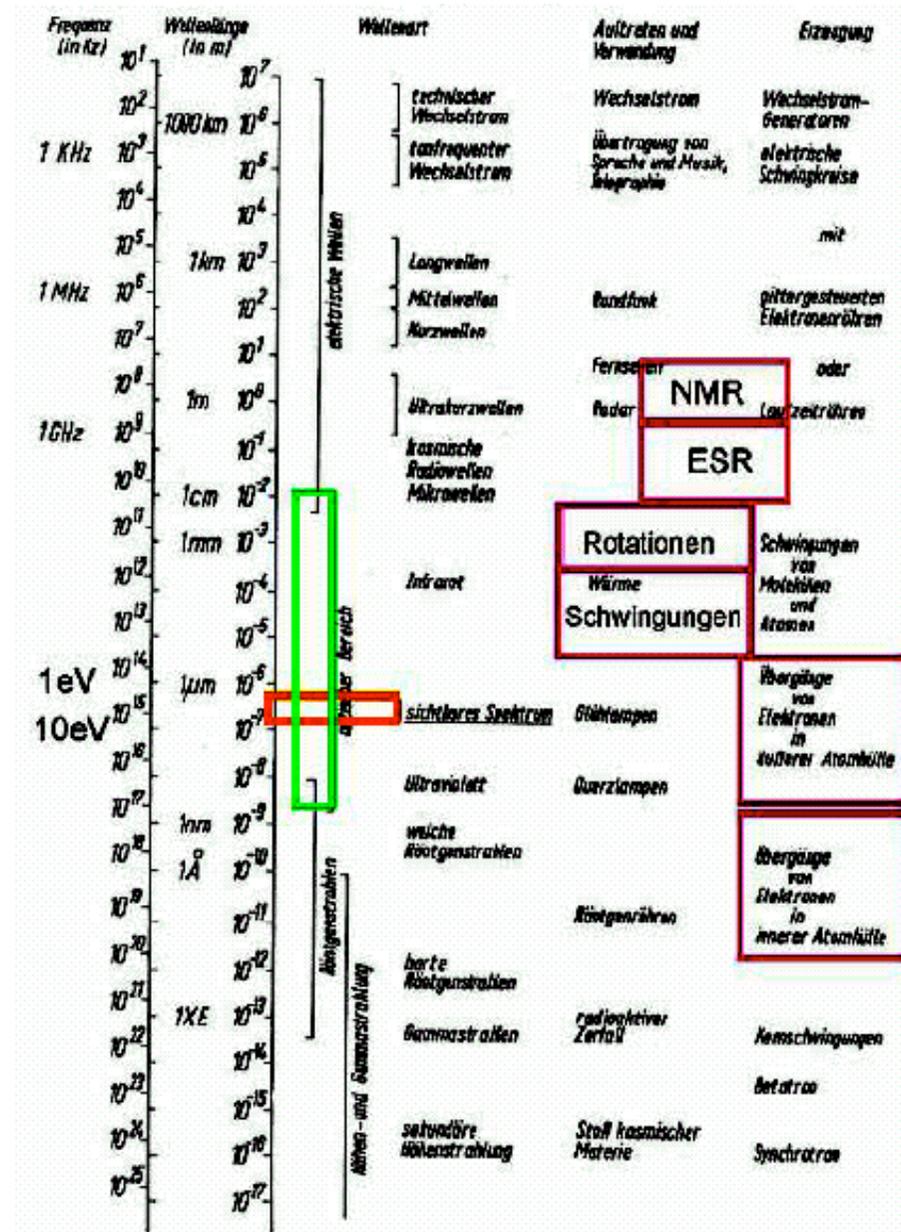


Circulardichroismus (CD) und Fluoreszenz

- Anwendungen in der Proteinchemie -

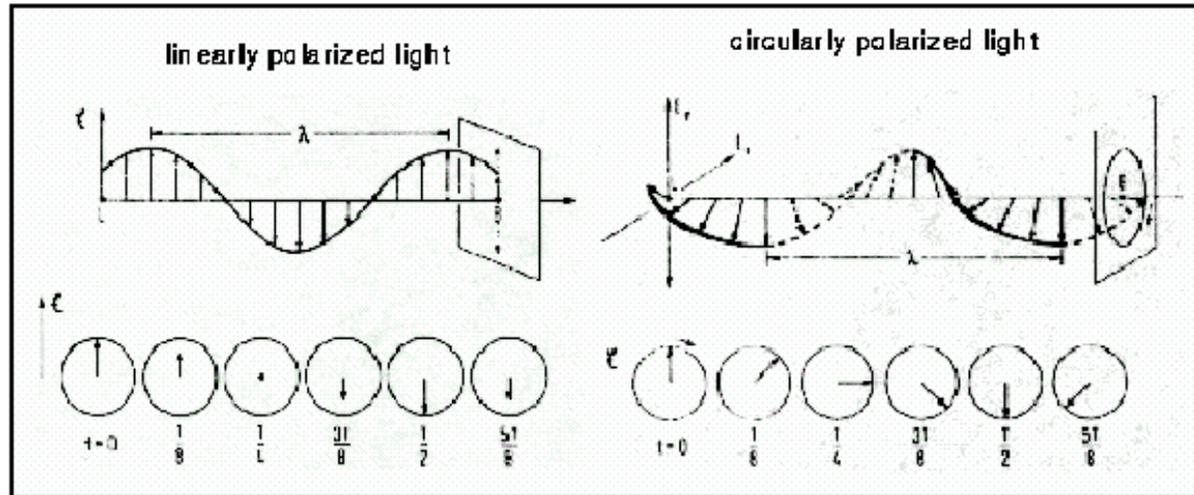


Circulardichroismus (CD) - Einführung

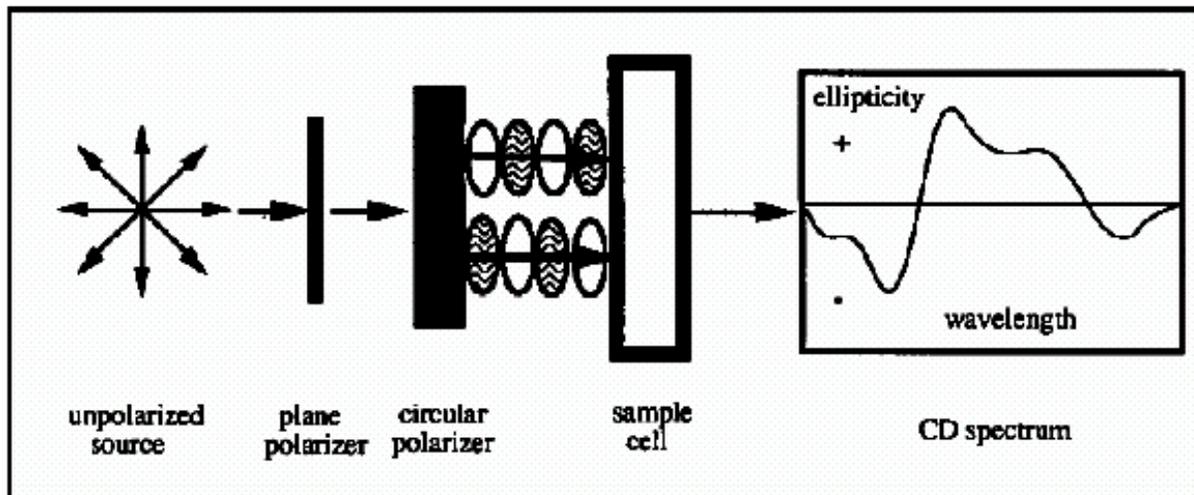
- *Circulardichroismus*: ungleiche Absorption von links und rechts zirkular polarisiertem Licht an asymmetrischen optischen Zentren
- sehr geringe *Absorptionsdifferenzen* (10^{-4} bis 10^{-6} bei Absorption von 1.0) → Hochpräzisionsgeräte, Messungswiederholung (Akkumulation) zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses
- Zwei Spektralbereiche: (1) Fern-UV oder Amidregion (170 - 250 nm), zur Bestimmung des Sekundärstrukturgehaltes eines Proteins; (2) Nah-UV oder Aromatenbereich (250 - 300 nm) zur Charakterisierung der Tertiärstrukturumgebung von aromatischen Seitenketten
- Disulfidbrücken: sehr geringe circulardichroitische Absorption bei ca. 250 nm

Circulardichroismus (CD) - Prinzip

- Zirkular polarisiertes Licht



- Herstellung von zirkular polarisiertem Licht



Circulardichroismus (CD) - Formel

- Meßsignal beruht auf unterschiedlicher Absorption rechts und links polarisiertem Licht
- Einheiten: Absorptionsdifferenz ($A_L - A_R$), Absorptionskoeffizienten-Differenz ($\epsilon_L - \epsilon_R$), molare Elliptizität [Θ] ($\text{Grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$)
- Umrechnungen: $\Theta = 3.300 \cdot (A_L - A_R)$, $[\Theta] = \Theta \cdot 100 \cdot M_r / (c \cdot d)$

bzw

$$\underline{\Theta_{\text{MRW}} = \Theta \cdot 100 \cdot \text{MRW} / (c \cdot d)}$$

- Θ : Elliptizität
- Θ_{MRW} : *mean residue weight ellipticity*
- c : Proteinkonzentration [mg ml^{-1}]
- MRW : mittlere Molmasse einer Aminosäure des Proteins [mg mmol^{-1}]
- d : Schichtdicke [cm]

beachte: Θ meist in mdeg gemessen \Rightarrow Meßwert durch 1000 dividieren

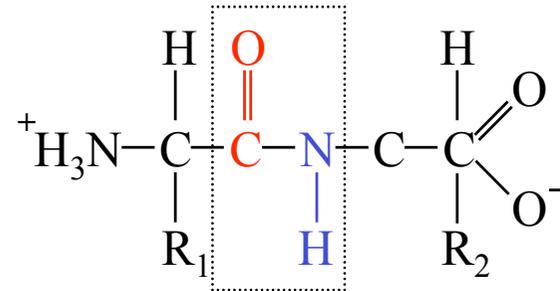
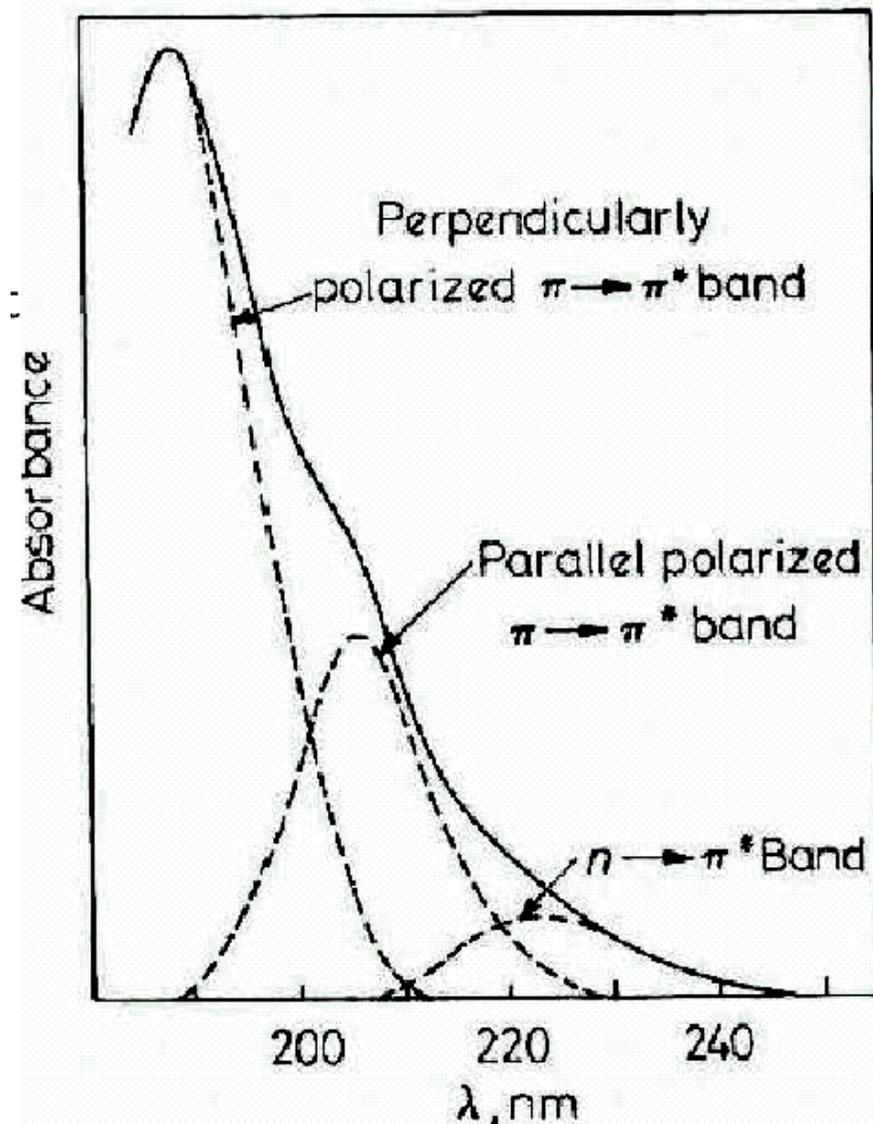
Circulardichroismus (CD) - Einführung

- Meßsignal beruht auf unterschiedlicher Absorption rechts und links polarisiertem Licht

Lambert-Beerschem Gesetz: $A = \varepsilon \cdot d \cdot c$

Circulardichroismus (CD) - Absorption

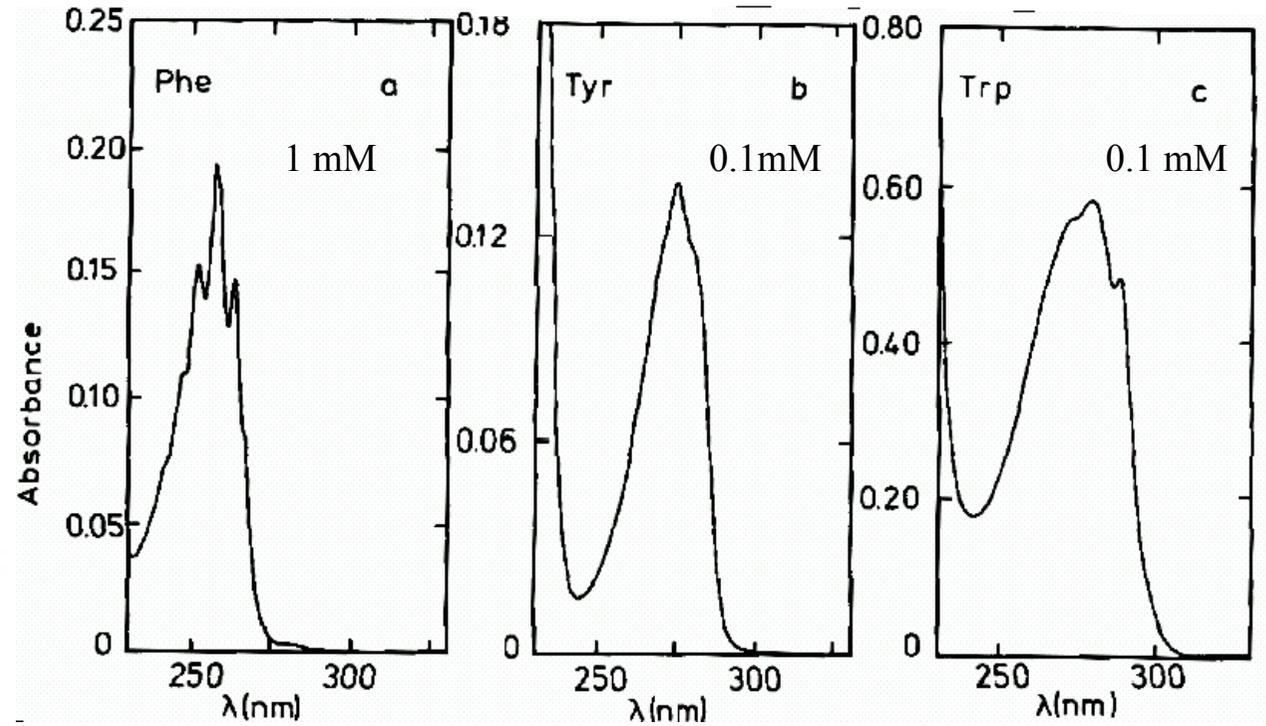
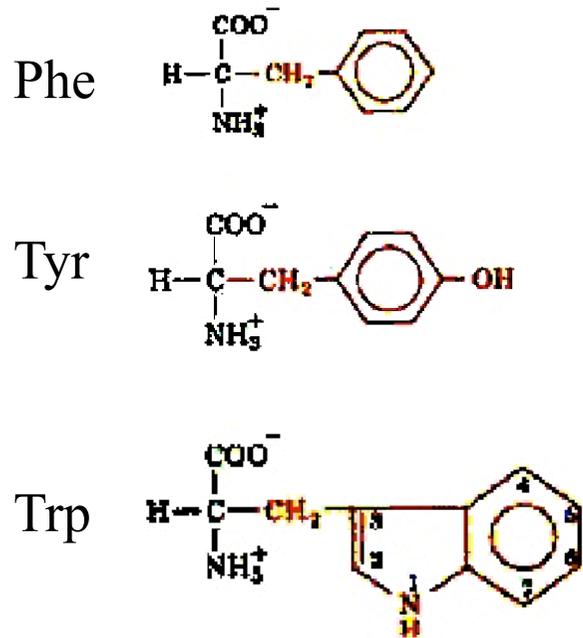
Absorbierende Gruppen in Proteinen: die Peptidbindung



- Absorption von Proteinen und Peptiden, genauer: der Peptidbindung \rightarrow breite Absorption zwischen 180 nm und 240 nm, mit einem Maximum bei ca. 190 nm
- Weitere Absorptionen zwischen 250 nm und 300 nm aufgrund der aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin (hier nicht dargestellt)

Circulardichroismus (CD) - Absorption

Absorbierende Gruppen in Proteinen: aromatische Aminosäuren



Aminosäure	Absorptionsmaximum	Absorptionskoeffizient	Fluoreszenzmaximum
Tryptophan	280 nm	5.600	348 nm
Tyrosin	274 nm	1.400	303 nm
Phenylalanin	257 nm	200	282 nm

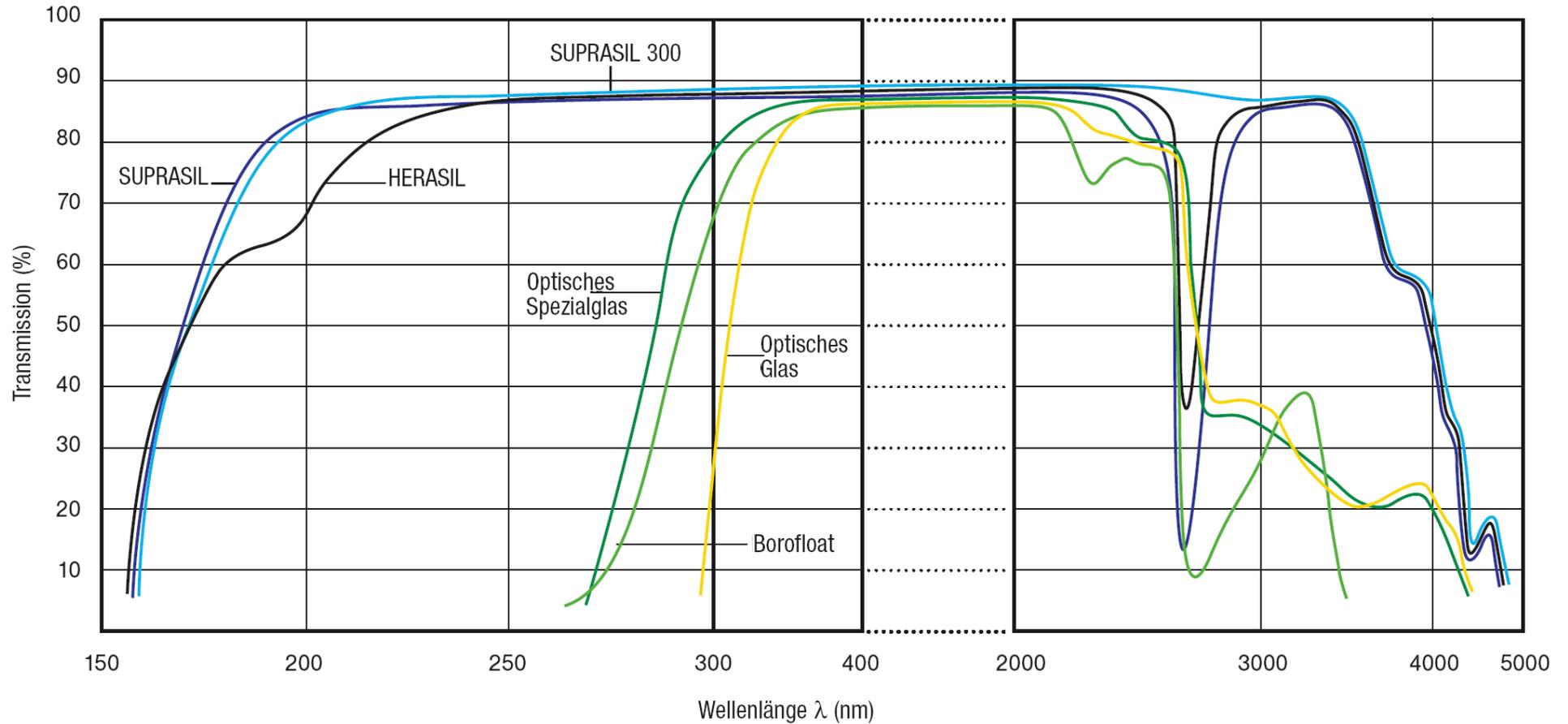
Circulardichroismus (CD) - Absorption

Andere absorbierende Gruppen in der Meßzelle: Puffersubstanzen

		<i>Absorption einer 10 mM Lösung in einer 0.1-cm-Zelle bei ...</i>			
<i>Puffer</i>	<i>Keine Absorption überhalb von ...</i>	<i>210 nm</i>	<i>200 nm</i>	<i>190 nm</i>	<i>180 nm</i>
NaClO ₄	170 nm	0	0	0	0
NaF, KF	170 nm	0	0	0	0
Borat	180 nm	0	0	0	0
NaCl	205 nm	0	0.02	>0.5	>0.5
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
Natriumacetat	220 nm	0.03	0.17	>0.5	>0.5
Glycin	220 nm	0.03	0.1	>0.5	>0.5
Diethylamin	240 nm	0.4	>0.5	>0.5	>0.5
NaOH, pH 12	230 nm	≥0.5	>2	>2	>2
Borat/NaOH, pH 9.1	200 nm	0	0	0.09	0.3
Tricine, pH 8.5	230 nm	0.22	0.44	>0.5	>0.5
Tris, pH 8.0	220 nm	0.02	0.13	0.24	>0.5
Hepes, pH 7.5	230 nm	0.37	0.50	>0.5	>0.5
Pipes, pH 7.0	230 nm	0.20	0.49	0.29	>0.5
Mops, pH 7.0	230 nm	0.10	0.34	0.28	>0.5
Mes, pH 6.0	230 nm	0.07	0.29	0.29	>0.5

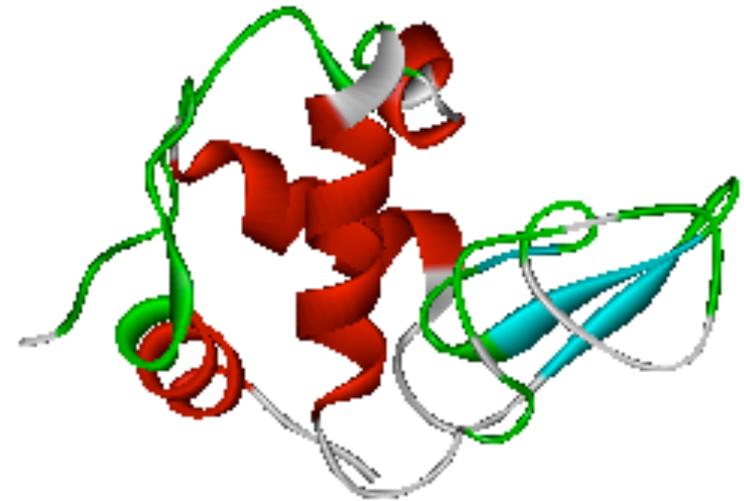
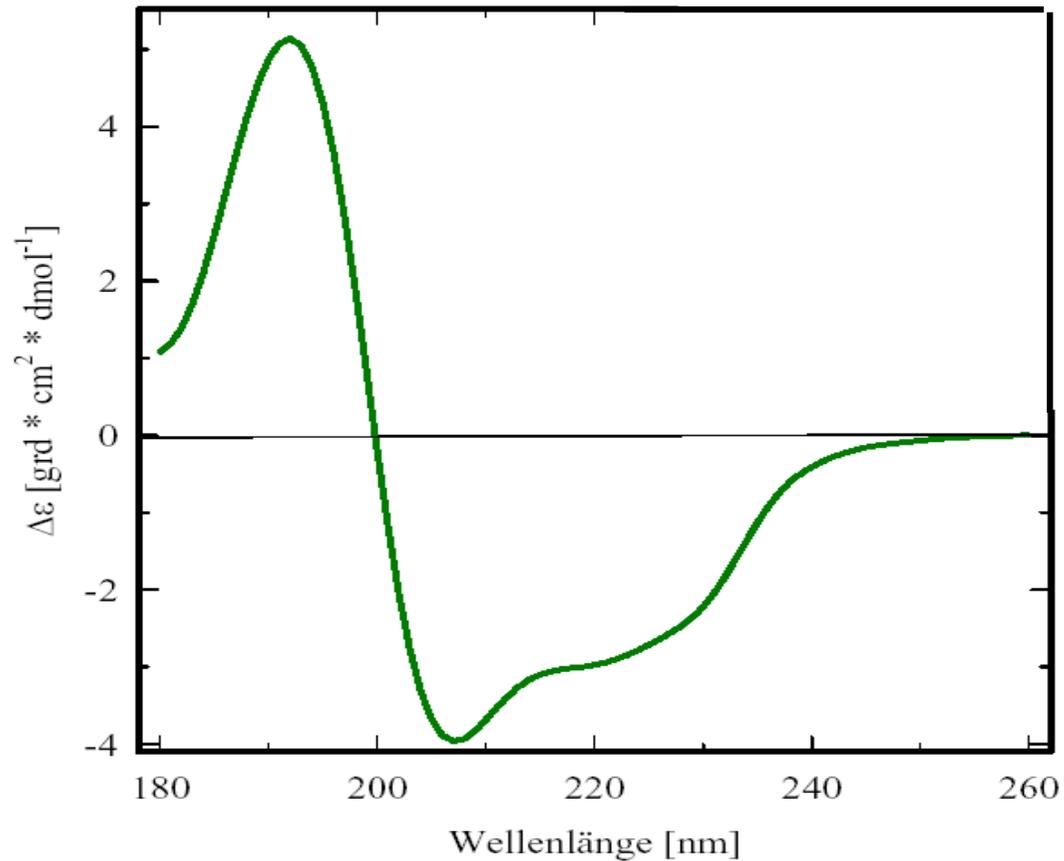
Circulardichroismus (CD) - Absorption

Andere absorbierende Gruppen in der Meßzelle: Küvettenglas



Transmission von leeren Küvetten aus verschiedenen Gläsern

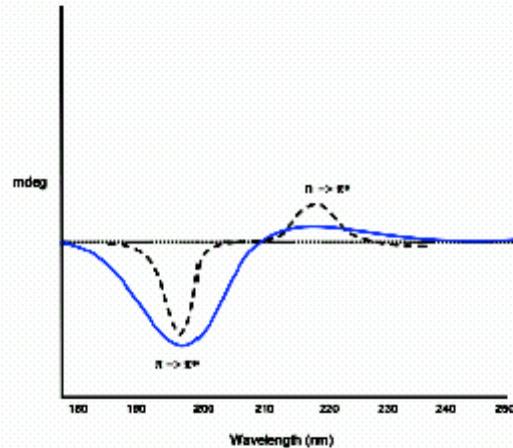
Fern-UV-CD-Spektren: Informationen zur Sekundärstruktur



Fern-UV-CD Spektrum von Lysozym aus Hühnereiweiss

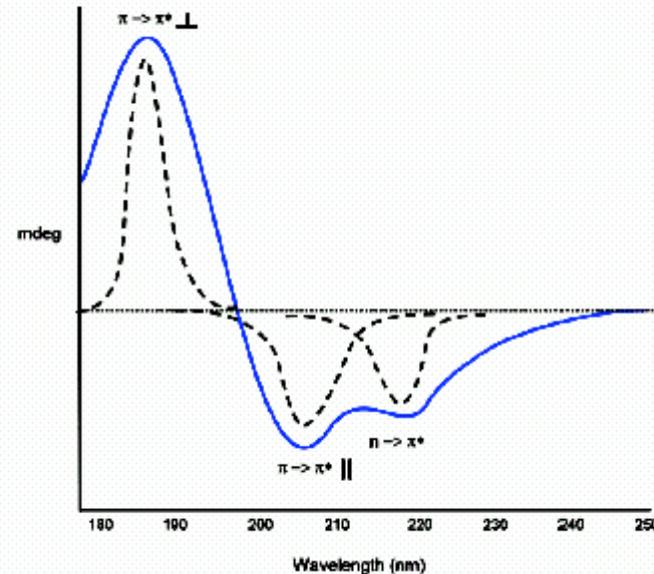
Fern-UV-CD-Spektren: Informationen zur Sekundärstruktur

Random coil



- positiv bei 212 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$)
- negativ bei 195 nm ($n \rightarrow \pi^*$)

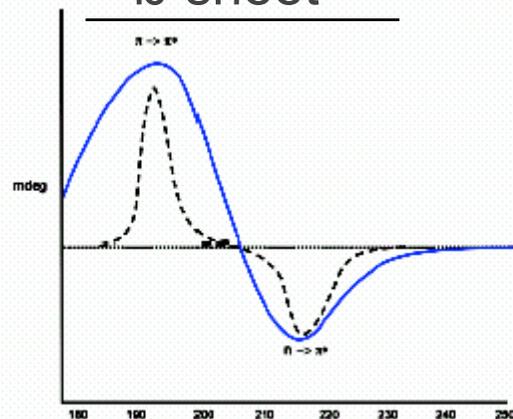
α -Helix



Anregungskopplung der $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge führt zu:

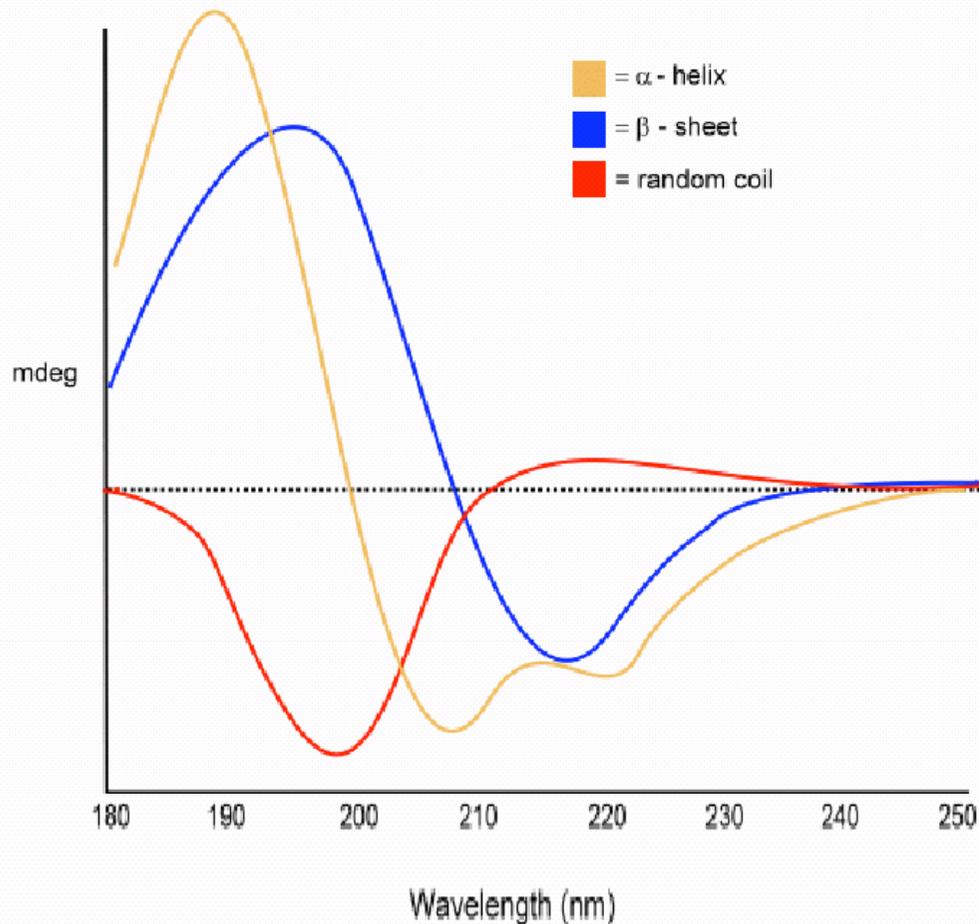
- positiv ($\pi \rightarrow \pi^*$) senkrecht bei 192 nm
- negativ ($\pi \rightarrow \pi^*$) parallel bei 209 nm
- negativ bei 222 nm; ist rot-verschoben ($n \rightarrow \pi^*$).

β -sheet

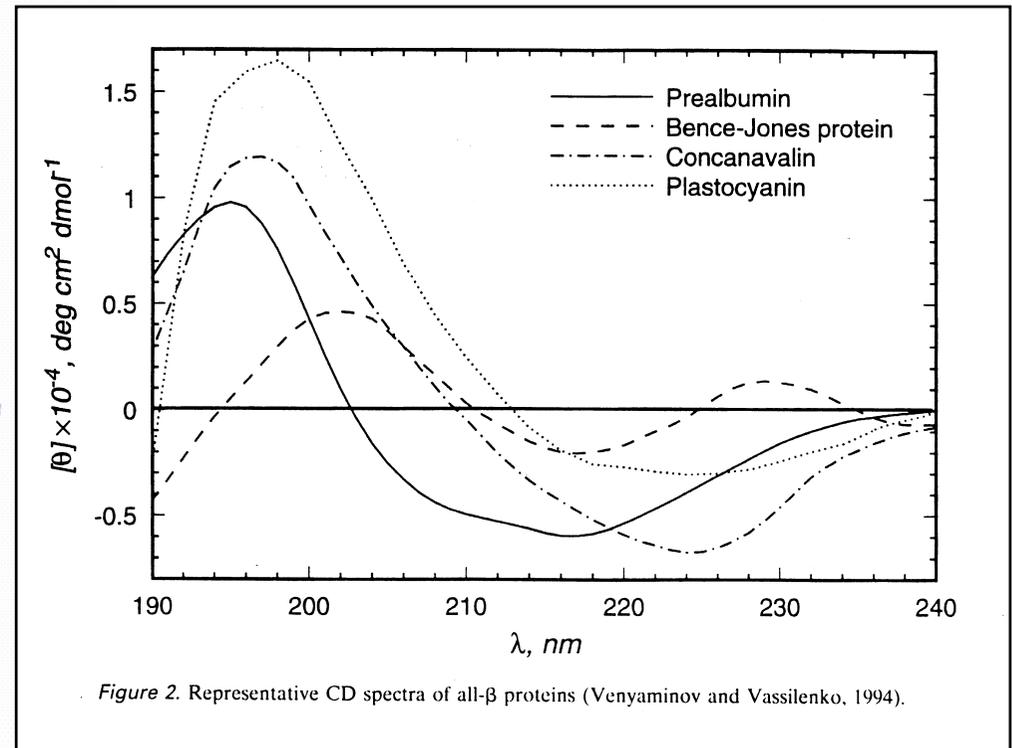


- negativ bei 218 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$)
- positiv bei 196 nm ($n \rightarrow \pi^*$)

Fern-UV-CD-Spektren: Informationen durch Dekonvolution ?

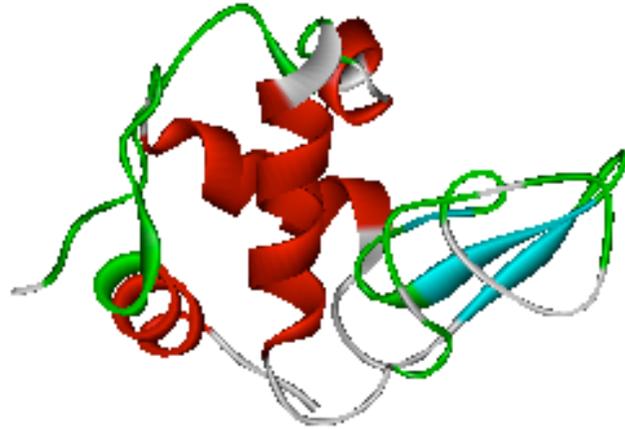


Spektren unterschiedlicher β -sheet Proteine

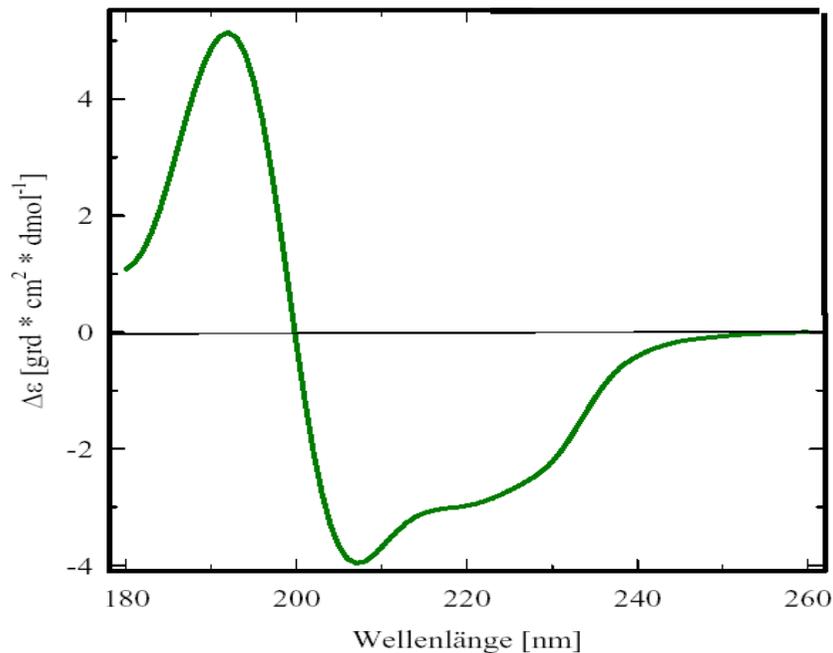


Idealisierte Spektren
unterschiedlicher Sekundärstrukturelemente

Fern-UV-CD-Spektren: Dekonvolution (CDNN)



$$\Theta = 3.300 \cdot (\epsilon_L - \epsilon_R); [\Theta] = \Theta \cdot 100 \cdot M_T / (c \cdot d)$$



Sekundärstrukturgehalt von Lysozym:

- 28 % Helix
- 9 % β-sheet

Programm CDNN

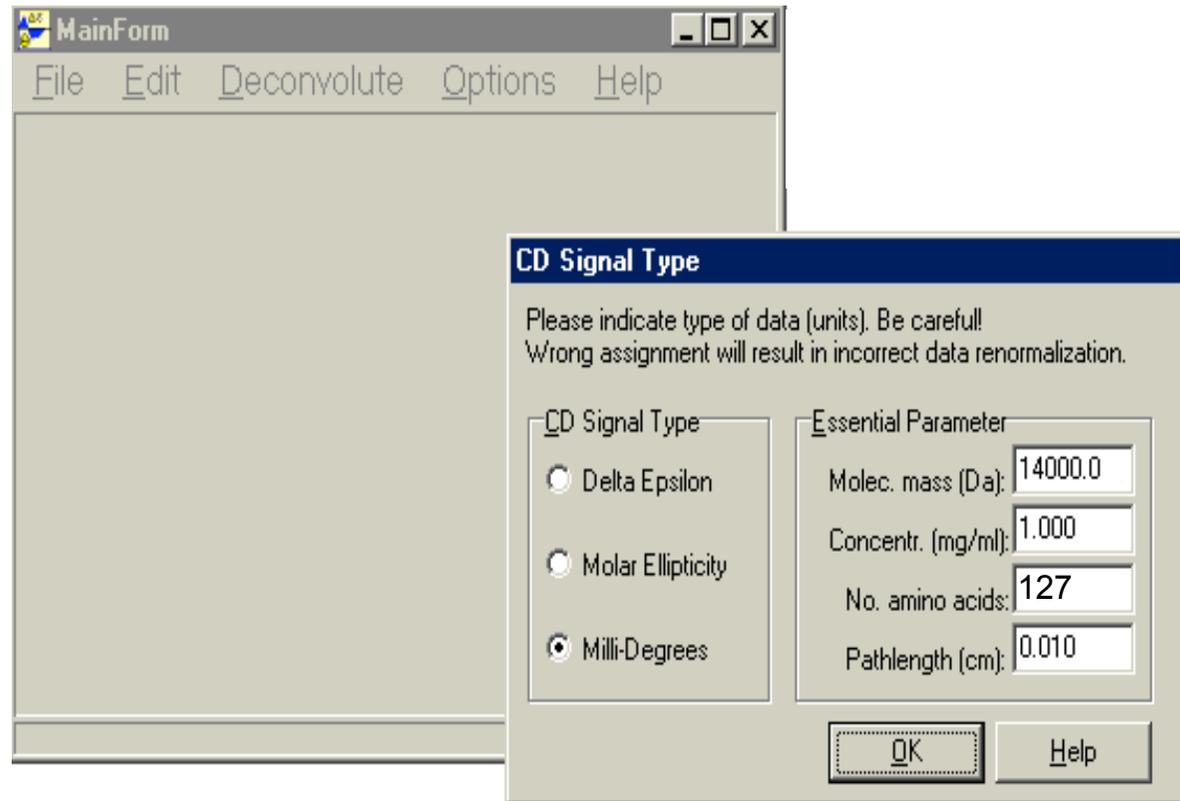


Fern-UV-CD-Spektren: Dekonvolution (CDNN)

Datenform: ASCII Tabelle

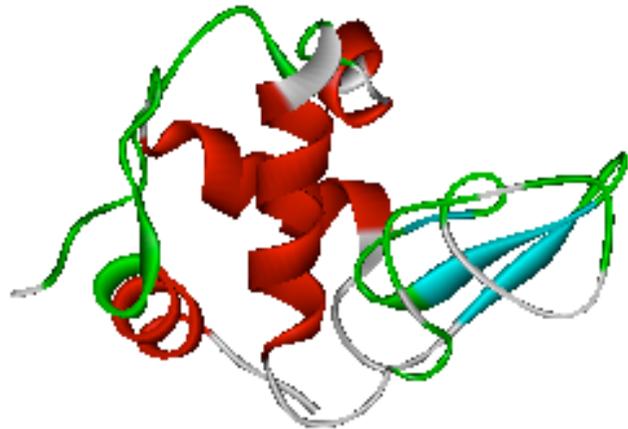
```
180.0    0.4000
181.0    0.7771
182.0    1.2200
183.0    1.7353
184.0    2.3000
.
.
.
258.0    0.0000
259.0    0.0000
260.0    0.0000
```

$$\Theta = 3.300 \cdot (\epsilon_L - \epsilon_R); [\Theta] = \Theta \cdot 100 \cdot M_T / (c \cdot d)$$



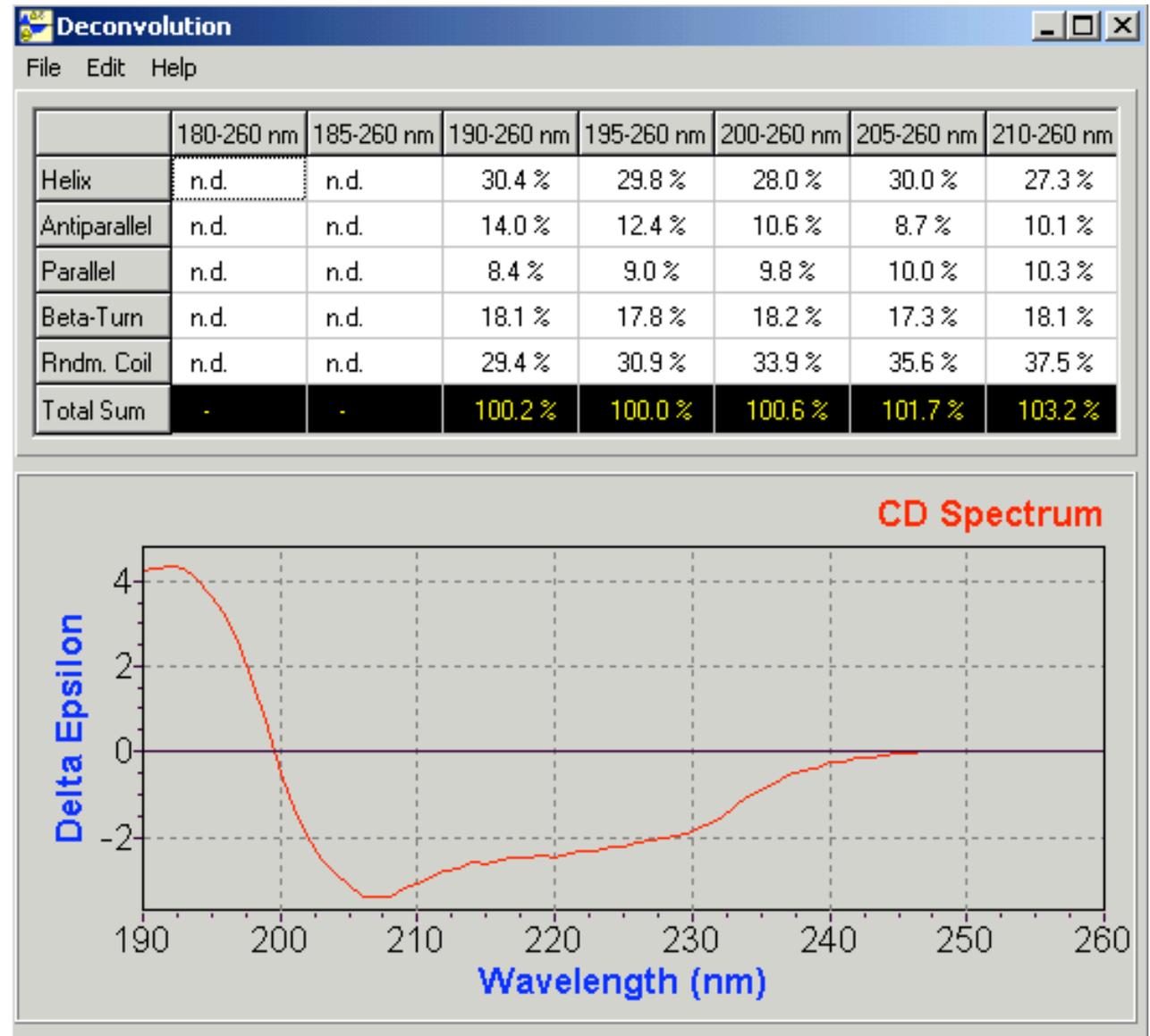
Fern-UV-CD-Spektren: Dekonvolution (CDNN)

- Beispiel Lysozym -



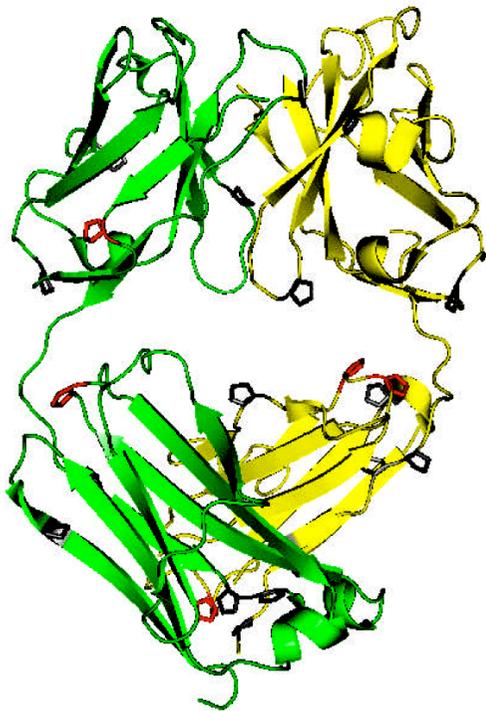
Sekundärstrukturgehalt
von Lysozym (Struktur):

- 28 % Helix
- 12 % β -sheet



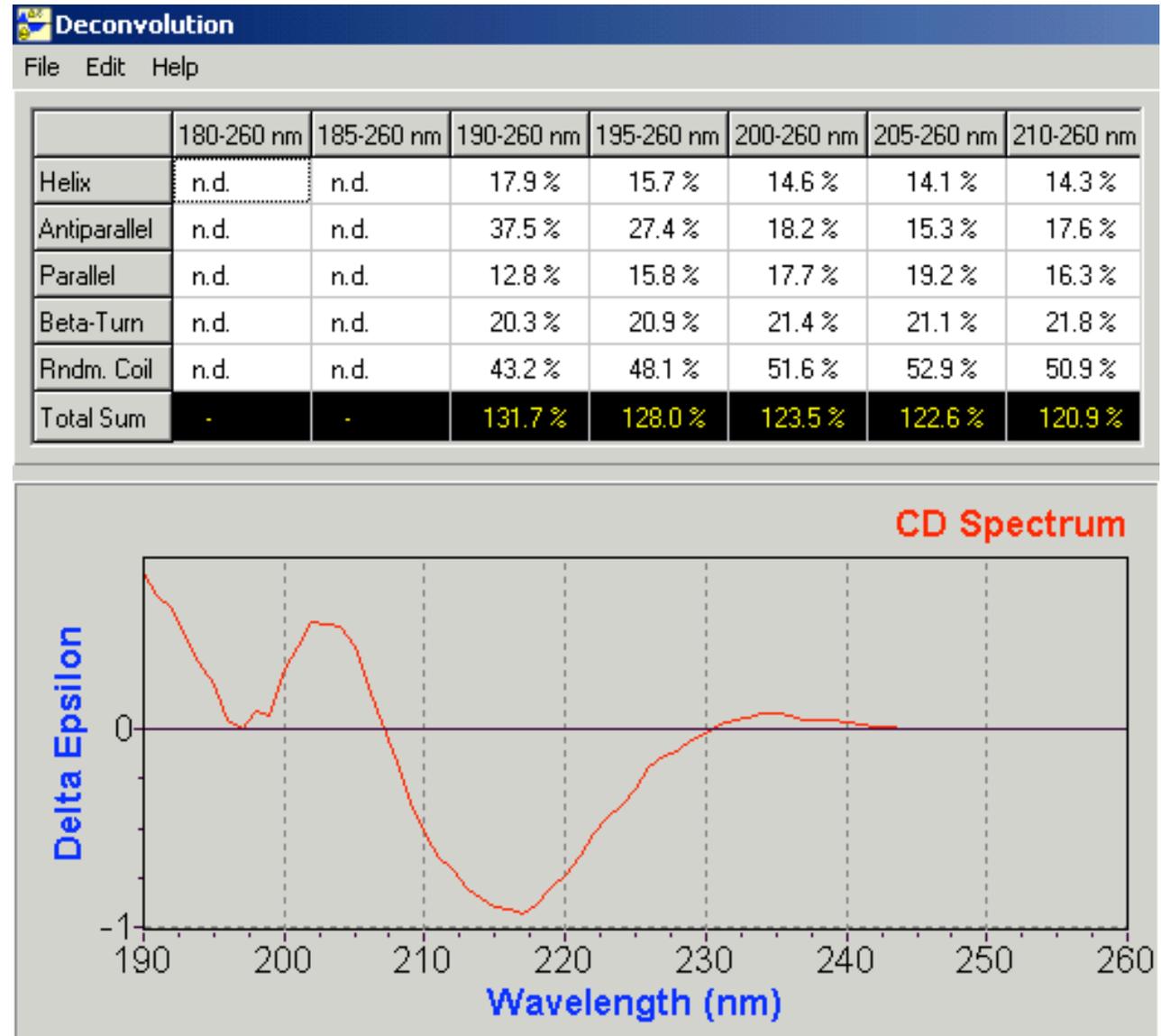
Fern-UV-CD-Spektren: Dekonvolution (CDNN)

- Beispiel Antikörperfragment -

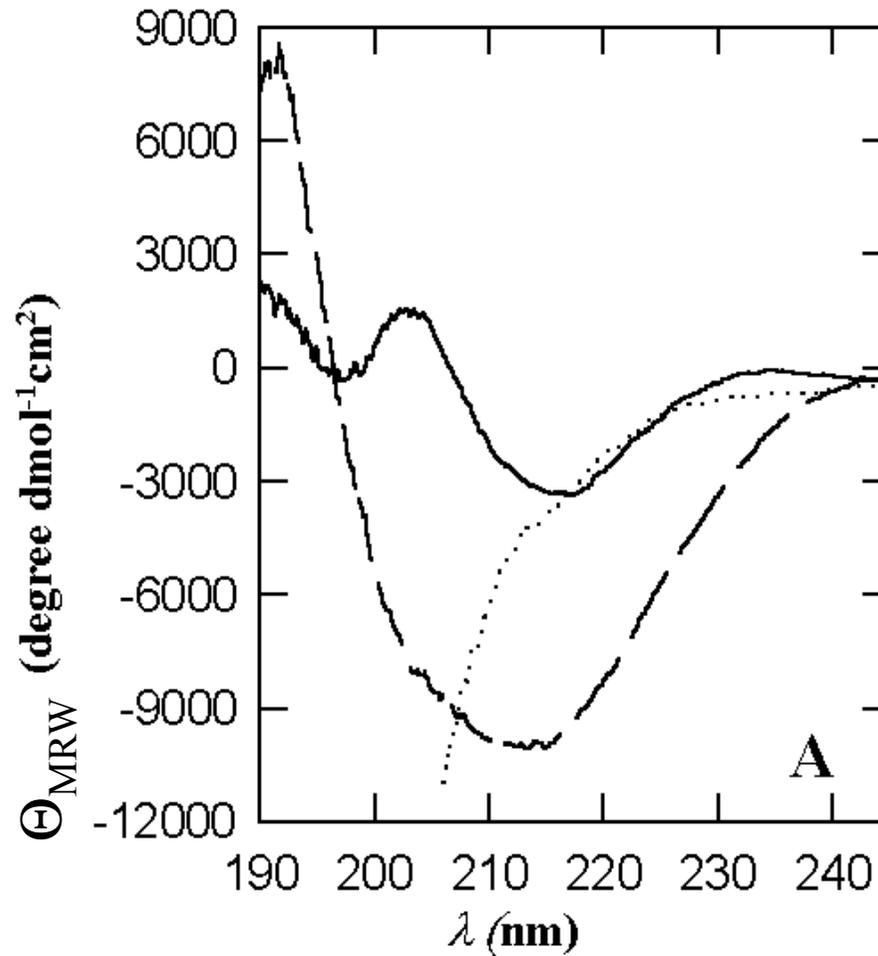
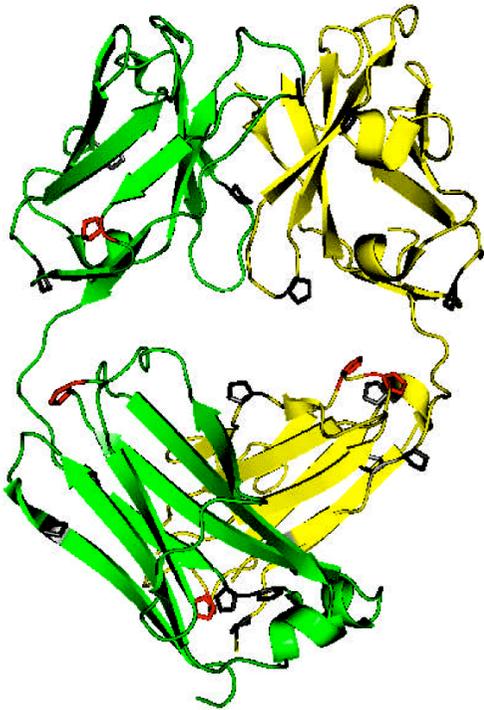


Sekundärstrukturgehalt
von Antikörperfragment
(Struktur):

- 4 % Helix
- 64 % β -sheet



Fern-UV-CD-Spektren: - Darstellung struktureller Änderungen -

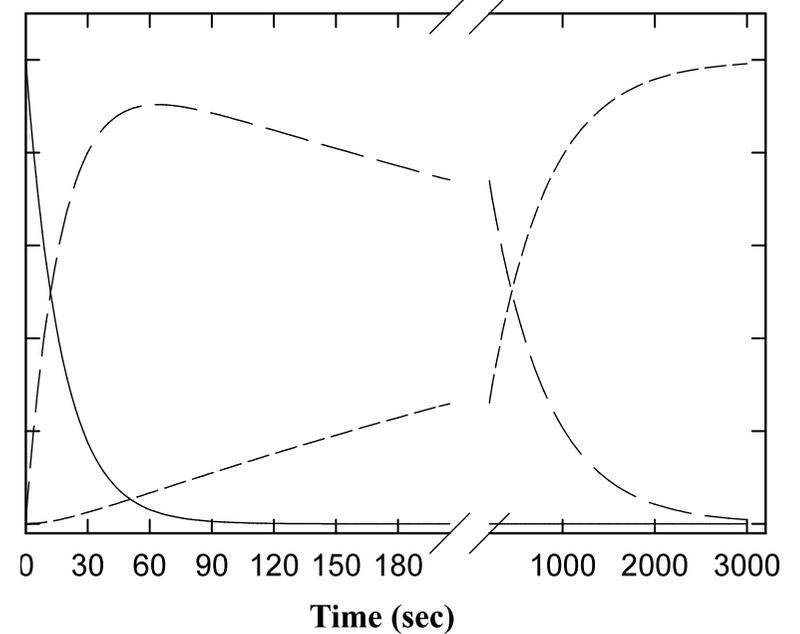
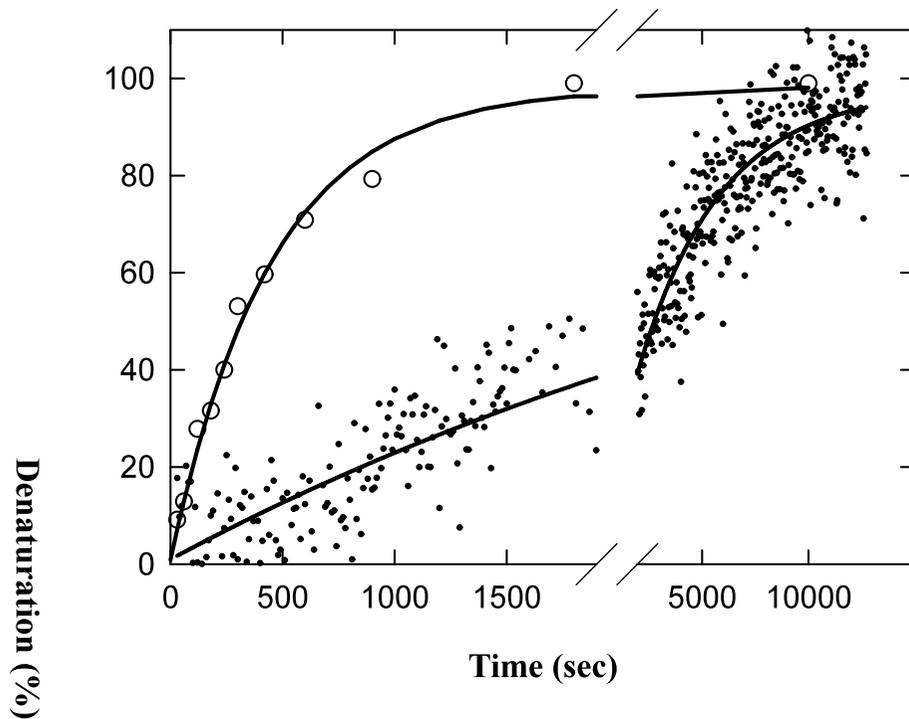


- nativ strukturiert
- - bei pH 2
- ... in 6 M Guanidin

Denaturierung des Antikörperfragmentes - kinetische Betrachtung -



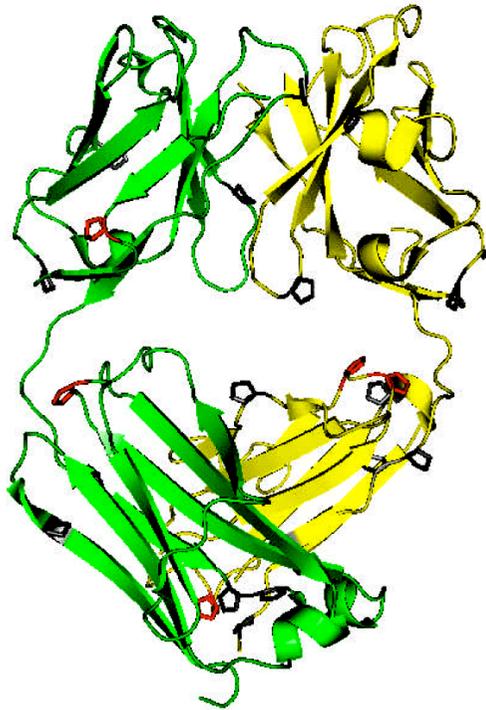
Verteilung von N, Int, U über die Zeit



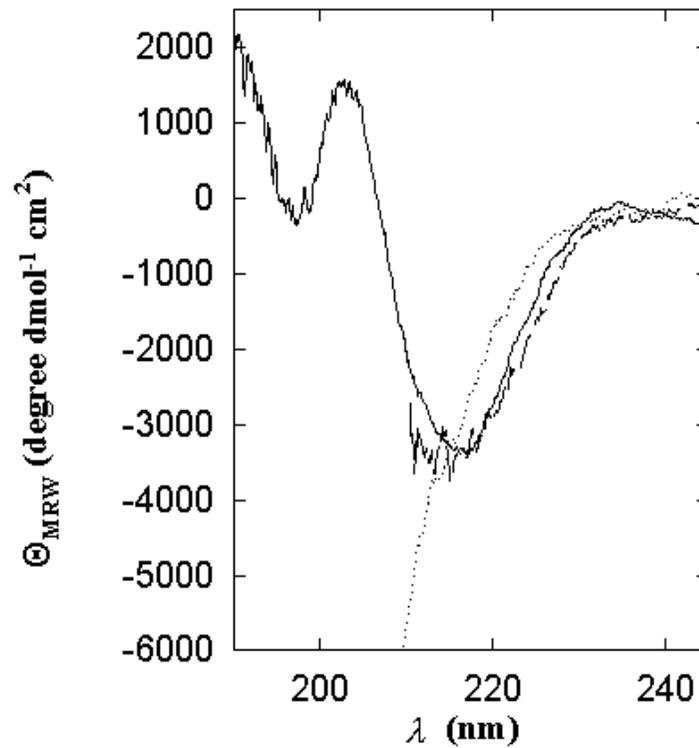
o Aktivität
dots CD 210 mn

Denaturierung des Antikörperfragmentes

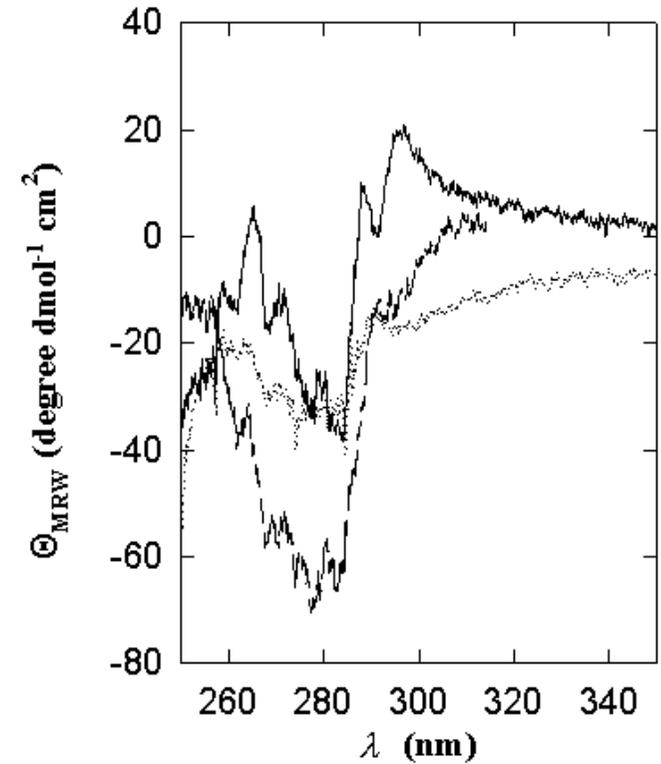
- strukturelle Betrachtung -



Fern-UV-CD



Nah-UV-CD



— nativ strukturiert, - - Intermediat, in 6 M Guanidin

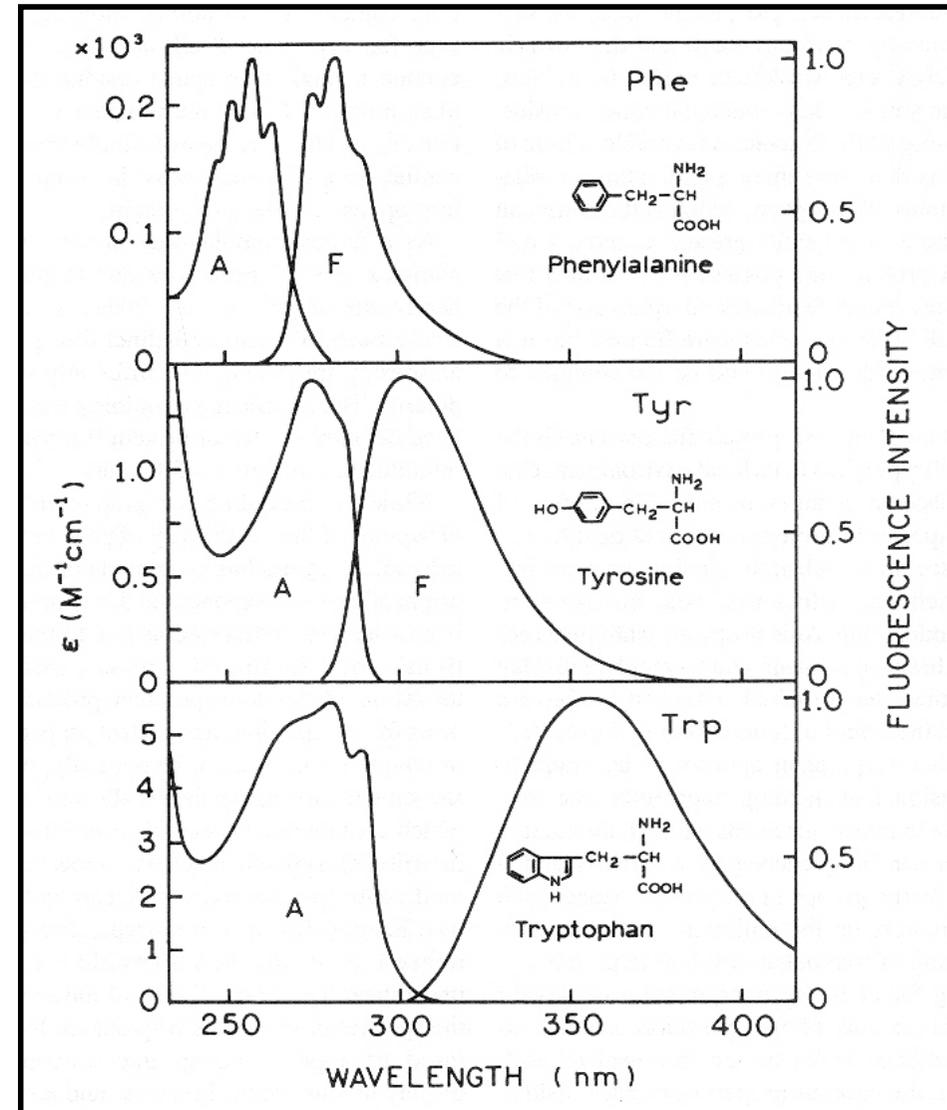
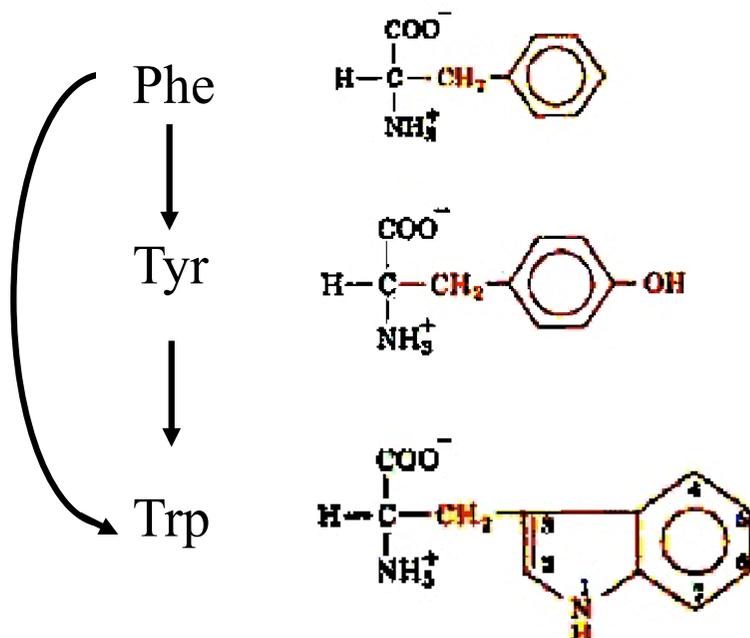
CD-Spektren - Interpretation

- Nah-UV-CD: fixierte Umgebungen (immobilisierte Seitenketten); geringes Signal; nicht prognostizierbar (komplexe Wechselwirkungen); keine Zuordenbarkeit von einzelnen Peaks zu Strukturänderungen
 - aber: „*Fingerabdruck*“ für ein natives, korrekt gefaltetes Protein
- Fern-UV-CD: dominiert vom Signal der α -Helix in Proteinen (bei ca. 220 nm); CD-Signal von β -Faltblatt und β -Turn ist eher gering; zusätzlich geringe Beiträge von aromatischen Gruppen und Disulfidbrücken; komplexes Wechselspiel, schwer prognostizierbar und auflösbar
 - quantitative Dateninterpretation sehr schwer, *qualitative* Dateninterpretation dagegen vergleichsweise einfach (→ Programm CDNN von Gerald Böhm)

Fluoreszenz von Proteinen

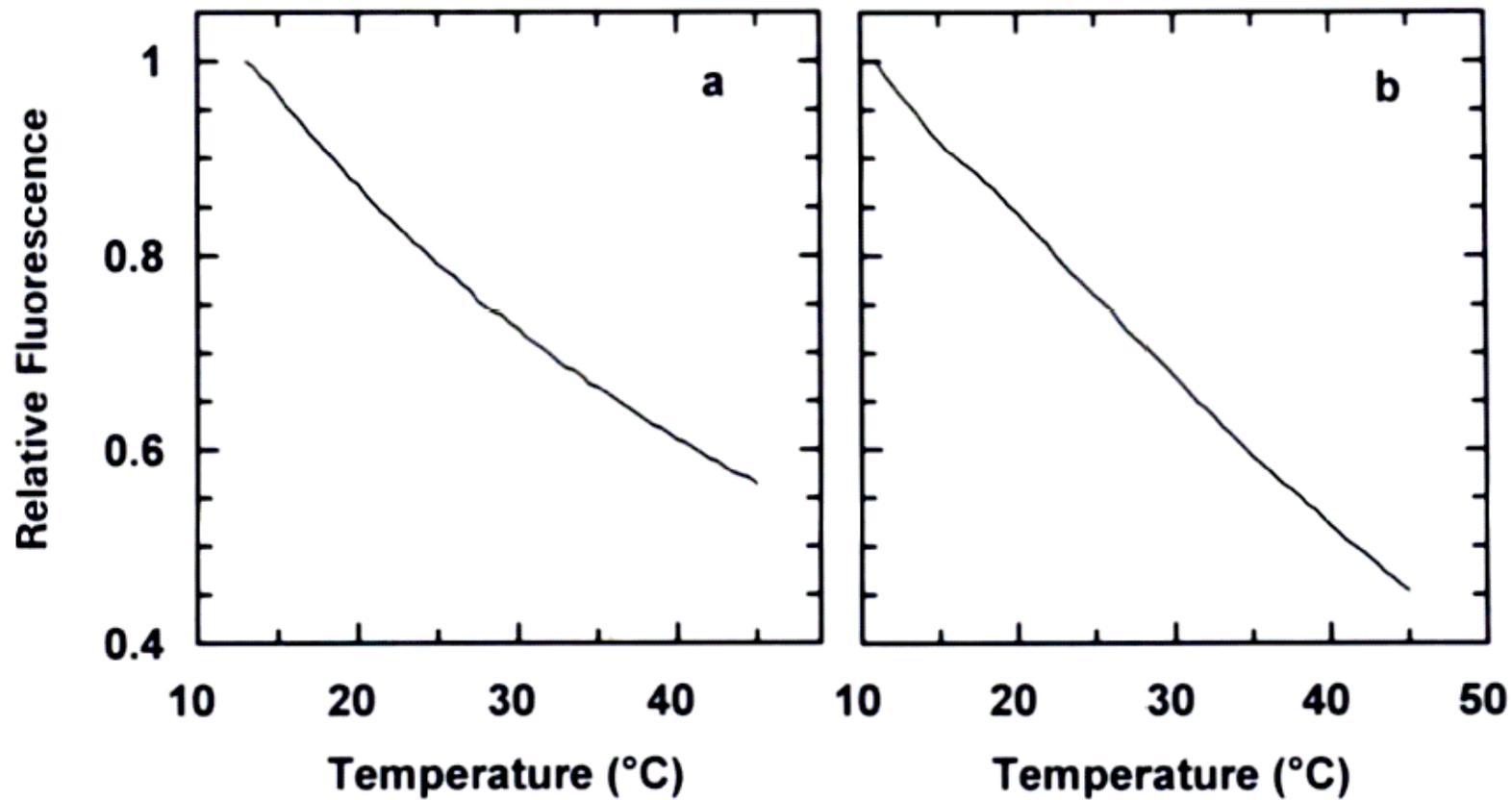
- Betrachtung aromatischer Aminosäuren -

- intrinsische Fluorophore (Phe, Tyr, Trp)
- in tryptophanhaltigen Proteinen überwiegt Fluoreszenz von Trp gegenüber der von Phe und Tyr
- FRET erfolgt:



Fluoreszenz von Proteinen

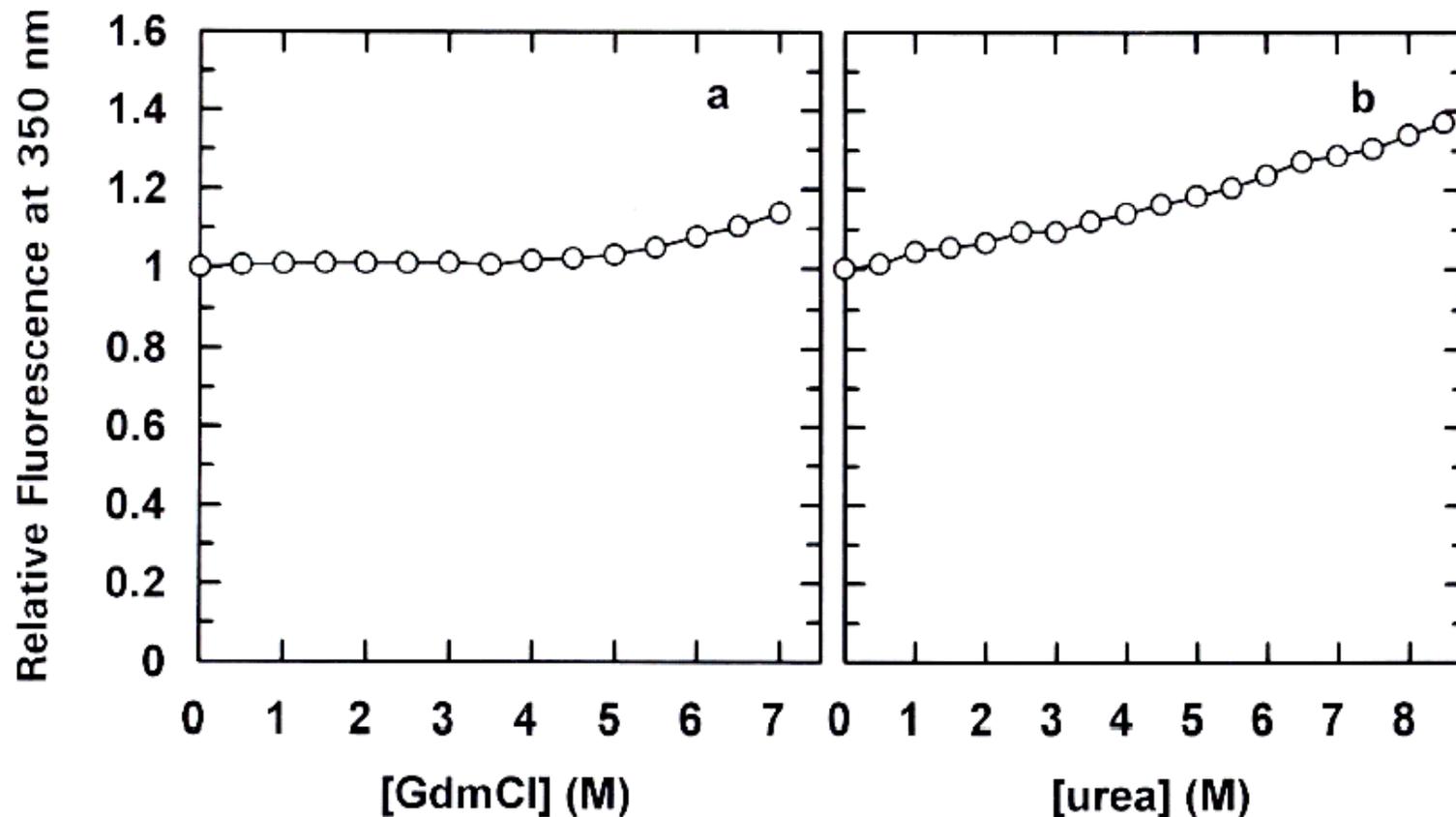
- Bedeutung äußerer Parameter: Temperatur -



Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzspektren von (a) Tyrosin (6 μM , Anregung bei 274 nm, Emission bei 303 nm) und (b) Tryptophan (1 μM , Anregung bei 278 nm, Emission bei 355 nm).

Fluoreszenz von Proteinen

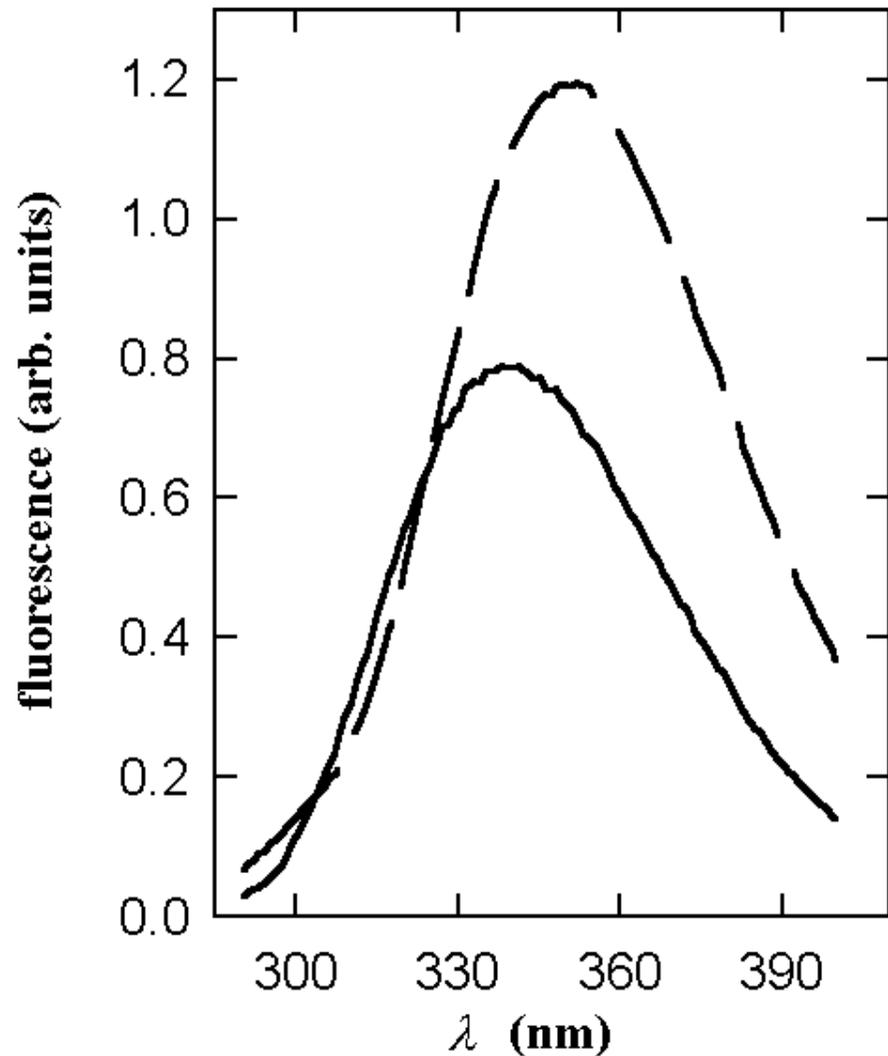
- Bedeutung äußerer Parameter: Lösungsmittel -



Abhängigkeit der Fluoreszenzspektren von Tryptophan (2 μ M, Anregung bei 278 nm, Emission bei 355 nm) von (a) der GdmCl-Konzentration und (b) der Harnstoffkonzentration.

Fluoreszenz von Proteinen

- hydrophobe/hydrophile Umgebung -



— natives Antikörperfragment
(Aromaten in hydrophober Umgebung)

- - - denaturiertes Protein
(Aromaten lösungsmittlexponiert;
hydrophile Umgebung)

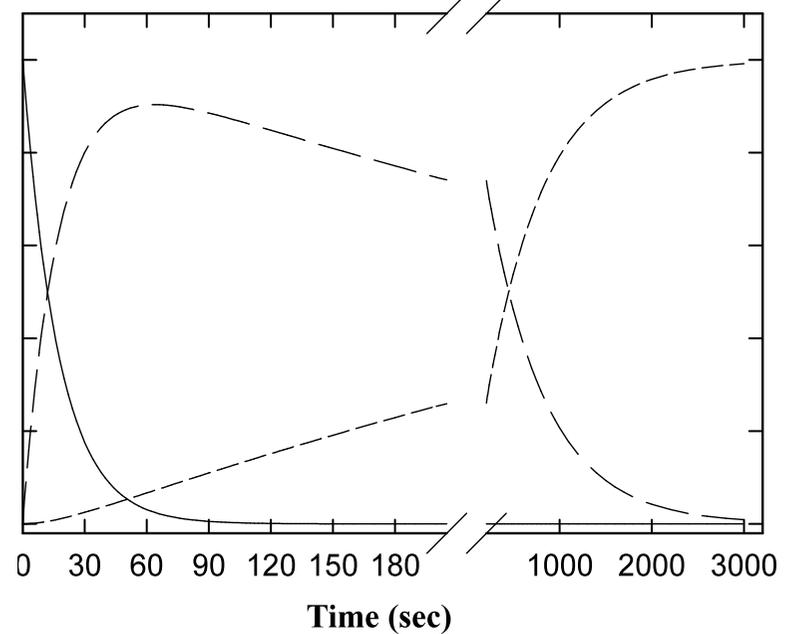
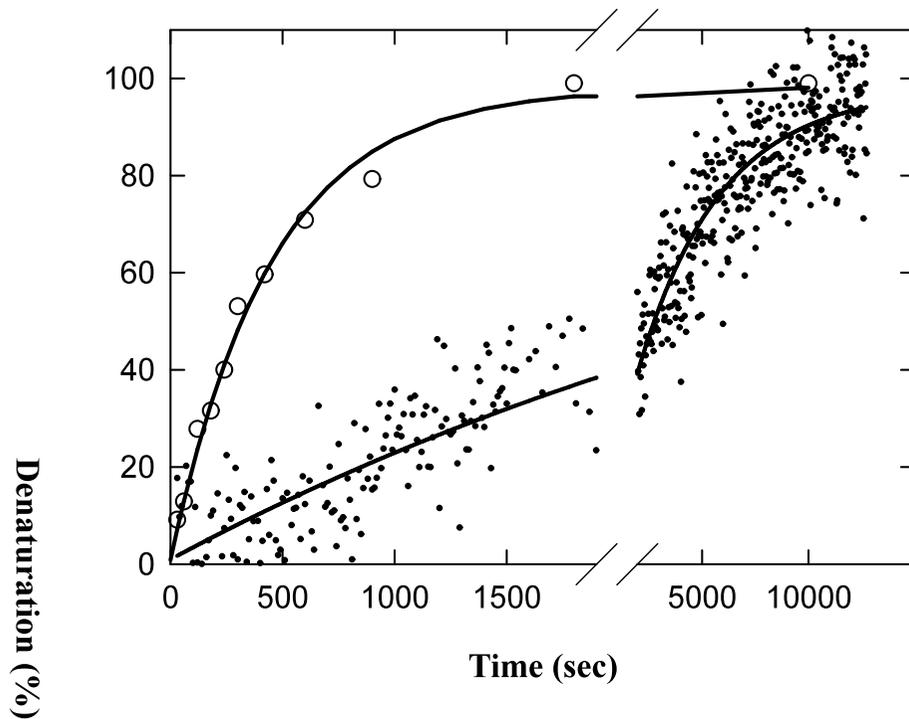
Anregung: 280 nm --> Tyr, Trp

- ergibt typisches Trp Spektrum
(Energietransfer Tyr -> Trp)

Denaturierung des Antikörperfragmentes - kinetische Betrachtung -

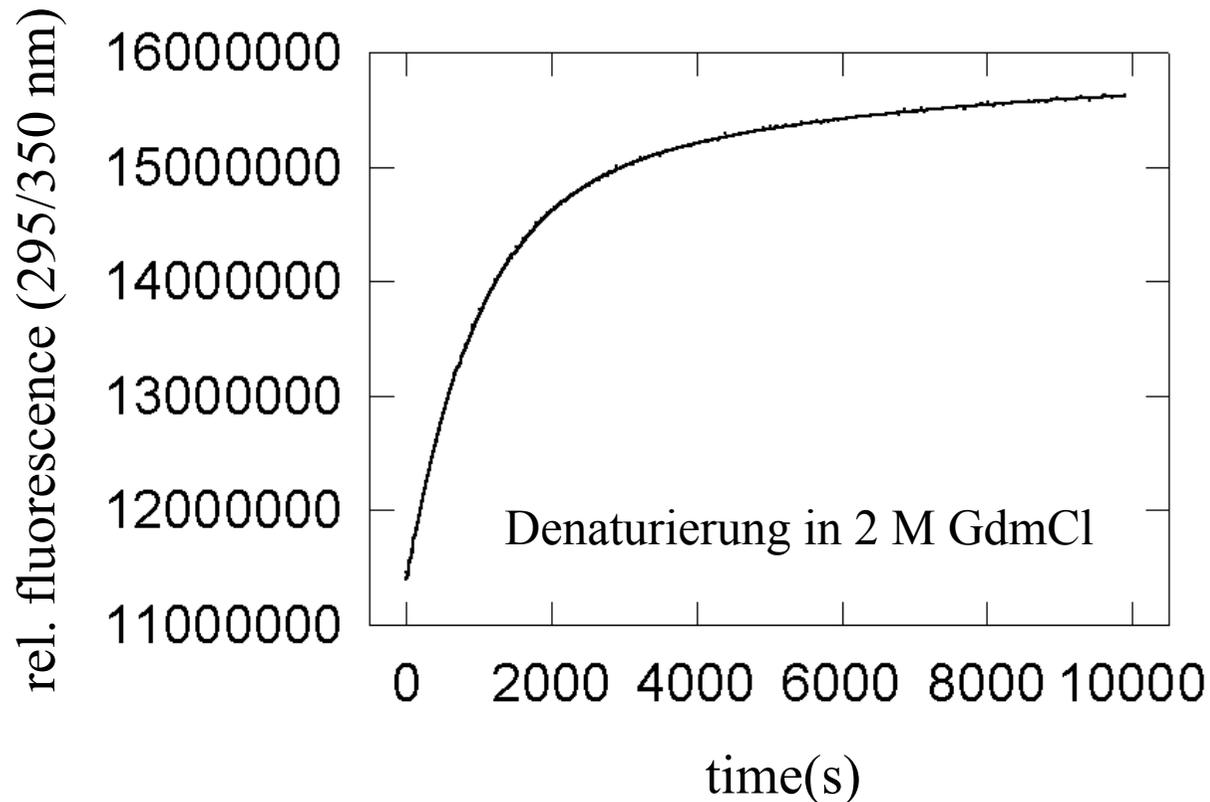


Verteilung von N, Int, U über die Zeit



o Aktivität
dots CD 210 mn

Denaturierung des Antikörperfragmentes - kinetische Betrachtung mittels Fluoreszenz -



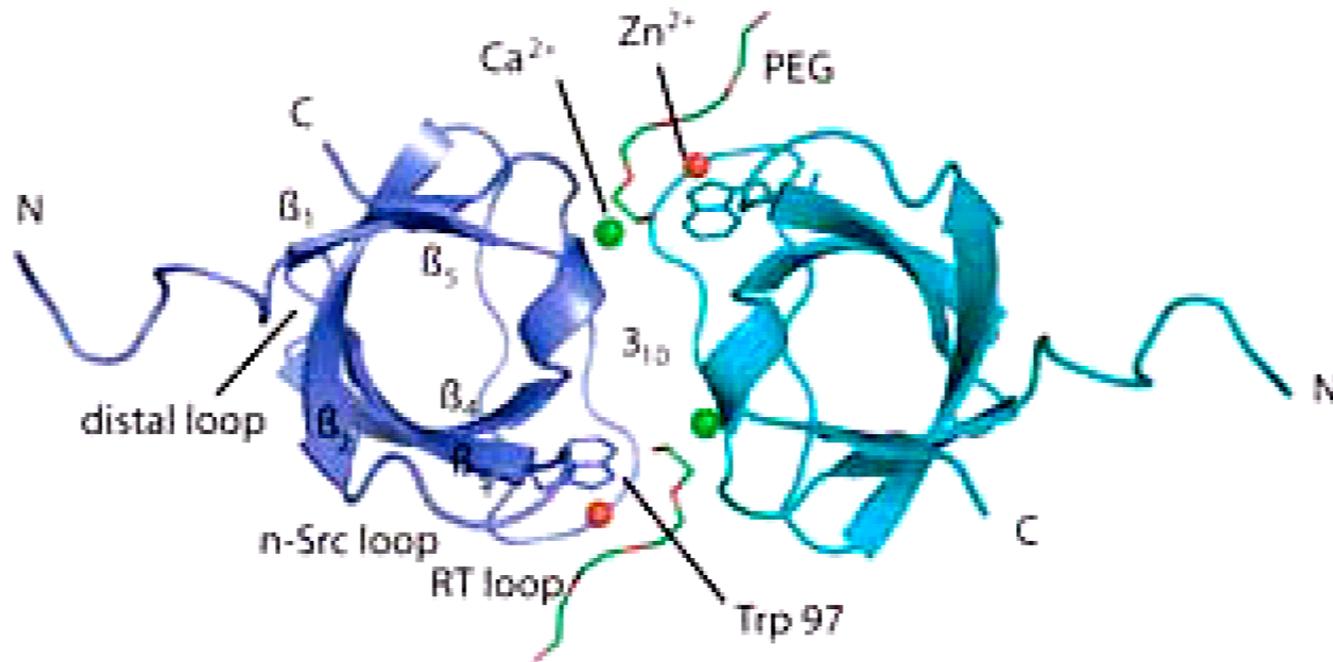
- Verlust der Aktivität
- Domänen alle intakt
- Änderung der Fluoreszenz



- Verlust der Sekundärstruktur
- Änderung der Fluoreszenz

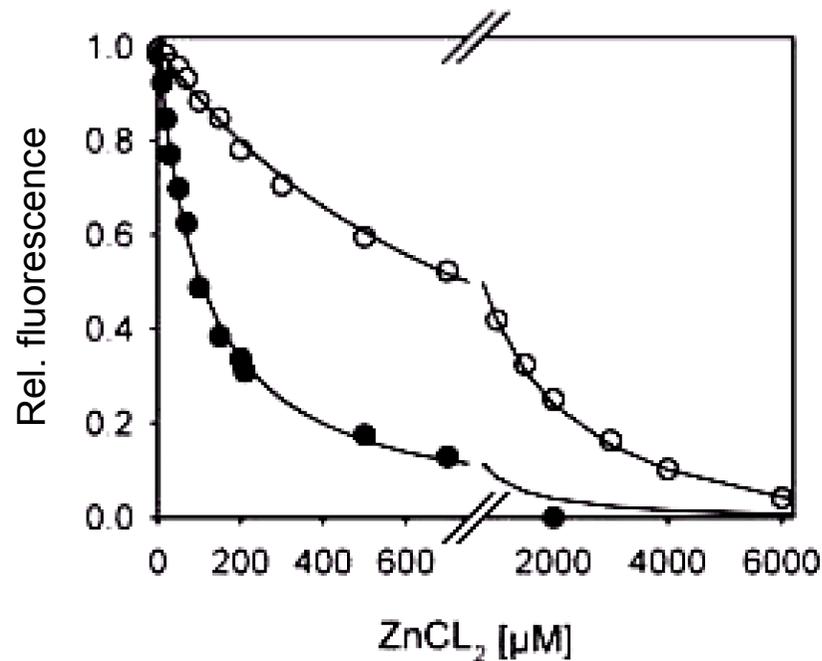
Fluoreszenz zur Messung von Dissoziation / Assoziation

Die S_H3 Domäne von Lck (Src Homolog)
bildet Zn-abhängig ein Homodimer



Fluoreszenz zur Messung von Dissoziation / Assoziation

Die S_H3 Domäne von Lck (Src Homolog)
bildet Zn-abhängig ein Homodimer

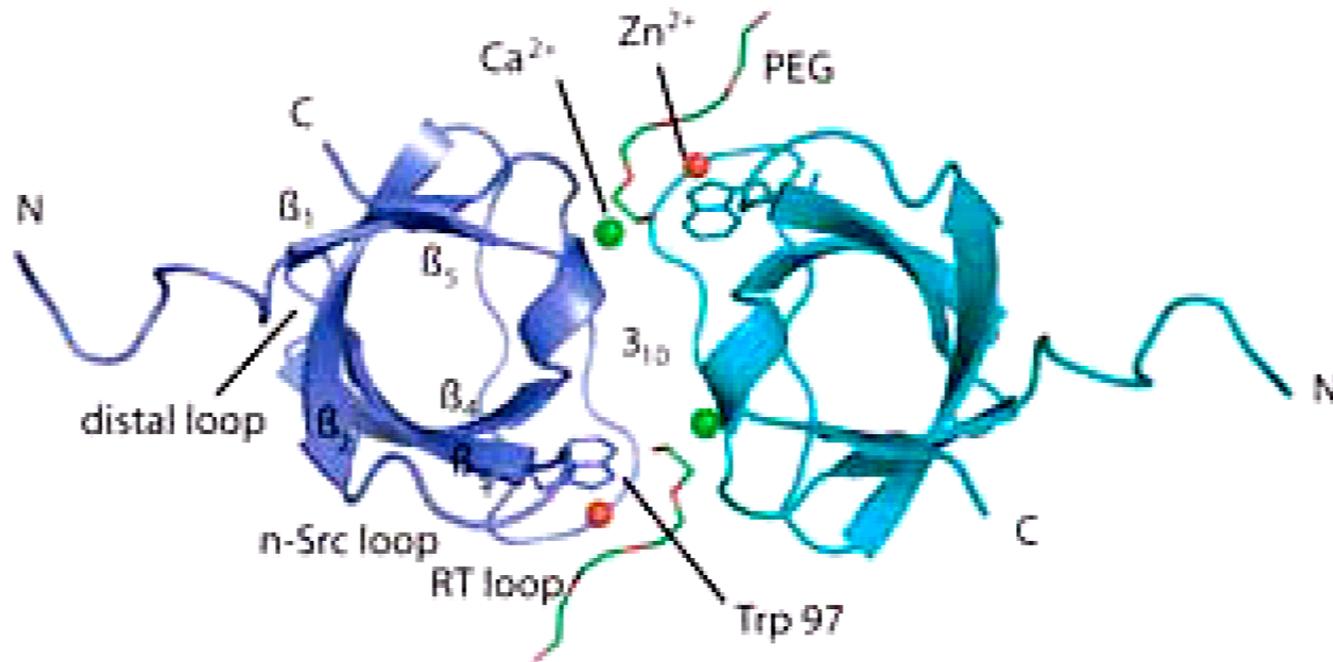


- ohne Bindepeptid
- mit Bindepeptid

ohne Zink -> Monomer
+ 2 mM Zink -> Dimer
(Nachweis durch analytische UZ)

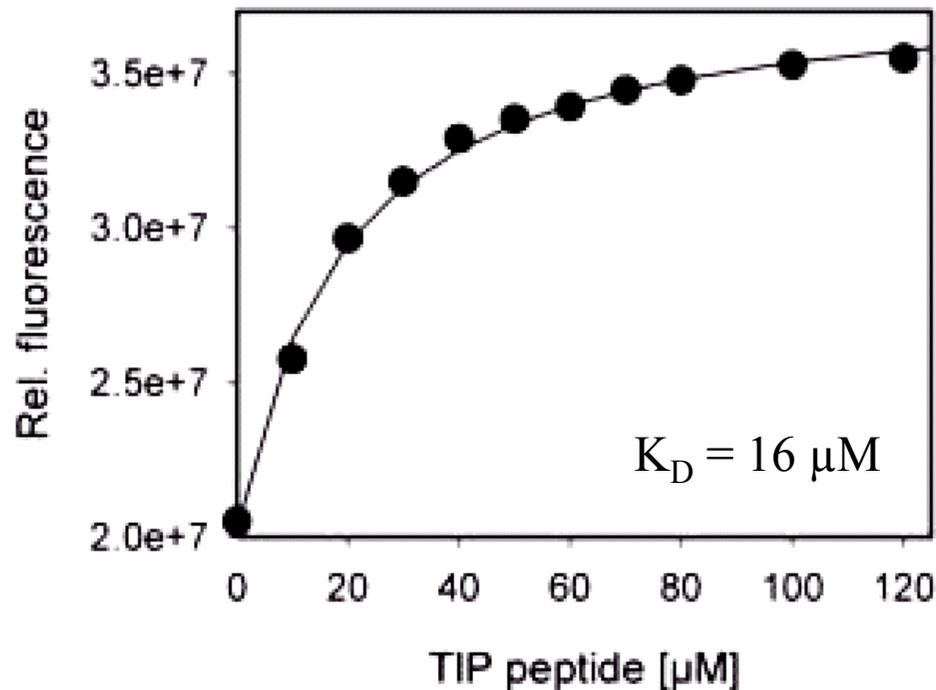
Fluoreszenz zur Messung von Dissoziation / Assoziation

Die S_H3 Domäne von Lck (Src Homolog)
bindet prolinreiche Peptide



Fluoreszenz zur Messung von Dissoziation / Assoziation

Die S_H3 Domäne von Lck (Src Homolog)
bindet prolinreiche Peptide



$$y = S0 + dS * RL/R0$$

$$RL = c/2 - \sqrt{(c/2)^2 - R0 * L0}$$

$$c = R0 + L0 + K_D$$

RL: Konzentration Komplex

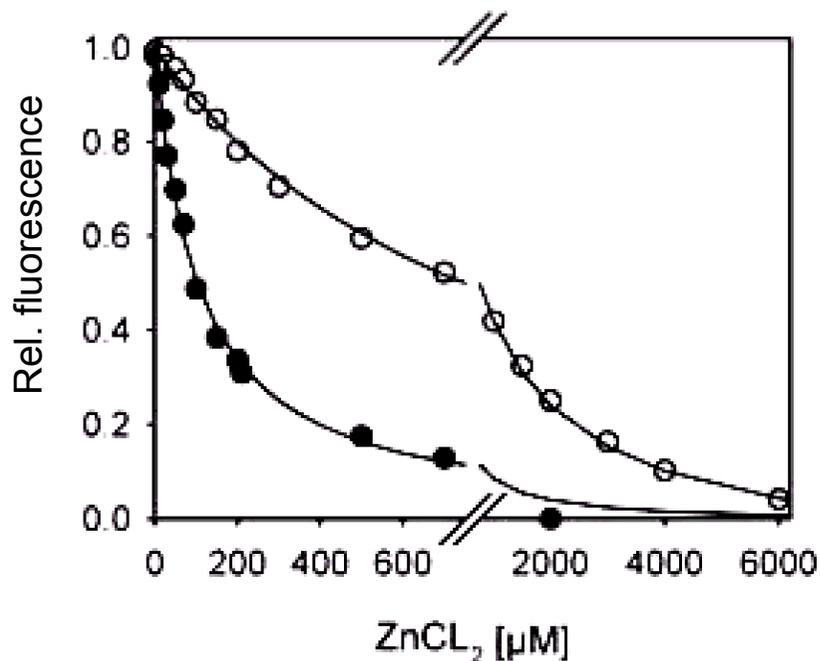
R0: Ausgangskonzentration Rezeptor

L0: Ausgangskonzentration Ligand

Fluoreszenz zur Messung von Dissoziation / Assoziation

Die S_H3 Domäne von Lck (Src Homolog)

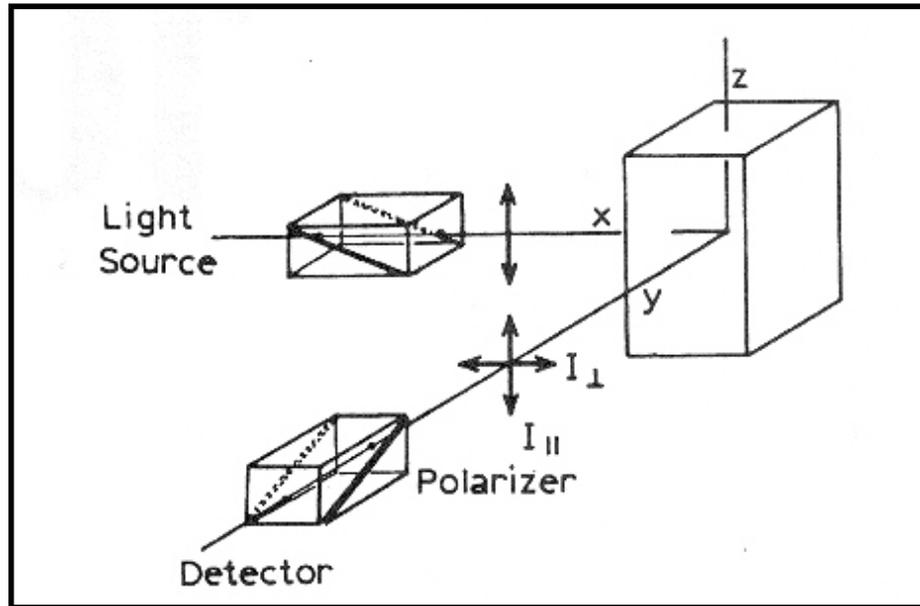
Kompetition zwischen Dimerisierung und Peptidbindung



- ohne Bindepeptid
- mit Bindepeptid

Dissoziation / Assoziation

- Messung mittels Anisotropie -



Anregung mit polarisiertem Licht
 -> Emission von polarisiertem Licht

Anregung nur von Fluorophoren,
 deren Übergangsmoment parallel
 zur Schwingungsebene des
 polarisierten Lichts liegt

Emission in der gleichen Ebene
 wie Anregung

nur durch Bewegung der Moleküle
 verändert sich die Schwingungsebene
 des emittierten Lichts

$$\text{Anisotropie} = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2 \cdot I_{\perp}}$$

Bewegung der Moleküle abhängig
 von deren Größe
 => Messung von Assoziation

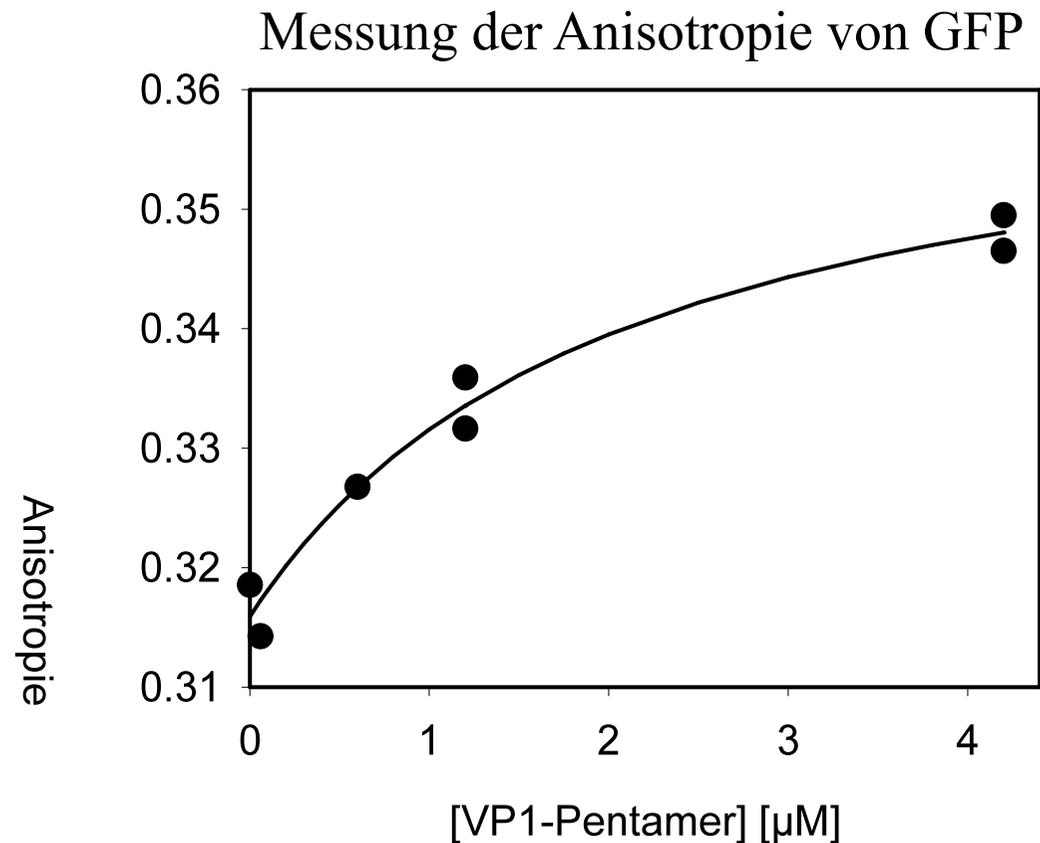
Anisotropie

- Bindung von VP2-GFP an VP1 -

200 kDa VP1
34 kDa VP2-GFP-Fusion

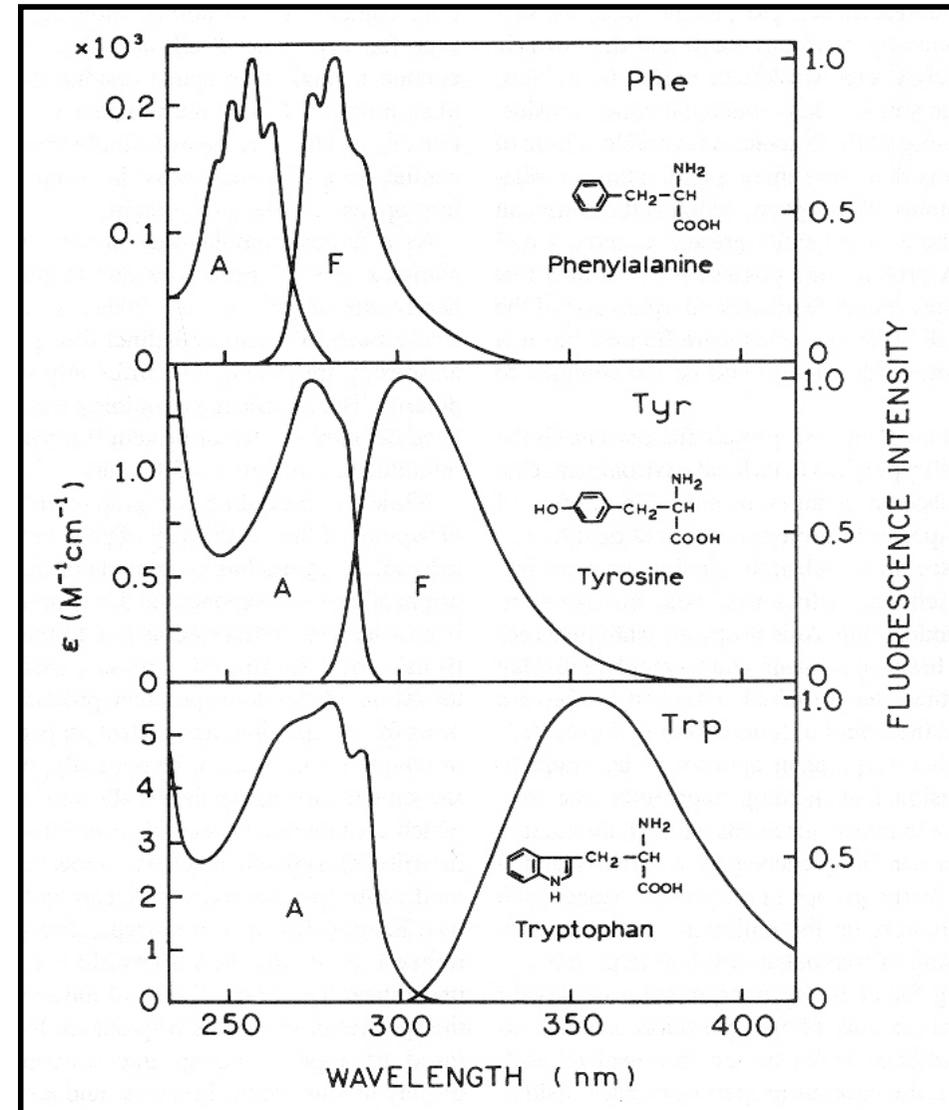
experimentelle Voraussetzung:
- deutlicher Größenunterschied
der Bindungspartner

- ideales Experiment:
fluoreszierendes Protein vorlegen,
nicht-fluoreszierenden, größeren
Bindungspartner titrieren



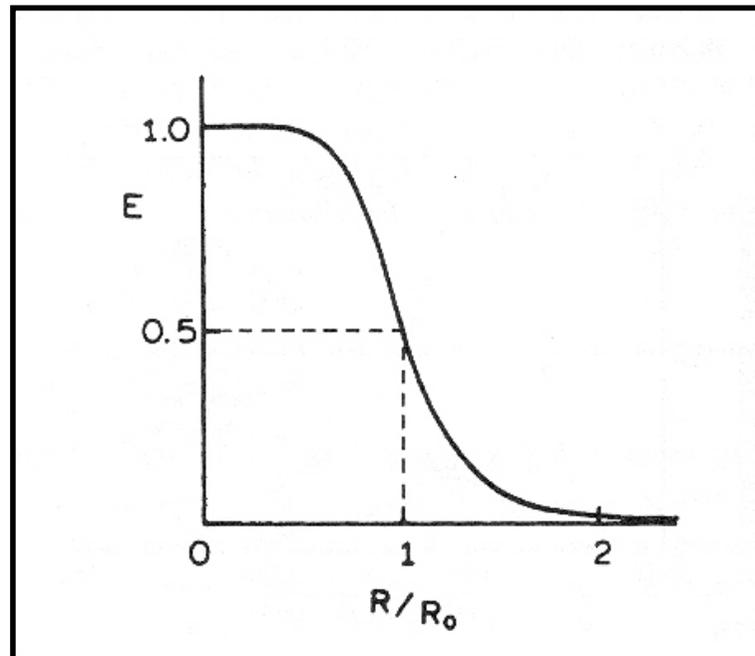
Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)

- Transfer der Energie eines Donors (D) im angeregten Zustand auf einen Akzeptor (A)
- Energietransfer erfolgt strahlungslos durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung
- spektrale Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors
- relative Orientierung von Donor und Akzeptor
- Distanz zwischen Donor und Akzeptor (20-90 Å für biologische Makromoleküle)



Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) - Förster-Radius -

Abhängigkeit der Transfereffizienz vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor
(geeignete Auswahl der Fluorophore nach R_0)



Abstand, bei dem halbmaximaler Energietransfer erfolgt, ist als Förster-Radius definiert

Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) - Abstandsmessungen im Molekül -

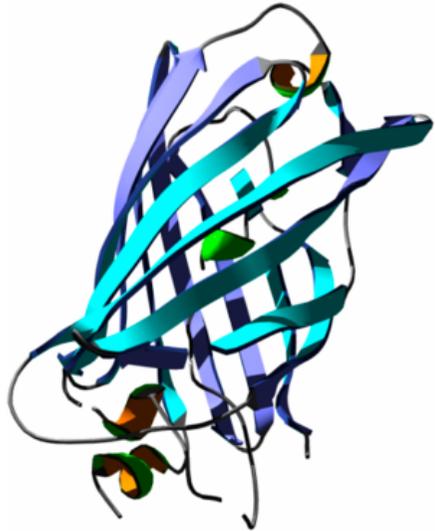
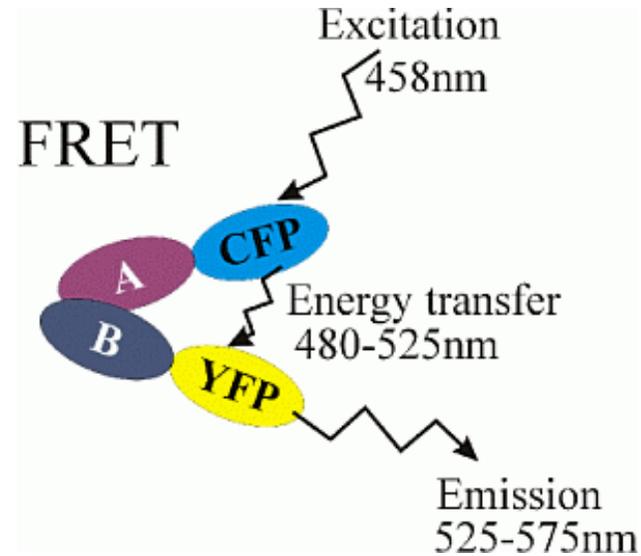


Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)

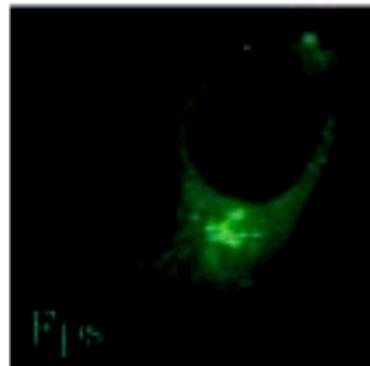
- Zellkultur -

FRET Pärchen:

- BFP + GFP
- GFP + RFP
- CFP + YFP
- 2 Fragmente von GFP



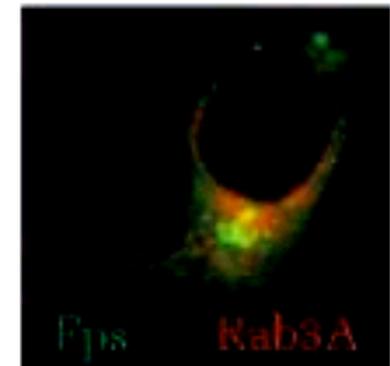
458 -> 500 nm



510 -> 535 nm



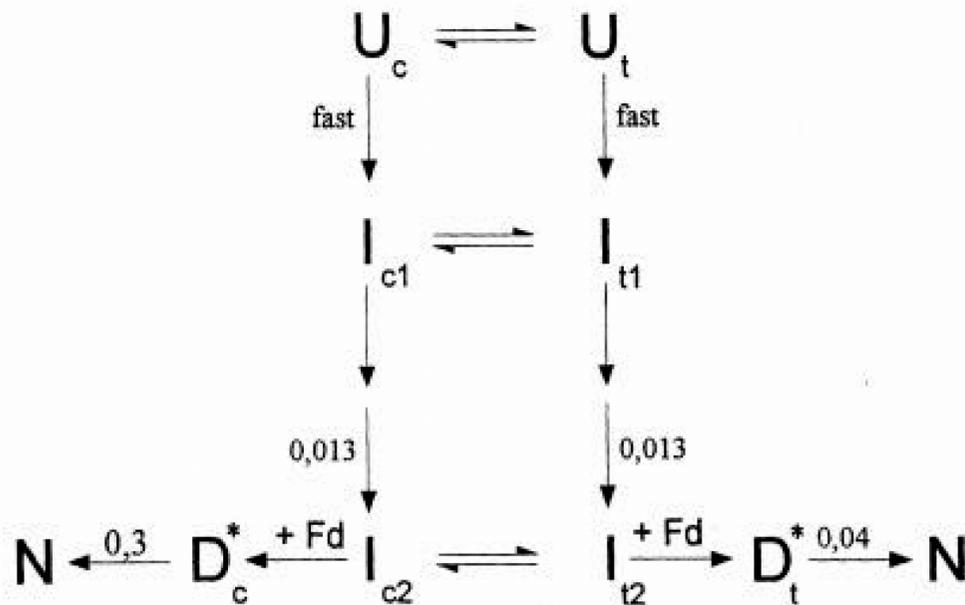
458 -> 535 nm
+ 458 -> 500 nm



Fluoreszenz - Zusammenfassung

- aromatische Aminosäuren als intrinsische Fluophore in Proteinen
- sehr sensitive Methode (meist 1-10 $\mu\text{g/ml}$ Protein)
- Fluoreszenz der Aromaten abhängig von ihrer Umgebung
(-> Faltung, Stabilität, Assoziation, Ligandenbindung)
- Methode vielfältig einsetzbar
(intrinsische Fluoreszenz, Fluoreszenzlabel
Fluoreszenz, FRET, Anisotropie)
- Fluoreszenzspektroskopie, Einzelmolekülspektroskopie (FCS),
(konfokale) Fluoreszenzmikroskopie

Mechanismus der Antikörperfaltung / -entfaltung



Analyse:

- Wildtyp-Protein und zwei Mutanten
- Kinetik, Stabilität und Struktur
Denaturierung
Renaturierung
(Variation von Temp., GdmCl)

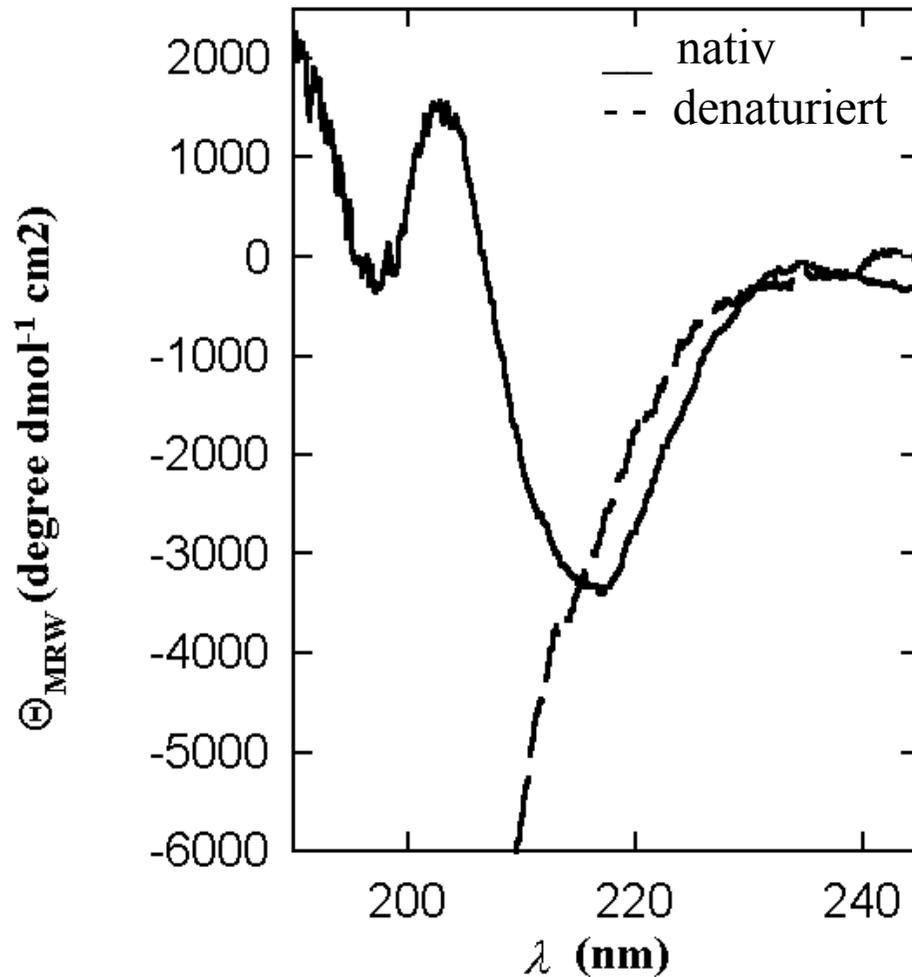
- Methoden:

- Aktivität
- Fluoreszenz
- Fluoreszenzlöschung
- Fern- und Nah-UV-CD

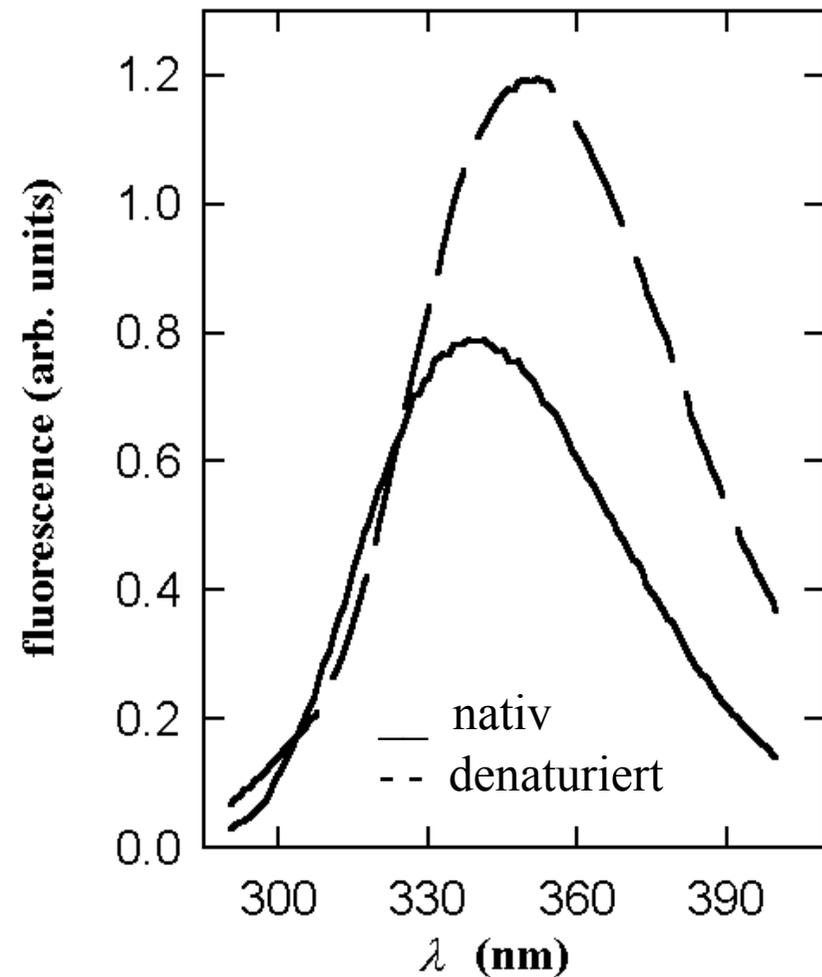
Thermodynamische Stabilität von Proteinen

- spektroskopische Analyse -

CD

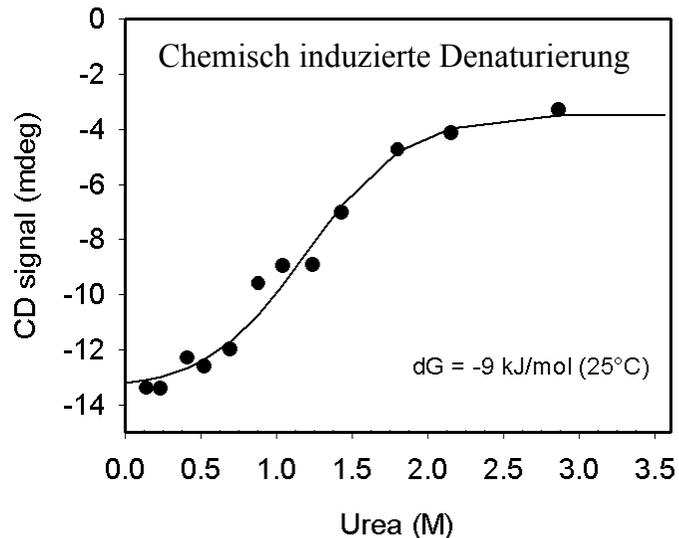
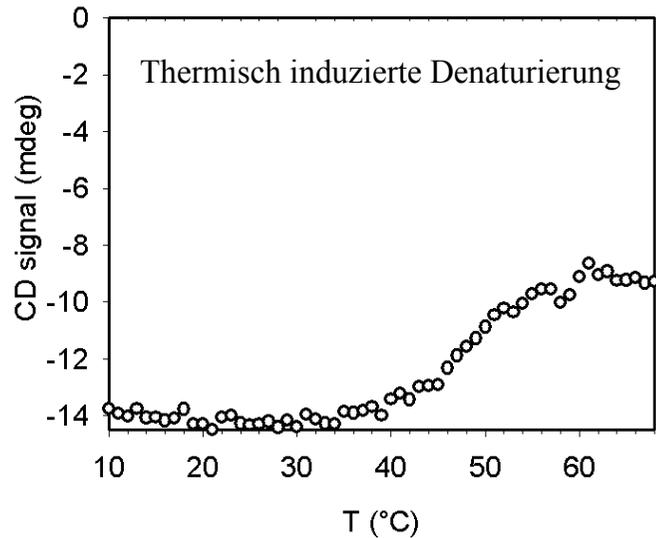


Fluoreszenz



Thermodynamische Stabilität von Proteinen

- spektroskopische Analyse -



Voraussetzung für quantitative Analyse:

- reversible Reaktion
(N \rightarrow U und U \rightarrow N gleich)
- nur zwei Zustände N und U

Thermodynamische Stabilität von Proteinen

- spektroskopische Analyse -

$$\Delta G = \Delta G^D + RT \ln K \quad (K = U/N)$$

im Gleichgewicht: $\Delta G = 0$

$$\Delta G^D = -RT \ln K$$

