



Cirkulární dichroismus (CD) a CD spektroskopie

Daniel Renčiuk
BFU AV ČR, v.v.i.

MU Brno
23.10.2018

Cirkulární dichroismus (CD)

Rozdíl v absorpci levotočivě a pravotočivě kruhově polarizovaného světla molekulou

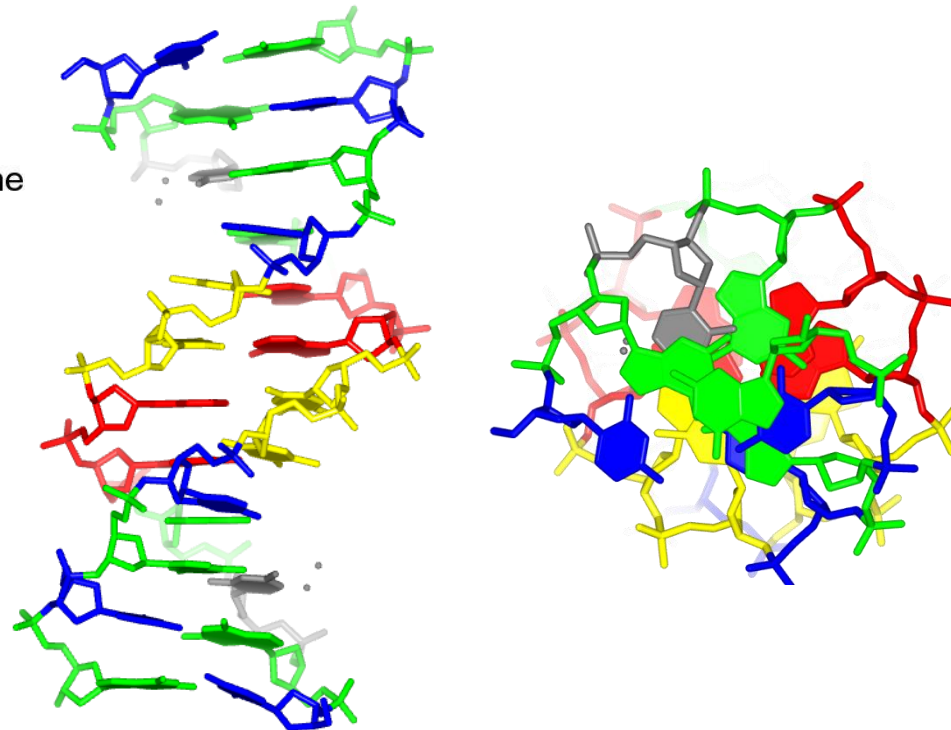
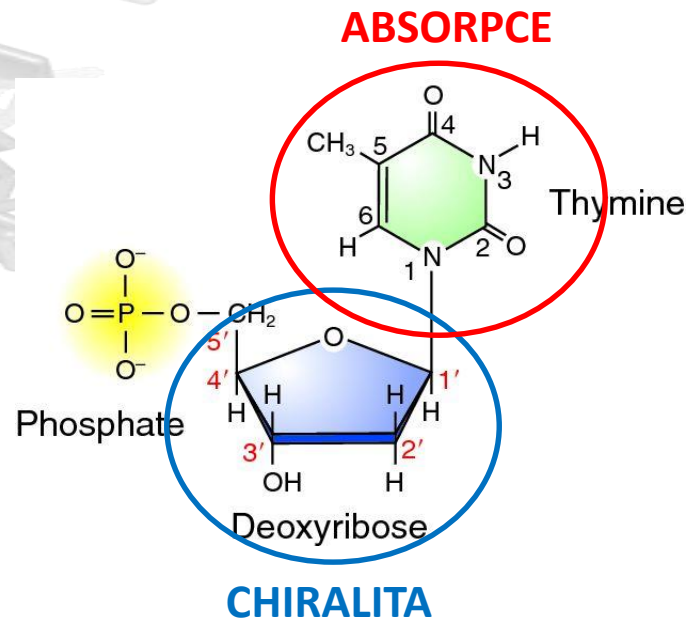
- nutné podmínky: molekula je **chirální**, tedy i opticky aktivní a navíc **absorbuje** v dané oblasti měření – CD jen v oblasti kde molekula absorbuje
- obvykle míněně elektronický CD, tj. v oblasti energií elektronových přechodů
- obvykle měřeno celé spektrum v oblasti UV popř. VIS – CD spektroskopie

CD je citlivé k vzájemné orientaci jednotlivých komponent (nukleobází, AMK – reprezentovaných tranzitními dipóly) v molekule – sekundární struktura

- **optická aktivita** = schopnost molekuly reagovat rozdílně s vlevo a vpravo kruhově polarizovaným zářením
- **Optická rotační disperze (ORD)** – stáčení roviny lineárně polarizovaného světla při průchodu opticky aktivní látkou – ORD v celém rozsahu vlnových délek – horší interpretace
- **Cottonův efekt** – CD / ORD pás – pozitivní x negativní

Cirkulární dichroismus (CD) – DNA / RNA

VZÁJEMNÁ ORIENTACE BAZÍ

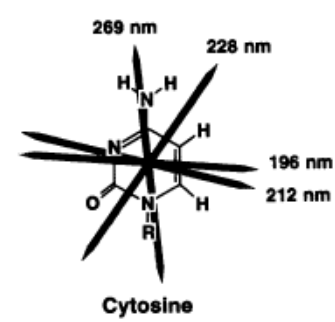
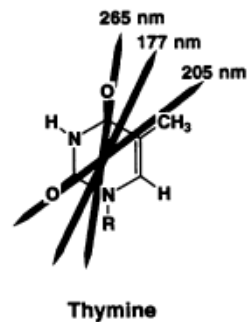
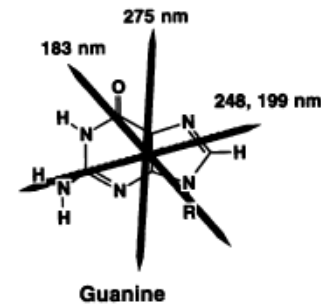
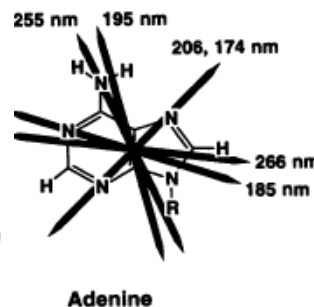
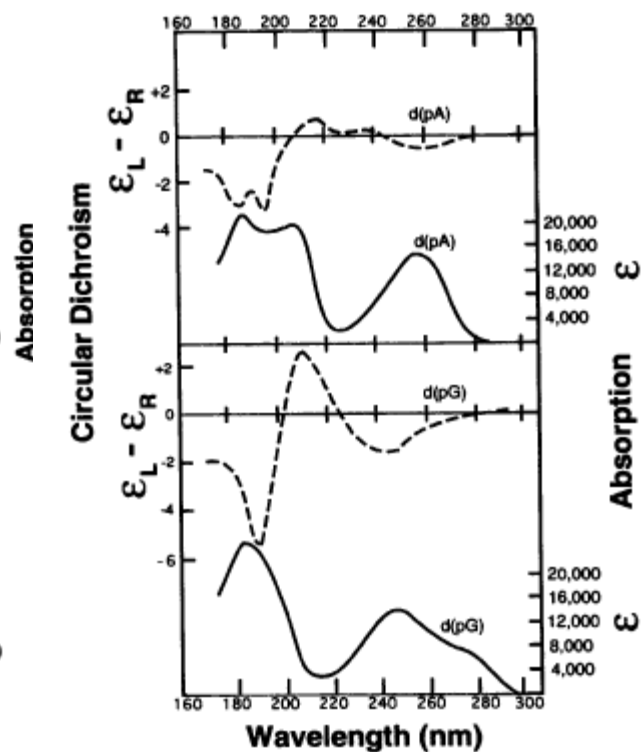
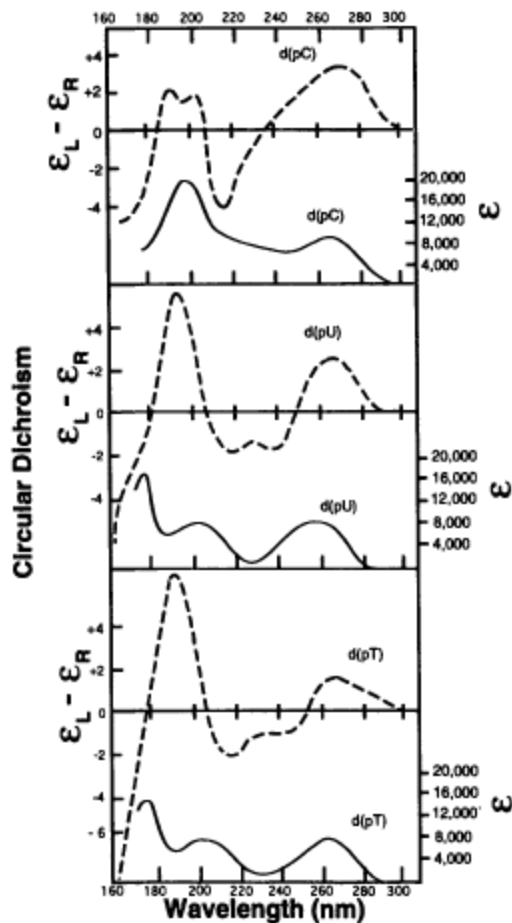


Elektrický dipólový přechodový moment

Rozložení elektronové hustoty v **základním stavu** x v **excitovaném stavu** odlišné
 - směr a velikost posunu el. hustoty je charakterizován **Elektrickým dipólovým přechodovým momentem** – μ – velikost \sim množství absorbovaného světla

směr \sim polarizace světla nutná pro maximální A

$A_{\text{měřená}} = A_{\text{nukleosidů}} + \text{vliv jejich „interakce“}$
 V CD podstatně zvýrazněn vliv „interakce“



Polarizace světla

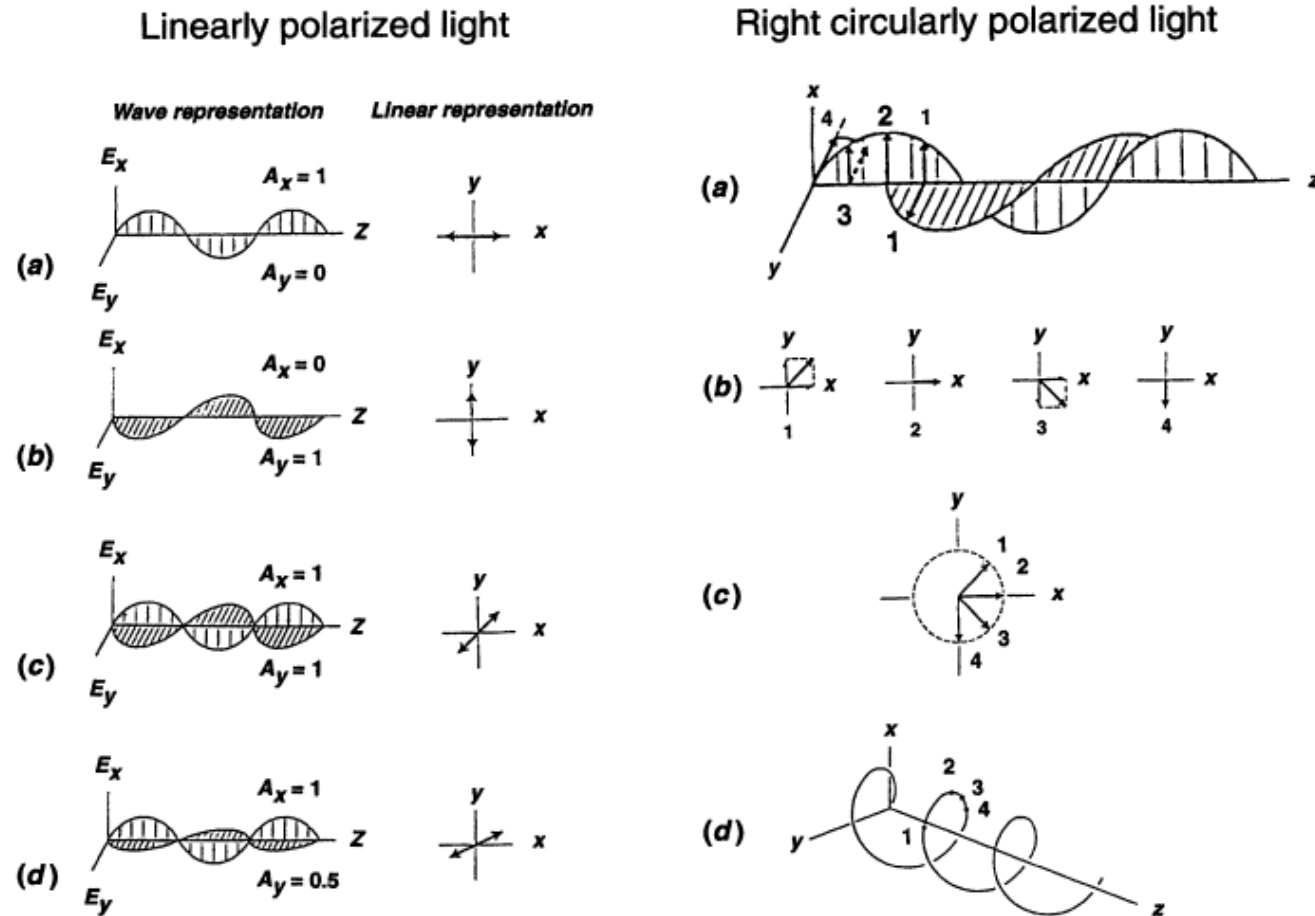
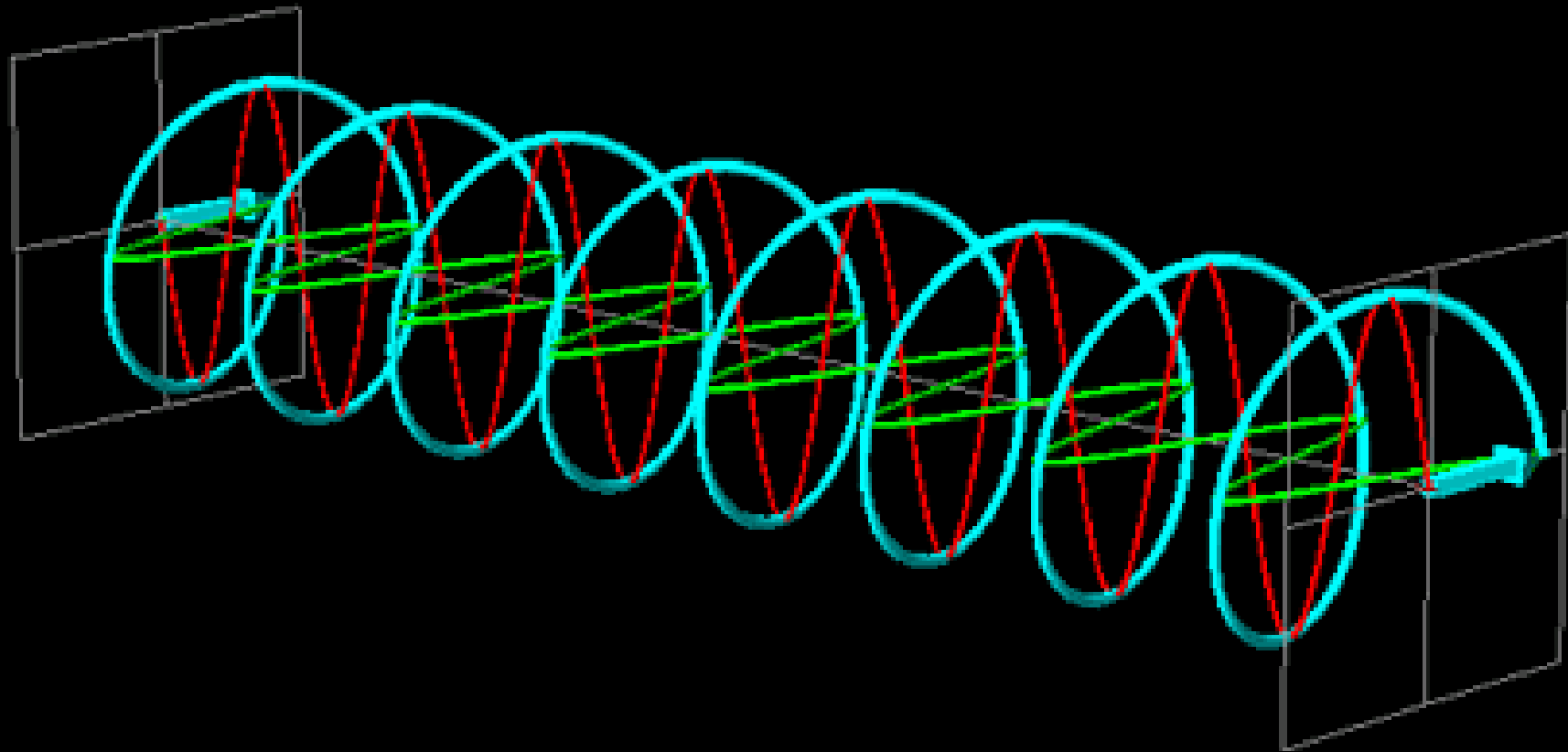
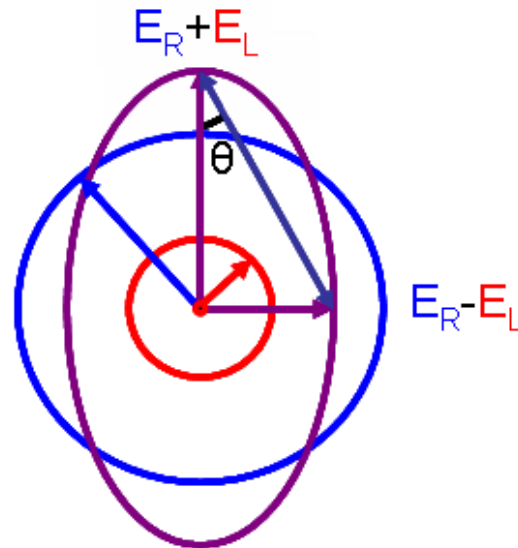


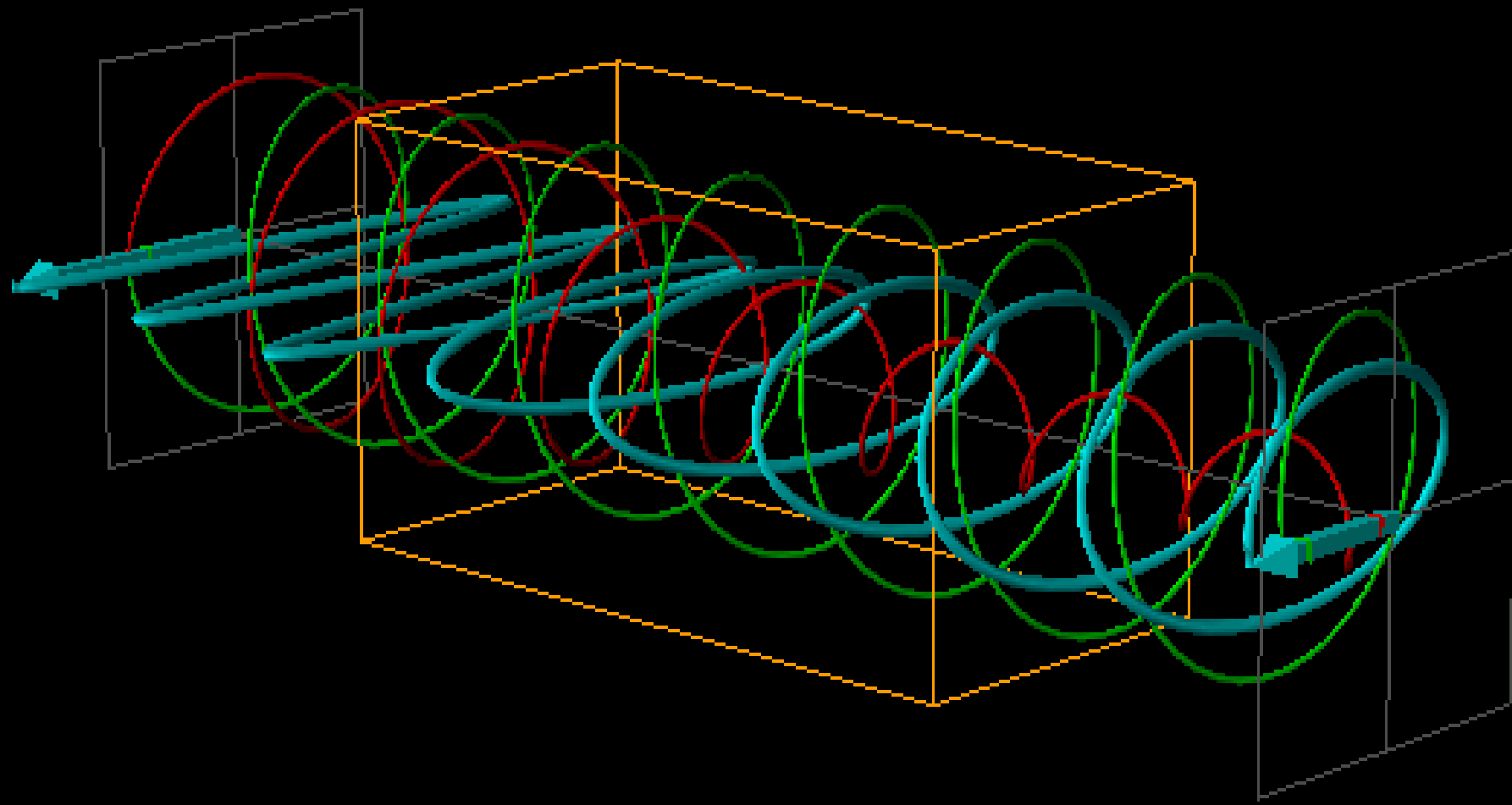
Figure 6-10
 Representations of different types of polarized light by an oscillating vector. The tip of the vector indicates the magnitude and direction of the electric field of the light as a function of time and space. On the left is shown linearly polarized light propagating in the z direction. The polarization is along : the x axis (a), the y axis (b), 45° from the x axis (c), and 30° from the x axis (d). On the right is shown right circularly polarized light propagating in the z direction. Panels (a) and (b) illustrate that circularly polarized light can be considered as a sum of two perpendicular vectors oscillating 90° out of phase. The resulting tip of the electric vector of the light produces a circle as seen by an observer moving with the light (c); it produces a helix as seen by a stationary observer (d). [Reprinted with permission from Kliger et. al., 1990. This figure is from Figures 2-2 and 2-3.]



Cirkulární dichroismus (CD)

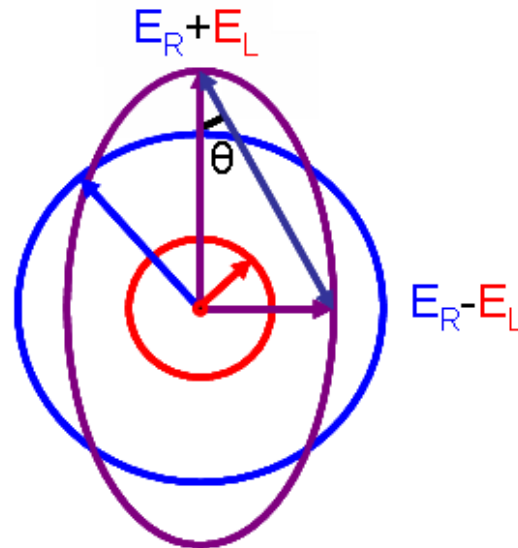
- Rozdíl absorpce levotočivě a pravotočivě kruhově polarizovaného světla: $\Delta A = A_L - A_R$
- Pokud známe koncentrace $\Delta \varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R = \Delta A / lc$ (Lambert-Beerův zákon)
- Popřípadě, úhel stočení polarizovaného světla = elipticita
 $\text{tg} [\theta] = (E_L - E_R) / (E_L + E_R) = 3298 * \Delta \varepsilon$





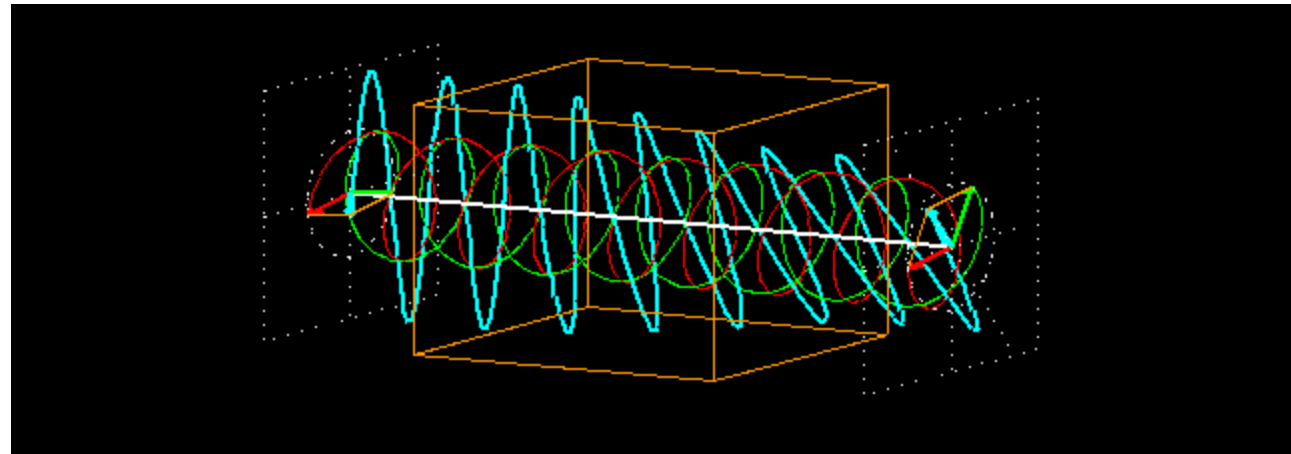
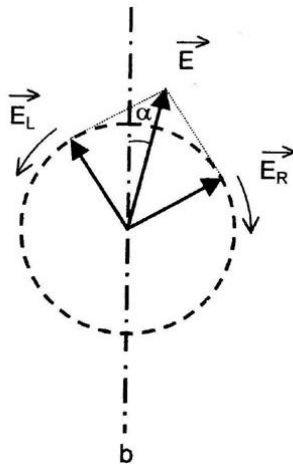
Cirkulární dichroismus (CD)

- Rozdíl absorpce levotočivě a pravotočivě kruhově polarizovaného světla: $\Delta A = A_L - A_R$
- Pokud známe koncentrace $\Delta \varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R = \Delta A / lc$ (Lambert-Beerův zákon)
- Popřípadě, úhel stočení polarizovaného světla = elipticita
$$\text{tg} [\theta] = (E_L - E_R) / (E_L + E_R) = 3298 * \Delta \varepsilon$$

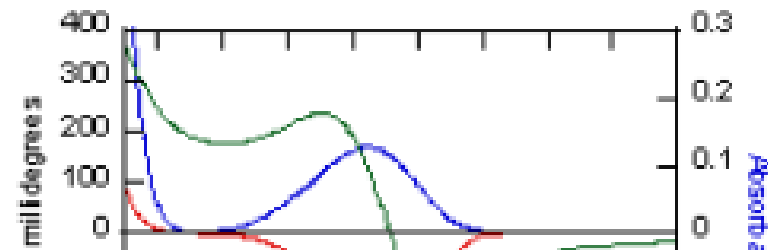
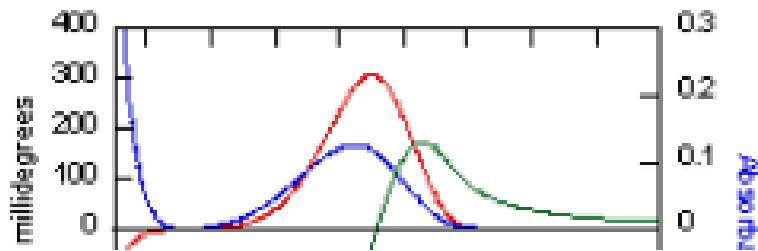


Optická rotace – optická rotační disperze (ORD)

- Rozdílná rychlost průchodu L-CPL a R-CPL opticky aktivním prostředím: $n_L \neq n_R$
- Dojde ke stočení roviny polarizace procházejícího světla – optická rotace – úhel α
- Závislost optické rotace (α) na vlnové délce (λ) světla – optická rotační disperze (ORD)
- Téměř identická informace jako CD, avšak obtížněji interpretovatelná
- ORD existuje při všech vlnových délkách, v místě absorpce anomální – Cottonův efekt

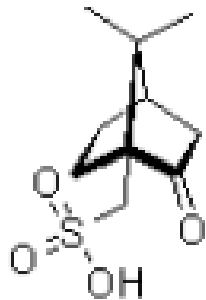


A vs ORD vs CD



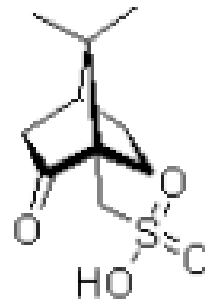
Mimořadně, CD je ideální a velmi používaná metoda pro rozlišení enantiomerů malých molekul, např. léčiv.

220 240 260 280 300 320 340 360 380
Wavelength nm





(1S)-(+)-Camphor-10-sulphonic acid

220 240 260 280 300 320 340 360 380
Wavelength nm



(1R)-(-)-Camphor-10-sulphonic acid

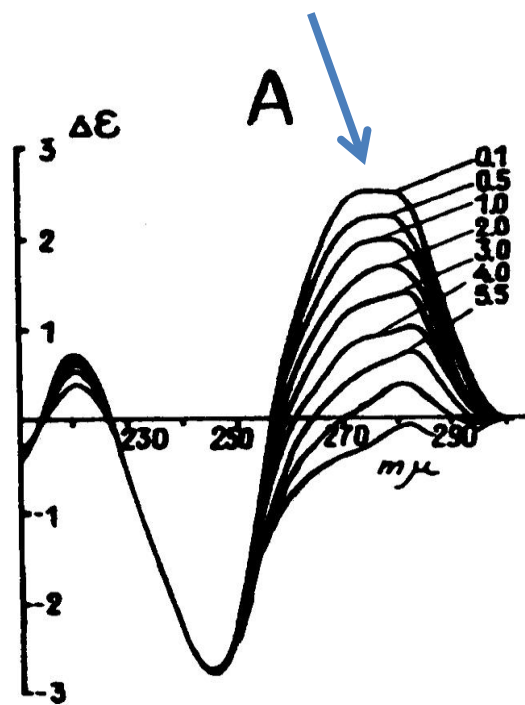
Výhody a nevýhody CD

- **Citlivost** – nízká koncentrace studovaných látek (DNA 20nt od cca 1 μ M x 50 μ M 1D NMR x 1 mM 2D NMR/ X-ray) a široký rozsah koncentrací (DNA – 4 řády dle optické dráhy kyvety) – rozpustnost, cena materiálu atp.
-  Snadná **titrace** a **změny podmínek** přímo v kyvetě během jednoho experimentu – koncentrace iontů, ligandů atp., změny pH - výhoda především ve srovnání s metodami strukturní analýzy (NMR, X-ray)
- Rozlišení **kooperativních** a **nekooperativních** změn
- Chybí **explicitní vztah** mezi CD a strukturou (vypočtená CD neodpovídají měřeným)
- Jednoduše nerozlišuje **molekularitu** konformací – nutná komplementární metoda (elektroforéza, ...)
-  Měření v roztoku tj. **směs** (v prostoru i čase) x výsledky single-molecule metod (smFRET)

Kooperativita přechodu

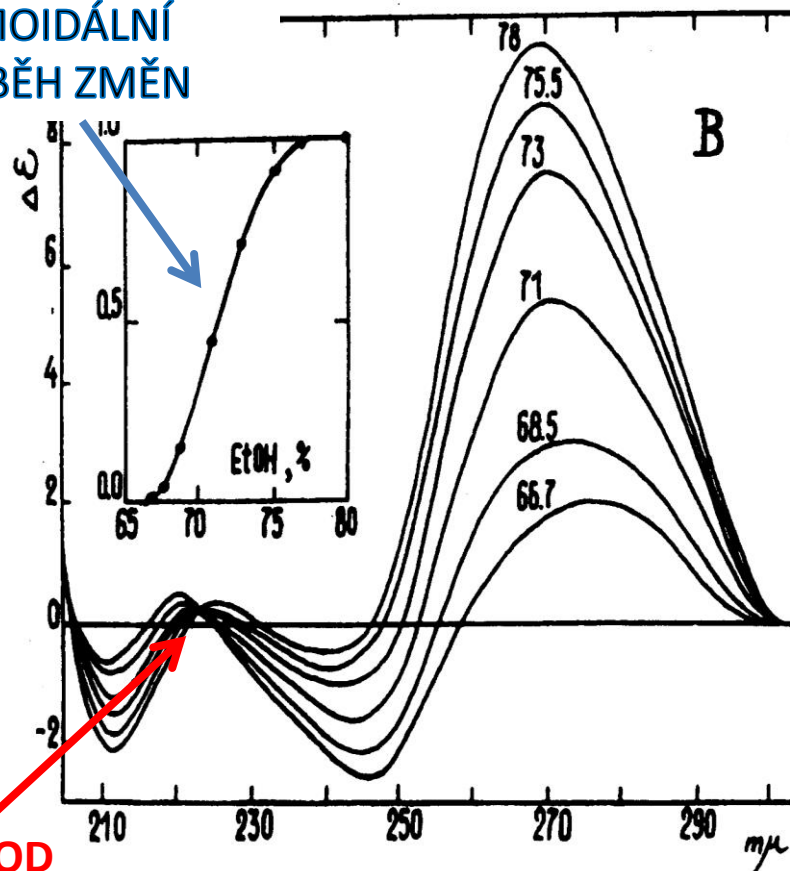
NEKOOPERATIVNÍ
ZMĚNY

LINEÁRNÍ PRŮBĚH
ZMĚN





KOOPERATIVNÍ ZMĚNY

SIGMOIDÁLNÍ
PRŮBĚH ZMĚN



IZOELIPTICKÝ BOD

Výhody a nevýhody CD

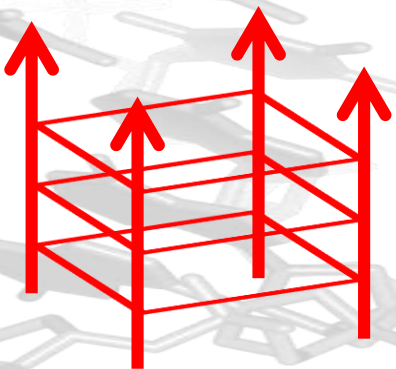
- **Citlivost** – nízká koncentrace studovaných látek (DNA 20nt od cca 1 μ M x 50 μ M 1D NMR x 1 mM 2D NMR/ X-ray) a široký rozsah koncentrací (DNA – 4 řády dle optické dráhy kyvety) – rozpustnost, cena materiálu atp.
-  Snadná **titrace** a **změny podmínek** přímo v kyvetě během jednoho experimentu – koncentrace iontů, ligandů atp., změny pH - výhoda především ve srovnání s metodami strukturní analýzy (NMR, X-ray)
- Rozlišení **kooperativních** a **nekooperativních** změn
- Chybí **explicitní vztah** mezi CD a strukturou (vypočtená CD neodpovídají měřeným)
- Jednoduše nerozlišuje **molekularitu** konformací – nutná komplementární metoda (elektroforéza, ...)
-  Měření v roztoku tj. **směs** (v prostoru i čase) x výsledky single-molecule metod (smFRET)

Molekularita

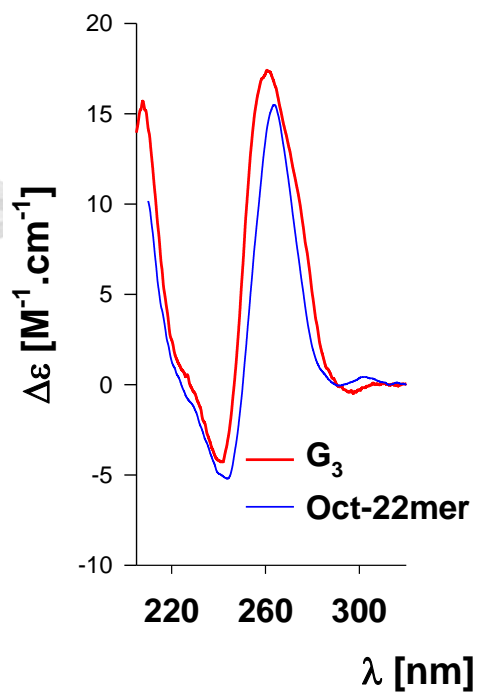
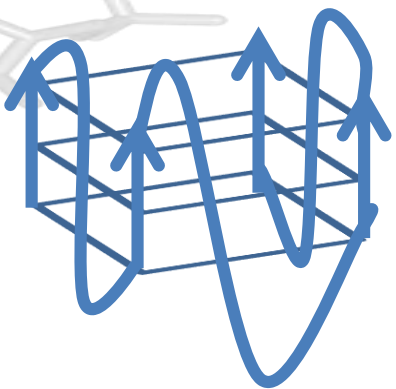
Paralelní kvadruplex

Dvoušroubovice

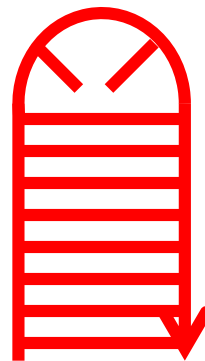
Tetra-molekulární



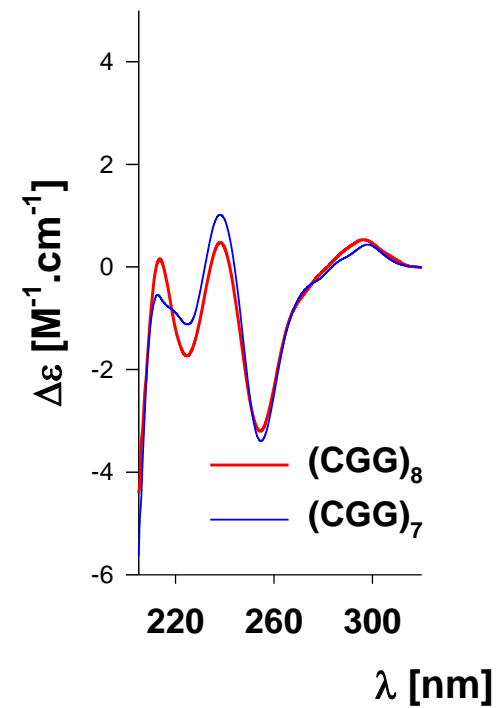
Mono-molekulární





Vlásenka



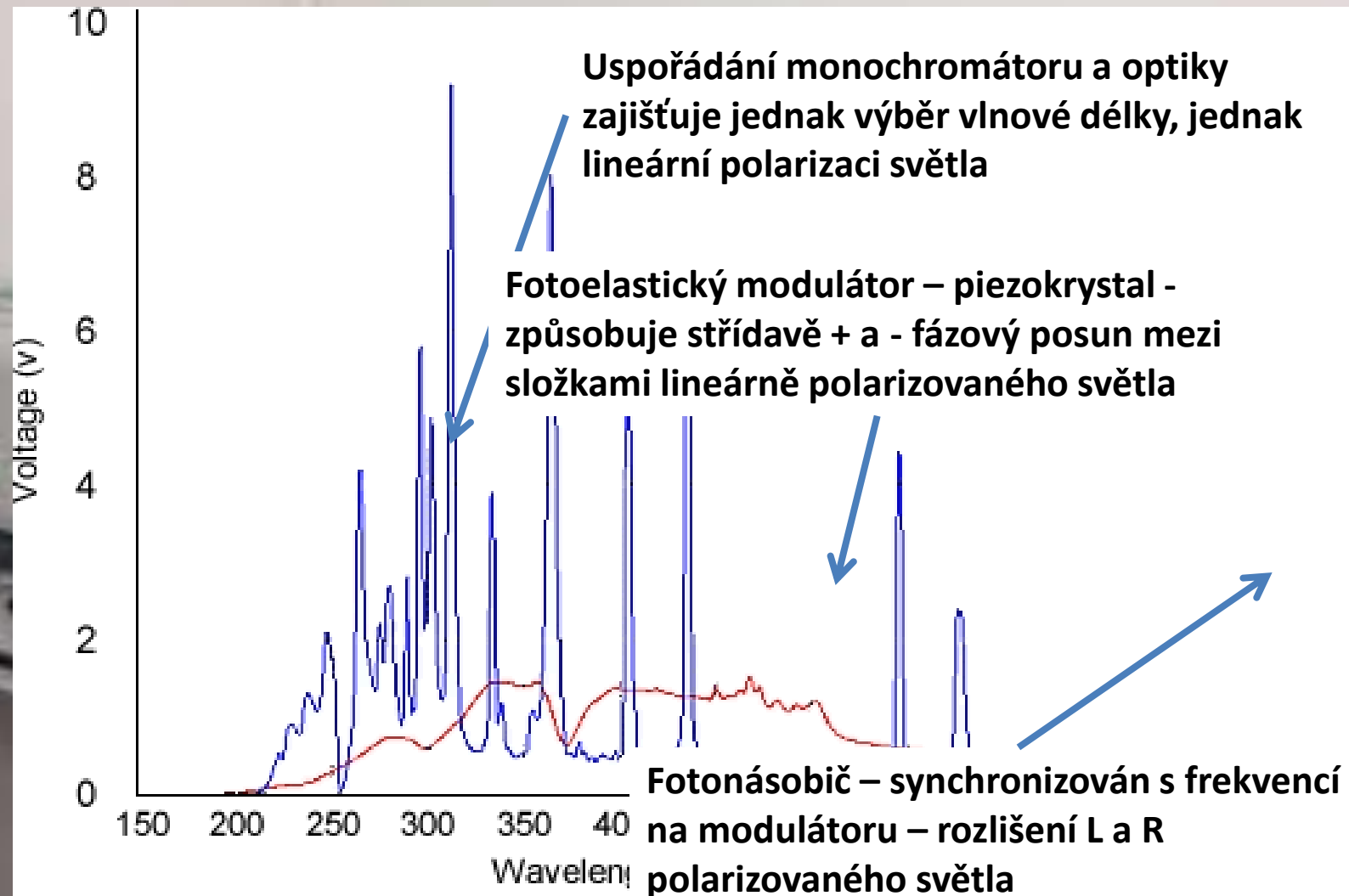
Antiparalelní homoduplex



Výhody a nevýhody CD

- **Citlivost** – nízká koncentrace studovaných látek (DNA 20nt od cca 1 μ M x 50 μ M 1D NMR x 1 mM 2D NMR/ X-ray) a široký rozsah koncentrací (DNA – 4 řády dle optické dráhy kyvety) – rozpustnost, cena materiálu atp.
-  Snadná **titrace** a **změny podmínek** přímo v kyvetě během jednoho experimentu – koncentrace iontů, ligandů atp., změny pH - výhoda především ve srovnání s metodami strukturní analýzy (NMR, X-ray)
- Rozlišení **kooperativních** a **nekooperativních** změn
- Chybí **explicitní vztah** mezi CD a strukturou (vypočtená CD neodpovídají měřeným)
- Jednoduše nerozlišuje **molekularitu** konformací – nutná komplementární metoda (elektroforéza, ...)
-  Měření v roztoku tj. **směs** (v prostoru i čase) x výsledky single-molecule metod (smFRET)

CD spektrofotometr (Jacso J-815)



Kyvety

Variabilní optická dráha umožňuje široké rozmezí měřených koncentrací látek.
(Snížení vlivu absorpce pufru, srovnání podmínek s NMR experimenty, ...)



50 mm

10 mm

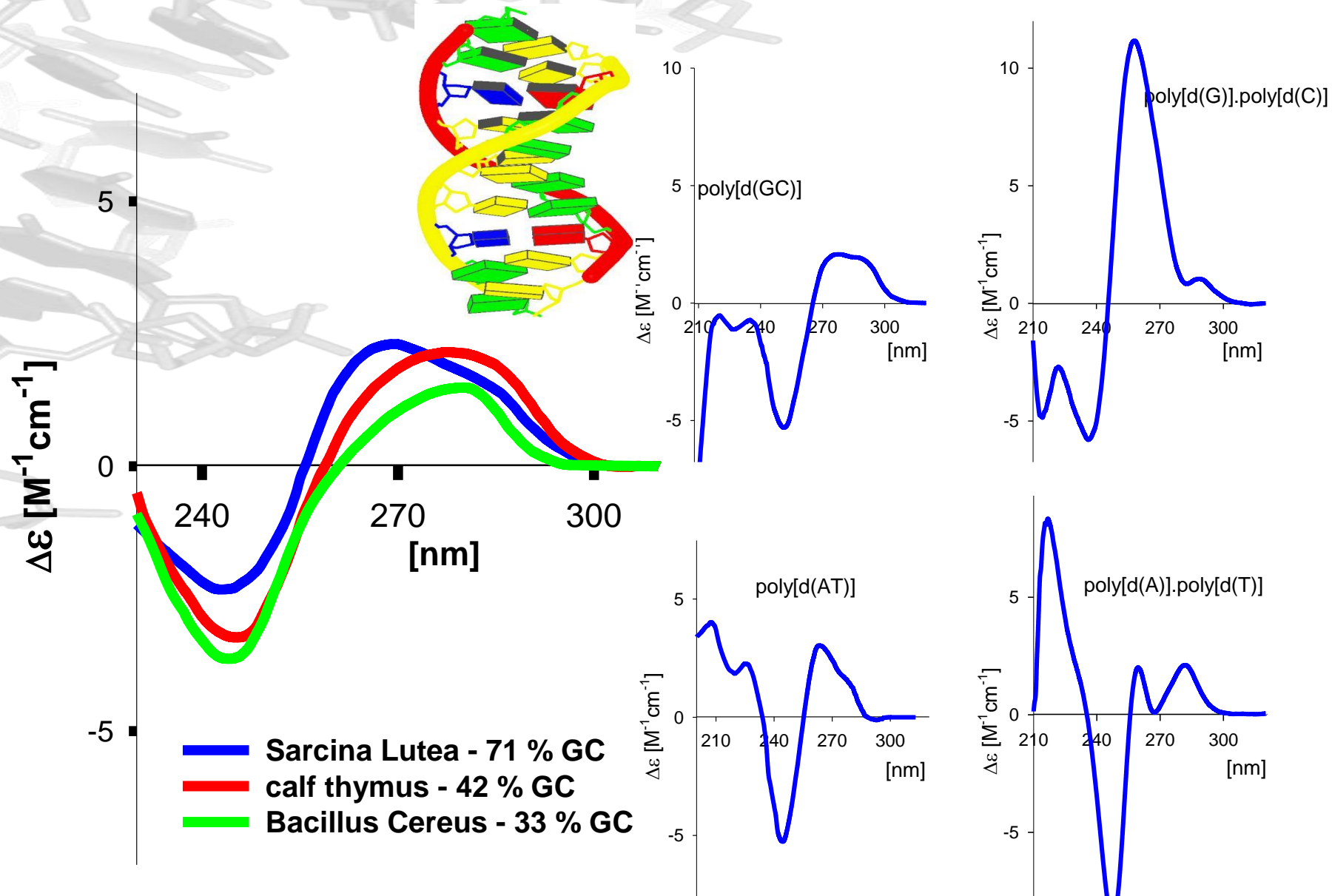
5 mm

1 mm

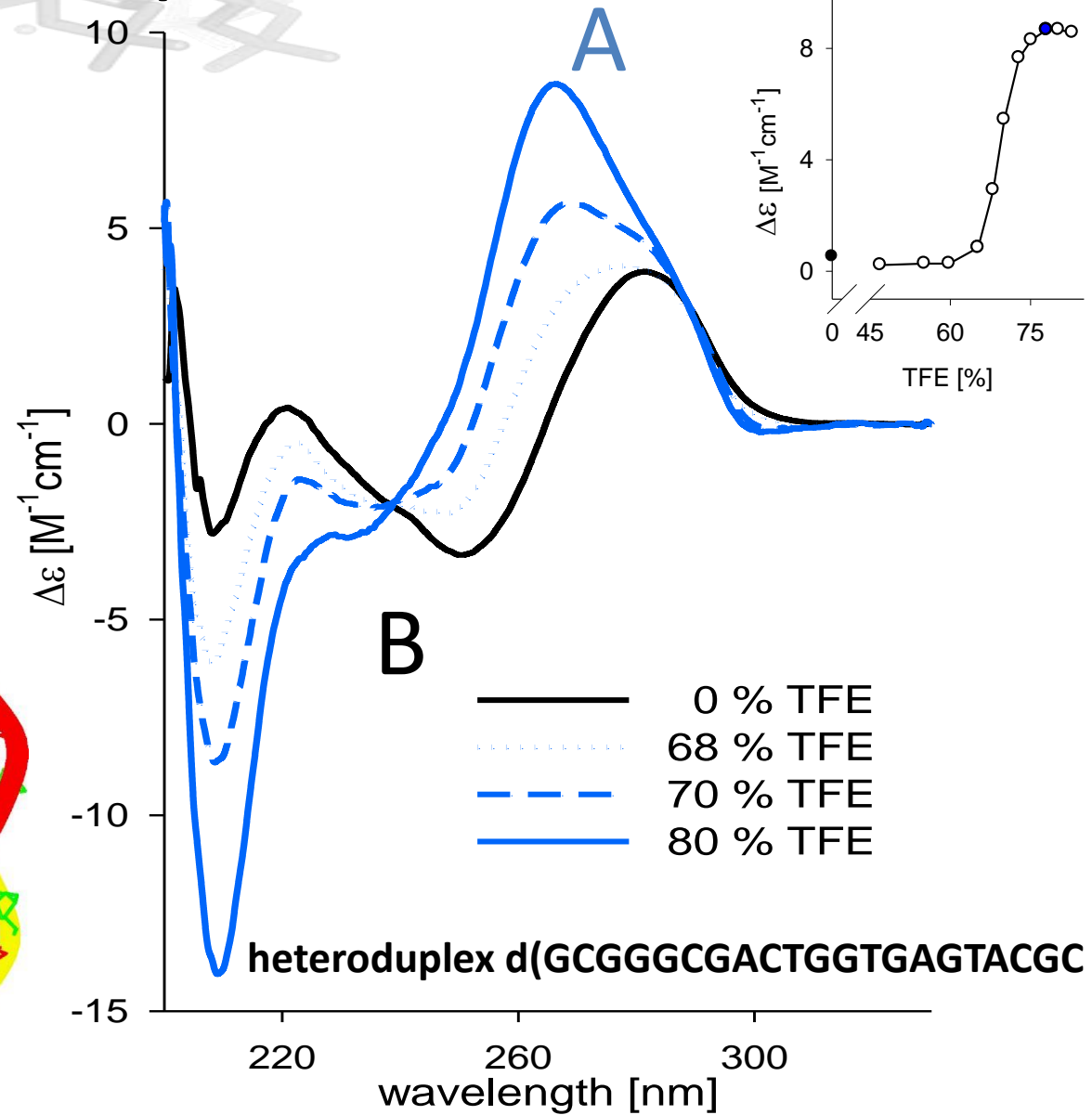
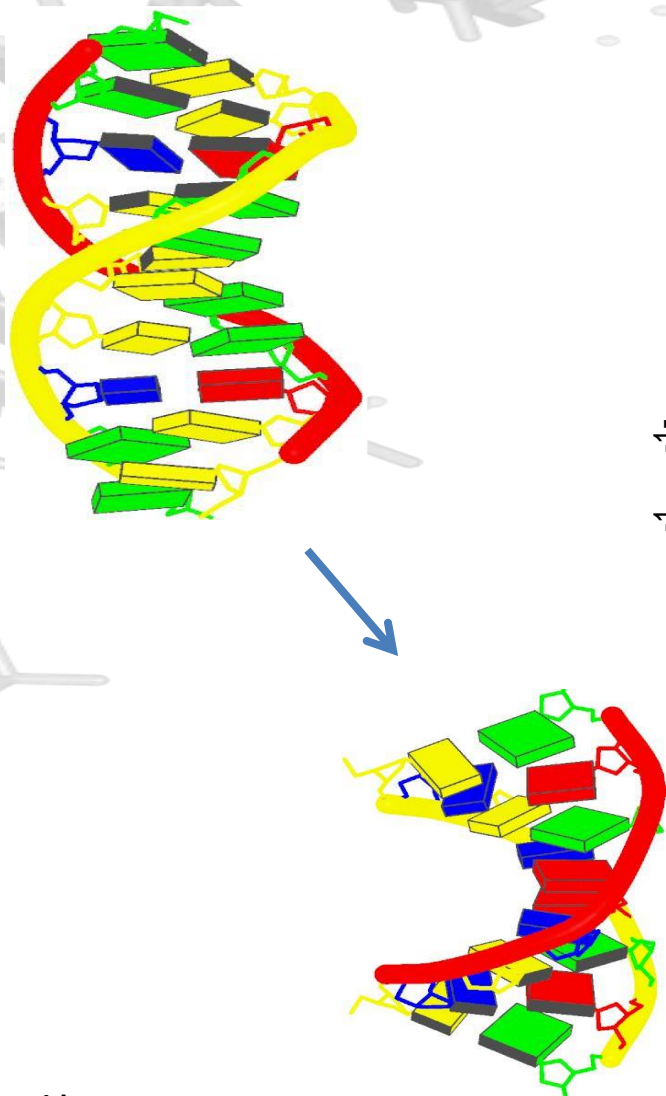
0,1 mm

0,01 mm

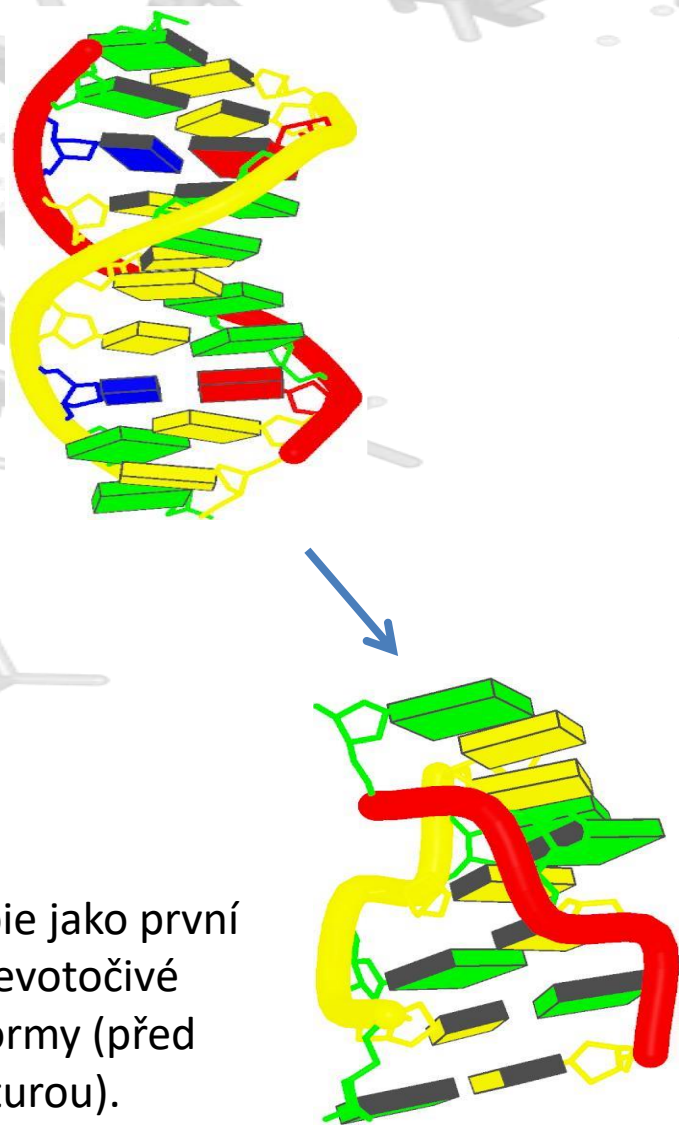
B-DNA – primární sekvence



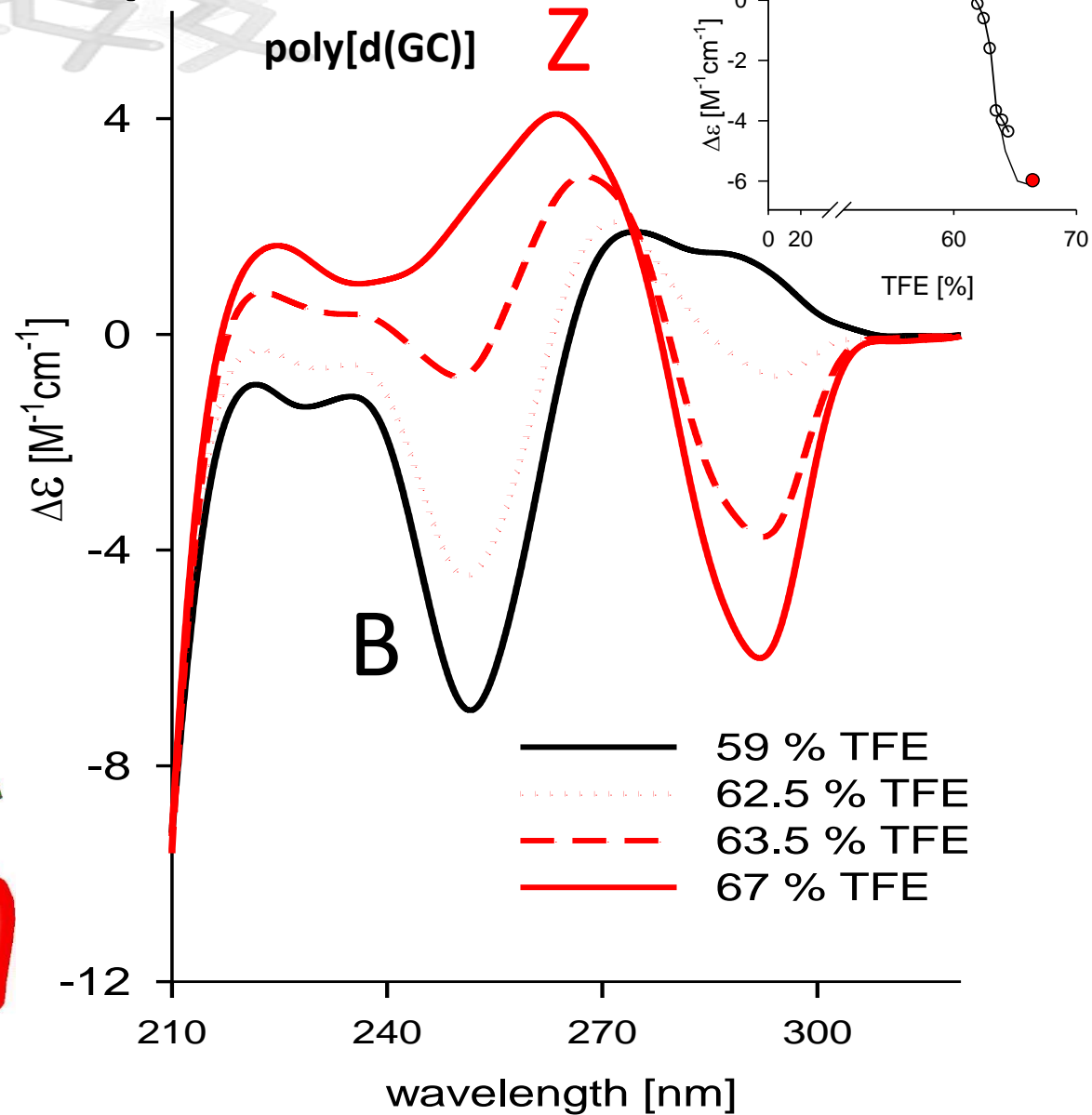
B-A přechod



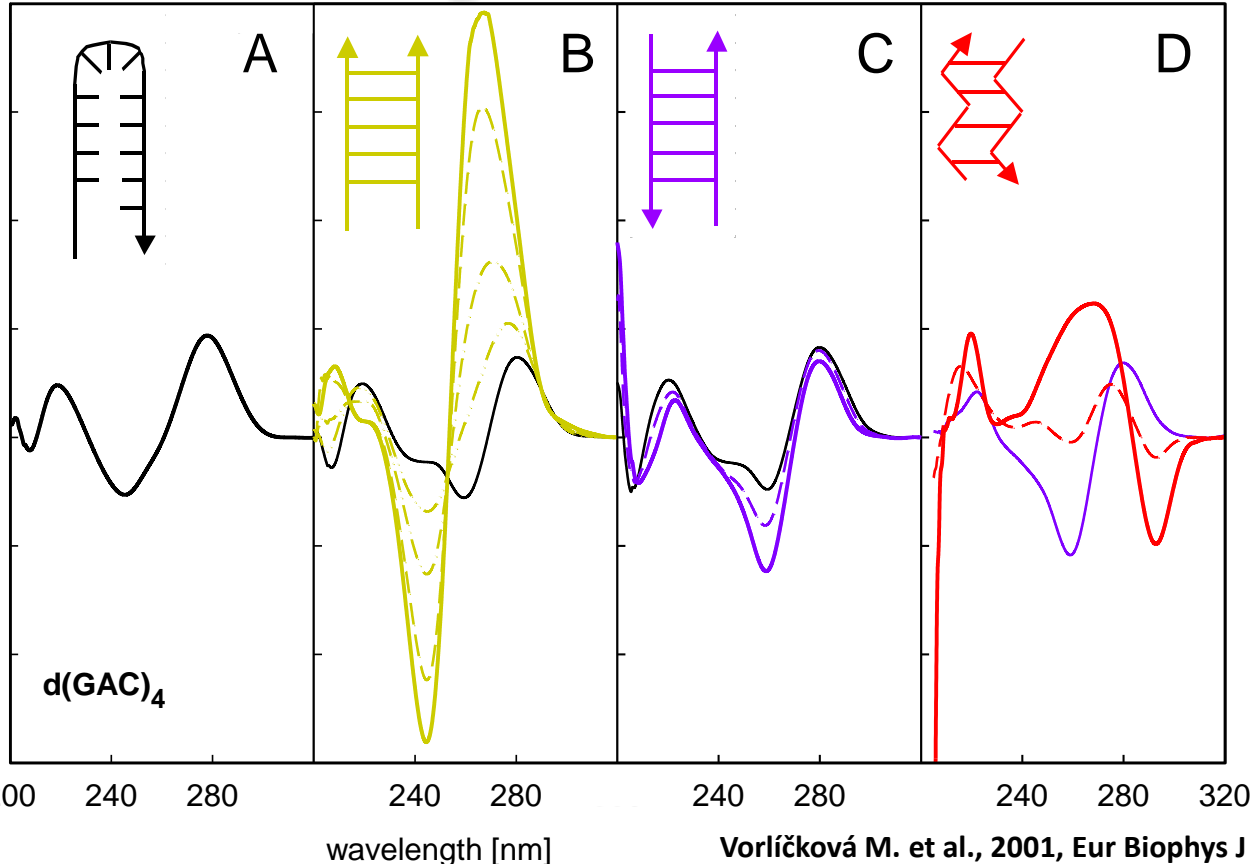
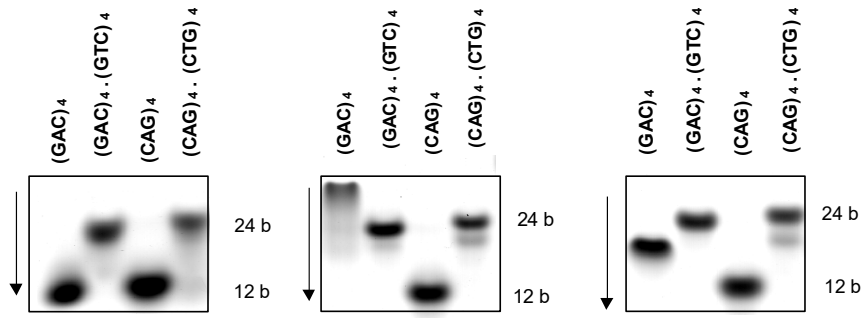
B-Z přechod



CD spektroskopie jako první předpověděla levotočivé uspořádání Z-formy (před atomární strukturou).

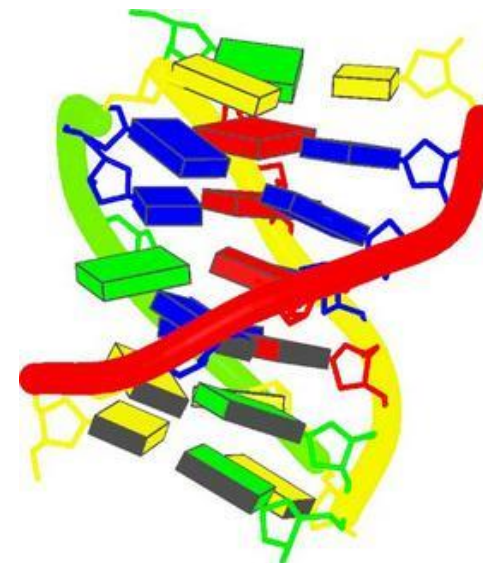
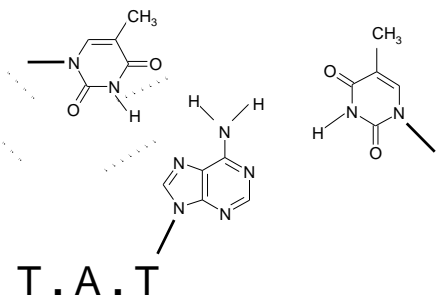
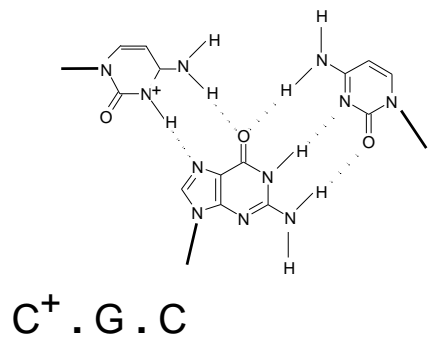
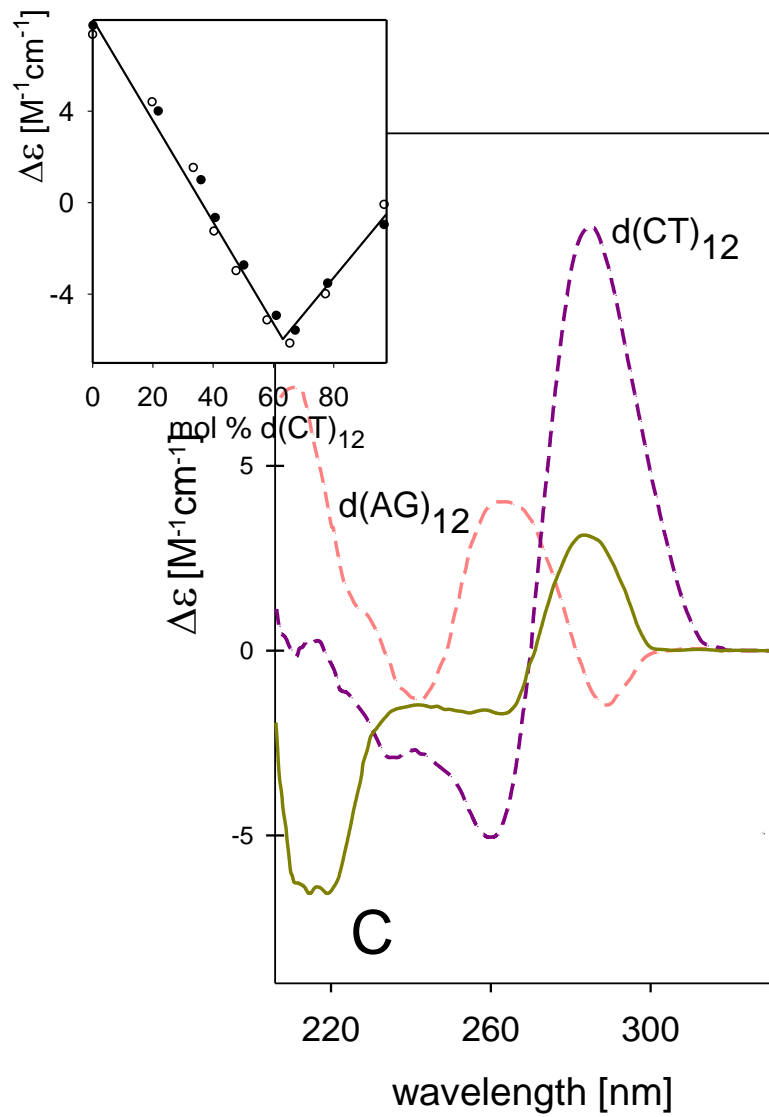


(GAC)₄



- A – vlásenka
(nízká iontová síla)
- B – paralelní duplex
(protonace – nízké pH)
- C – antiparalelní duplex
(vyšší iontová síla)
- D – Z-forma
(velmi vysoká iontová síla)

DNA Triplex

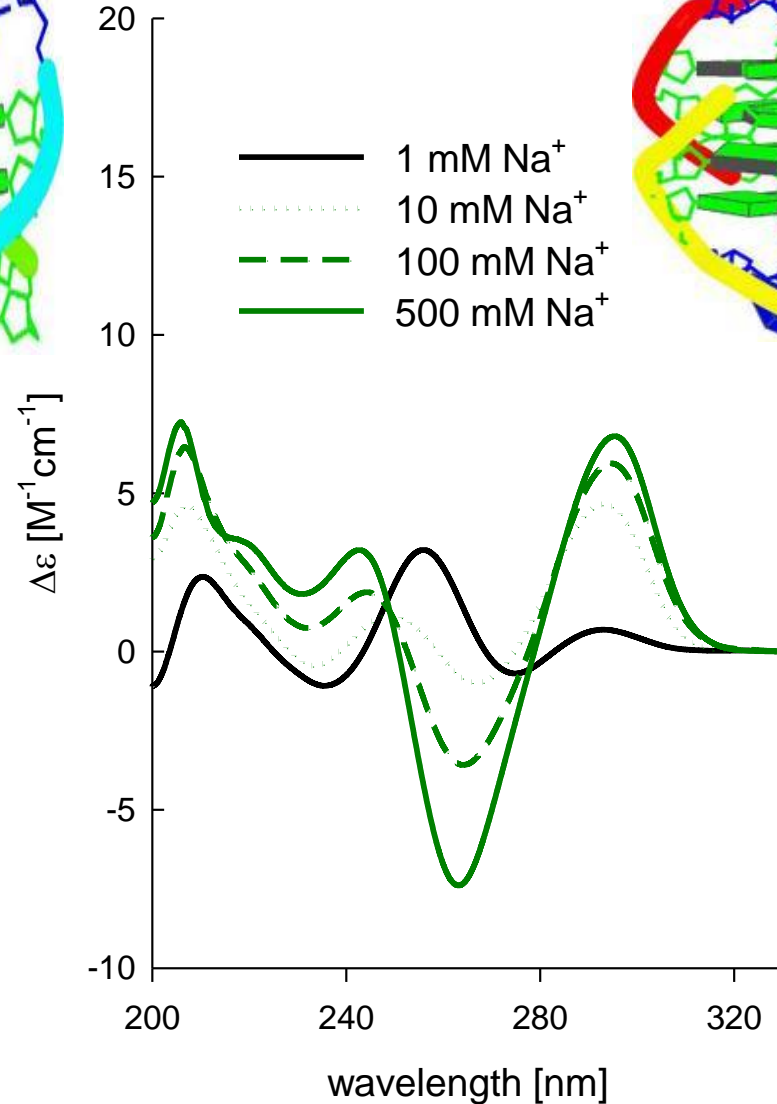
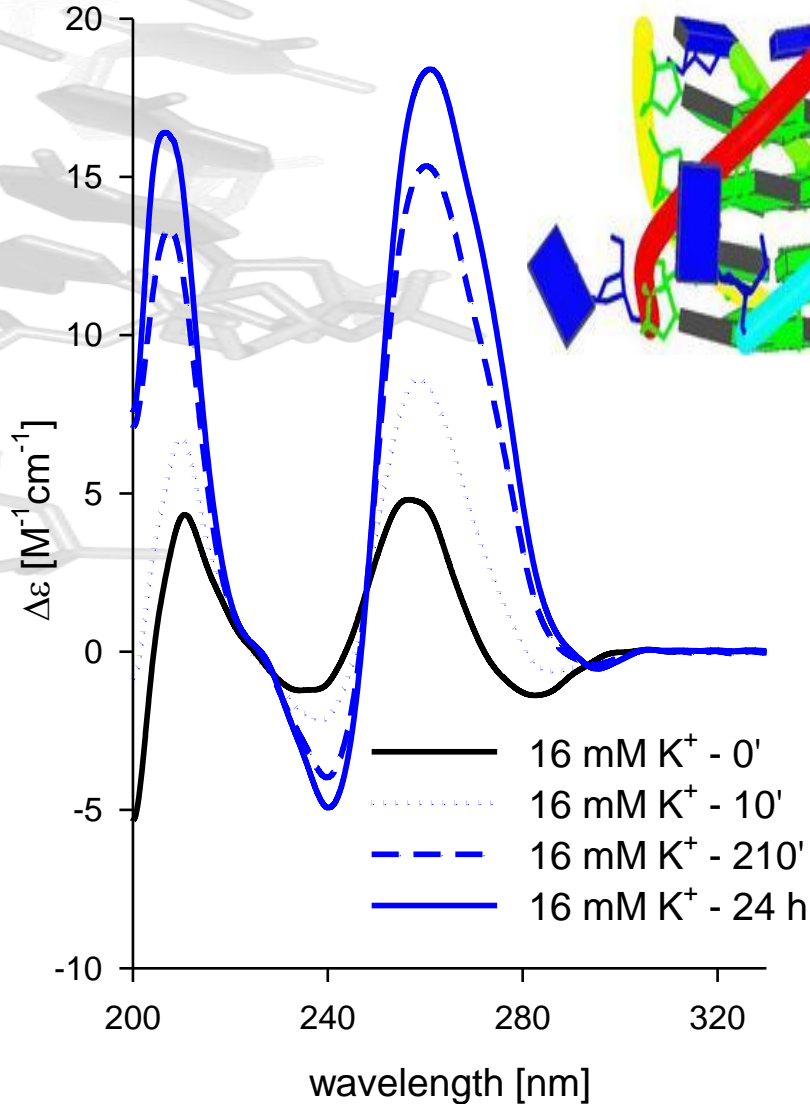
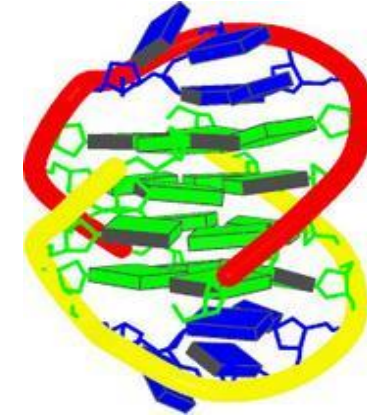
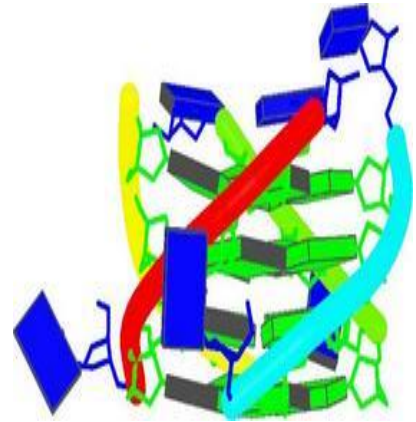
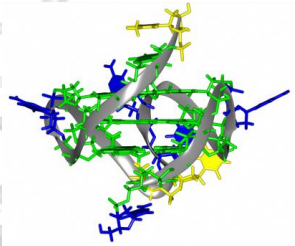


Guaninový kvadruplex

Paralelní - TGGGGT

Antiparalelní - GGGGTTTGGGG

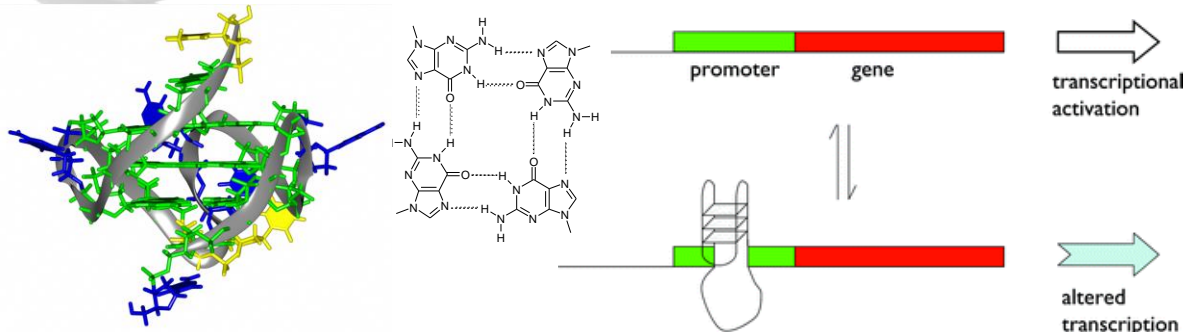
CD spektroskopie jako první předpověděla monomolekulární paralelní kvadruplex.



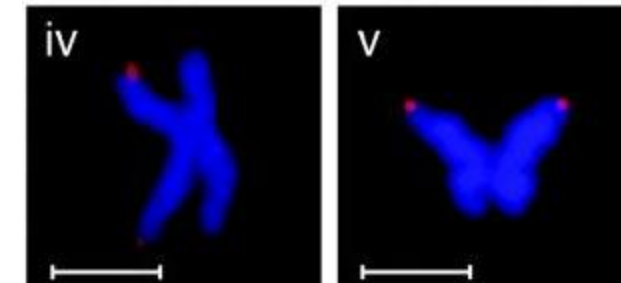
Guaninové kvadrupelexy



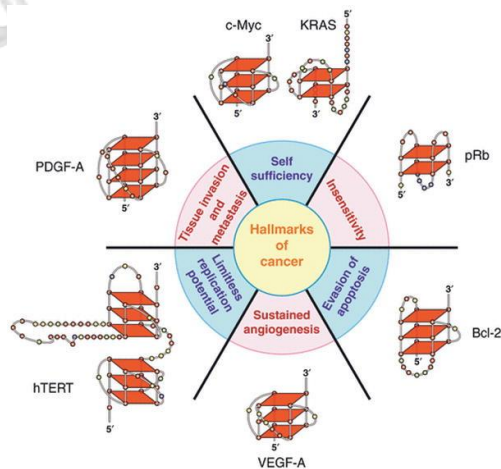
- regulace genové exprese
- struktura telomer



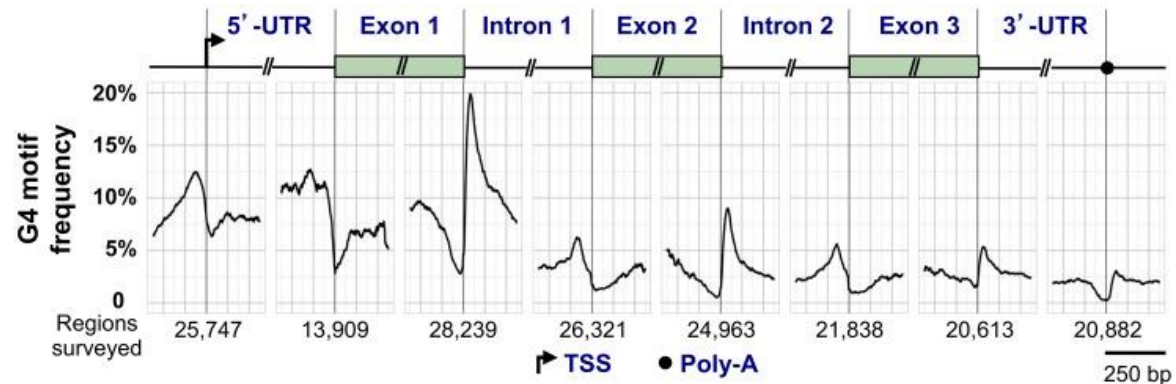
(Huppert J.L., Chem Soc Rev, 2008)



(Biffi G., et al., Nat Chem, 2013)

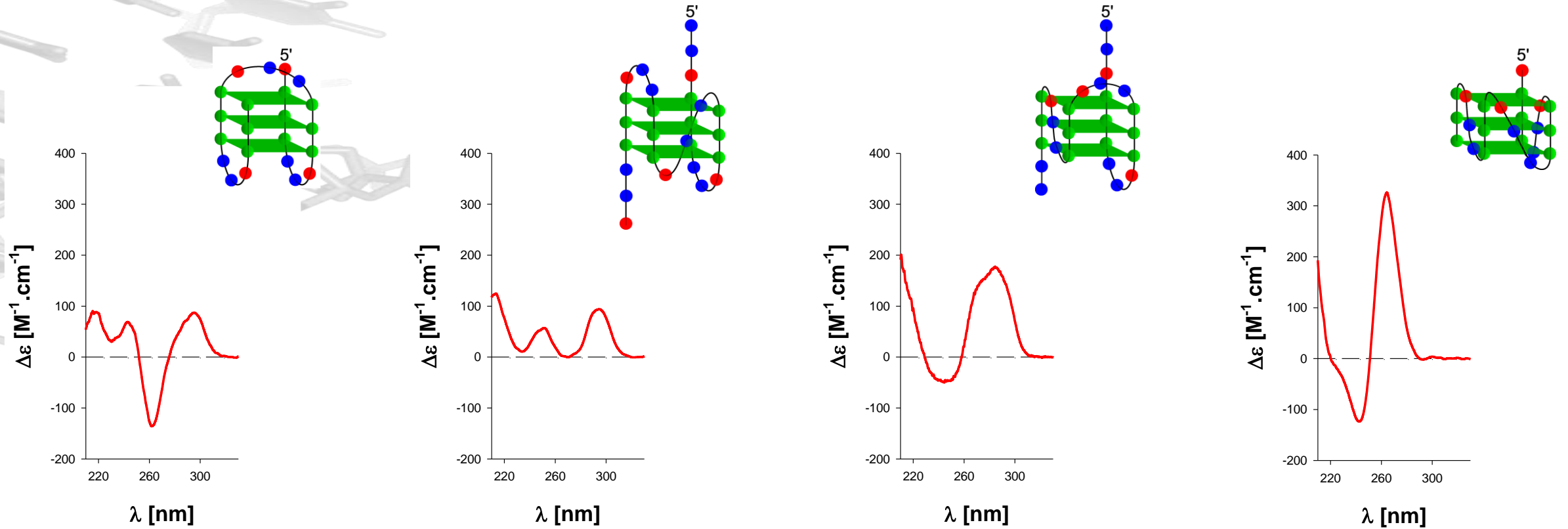


(Brooks T. A., et al., FEBS J, 2010)



(Maizels N. and Gray L.T., PloS Genet., 2013)

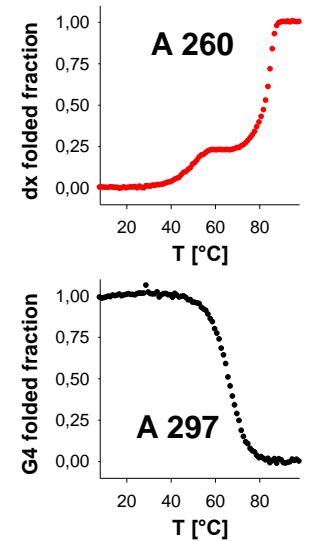
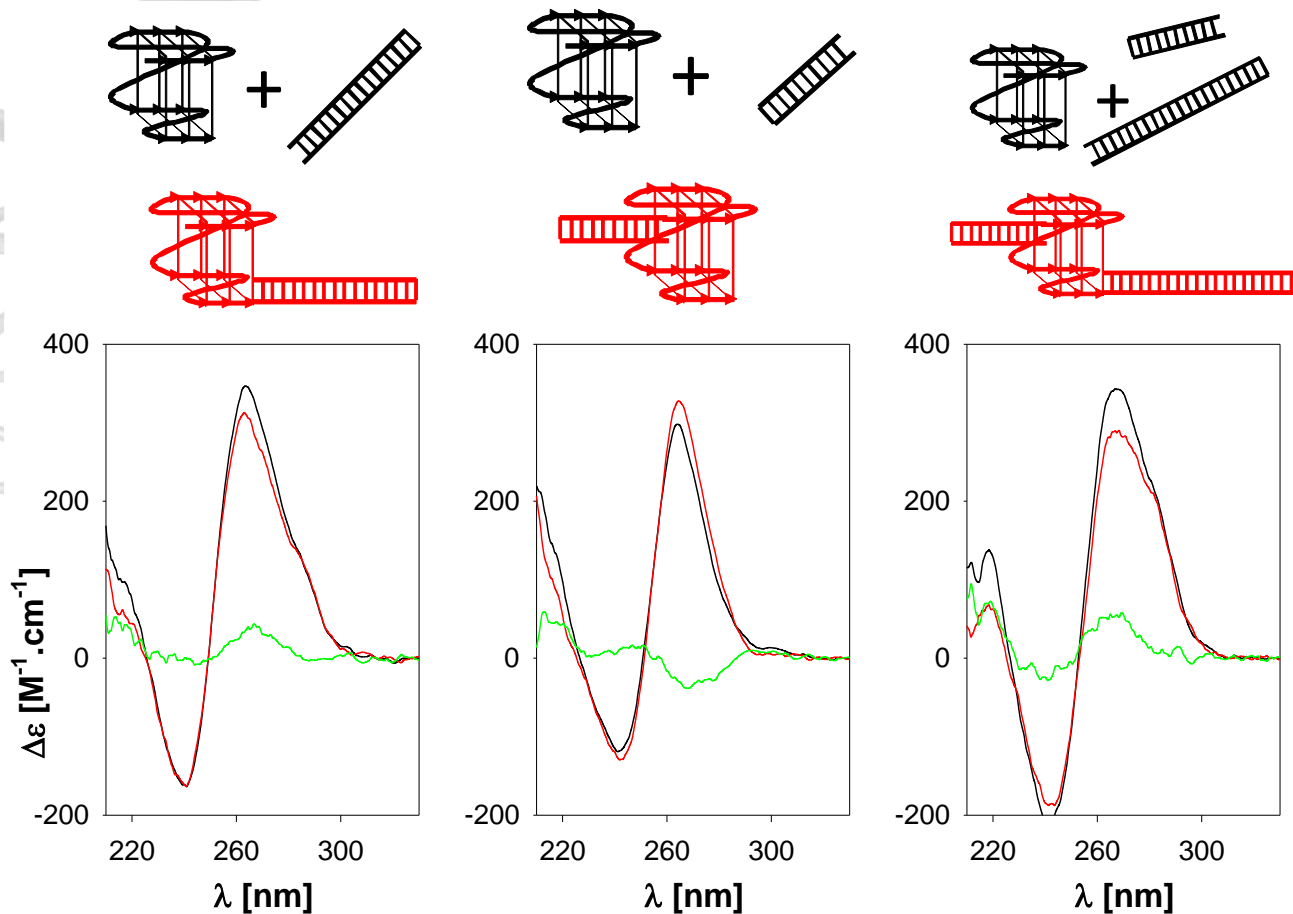
Guaninový kvadruplex



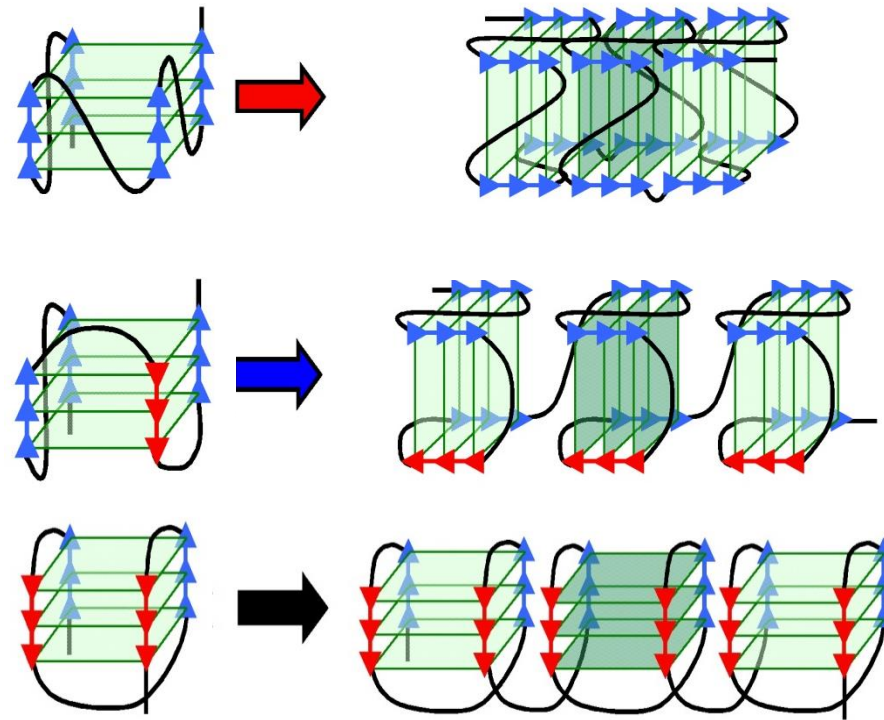
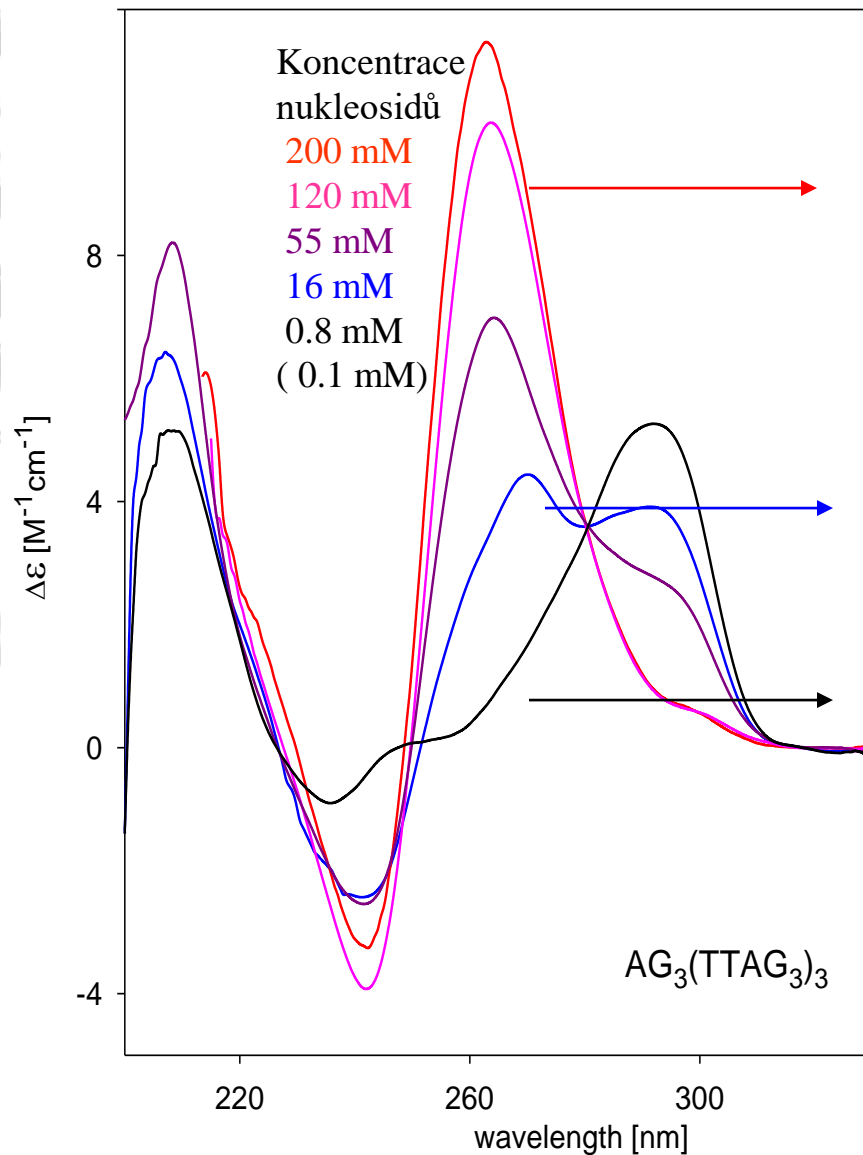
Guaninový kvadruplex

CD spektra je možné jednoduše numericky sčítat atp. – součet CD měřených nezávisle x směs x komplex

- efekt vzájemného ovlivnění více struktur/oblastí v rámci molekuly



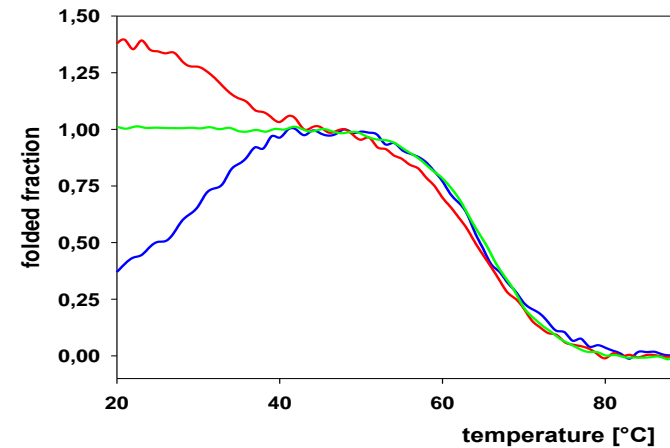
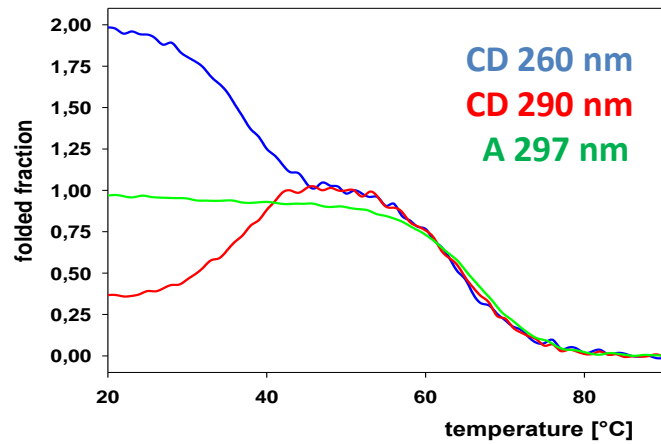
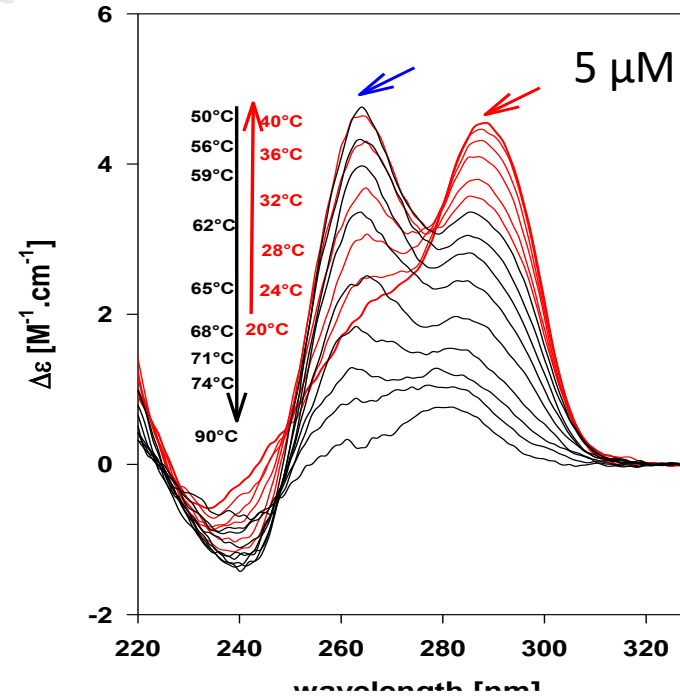
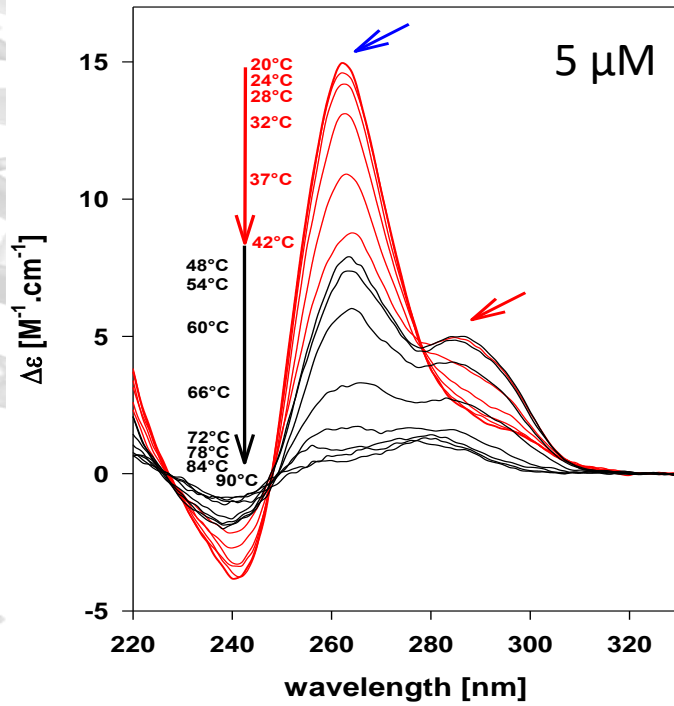
Kvadruplex lidské telomerní DNA



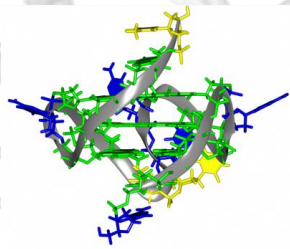
Různé metody využívají různé koncentrace DNA – konformační variabilita.

CD – tání DNA

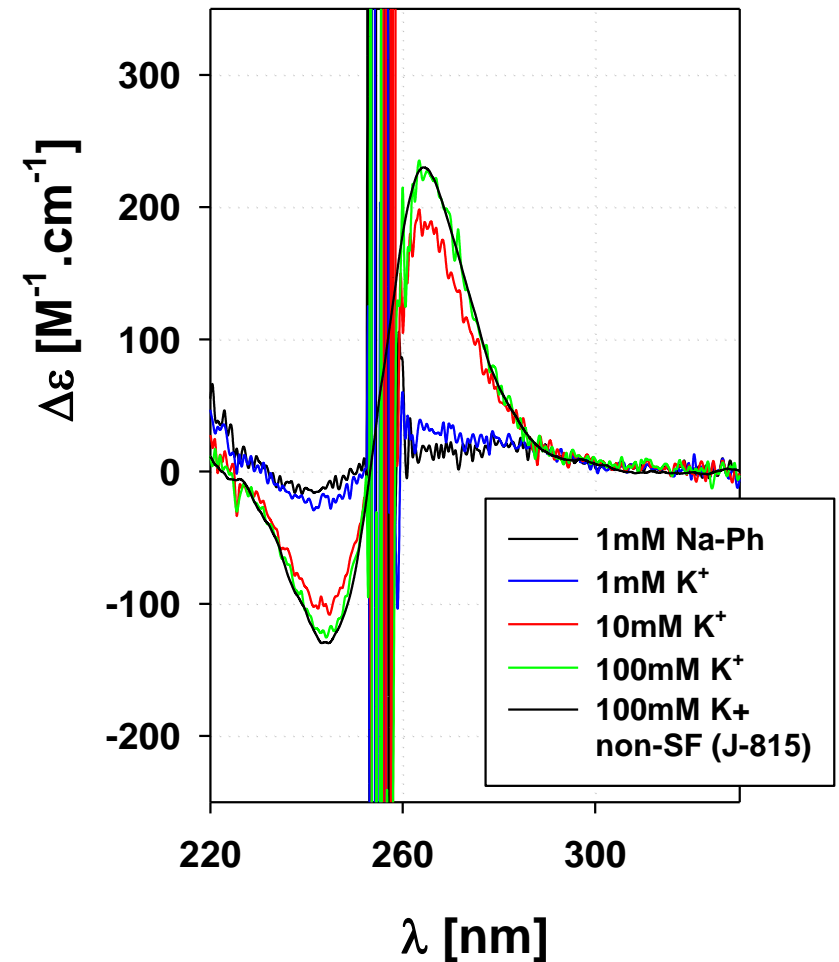
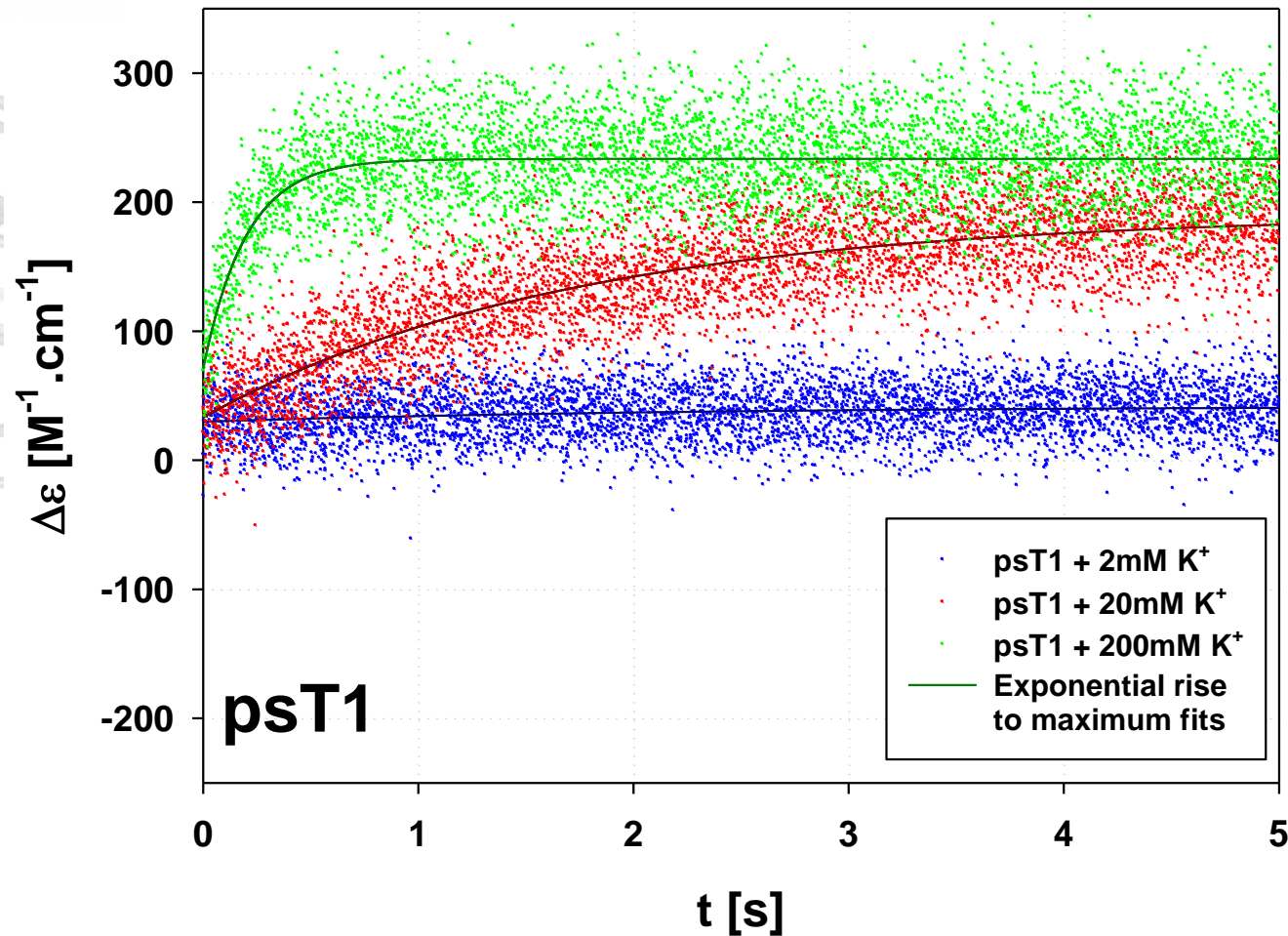
Kvadruplex – $G_3T_2G_3T_2G_3T_2G_3$ v K^+ - různé koncentrace DNA



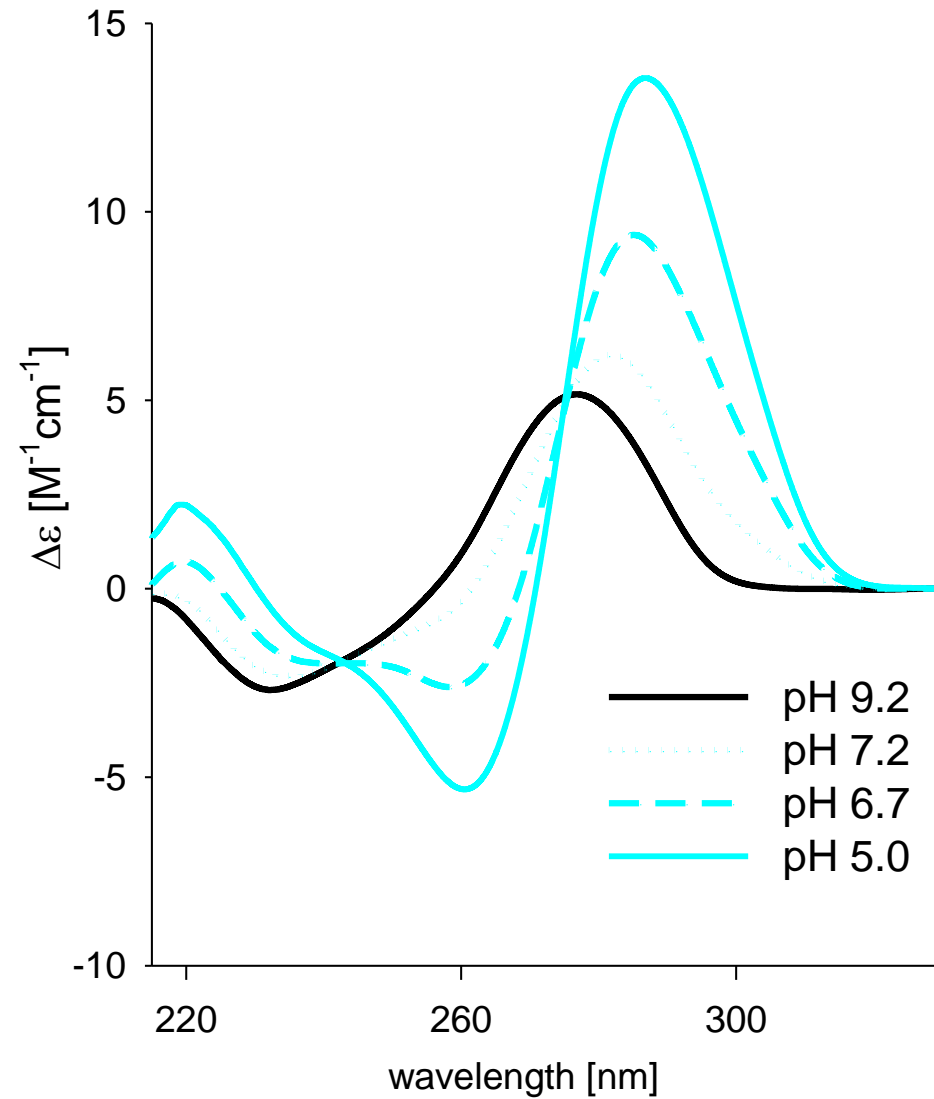
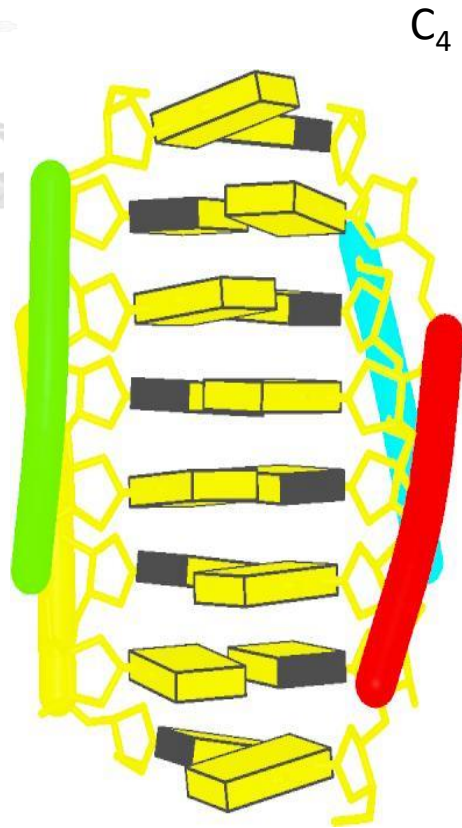
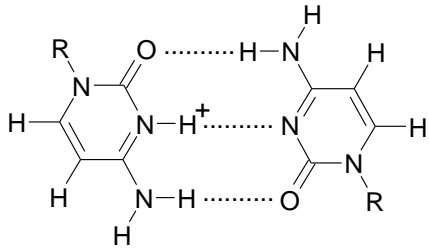
Tvorba kvadruplexu – detekce CD / stopped-flow



AATTG₂TG₃TG₃TG₃TAA + různé koncentrace K⁺



Cytosinový I-motiv

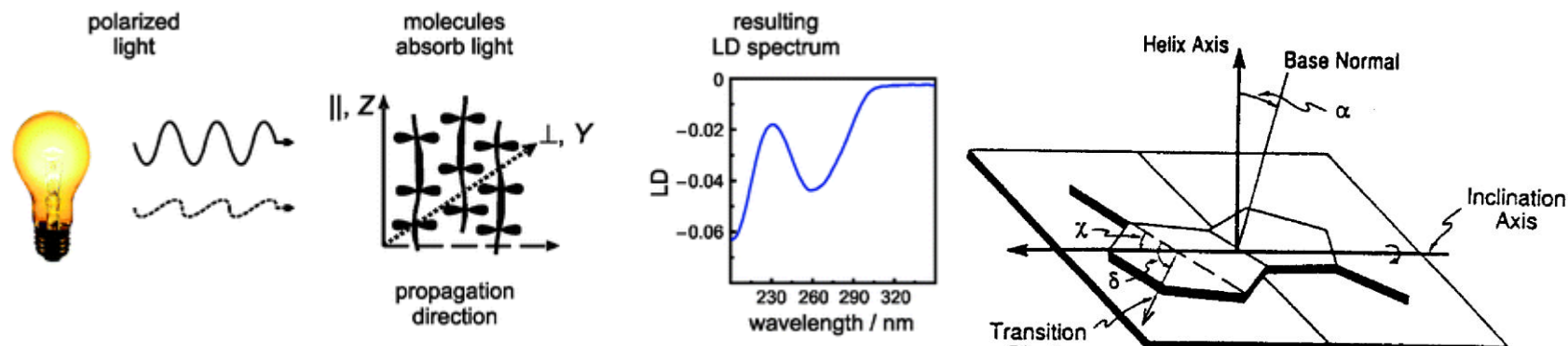


Lineární dichroismus (LD)

Rozdíl v absorpci světla lineárně polarizovaného rovnoběžně a kolmo na orientaci molekuly

- nutné podmínky: molekuly jsou **orientované** a navíc **absorbují** v dané oblasti měření
- orientace molekul: gel, elektrické pole, proud nebo **rotace kapaliny**
- měří se jak v oblasti elektronových přechodů (UV / VIS), tak vibračních přechodů (IR)

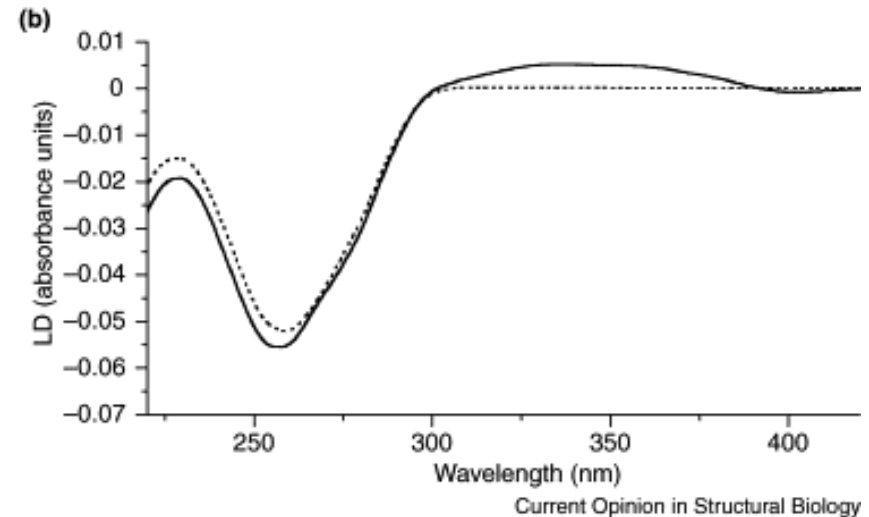
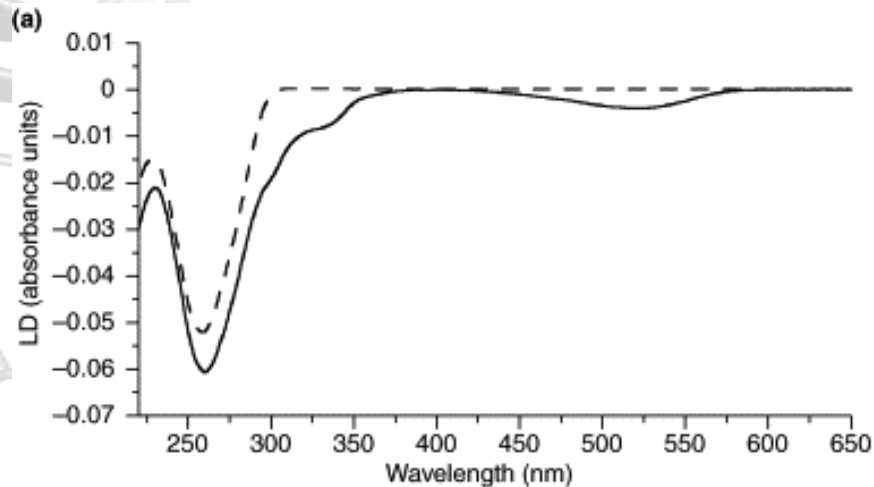
LD je citlivé k orientaci jednotlivých komponent vůči směru orientace molekul – např. inklinace bazí v DNA (úhel mezi osou dvojšroubovice a normálou roviny báze)



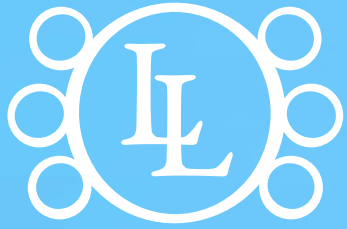
Bulheller et al., 2007, Phys Chem Chem Phys

Rodger et al., 2006, Phys Chem Chem Phys

LD DNA + ligand



LD of DNA and DNA–ligand systems. **(a)** LD of calf thymus DNA (1000 μM base, dashed line) and the DNA plus an ethidium bromide intercalator (50 μM , solid line). **(b)** LD of calf thymus DNA (1000 μM base, dashed line) and the DNA plus a minor groove binder (diaminophenyl indole, 50 μM , solid line)



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



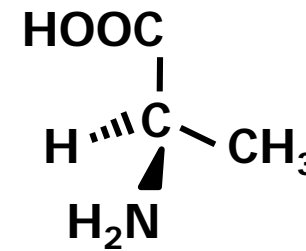
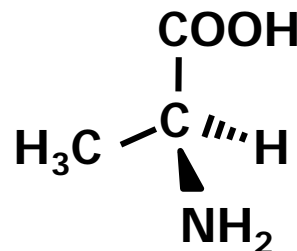
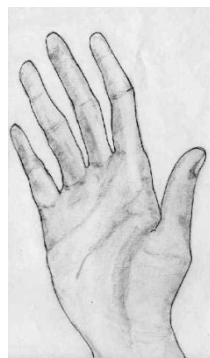
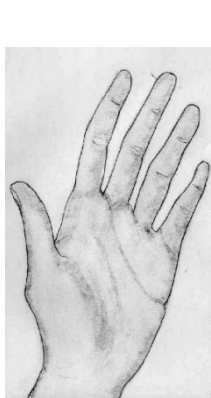
Analýza struktury proteinů

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

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

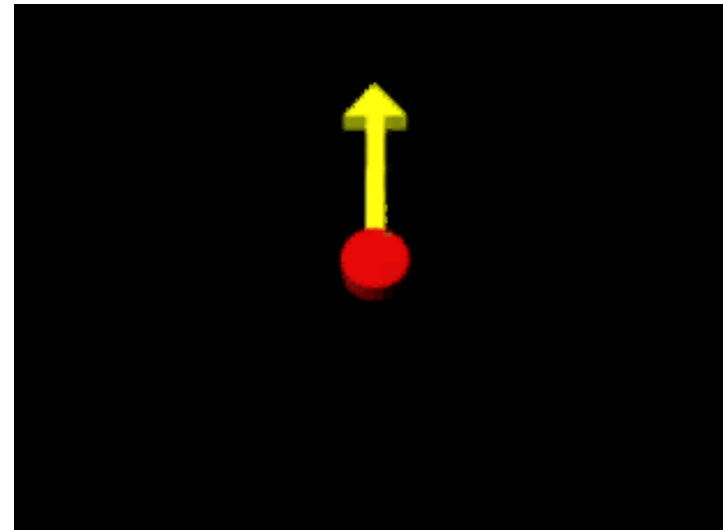
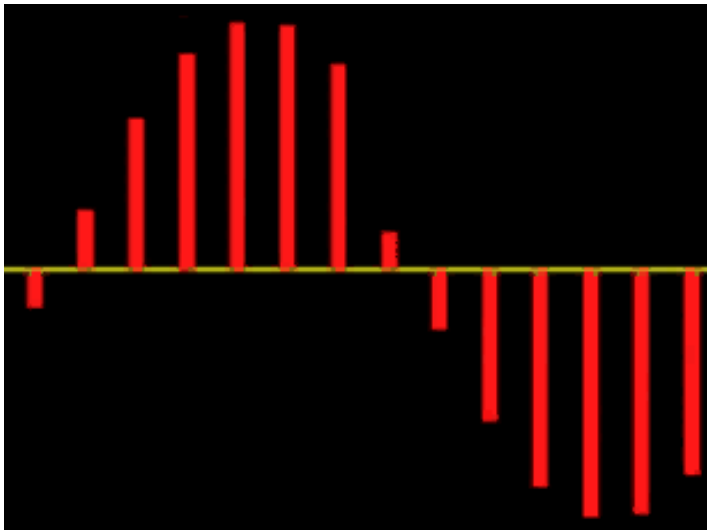
Chirální molekuly

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



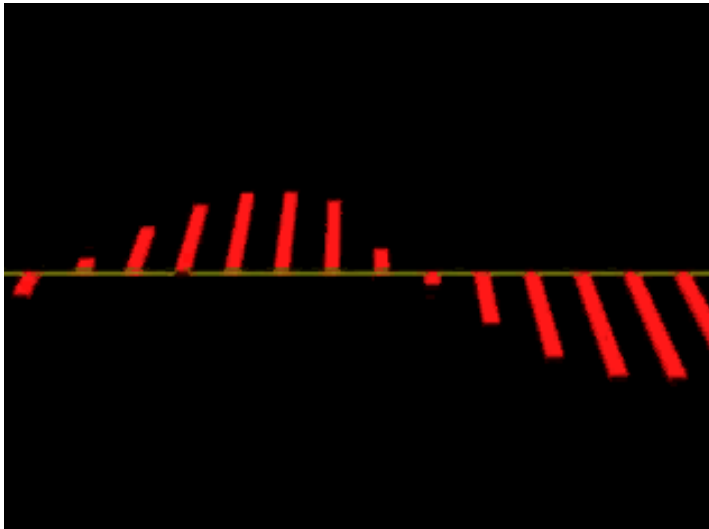
Lineárně polarizované světlo

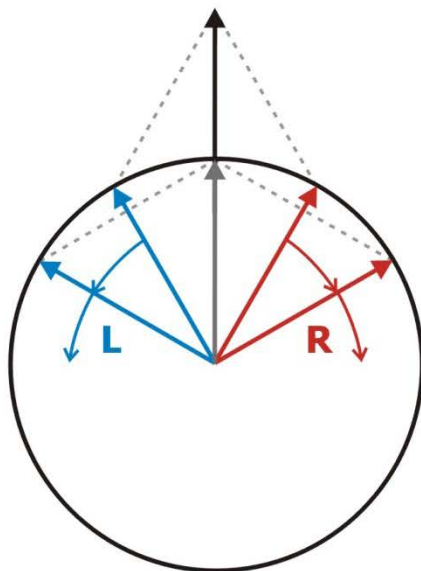
- ❑ konstantní směr (orientace), modulovaná amplituda
- ❑ úsečka o délce $2A_{\max}$

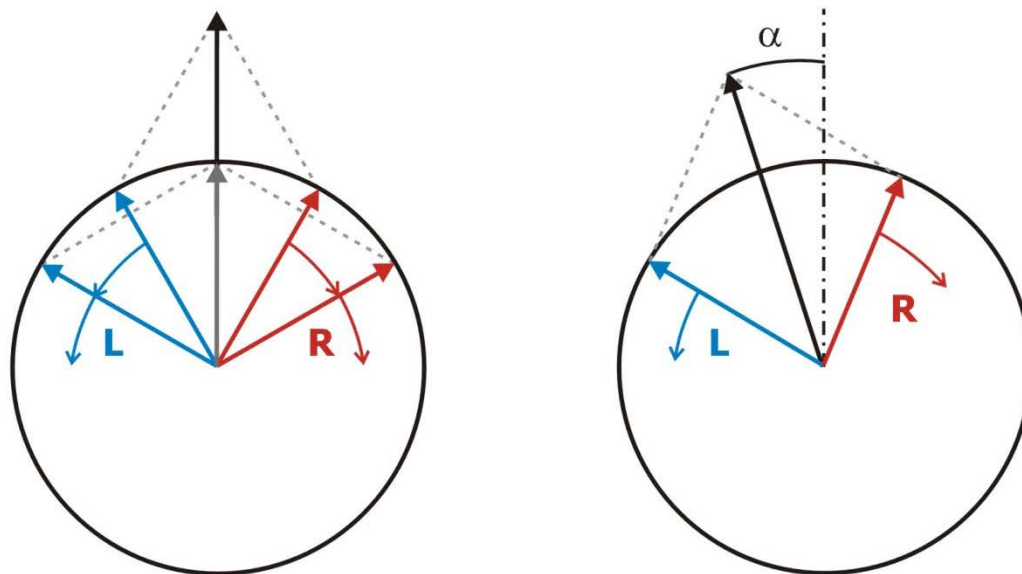


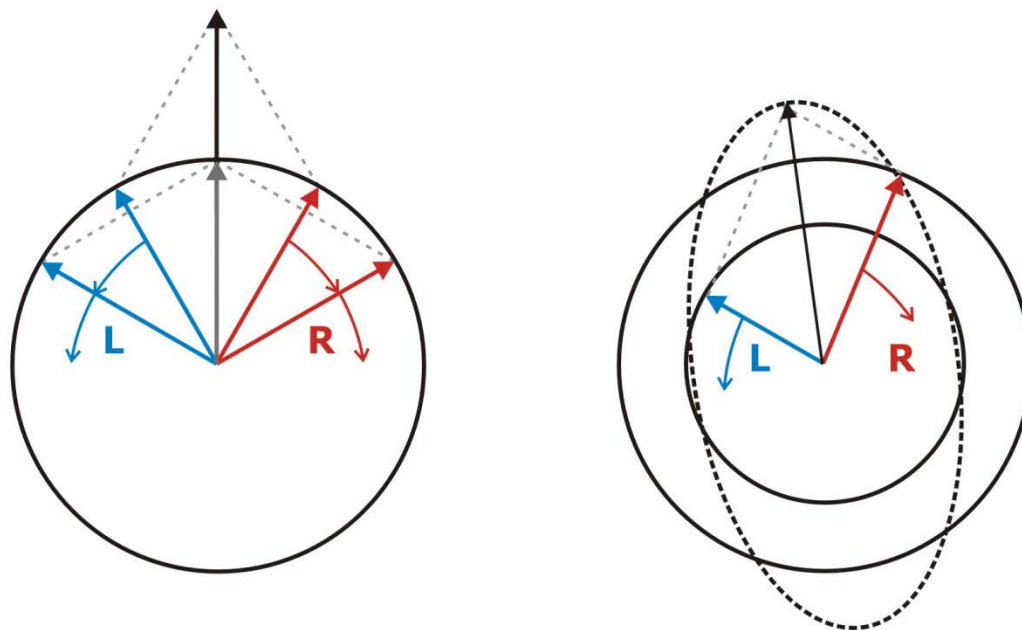
Kruhově polarizované světlo

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

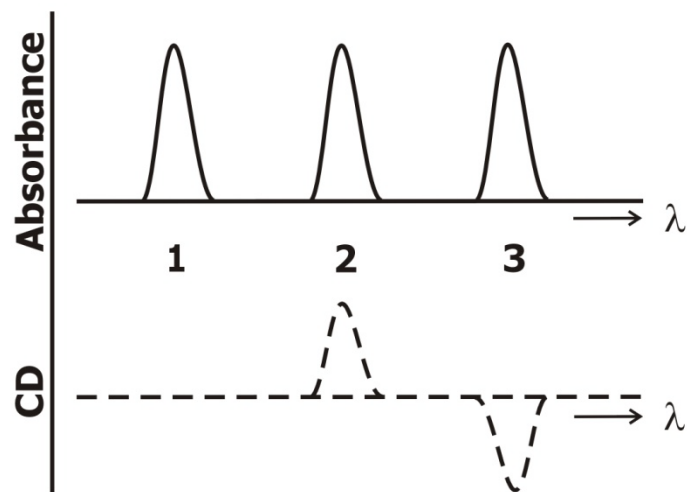
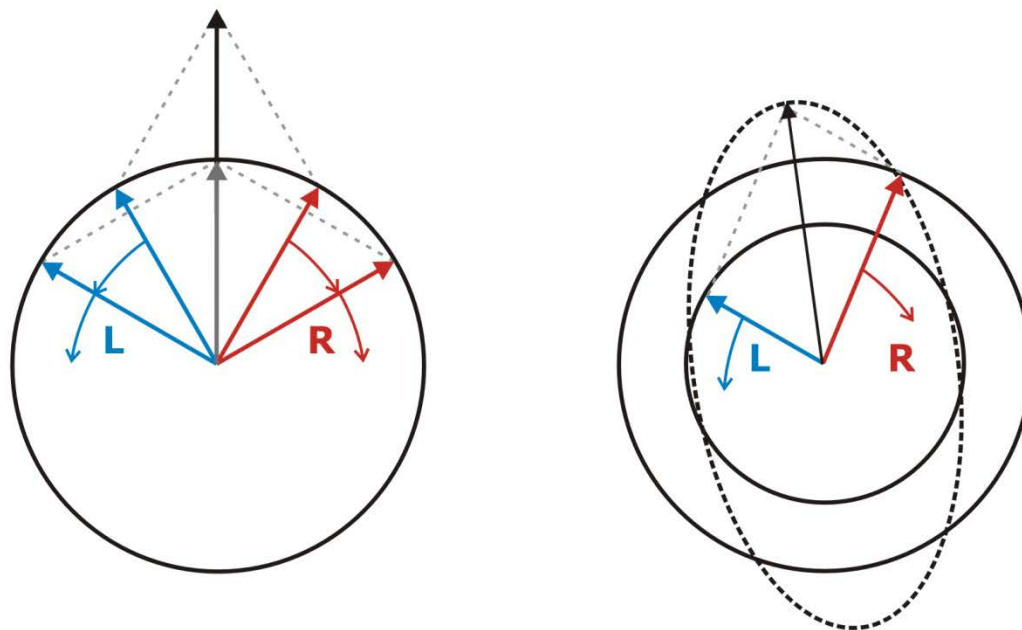








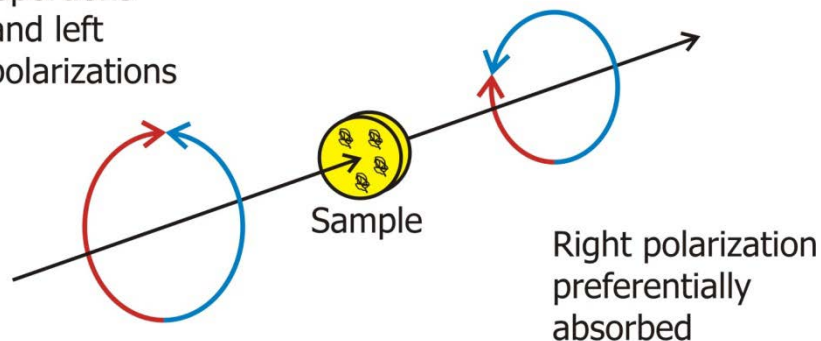
Fyzikální podstata



Fyzikální podstata - 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}	$\theta_{\text{MRE}} = \frac{(\theta_{\text{obs}} \cdot M_w \cdot 100)}{n \cdot c \cdot l}$	$\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$

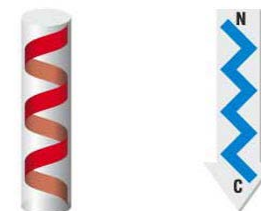
Proteinové chromofory

❑ daleká UV oblast

180-250 nm

chromoforem je peptidová vazba

informace o sekundární struktuře proteinu

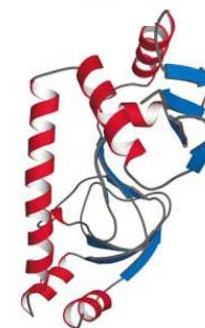


❑ blízká UV oblast

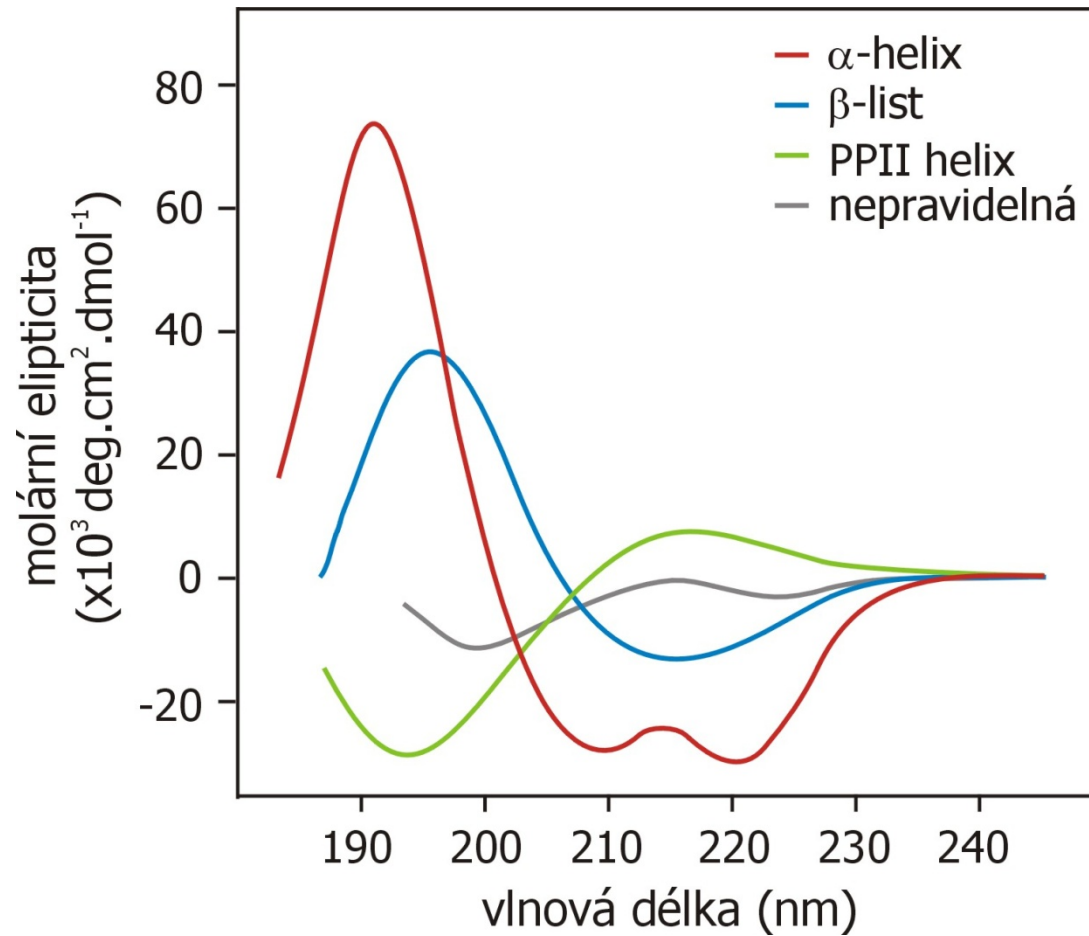
260-320 nm

chromofory jsou aromatické aminokyseliny a disulfidické můstky

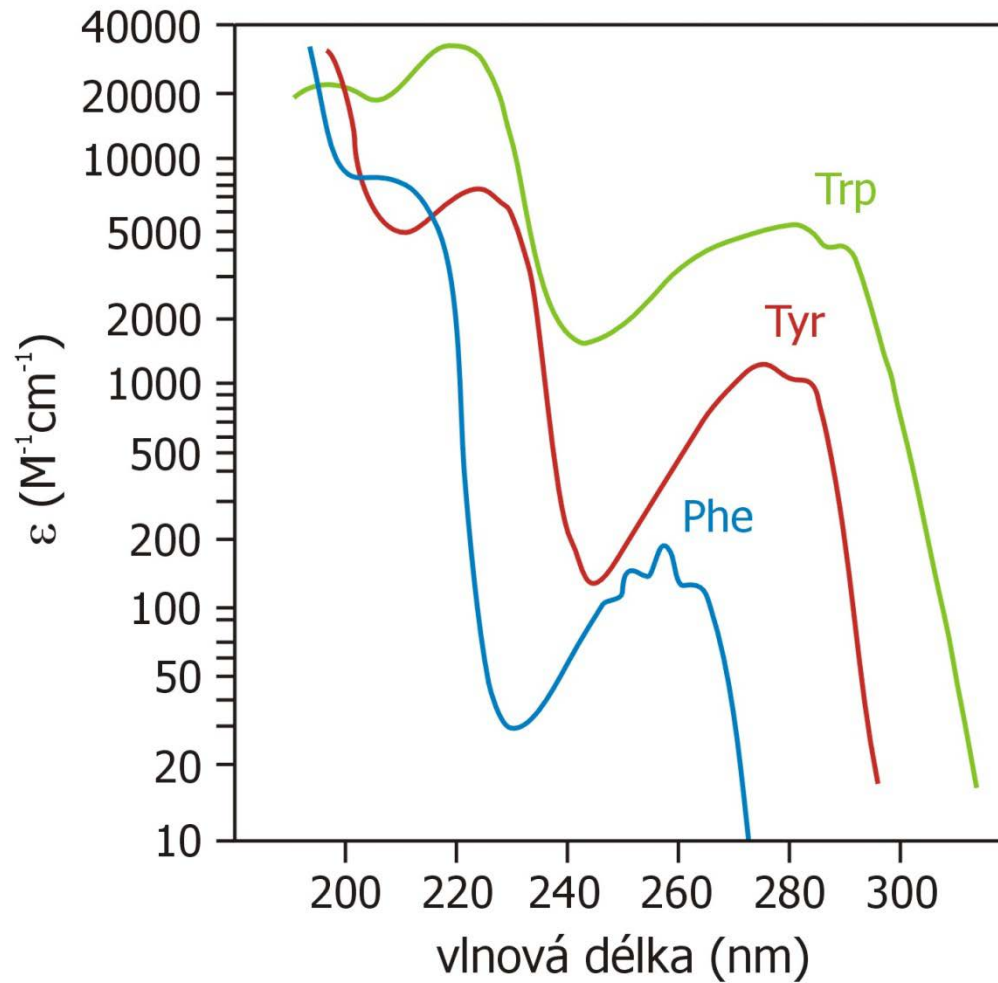
informace o průměrných změnách v terciální struktuře proteinů



Daleká UV oblast



Blízká UV oblast



Příprava vzorků pro CD měření

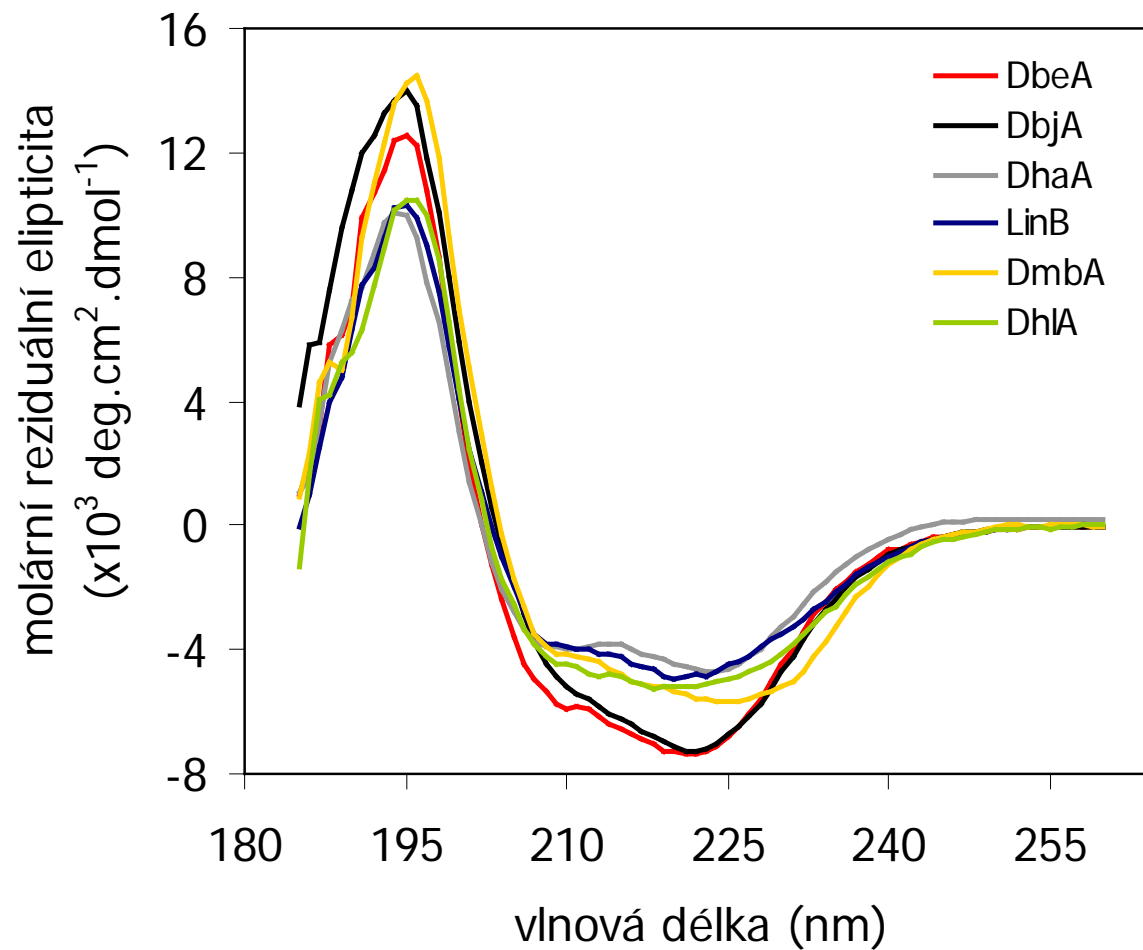
- ❑ vysoká čistota ~ 95% (kontrola na SDS gelu)
- ❑ homogenní vzorek bez proteinových agregátů (filtrace proteinu)
- ❑ odstranění oligonukleotidových fragmentů (přídavek nukleasy před purifikací proteinu)
- ❑ odstranění imidazolu/NaCl po purifikaci (dialýza, gelová filtrace)
- ❑ odstranění stabilizačních 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

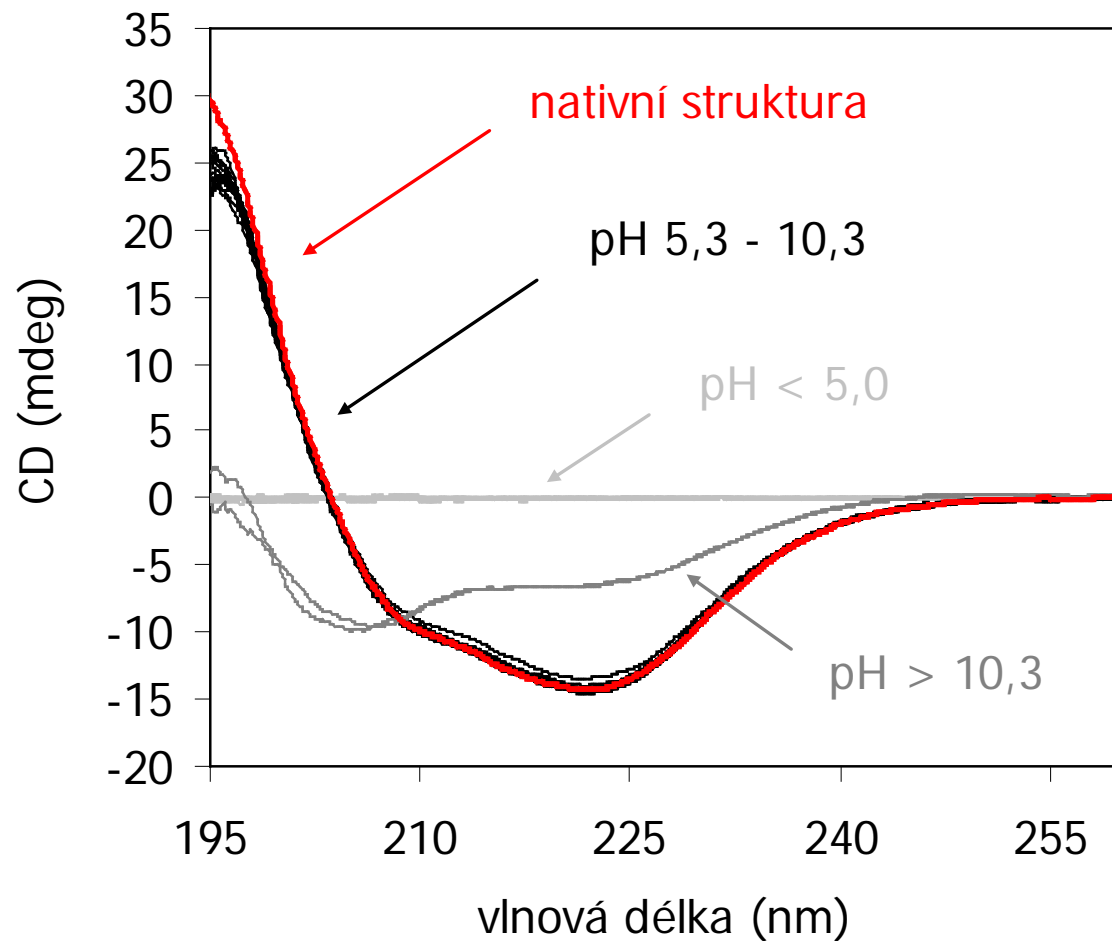
DichroWeb currently has 3600+ registered users and has performed over 375,000 deconvolutions.

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](#).

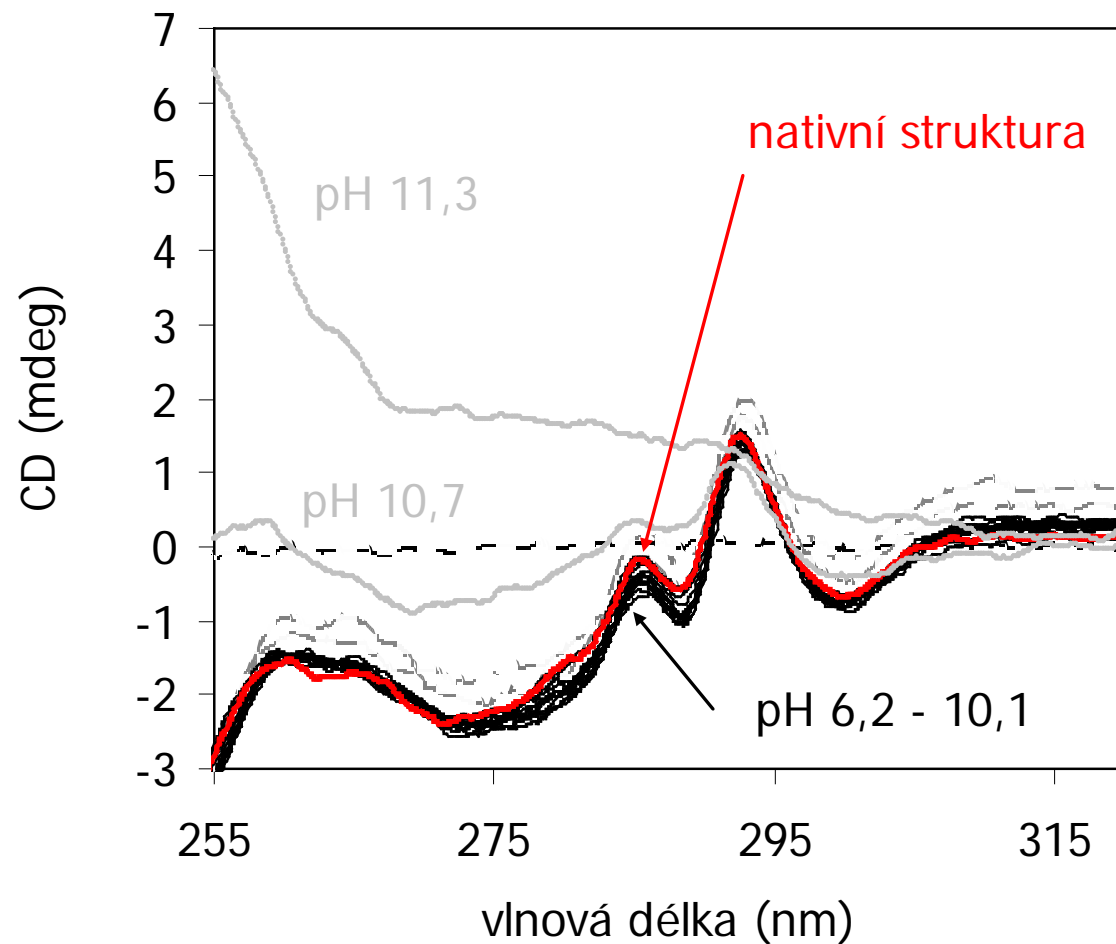
Příklady využití CD spektroskopie

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

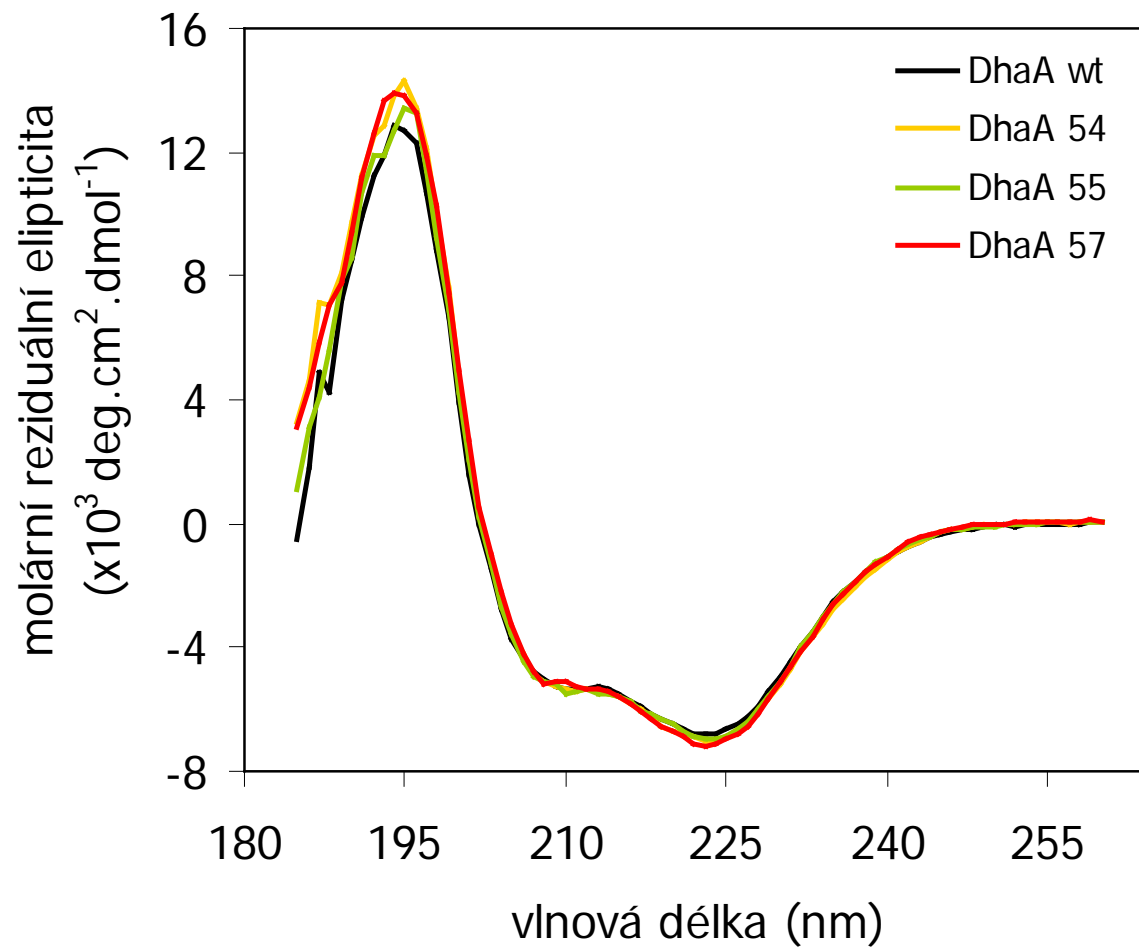
Příklady využití CD spektroskopie



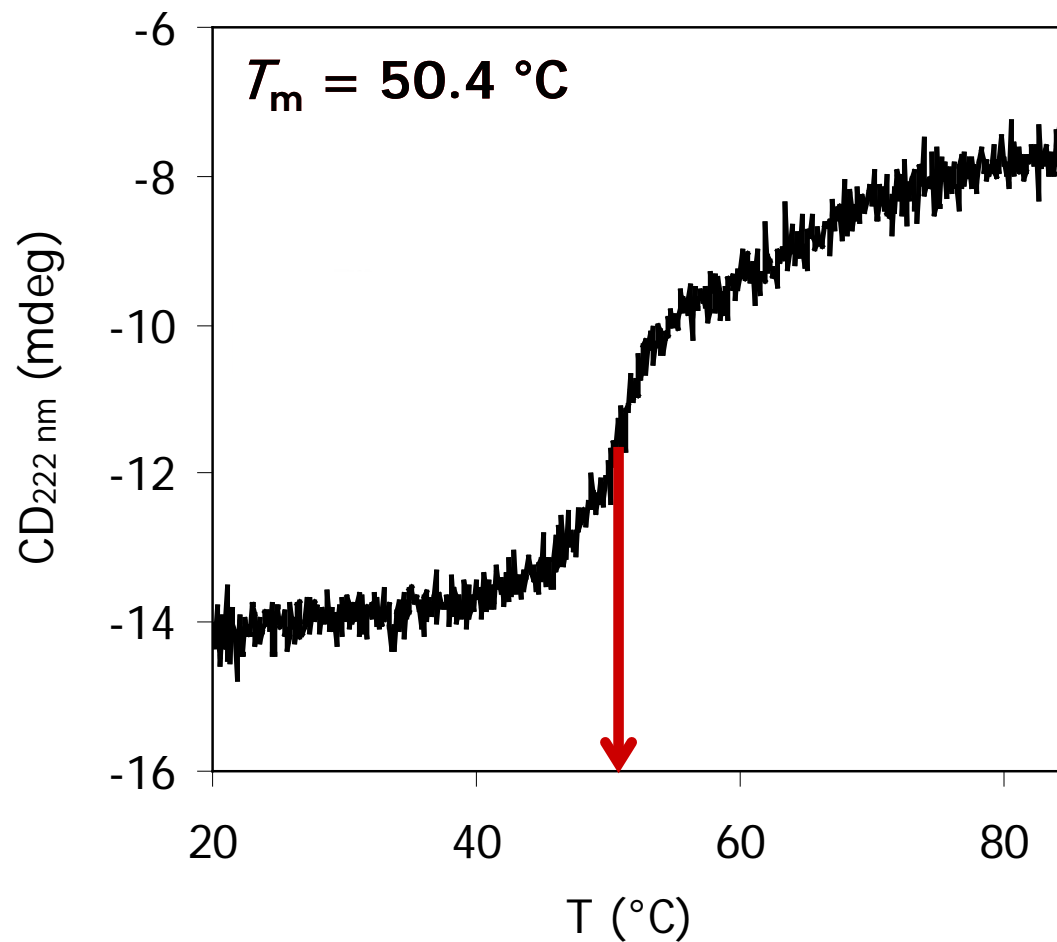
Příklady využití CD spektroskopie



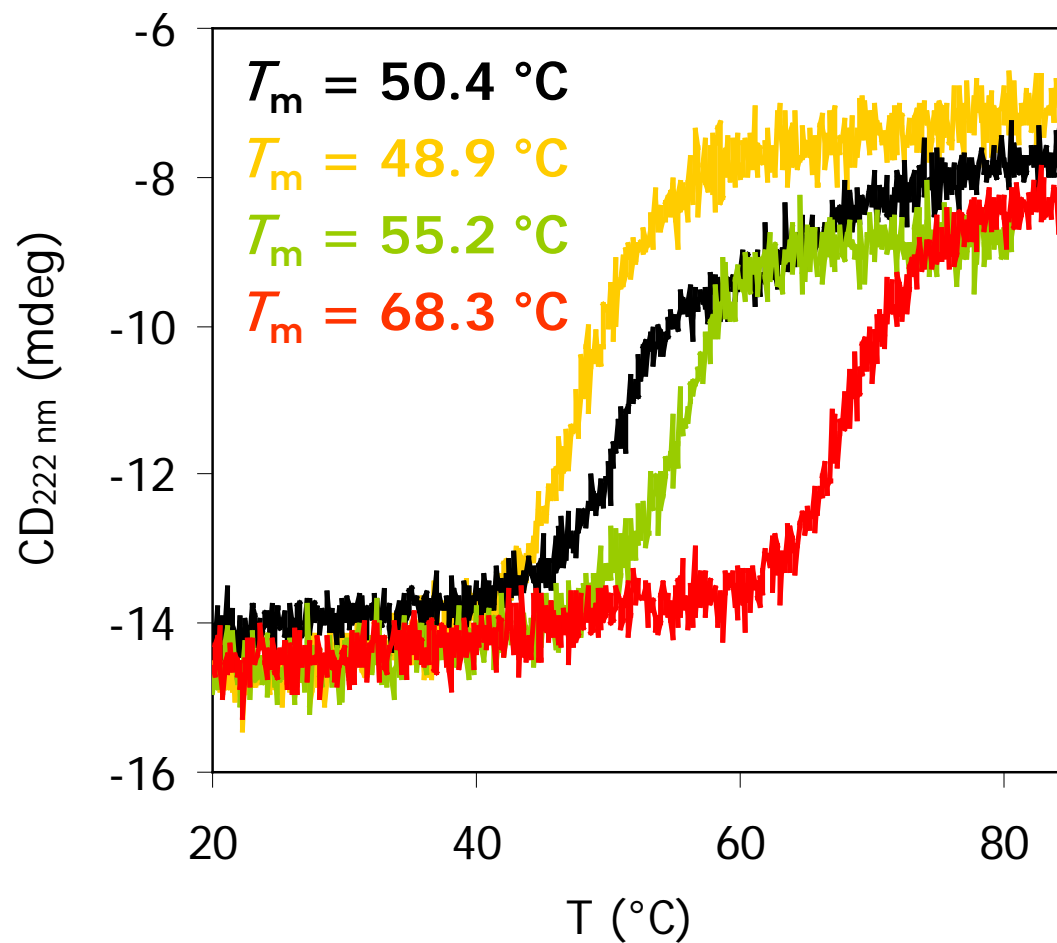
Příklady využití CD spektroskopie



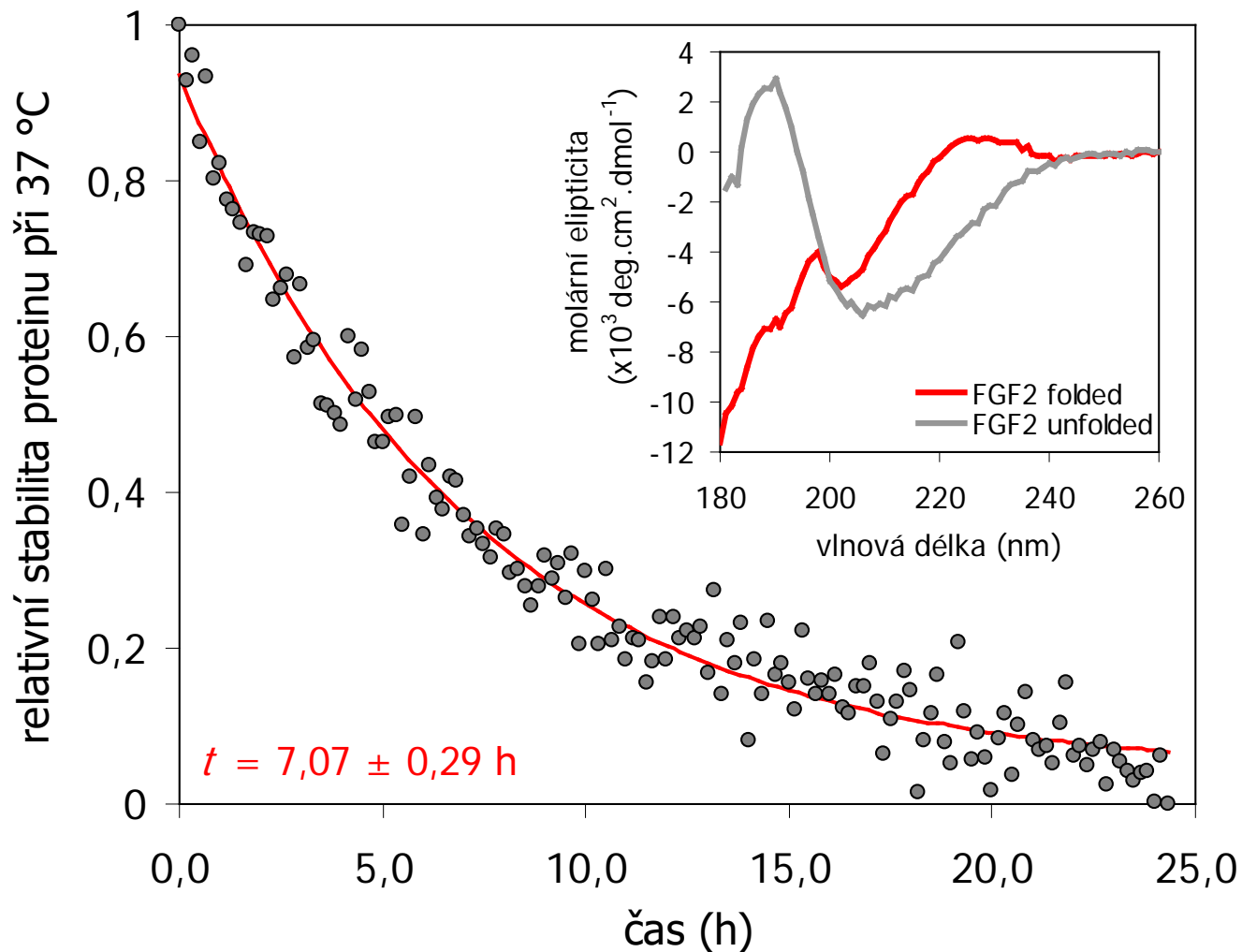
Příklady využití CD spektroskopie



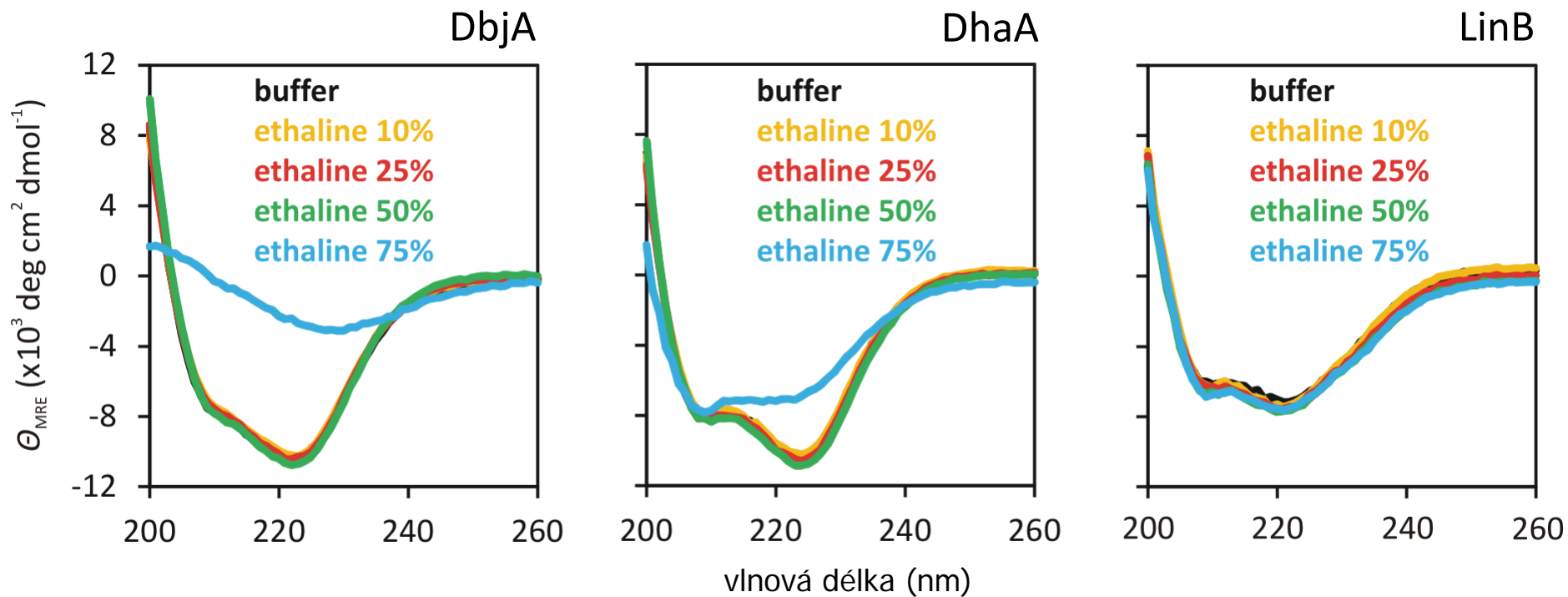
Příklady využití CD spektroskopie

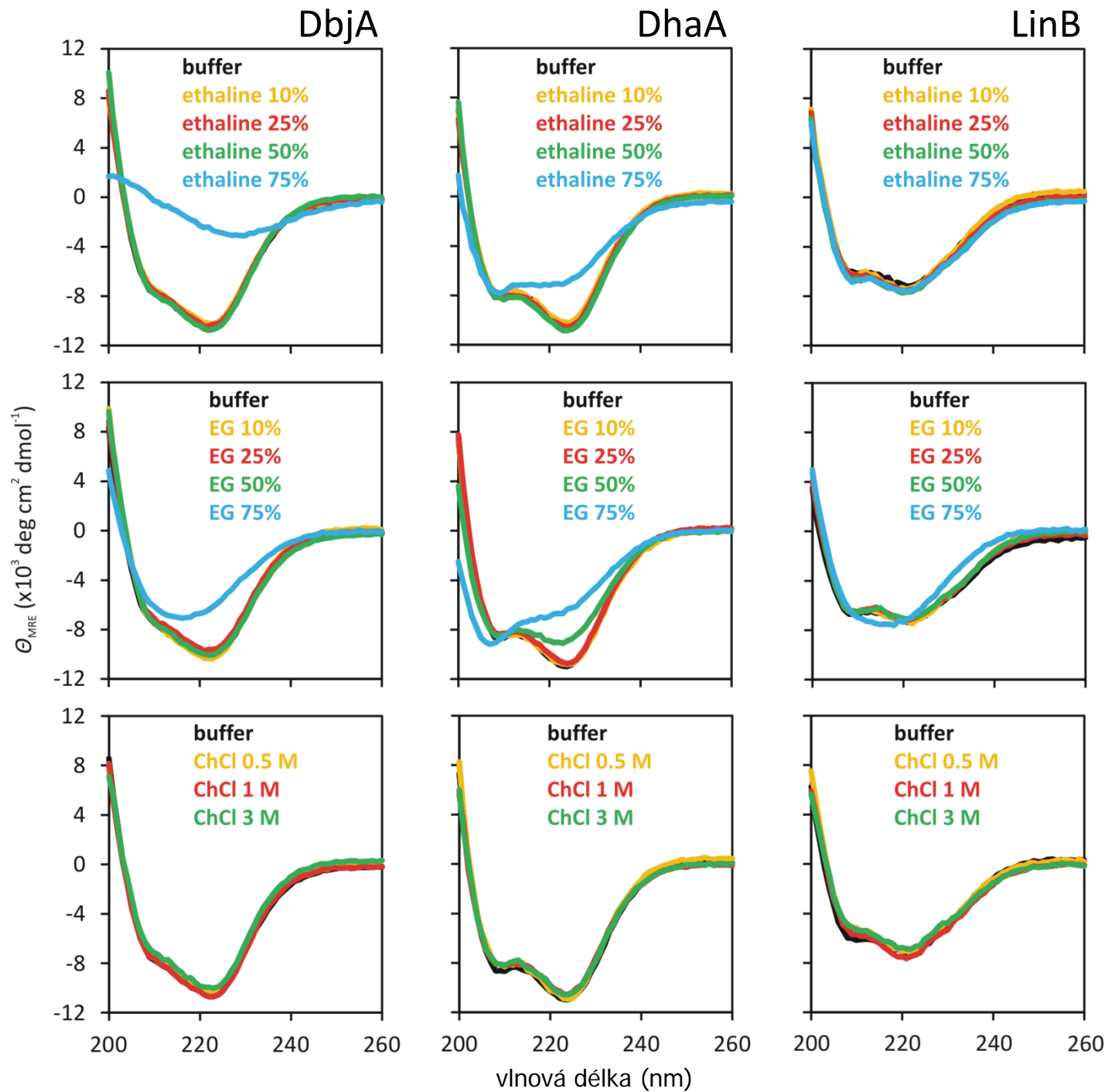


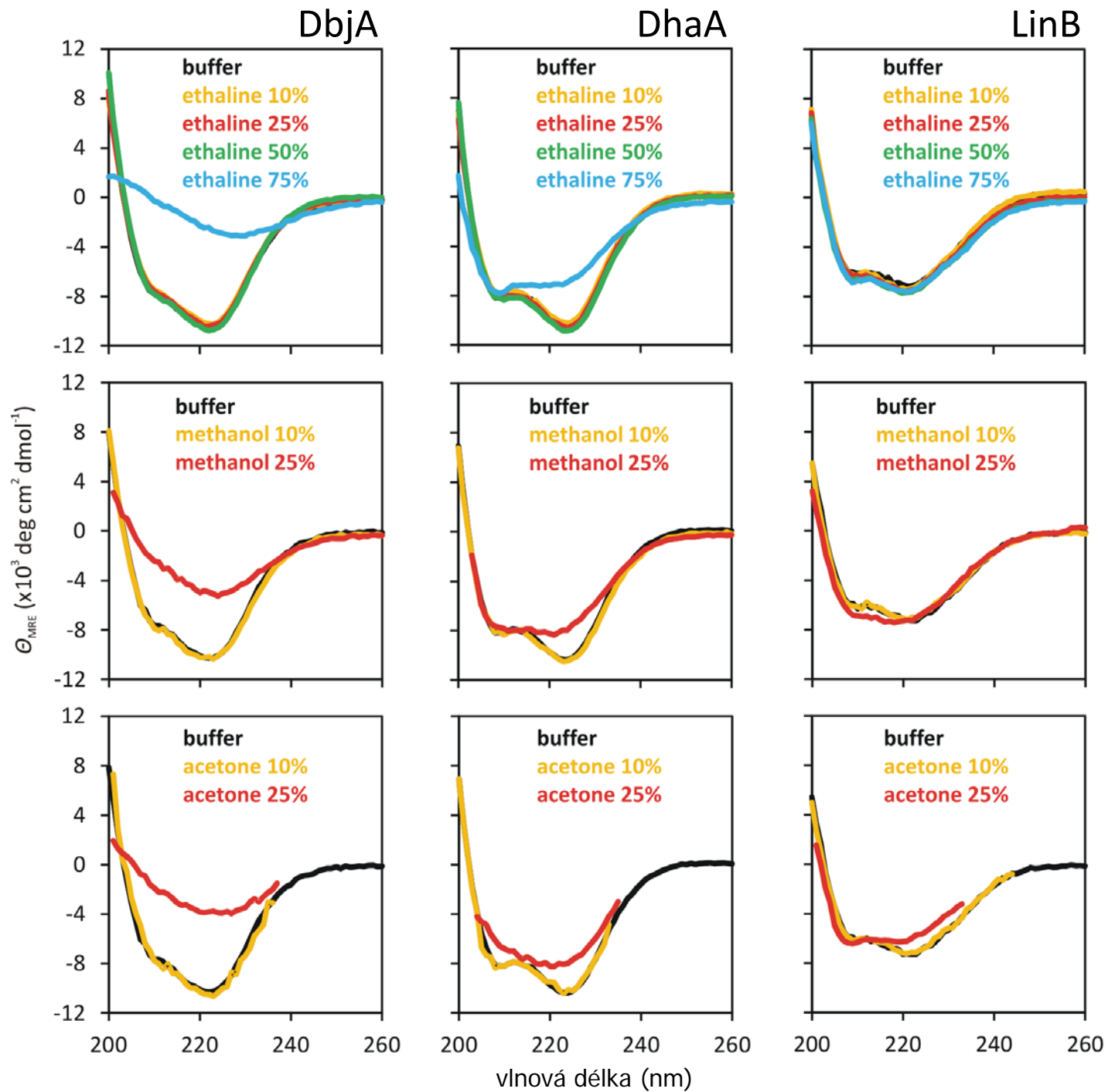
Příklady využití CD spektroskopie



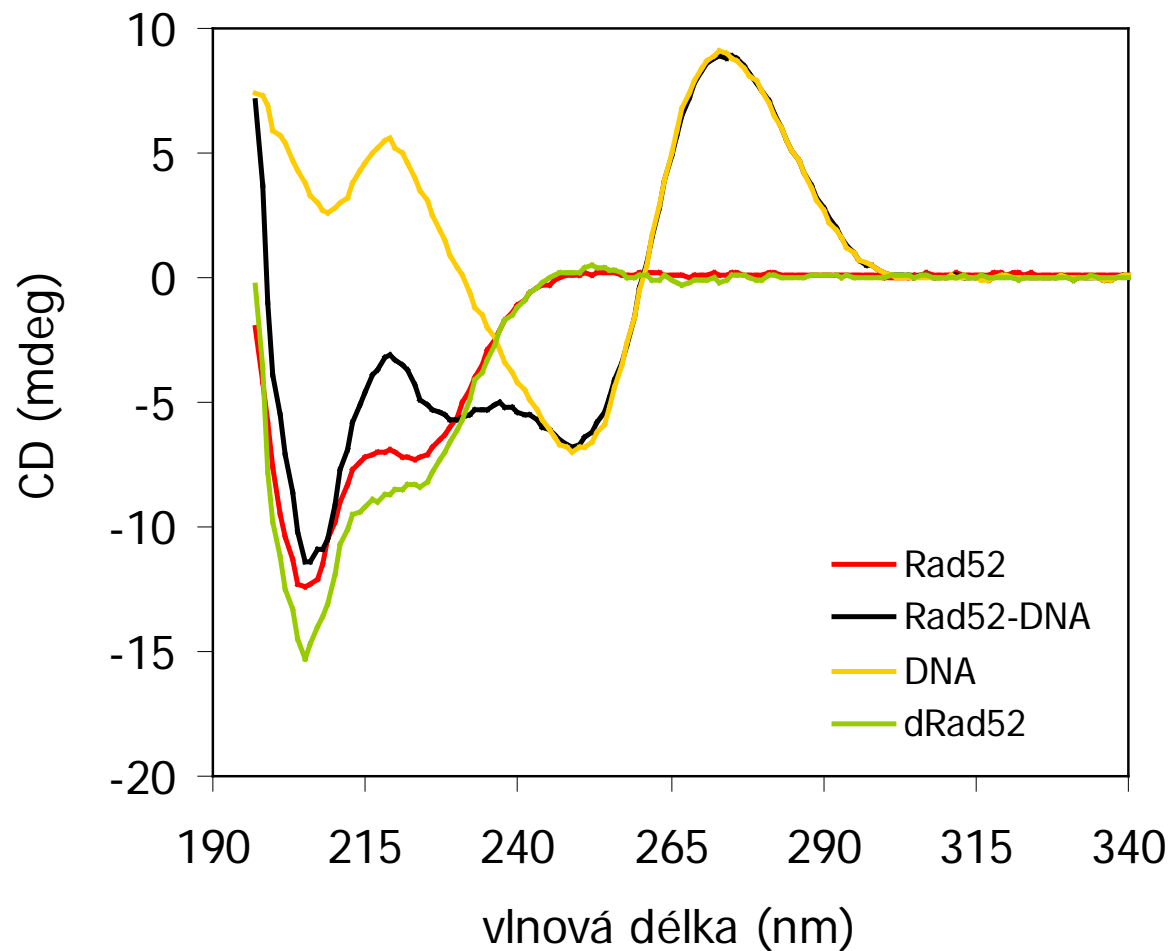
Příklady využití CD spektroskopie



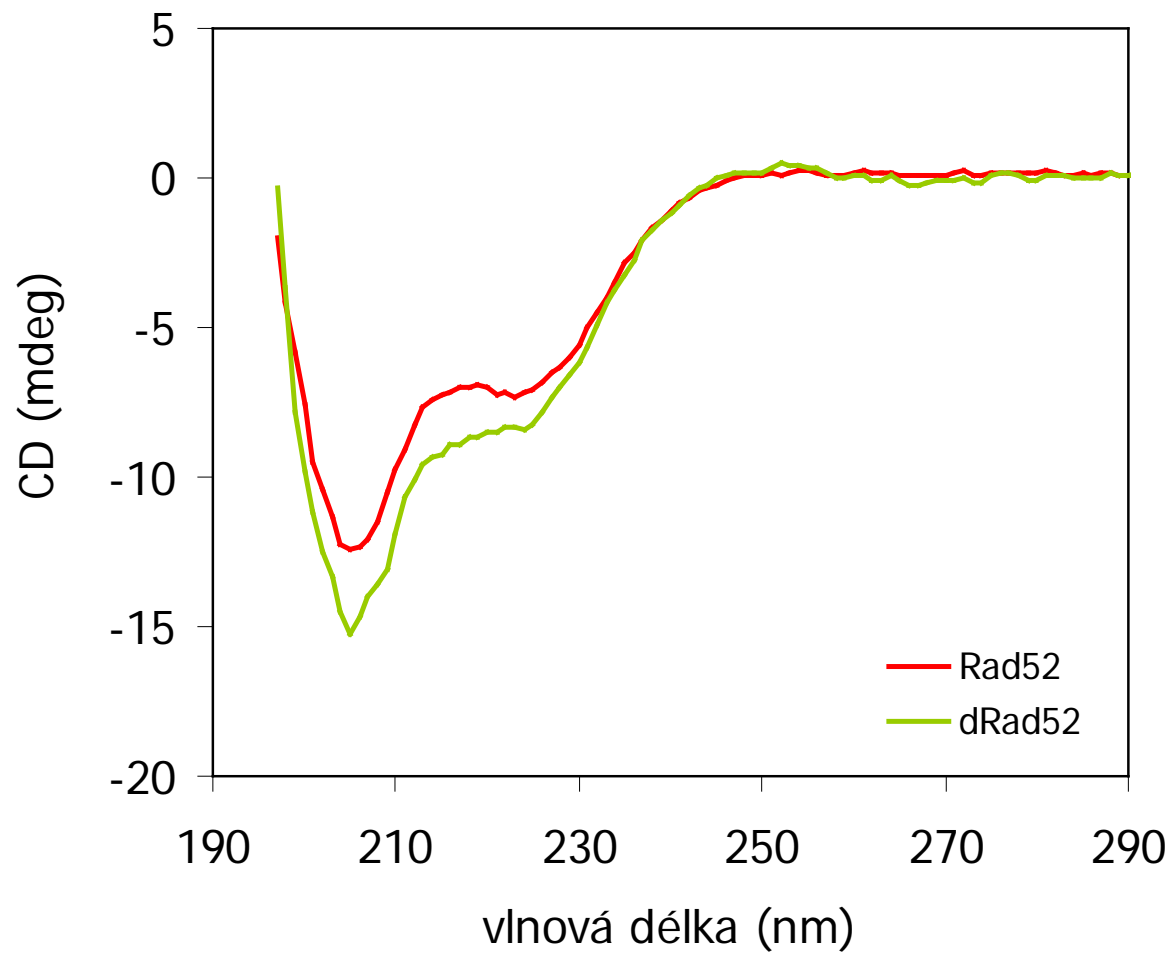




Příklady využití CD spektroskopie



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

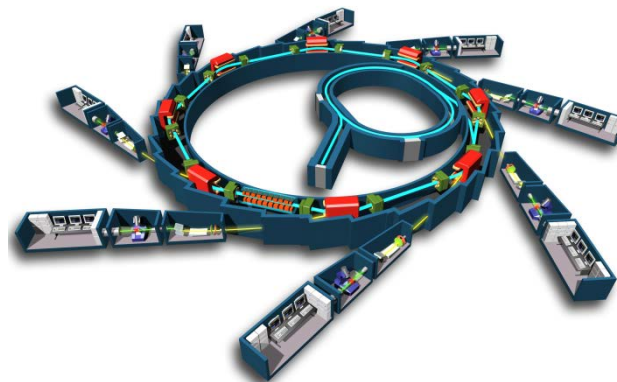
- ❑ strukturní informace s relativně nízkým rozlišením
- ❑ žádná informace o kvartérní struktuře proteinů

Výhody a limitace CD spektroskopie

Spektroskopická technika	Požadavky na vzorek		Měřicí 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

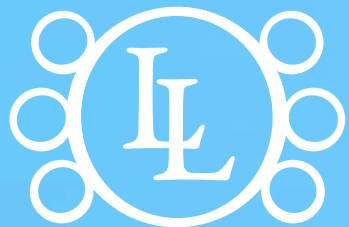
Výhody a limitace CD spektroskopie

- ❑ 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