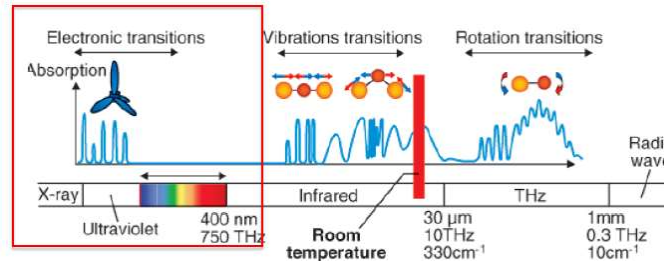


4.gaia: DIKROISMO ZIRKULARRA

Argi polarizatuaren xurgapenean oinarrituriko espektroskopia da, linealki zein zirkularki polarizaturiko argian oinarritzen delarik. Kitzikapenerako ultramoreari dagokion argia erabiltzen da.

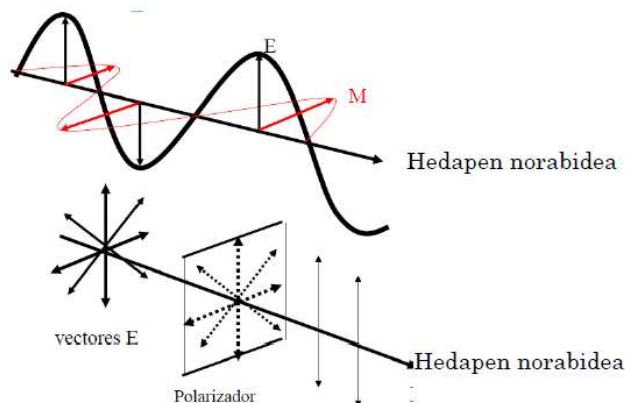


Dikroismo zirkularrak, eskuinerantz zein ezkerrerantz polarizaturiko argiaren xurgapen desberdintasuna neurtzen du.

Bereziki makromolekulen egituren azterketarako erabiltzen da; proteinen egituren determinazioa, proteinen tolesketa/desplegamentuaren azterketa, pH temperatura zein ligando baten baturak eragindako egitura aldaketen azterketa, azido nukleiko, polisakarido, peptido, hormona edo beste molekula txikien konformazio azterketa...

Plano desberdinetan oszilatzen duen argia izanik, polarizatzaile bat erabiliz plano jakinean oszilatzen duen argia soilik aukeratu genezake.

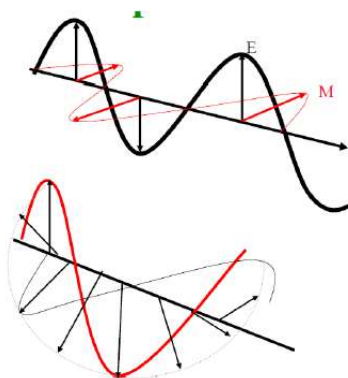
Hedapen norabide jakina izanik norbaide desberdinetan oszilatzen den argia ikus dezakegu alboko irudian.



Linealki, zirkularki eta eliptikoki polarizaturiko argia

Plano batean polarizaturiko argia: Argia polarizatzaile batetik igarotzean, soilik plano batean polarizatzen den argia igaroko da, kasu honetan polarizatzailearen ardatzarekiko paraleloak diren eta bektoretzat E dutenak soilik igaroko dira.

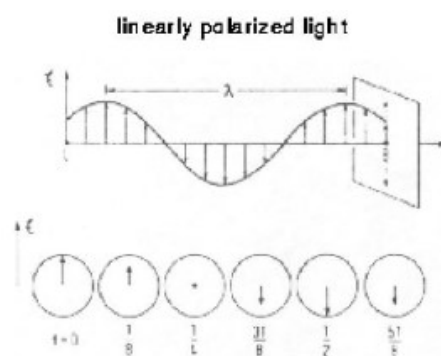
Zirkularki polarizaturiko argia: bi uhin elektromagnetiko perpendikularren baturaren ondorioz ematen da, E bektoreak $\frac{1}{4}$ -eko desfasea dutenena. Batura bektoreak errotatu egiten du zirkulu bat marraztuz (puntudun zuzena)



Linealki edo plano batean polarizaturiko argia

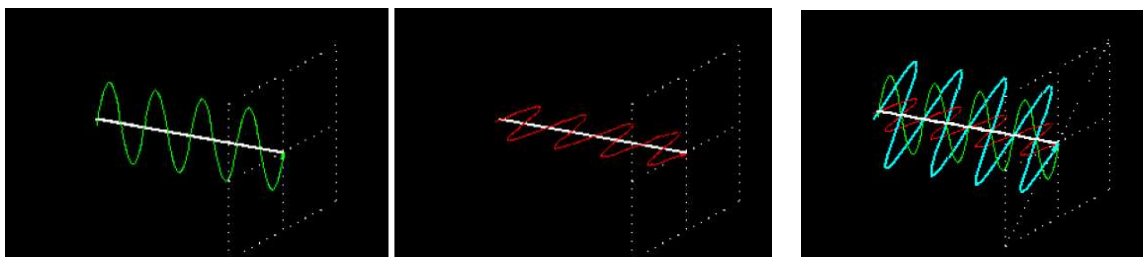
Linealki polarizaturiko argian, bektore elektrikoaren norabidea konstantea izanik, bere modulua aldatzen da.

Linealki polarizaturiko argia, zuriz adierazitako ardatzaren norabidea izango du, ardatz horren inguruan oszilatuko duelarik. Modulu edo geziaren tamaina aldatuko da. Hau esaterako anisotropia neurtzeko erabiltzen da.



Uhinak batu daitezke hirugarren uhin bat emanez eta beraz, uhin hauen bektore elektrikoak batu egingo dira, bektoreen arauak jarraituz. Beraz, plano desberdinetan (perpendikularki) polarizaturiko bi uhin elektromagnetiko gainjartzean, eremu elektrikoak gehituko dira.

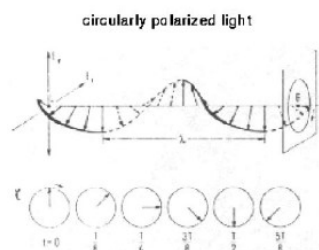
Demagun erradiazio gorri eta berdea ditugula, plano perpendikularrean aurkitzen direnak. Anplitude eta uhin luzera berdina izanik, bi uhin hauek fasean gainjarri eta bektoreak gehitzean kolore urdineko bektore elektrikoa lortuko da.



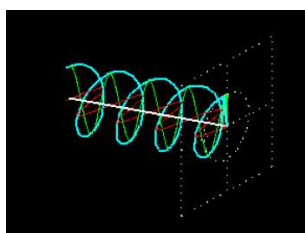
Zirkularki polarizaturiko argia

Zirkularki polarizaturiko argian, erradiazio bektorearen norabidea aldatzen da, modulua konstante mantentzen delarik. Beraz, bektorea ardatzaren inguruan biratzen egongo da modulua aldatu gabe.

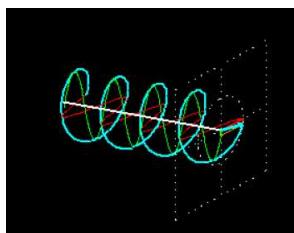
Plano perpendikularrean polarizaturiko bi uhin, uhin-luzera eta anplitude berdinekin gainjartzean, faseak 90° -tan desfasaturik badituzte, bi uhinen baturak ibilbide zirkularra duen bektore elektrikoa emango du. Hau da, erradiazio elektromagnetikoak ez badaude fasean, bien anplitude maximoak ez du espazioko puntu berean kointziditzen eta beraz, zirkularki polarizaturiko bektore elektrikoa lortuko da, modulua konstantea duen baina bektorearen norabidea aldatzen duena alegia.



Bi polarizazio mota aurkitzen dira: eskubirantz eta ezkerrerantz polarizatua.



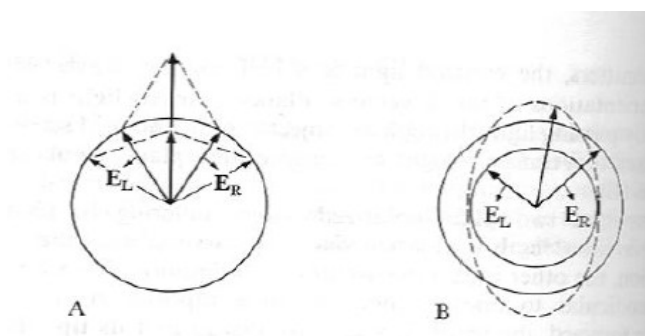
Ezkerreruntz



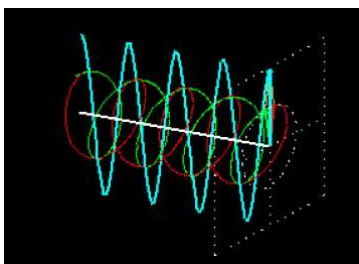
Eskubiruntz

Eliptikoki polarizaturiko argia

Kasu honetan, zirkularki polarizaturiko argia beharrezan eliptikoki oszilatzen duena lortzen da. Zirkularki eskubira eta ezkerrera (L eta R) polarizaturiko argiak konbinatzean anplitude berekoak badira linealki polarizaturiko argia lortzen da (A irudia), baina anplitude desberdinekoak badira, eliptikoki polarizaturiko argia lortuko da (B irudia).



Ondoan agertzen den irudian anplitude bereko eta eskuinerantz eta ezkerrerantz (uhin gorri eta berdea) polarizatzen duten bi bektore elektriko lortu dira. Hauen baturaz Z ardatzaren paralelo mugitzen den linealki polarizaturiko argia lortzen dela ikus daiteke (uhin urdina).



Eliptikoki polarizaturiko argia ondoko hauek konbinatuz lortzen da:

- Linealki polarizatutako bi uhin, anplitude berdinarekin eta hauen faseen arteko angeluak 0° eta 90° ez diren angeluak dituztenean
- Linelaki polarizaturiko bi uhin, anplitude ezberdinekin eta hauen faseen arteko angelua 0° ez direnean
- Zirkularki polarizaturiko uhinak (R+L) eta anplitude ezberdinak dituztenak.

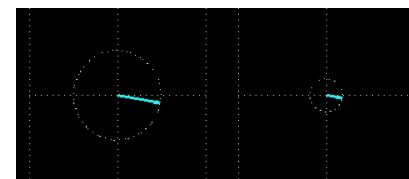
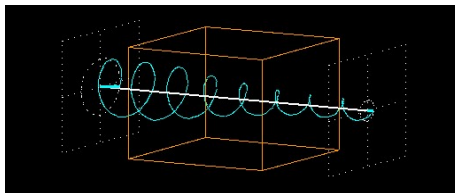
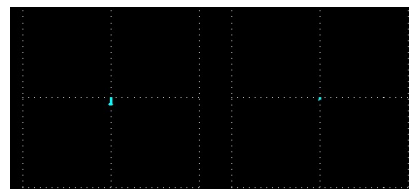
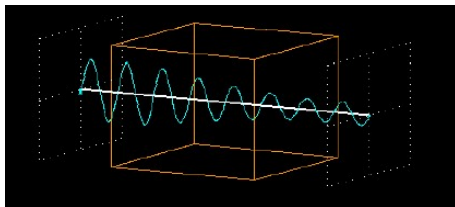
Materia eta energiaren arteko elkarrekintza

Materia zeharkatzean argiaren ezaugarriak aldatzen dira (intentsitatea, polarizazioa, abiadura...). Ikertuak izan diren elkarrekintza arruntenak xurgapena eta abiadura dira. Xurgapenak, argiaren intentsitatearen murrizpena eman dela esan nahi du. Abiadurari dagokionez, txikitu egiten da, materiaren errefrakzio-indizea (n) dela eta, hau da, molekula edo materiala zeharkatzean ez du hutsean duen abiadura izango, hutsean izan dezakeen abiadura maximoena izango duelarik.

Linealki eta zirkulari polarizaturiko argiaren xurgapena

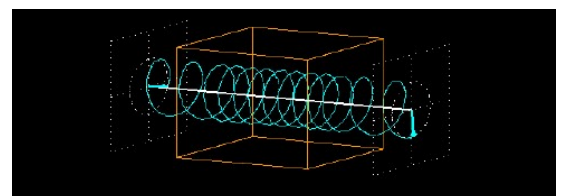
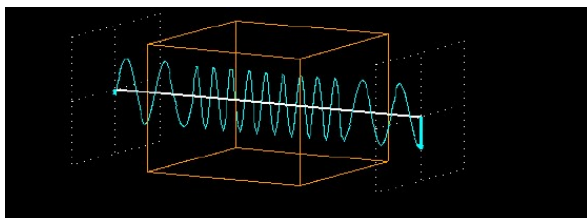
Linealki zein zirkulari polarizaturiko argiak material bat zeharkatzean, xurgapena ematen bada irteerako argi polarizatuaren modulua edo anplitudea hasierakoa baino txikiagoa izango da, bektore elektrikoak norabide berdina izango duelarik. Argiak intentsitatea galduko du beraz.

Xurgatzen du $n=1$

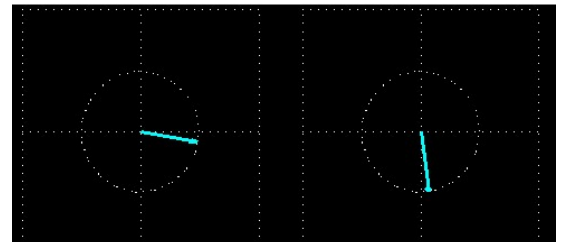


Linealki eta zirkulari polarizaturiko argiaren abiadura

Linealki zein zirkulari polarizaturiko argiak material bat zeharkatzean errefrakzio indizearen aldaketa emango da, argiaren abiadura gutxituko delarik. Laginean zehar igarotzean abiadura murrizten bada ere laginetik irtetzean berriz ere hasierako abiadura berreskuratzen da. Abiadura murrizten bada ere, ez da maiztasuna aldatzen, soilik laginaren uhin luzera aldatzen da. Laginetik igarotzean desfasatu egiten da eremu elektrikoa beraz.

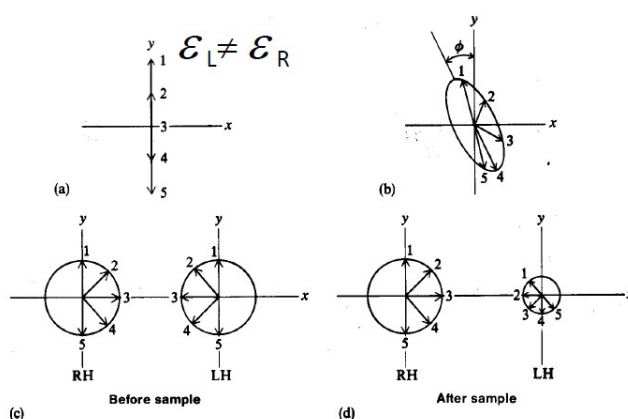


Ez du xurgatzen
Eta $n > 1$

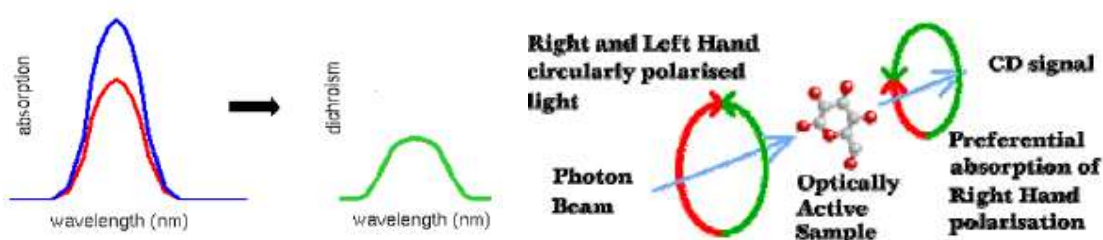
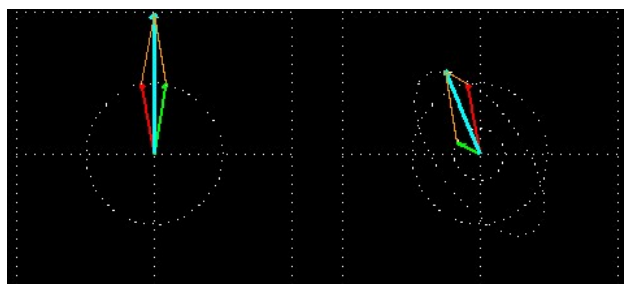
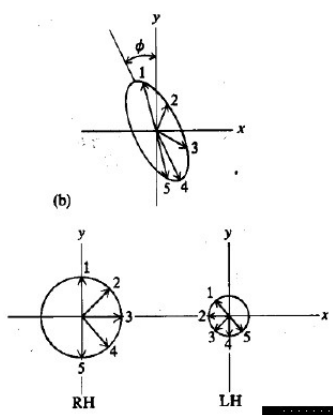


Dikroismo zirkularra

Dikroismo zirkularrean laginak nolako xurgapena duen neurtzen da eta xurgapena ez da berdina izango eskuin zein ezkerrerantz xurgatzen duten argi zirkularrei dagokionez. Eskuin eta ezkerreko erradiazioek anplitude bera izango dute hasieran baina laginetik igarotzean xurgapenaren ondorioz, adibidez ezkerrerantz biratzen duen argiaren modulua edo anplitudea gutxituko da. Kasu hau emango da ezkerrerantz biratzen duen argiaren xurgapena ematen denean. Ondorioz, bien baturaz lorturiko erradiazioak modu eliptikoan biratuko du.



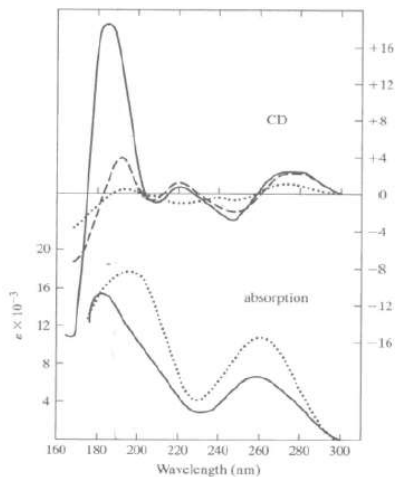
Beraz, ezkerrerantz doan argia gehiago xurgatzen bada, eskuinerantz biratzen duen argiaren bektorea handiagoa izango da. Xurgapen desberdintasuna handiagoa edo txikiagoa denaren arabera lorturiko bektore elektrikoa eliptikoagoa izango da edo ez.



λ -ren funtziopean neurtzen da eta diferentzia beti oso txikia da (totalaren $\ll 1/10000$).

Dikroismo zirkularraren seinalea bi seinale handien arteko aldaketa txikia da, xurgapen desberdintasun txikiak alegia. Eliptizitatea neurtzen da (xurgatu ez den argia) teknika hau erabiliz.

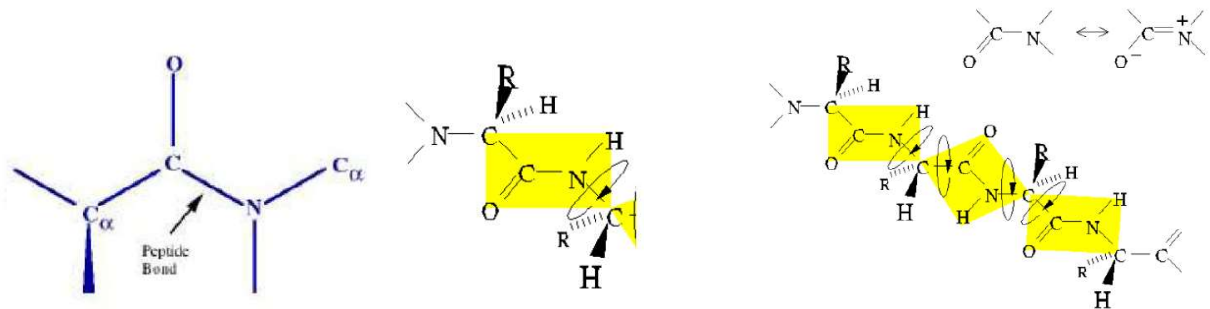
Jarraian lorturiko espektruetan, behekoan xurgapen normala ε bidez adierazten dira. Goikoan aldiz, dikroismo bidez lorturiko espektrua da. Bietan proteina baten bi aldaera edo konformazio ezberdin agertzen dira; puntu beltzez desnaturalizatua eta marraren bidez natiboa.



- *E. coli* ren DNA-ren DZ
- WT —
- Desnaturalizatua - - - -
- Adibidez, 260 nm-tara:
- $\Delta\epsilon = \sim 3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- $\epsilon = \sim 6000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- Hau da, CD-aren seinalearen %0,05-ekoa da.

Aktibitate optikoa biologian

Proteinetan aktibitate optikoa lotura peptidikoko α karbonoetatik dator. Beraz, proteinari dagokionez lotura peptidikoa behatzen da. Kromoforo honek, ultramorean xurgatzen du (140-260 nm).



Lotura peptidikoa asimetrikoa da eta beraz, optikoki aktiboa.

Lotura peptidikoaz gain beste kromoforo batzuk ere kitzikatu daitezke, beste uhin luzera batzuk erabiliz. Adibidez, trp, tyr, kofaktoreak kitzikatzeko uhin luzerak erabil daitezke beste gauza batzuk aztertzeke.

Xurgapen espektroen eta dikroismo zirkularren espektroen konparaketa

Xurgapen espektroskopian laginak xurgatzen duen argia neurtzen da, λ -ren funtzioan. Xurgapen espektroskopian oinarritzen diren legeak erabiliz, uhin luzeraren funtziopean xurgapena desberdina izango da.

$$\text{Xurgapena: } A = \log(I_0/I)$$

$$\text{Lambert-Beer-en legea: } A(\lambda) = \epsilon(\lambda)lc$$

Xurgapena handiagoa izango da argi intentsitatea handiagoa denean edo laginaren kontzentrazioa handitzean.

Dikroismo zirkularrak aldiz, eskubira eta ezkerrera orientaturiko zirkularki polarizaturiko argien xurgapen diferentziala neurtzen du (xurgapenen diferentzia oso txikia izan daiteke).

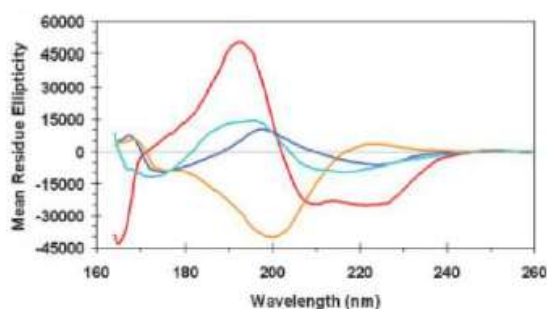
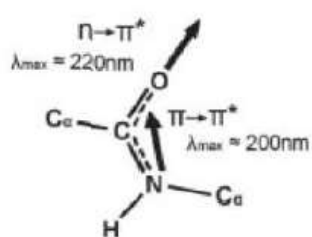
$$\Delta A(\lambda) = A_L(\lambda) - A_R(\lambda) = [\epsilon_L(\lambda) - \epsilon_R(\lambda)]lc \quad \text{edo} \quad \Delta A(\lambda) = \Delta \epsilon(\lambda)lc$$

Neurtuko den aldaketa seinalearen oso ehuneko txikia izango da, izan ere, xurgapen koefizientea ($\Delta \epsilon$) $10 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ baino txikiagoa da eta ϵ $20000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Dikroismo zirkularra

Xurgapena, trantsizio dipoloen arteko elkarrekintzaren ondorioz ematen da. Trantsizio hauek, molekularen taldeen espazioko konformazioarekin daude erlazionaturik. Ondorioz, dikroismo zirkularrean jasotzen ditugun seinaleak konformazioarekiko oso sentikorak dira (aldaketa txikiena ere nabaritu daiteke). Izan ere, lotura peptidikoaren kokapenak aktibitate desberdina emango du, dipoloen arteko elkarrekintzak desberdinak izango direlako.

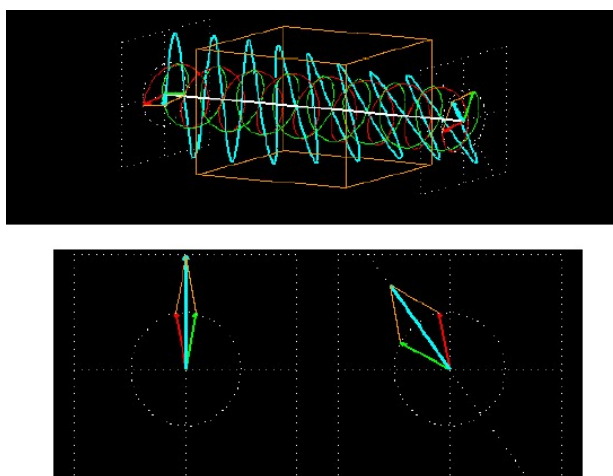
Orokorrean, $\Delta \epsilon$ balioa ϵ -rena baino sentikorragoa da konformazioarekiko.



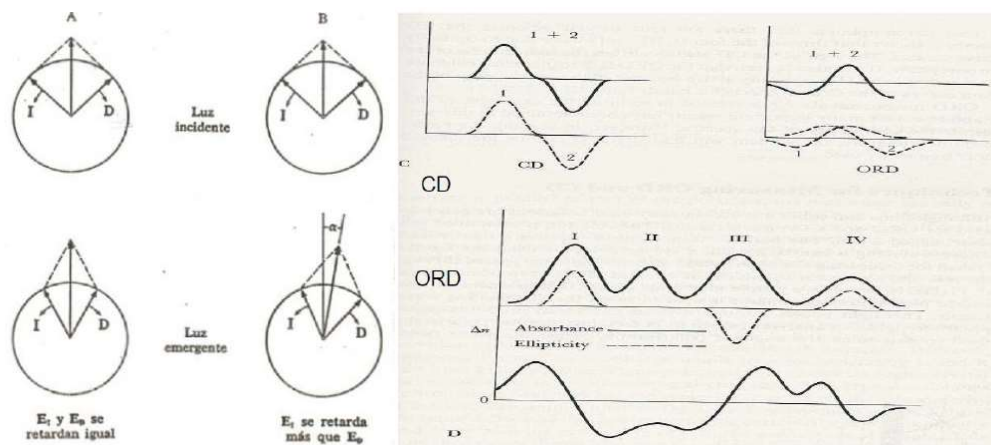
Medioaren errefrakzio indizearen eragina → ORD: Optical Rotatori Dispersion

Zirkularki polarizaturiko bi argik lagina zeharkatzean sorturiko desfaseak eragina izango du bi erradiazioak elkartzean sortuko den erradiazioaren sorreran. Linealki polarizatuko den erradiazio berriaren errefrakzio indizea aldatuko da eta beraz, angelu zehatzarekin desplazaturiko erradiazio berria lortuko da.

Laginetik ateratzen den argiak sartu aurretik zuenarekiko desfase bat emango da. Laginean optikoki aktiboa den zerbait badago, eskuineruntz eta ezkerreruntzko argiaren desfaseak desberdinak zian daitezke. Berriz bi uhinak elkartzean z ardatzarekiko angelua sortzen da. Ezkerreruntz polarizatutakoak errefrakzio indize handiagoa jasaten du.



Ondorioz, uhin luzeraren arabera (λ) R eta L-ren errefrakzio indizeak aldatzen dira.



Uhin luzeraren arabera errefrakzio indizeak alda daitezke laginean aktiboa den molekula bat dugunean. Desfaseak errefrakzioari buruzko informazioa eman ditzake. Angeluak neur badaitezke ere (ORD), eliptizitatea neurtzen da, ez elipseak izan dezakeen angeluan.

CD unitateak:

Dikroismoa zirkularra kalkulatzeko kenketa egiten da, ezkerreruntz oszilatzen duen argia ken eskuineruntz biratzen duena. Hori luzera eta kontzentrazioarekin biderkatzen da.

Dikroismo zirkularrean laginetik ateratzen den argi eliptikoaren eliptizitatea neurtzen da(θ). Eliptizitate molarretan ematen da, angelua zatituz lagin kontzentrazioa, laginak igaro duen paso optikoaren luzera eta gure laginak dituen lotura peptidiko kopuruarekin (mol bakoitzak adibidez).

CD UNITATEAK

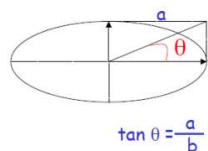
oEliptizitatea (θ)

$$\bullet \tan \theta = a/b$$

oEliptizitate Molarra:

$$[\theta]_{\lambda} = \theta / 10ncl$$

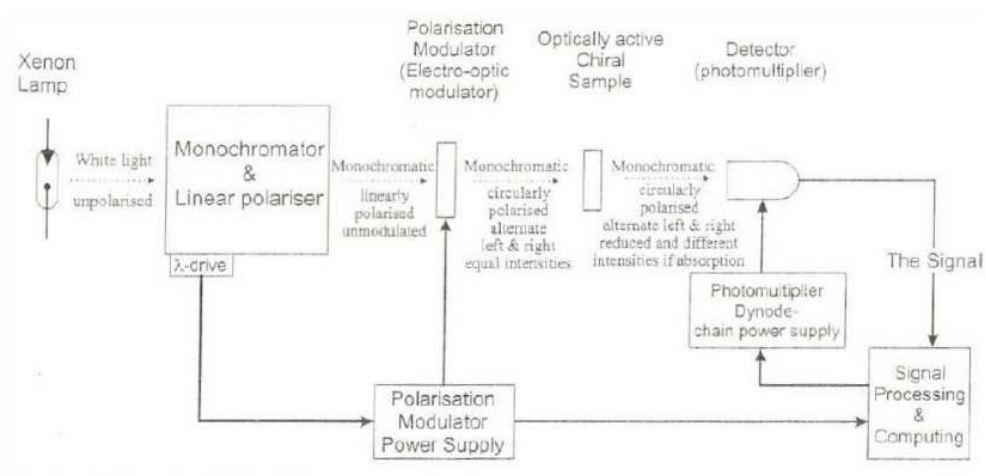
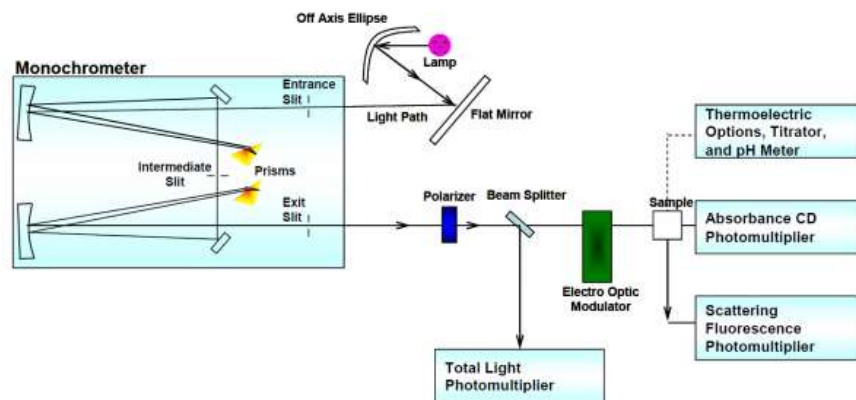
- θ = neurtutako eliptizidatea gradutan, n = lotura peptidiko kopurua, l = paso optikoa cm, c = [lagina] M.



Instrumentazioa:

Dikroismo zirkularren neurketarako espektrofotometroa erabiltzen da, xurgapeneko ezaugarri berdinak eta beste hainbat ezaugarri berezi dituen. Normalean laginean gas geldo bat jartzen da, laginetik kentzeko xurgatzen duten beste molekula batzuk, interferentzia sor dezaketenak. Argi iturria, monokromadorea eta polarizadorea ditu, baina beste gehigarri bat ere behar du, argi polarizatu zirkularra sortzen duena: modulatzailer elektro optikoa (Electro Modulator). Hori guztia pasa ondoren, argiak lagina zeharkatzen du eta detektorera iristen.

CD-ko espektrometro baten eskema



Kubetak bereziak izan daitezke, neurtu behar den uhin luzeraren arabera. Ultramorean kuartzoko kubetak erabiltzen dira adibidez, egitura sekundario eta lotura peptidikoa neurtzeko. Beste uhin luzera batzuetan neurketak egiteko kristalezko edo plastikozkoak erabil daitezke, esaterako, kofaktoreak edota egitura tertziarioak.

Kubetak

Table 3: Selection of Cuvette

Material	Transmission >80%
QS Quartz	200 - 2500 nm
QH Quartz	230 - 2500 nm
QX Quartz	200 - 3500 nm
OS "Special Optical Glass"	320 - 2500 nm
OG "Optical Glass"	360 - 2500 nm
PY "Pyrex"	340 - 2500 nm
Methacrylate Plastic	300 - 750 nm
Polystyrene Plastic	350 - 750 nm

Neurketaren baldintza tipikoak:

- Proteinaren kontzentrazioa: 0,25 mg/ml.
- Kubetaren paso optikoa txikiagoa da: 1mm (ez 1cm).
- Bolumena 0,4 ml.
- Lagin gutxi behar da, 0,1 mg.
- Indargetzaileak eta beste hainbat substantzia interferentziak eragin ditzake, horregatik, ahalik eta indargetzaile gutxien erailtzen saiatu behar da, baina beharrezkoa da proteinaren egitura mantentzeko (5mM inguru).

Erabilera praktikoa:

CD-a desberdintasun txikietan oinarritutako neurketetan oinarritzen denez, neurketak kontu handiarekin egin behar dira.

Erabilitako kuartzozko kubeten pasu optikoa 0,0001 cm eta 10 cm tartekoa izaten da. Ohikoenak 1 cm eta 0,1 cm-koak.

Indargetzailearekin kontuz ibili behar da, esaterako, Tris-ek (hidroximetil amonio metano ((HOCH₂)₃CNH₂) ultramore-ikusgaian xurgapen handia du eta interferentzia sor dezake. Uhertasunarekin ere kontuan hartu behar da, dispersioa ekiditeko. Egituraren azterketa zehatz bat burutzeko, laginaren kontzentrazio zehatza ezagutu behar da.

Disolbatzaile, gatzen eta indargetzaileen xurgapena:

Kontuz ibili behar da zein uhin luzeratan neurtzen den, indargetzaile, gatzen kontzentrazioarekin eta horiek izan dezaketen interferentziarekin uhin luzera horretan. TRIS oso erabilia da, proteinak modu egokian izateko, baina xurgapena du ultramore-ikusgaian.

α helizea	β orria	Desegituratua
Banda intentsoak	α Baina intentsitate gutxiago duten bandak. Aldakorrak	
Banda positibo oso intentsoa 190 nm	Banda positiboa 195 nm	
Banda negatiboak 208 eta 222 nm	Banda negatiboa 217 nm (aldakorra)	Banda negatiboa 200 nm

β birak	Poli-prolina II helizeak
Banda negatiboak: 220-230 nm (ahula) 180-190 nm (intentsoa)	Banda negatiboa 190 nm
Banda positiboa 205 nm	Banda positiboa 210-230 nm

Table 1: Solvent Transparency

Compound	Wavelength (nm) for OD = 1.0	
	1.0-mm Path Length	0.05-mm Path Length
H ₂ O	182	176
MeOH	195.5	184
F ₆ iPrOH	174.5	163
F ₃ EtOH	179.5	170
EtOH	195	186
MeCN	185	175
Dioxane	231	202.5
Cyclohexane	180	175
α -Pentane	172	168

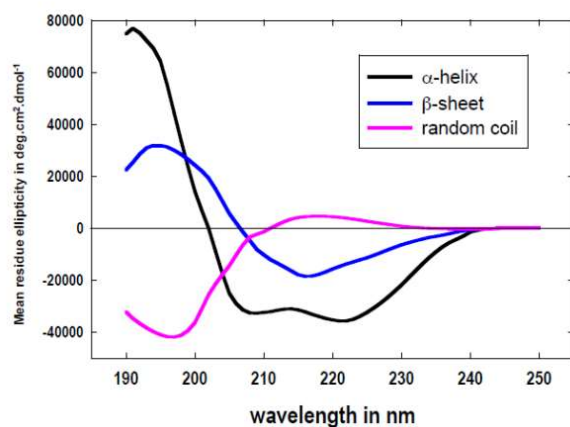
Table 2: Absorbance of Various Salt and Buffer Substances in the Far-UV Region

Compound	pH	No Absorbance Above	Absorbance of a 10 mM solution in a 1.0 mm Cuvette at:			
			210 nm	200 nm	190 nm	180 nm
NaClO ₄		170 nm	0	0	0	0
NaF, KF		170 nm	0	0	0	0
Boric Acid		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
Na Acetate		220 nm	0.03	0.17	>0.5	>0.5
Glycine		220 nm	0.03	0.1	>0.5	>0.5
Diethylamine		240 nm	0.4	>0.5	>0.5	>0.5
NaOH	pH 12	230 nm	>0.5	>2	>2	>2
Boric Acid, NaOH	pH 9.1	200 nm	0	0	0.09	0.3

CD espektroen ezaugarriak: proteinen egitura.

Egitura sekundario bakoitzak ezaugarri bereizgarriak ditu. Eskuinerantz polarizatutako argiak gehiago xurgatzen badu seinalea negatiboa da eta ezkererantz polarizatutakoak gehiago xurgatzen badu positiboa.

Espektroan X ardatzean uhin luzera desberdinak adierazten dira eta Y ardatzean eliptizitatea (graduak / kubetaren pasoa).



Polilisina pH desberdinetara:

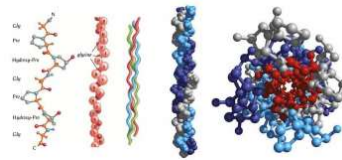
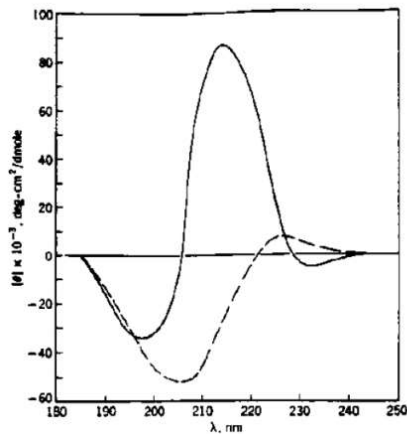
pH 7

pH 10,8

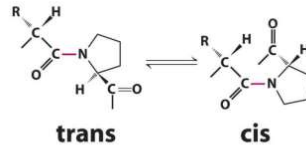
pH 11,1

pH 7an polilisina ez du izango egitura zehatz bat, egitura desordenatu bat baizik, 220 nm-tan pixkat bat xurgatuz (marra arrosa). pH igotzean, alfa helize konformazioa hartzen du, marra beltzeko xurgapen intentsoak lortuz. Gehiago igoz beta orriak lortzen dira, banda ez hain intentsoak lortuz (urdina). Proteina berak konformazio ezberdinetan espektru ezberdinak emango ditu beraz.

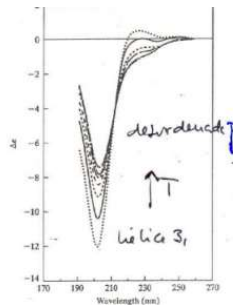
Cys edo trans konfigurazioaren arabera ere espektruak aldatuko dira.



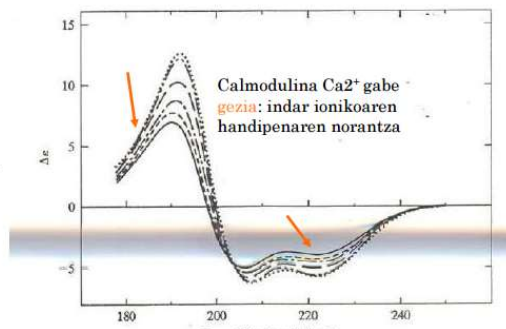
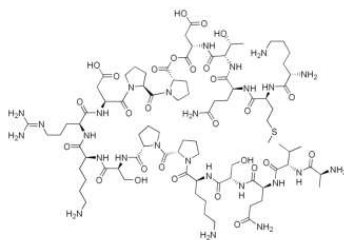
— poly-Pro I (cis)
 - - - poly-Pro II (trans)



Sisteminak helize batzuk ditu, baina tenperatura igotzen goazen heinean egitura galtzen doa eta bandak ez dira hain intentsuak. Indar ionikoaren azterketan berdina egin daiteke, kalmodulinaren kasuan. Geziek indar ionikoa adierazten dute, indar ionikoa handitzeak kalmodulinaren egitura skeundarioa desagertarazten du.

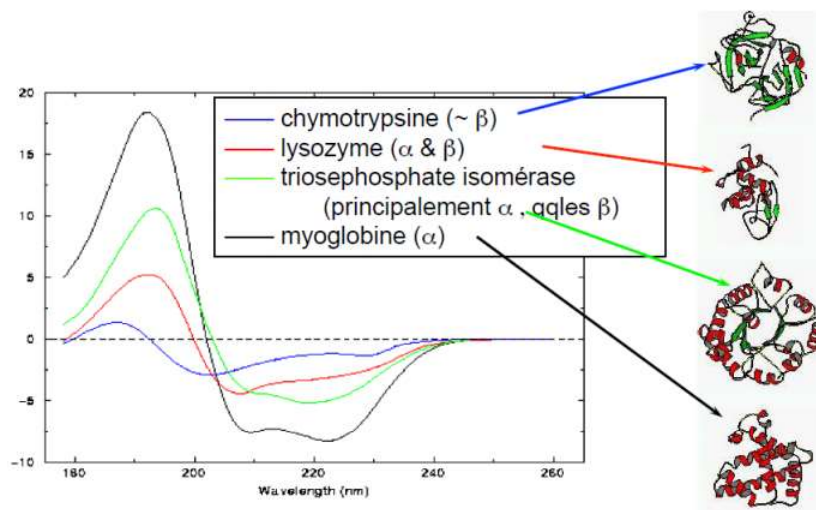


Sistemia. Peptido actividad hormonal
 en plantas
 Helice 3₁ a bajas T



Egitura sekundario desberdineko CD espektroak:

Proteinek egitura sekundarioen nahasteak izaten dituzte. Mioglobinak (beltza) bakarrik alfa helizeak ditu. Kimiotrispinak (urdira) batez ere beta orriak ditu. Egitura sekundario horiei dagozkien espektruen ezaugarriak lortzen dira. Lisozimak (gorria) eta triosa fosfato isomerasak (berdea) nahasketak dituzte eta horrelako kasuetan ez da hain erraz ikuten zenbat orri eta helize ditugun.

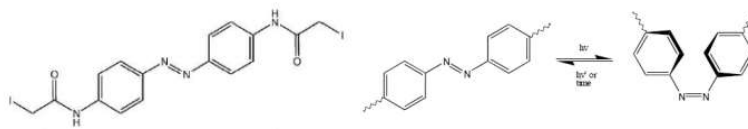


Dikroismo zirkularraren aplikazioak biologia estrukturalan:

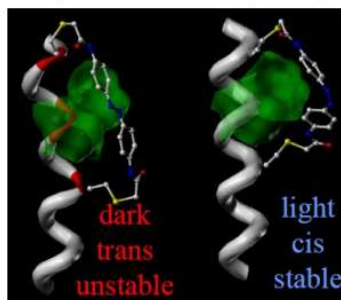
- Proteinen egitura sekundarioak zehazteko: zein frakziotan dituen orriak, helizeak eta egitura desordenatuak.
- Posible da inguruneak egituran duen eragina aztertzea.
- Proteinen tolesketa eta desnaturalizazioa.
- Mintz proteinen egitura sekundarioaren azterketa.
- Ligando baten loturak eragin dezakeen egitura sekundarioaren aldaketa.
- Proteina-proteina eta proteina-azido nukleiko arteko elkarrekintzen azterketa.
- Karbohidratoen konformazio aldaketak.

Konformazio azterketa:

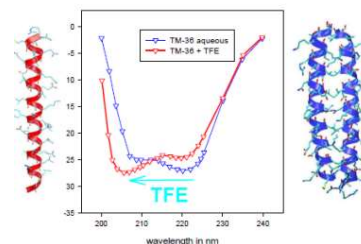
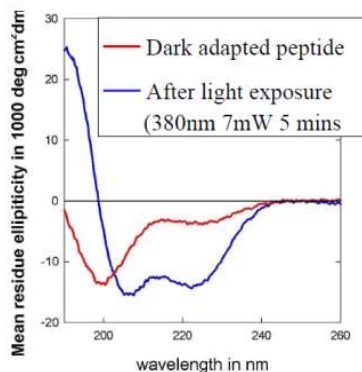
Demagun peptido bat dugula, bi konformazio izan ditzakeena, cys edo trans. Argiarekin cys konformaziora pasatzen da, eta iluntasunean trans egoeran dago. Argiaren eraginezko isomerizazioa CD espektru baten bidez ikus daiteke. Azobenzenoaren iodozetamidaren eratorriak cys hondar batzuk elkargurutzatzen ditu. Iluntasunean azobenzeno taldeak trans konformazioa du eta argiarekin kitzikatu ondoren (ehin-luzera egoki batez) cys konformazioa hartu eta egitura helikoidal bat eratzen da, helizeen espektru bat lortuz.



oCis konformazioan peptidoa egitura helikoidala edukioko du (argia) eta iluntasunean egitura hau desegonkortuko da (trans).



Kumita, Smart & Woolley
PNAS (2000) 97:3803-3808

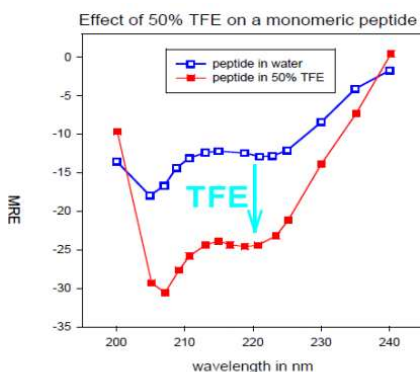


Coiled-coil batetan, dimero helikoidaletik abiatuta, helize monomerikoa lor daiteke.

Posible da baita ere tenperaturaren eragina aztertzea:

Disolbatzailearen efektua:

Disolbatzaileak egitura sekundarioan eragina izan dezake. Ingurua aldatzen trantsizioan probabilitatea aldatzen da eta helizitatea ere bai, horrek eliptizitatean eta, beraz, CD espektruan eraginez. Adibidez, TFE-k peptido baten helizitatea eragiten du, espektrua aldatuz (helizearen espeketroaren itxura hartzen du).

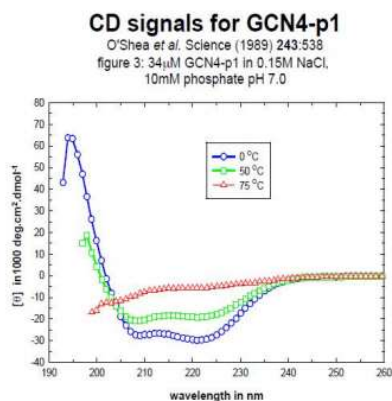


- o CD seinalea kromoforoaren ingurunearen arabera alda daiteke.
- o Trifluoroetanolaren (TFE) efektua GCNA-p1-ren espektruan.

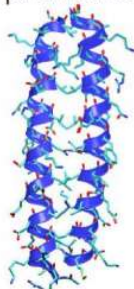
TFE-k helizitatea eragiten du

Egitura sekundarioaren determinazioa:

Greenfield eta Fasman-en (1969) metodoa erabilia egitura sekundarioaren determinazioa burutu daiteke:



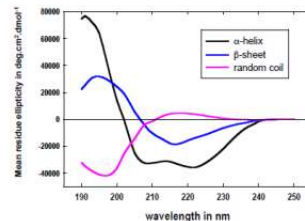
GCN4-p1 is a coiled-coil:



100% α helizea 0 °C-tara eta
desegituratua 75 °C-tara

oGreenfield eta Fasman-en (1969) metodoa erabilia egitura sekunarioaren determinazioa burutu daiteke:

- $\theta_t = x_\alpha \theta_\alpha + x_\beta \theta_\beta + x_c \theta_c$
- x_α , x_β eta x_c α helize, β orri eta desegituratu-aren (random coiled) proportzio erlatiboak.
- $x_\alpha + x_\beta + x_c = 1.0$



Peptidoaren egitura tenperaturarekiko sentikorra da. Helizeak izango ditu hasieran, eta tenperatura igotzean galduz joango dira. Asko igotzean egitura sekundarioa galduko da. Tenperatura aldatuz jakin daiteke zein egitura sekundario dituen (zenbat helize).

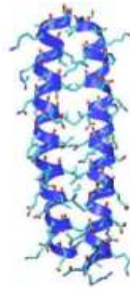
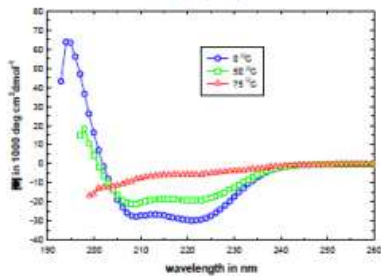
Eliptizitatea egitura sekundarioaren arabera izango da. Batura gerta daiteke helizeen eta orrien artean. Eliptizitatea maila gehitu daiteke egitura bakoitzaren frakzioa jakinda eta hori biderkatuz. Frakzio molarra bider eliptizitatearen batura izango da egitura osoaren eliptizitatea.

Doiketa batzuk lortzen dira ordenagailuz. Jakinik zein izango den konformazio bakoitzaren eliptizitatea eta doiketak eginez lortzen dugu:

kasu honetan alfa helizeak ditu edo desordenatuta egon daiteke. 0 gradutan α -helizearen proteina bat da eta 75 gradutan ez dago alfa helizerik. Alfa helizearen (α -helizedunaren eliptizitatea x proportzioa + egitura gabekoaren eliptizitatea x frakzioa). Horrela lortzen dugu espektrora hori zien konbinaziorik (frakzioak) dagokion.

CD signals for GCN4-p1

O'Shea et al. Science (1996) 243:538
figure 3: 34µM GCN4-p1 in 0.15M NaCl,
10mM phosphate pH 7.2



0°C: 100% helizea

75°C: 0% helizea

Zer gertatzen da 50°C?

$$\theta_t = x_0\theta_0 + x_{75}\theta_{75}$$

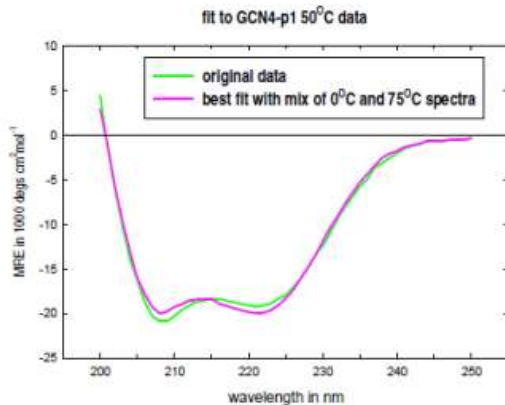
Doiketa hoberena:

$$x_0 = 50\%$$

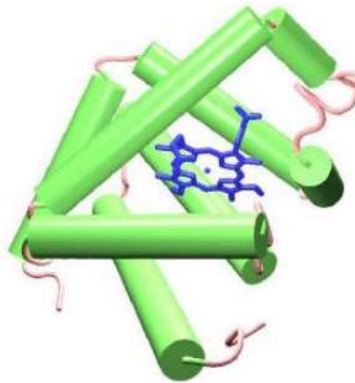
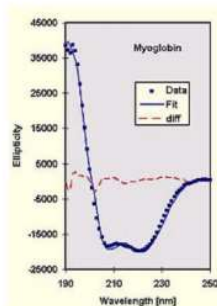
$$x_{75} = 50\%$$

50 °C:

- peptidoaren erdia dimero helikoidal bat da
- Beste erdia egitura gabeko monomero bat da



Mioglobina



$$\theta_t = x_\alpha\theta_\alpha + x_\beta\theta_\beta + x_c\theta_c$$

Doiketa hoberena:

$$x_\alpha = 80\%$$

$$x_\beta = 0\%$$

$$x_c = 20\%$$

3D egitura:
78% α -helizea

Doikuntzaren prozedura:

Espektruaren datuak hartzen dira eta egitura ezaguna duten proteinen (zehazki ezagutzen da zenbat α eta β -egitura), eta datu base horren alderaketak gure proteinaren egitura ematen digu. Metodo enpiriko bat da, konparaketa bidez egiten baita. Gutxienez 20 proteinekin alderatzea erabaki zen, hurbilketa fidagarritzat hartzeko.

Egituraren doikuntzaren zehaztasuna:

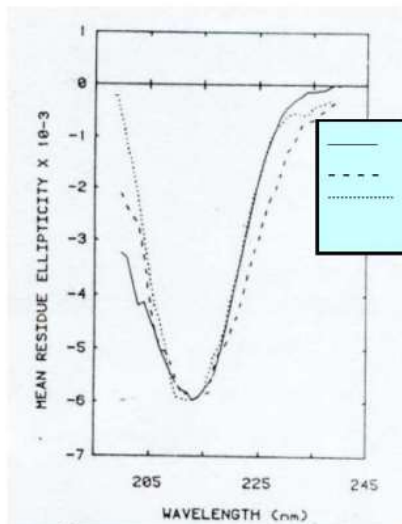
- 0,97 helizeak
- 0,75 beta orriak
- 0,50 birak
- 0,89 beste egiturak

Doikuntza ezberdinak egin eta datuekin ondoen kointziditzen duen egitura hartzen da.

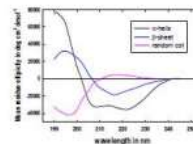
Mintz proteinen azterketa:

Oso baliagarria da mintz proteinen azterketarako. Mintz proteinak ezin dira uretan kristalizatu ez direlako egonkorra. Ingurune apropos batean jarri behar da, detergenteak adibidez. Egitura lortuta ere, proteinak mintzean benetan egitura hori duen ala ez argitzea zaila da. Horregatik da erabilgarria CD mintz proteinak aztertzeko, CD-n protienaren espektroak egin baitaitezke liposomak erabilita.

Adibidez, *Staphylococcus aureus*-en α -hemolisina, mintzean poroak sor ditzakeen proteina da, solugarria dena baina mintzean txerta daitekeen heptamero konformazioa hartuz. 3 egoera ezberdin hartu zituzten: monomeor solugarria, monomeroa lipidoan txertatuta eta lipidoan txertatuta heptamero moduan. Ikusten da CD ez dela aldatzen hiru egoeretan, beraz, hiru egoeretan konformazio berdina du. Beranduago atera zituzten kristal egiturak eta ikusi zen poroa osatzeko heptameroa behar zela eta proteina ez zen aldatzen mintzean edo uretan.

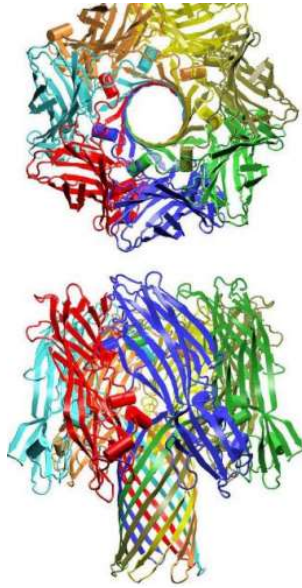


- Tobkes et al. (1985) Biochemistry 24:1915



- Los 3 espectros son similares de modo que las tres conformaciones tienen una estructura secundaria similar

Zein egitura sekundariotaz ari gara?
Ohikoa al da mintz proteina batean?

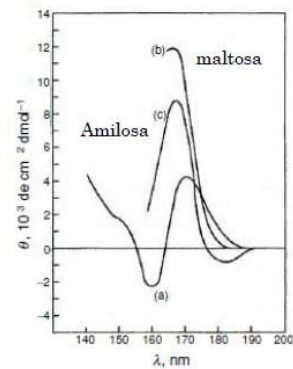


- Poroaren kristal egitura
– Song et al. Science 1996 274:1859
- DZ bidez ondorioztatu da ez duela egitura aldatzen ingurune lipidikoan edo detergentez inguratuta
- Ia dena beta egitura da
- Monomero hidrosolugarriaren egitura ere lortu da

Karbohidratoen konformazioen azterketa:

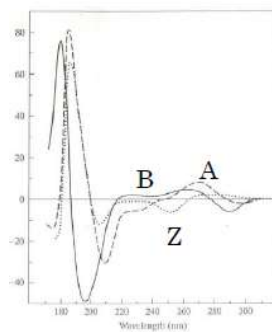
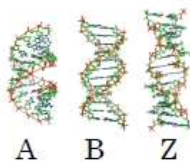
Karbohidratoek karbono asimetrikoa dutenez, teknika honen bidez ere azter daitezke. Izan ere, karbono asimetriko horren inguruan dauden molekulen arabera CD-ren espektroa aldatu egiten da.

Esaterako maltosa eta amilasa isomeroak dira eta beraien CD espektroa aldatzen dela ikus daiteke ondoko irudian.

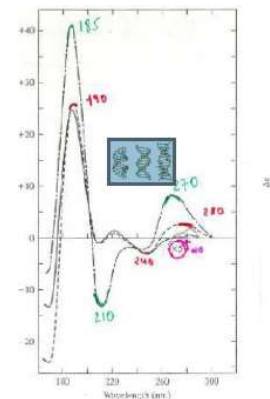


Azido nukleikoen azterketa:

CD-ren bidez ere azido nukleikoak azter daitezke. DNA molekula hiru formetan egon daiteke, A, B edo Z forman. Forma bakoitzak CD espektro ezberdina azaltzen duenez, modu honetan DNA molekula zein eran dagoen jakin dezakegu.



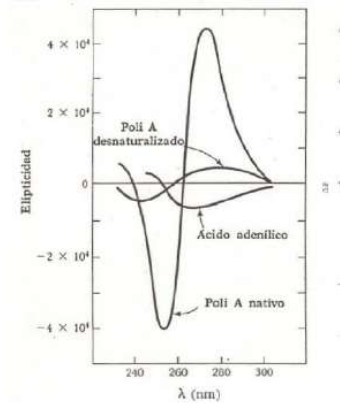
DNA-ren
Konformazio
desberdinak



A forma
B forma
DNA *Escherichia coli*

Z forma bazegoela dikroismo zirkularren teknika bidez nabaritu zen lehenengoz. Gatz kontzentrazioa igotzean ikusi zuten DNAREN konformazioa aldatu egiten zela. Ondoren, kristalizazioaren bidez definitu zituzten DNAak eman ditzakeen hiru bira horiek.

Ondorengo espektroan ikus daiteke, monomero, eta polimero natibo zein desnaturalizatuek CD espektro ezberdina ematen dutela.

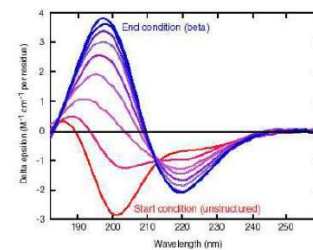


Gaixotasun amiloideen azterketa:

Gaixotasun batzuetan, β orri egiturazko zuntz amiloideak eratzen dira. Hauek polimerizatu egiten dira disolbaezinak diren egiturak eratuz nerbio sistema ehunetan (Alzheimer, CJD, BSE gaixotasunetan esaterako).

Esaterako, Alzheimer-ean LRRN peptidoak β egiturako polimeroak eratzen ditu, gaixotasunaren garapenean zehar LRRN peptidoaren polimerizazioa gertatzen delarik.

Irudian aminoazido bakar baten aldaketak peptidoaren polimerizazioan duen efektua ikusten da. Beraz, esperimendu honetan mutanteak sortzen dira aminoazido bakar batean aldaketak eginez. Hala, amiloideak osatzen doazen heinean espektroa aldatuz doa eta modu honetan prozesua nola geldiaraz daitekeen edo polimerizazioa zerk abiarazten duen (zein mutaziok) iker daiteke.

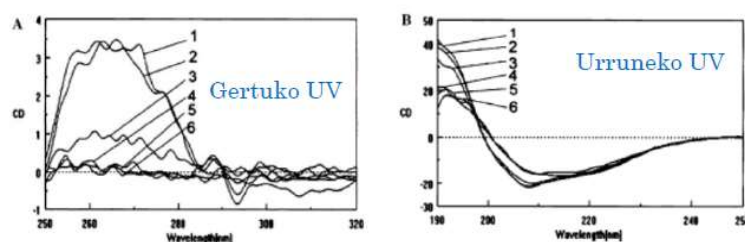


CD eta proteinen egitura tertziarioaren azterketa:

Aurretik ikusi dugun moduan, proteinak urruneko UV-tan (180-250nm) aztertuz, kromoroforaren lotura peptidikoak aztertzen dira, hau da, egitura sekundarioa.

Hala ere, proteinak aztertzeko posible da beste erradiazio bat erabiltzea horien aminoazido aromatikoak edota talde prostetikoak aztertzeko. Kasu honetan gertuko UV erabiltzen da (250-320nm; Phe: 250-270nm, Tyr: 270-290nm, Trp: 280-300nm). Kasu honetan lortzen den espektroa ez da proteinaren egitura sekundarioaren arabera izango, murgildurik dauden ingurunearen arabera baizik, hortaz, egitura tertziarioa ikertzeko balioko digu.

Ondorengo esperimentuan bi CD espektro lortu dira, batean gertuko UV eta bestean urruneko UV erabili dira eta kitzikapena tenperatura ezberdinetan neurtu da.



Bertan ikus dezakegu 45°C-tan (3 zenbakia) egitura tertziarioa galdu egiten dela, intentsitatearen jaitsiera nabarmena beha baitaiteke ezkerreko irudian. Hala ere, temperatura horretan, egitura sekundarioak inongo aldaketarik jasaten ez duela ohartzen gara (eskuineko irudia). Hortaz, egitura tertziarioa galdu arren, egitura sekundarioa mantentzen duela ondoriozta daiteke.

Dikroismo zirkularraren abantailak:

- Esperimentu azkarra eta erraza da.
- Ez da laginaren prestakuntza berezirik burutu behar.
- Disoluzioan neur daiteke.
- Laginaren kantitate baxuak nahikoak dira.
- Mikrosegunduetako erresoluzio tenporala lortzen da, hortaz, prozesu azkar bat aztertu nahi denean erabil daiteke.
- Edozein tamainako makromolekula bat azter daiteke. Esaterako, liposomak erabil ditzakegu eta horregatik oso erabilia da mintzeko lipidoak aztertzeko.

Laburbilduz:

- CD-a proteina eta peptidoen egitura sekundarioaren azterketarako teknika egokia da.
- Xurgapen espektroskopiaren moldapen bat da, zeinetan eskuinetara eta ezkerretara zirkularki polarizatutako argien xurgapen diferentziala neurtzen den.
- Egoera esperimantal askotara aplikatu daiteke.
- Kromoforoen ingurunearen aldaketa aztertzeko erabil daiteke.