemi různými možnostmi stočení v prostoru [Micsónai A, et al, 2018, NAR; Micsónai A, et al, 2015, PNAS].

Úhly stočení  $\beta$  - listů jsou určeny jako úhly mezi peptidovou páteří dvou sousedních  $\beta$  řetězců při umístění párů residuí přilehlých podél sousedního  $\beta$  - řetězce, jak uvádí Ho a Curmi [Micsónai A, et al, 2015, Proc. Natl. Acad. Sci.; Ho B. K., et al, 2002, J. Mol. Biol.]. Na základě úhlů stočení v prostoru je pak zastoupení antiparalelního  $\beta$  - listu rozděleno do tří skupin pomocí úhlů  $+3^\circ$  a  $+23^\circ$  jako hranic mezi skupinami nazvanými i) levostranně stočený (Anti 1), ii) relaxovaný (mírně pravostranně stočený, Anti 2) a iii) pravostranně stočený (Anti 3). Ohyby (turn) jsou v BeStSelu definovány identicky jako v DSSP (Dictionary of Secondary Structure of Proteins, DSSP) [Kabsch W, et al, 1983, Biopolymers]. Všechna ostatní residua včetně těch neviditelných v trojrozměrné struktuře jsou označována jako „Others“ (Ostatní).

BeStSel je volně přístupný na webových stránkách <http://bestsel.elte.eu> [Micsonai A, et al, 2018, NAR; Micsonai A, et al, 2015, PNAS].



Obr. 8: Schéma programu BeStSel. A) Schématické znázornění analýzy CD spekter. B) Prvky sekundární struktury definované v BeStSelu dle DSSP [Micsonai A, et al, 2018, NAR]

## Praktická část úlohy

CD spektrální experiment studovaného proteinu BSA (bovine serum albumin) bude realizován s využitím CD spektrofotometru Jasco J-810 (Tokyo, Japan) v inertní dusíkové atmosféře.

### Úkol:

Studium CD spektrálního chování BSA v prostředí fosfátového – acetátového pufru vlivem měnícího se pH (pH 2–9) a následná analýza sekundární struktury a s tím související predikce možných konformačních změn proteinu s využitím online programu BeStSel.

### Postup:

Před začátkem každého měření je nutné přístroj evakuovat proudem dusíku (3 l/min), aby se jednak zajistila inertní atmosféra, a jednak se zabránilo poškození přístroje.

1. V prvním kroku tedy nejdříve otevřeme tlakovou láhev s  $N_2$  a průtok dusíku nastavíme na 3 l/min.

2. Po 5–10 minutách zapneme přístroj, počítač a spustíme program *Spectra Manager* (lampa se zapne až po spuštění programu). Pro úplnou evakuaci přístroje dusíkem je doporučeno počkat 30 minut.

Mezitím si připravíme roztoky a vzorky potřebné pro realizaci experimentu. Zásobní roztok BSA ( $M_r = 66463$  Da) o koncentraci 30  $\mu$ M připravíme navážením 0,00997 g BSA a doplněním PBS pufru na objem 5 ml.

Dále si připravíme 8 ks Eppendorf zkumavek, do nichž budeme připravovat samotné vzorky pro měření. Do každé z nich nejdříve napipetujeme fosfátový - acetátový pufr o daném pH. Jelikož připravený pufr je 5 $\times$  koncentrovaný a my pro měření potřebujeme 1 $\times$  koncentrovaný, musíme ho nejdříve naředit, tj. dáme 1 díl pufru a 4 díly vody. Do každé Eppendorf zkumavky, tedy napipetujeme 300  $\mu$ l pufru a zředíme 1200  $\mu$ l  $H_2O$  (MiliQ, 18,2 M $\Omega$ -cm, 25  $^{\circ}$ C). Poté z každé z nich odebereme 50  $\mu$ l roztoku a přidáme 50  $\mu$ l BSA (zásobní roztok 30  $\mu$ M BSA v PBS); výsledná koncentrace BSA ve všech experimentech bude odpovídat 1  $\mu$ M. Podobně si připravíme i sadu blanků, opět do 8 Eppendorf zkumavek (1,5 ml), jako směs 300  $\mu$ l pufru a 1200  $\mu$ l  $H_2O$ .

3. Poté nastavíme parametry měření v dialogovém okně *Spectrum measurement* v záložce *Parameters*, kde nastavíme pouze vlnovou délku v rozsahu od 200 do 260 nm a počet měřených spekter (accumulation) na 3 (čím více spekter se změří, tím budou hladší); ostatní parametry zůstanou nezměněny. Měření tedy bude probíhat v kontinuálním módu rychlostí 100 nm/min po 1 nm. Zároveň také vzorek pojmenujeme v záložce *Data file* a klikneme na *OK*. Vložíme křemennou kyvetu ( $l = 0,5$  cm) se vzorkem do přístroje a spustíme vlastní měření kliknutím na *Start*. Spolu s CD spektrem se bude zaznamenávat i spektrum absorpční. Pro zajištění kvalitních výsledků je důležité dbát na čistotu kyvety. Několikrát ji vypláchneme MILQ vodou a poté ethanolem a necháme vyschnout. Následně proměříme blanky potřebné pro kalibraci přístroje a poté samotné vzorky.
4. Naměřené spektrum se vždy zobrazí v okně *Spectra Analysis*, kde je možné jej uložit do vlastní složky. Získáme data typu .txt, která poté můžeme vložit do programu MS Excel či Origin a dále zpracovat (odečíst baseline, vyhladit...).
5. Po skončení měření nejdříve ukončíme program *Spectra Manager*, poté vypneme přístroj a následně uzavřeme tlakovou láhev s dusíkem.
6. Získaná CD spektrální data pak můžeme přímo vložit do online programu BeStSel, který nám poskytne informaci o sekundární struktuře proteinu v podobě procentuálního zastoupení  $\alpha$ -helixu,  $\beta$ -skládaného listu a  $\beta$  – ohybů. Předpokládá se, že změna pH může indikovat rozdíly v zastoupení zmíněných frakcí, a tudíž lze predikovat možné konformační změny proteinu vlivem pH prostředí.