

Cirkular dikroisme i det fjerne ultraviolette med synkrotronstråling som lyskilde

I kælderen under Aarhus Universitet kan man nu måle absorption og CD-spektre med synkrotronstråling. Synkrotronstråling er en ekstremt intens lyskilde, der er langt kraftigere end de traditionelle

Af Peter W. Thulstrup, Kemisk Institut, Den Kongelige Veterinær og Landbohøjskole, pwt@kvl.dk

Under parkeringspladsen mellem Kemisk Institut og Institut for Fysik og Astronomi ved Aarhus Universitet foregår der noget spændende af interesse for danske kemikere, biokemikere og molekylærbiologer. Her ligger lagerringsfaciliteten ASTRID, som drives af ISA (Institute for Storage Ring Facilities – Aarhus). I løbet af det sidste halvandet års tid har ansatte ved ISA etableret en ny målestation (såkaldt beamline) kaldet UV1. Den er indrettet til spektroskopiske undersøgelser i det synlige, nære og fjerne ultraviolette spektralområde. Her kan der måles absorption og cirkular dikroisme (CD) af molekyler i opløsning samt af rene væsker og gasser. Der er dog tænkt specielt på studier af proteiner og andre biologiske molekyler i opløsning ved indretningen af målestationen.

Lidt om synkrotronstråling og om UV1

Nogle vil måske tænke: hvorfor er det nødvendigt at bevæge sig ned i kælderen under Aarhus Universitet for at måle absorption og CD-spektre, når der findes kommercielle instrumenter til den slags mange steder?

Årsagen er den, at synkrotronstråling er en ekstremt kraftig lyskilde, som er traditionelle lyskilder langt overlegen. Strålingsintensiteten er meget høj, f.eks. er der en foton-flux på ca. $4 \cdot 10^{10}$ fotoner/sek. ved 200 nm ved UV1. Det er op til fire størrelsesordner kraftigere end traditionelle lyskilder, som en Xe-

non-lampe, der ikke har så meget intensitet i det fjerne ultraviolette område under 200 nm.

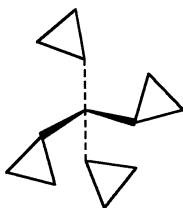
I en lagerring som ASTRID kan ladede partikler som ioner og elektroner opbevares, idet de holdes i omløb ved høj hastighed under vakuum (under 10^{-9} mbar). Opbevaring af ioner er af

Hvad er cirkular dikroisme spektroskopi?

Cirkular dikroisme (CD) er en spektroskopisk teknik, der kan give information om optisk aktive molekyler. Som navnet antyder anvendes der cirkulært polariseret lys, og dikroisme henviser til at chirale molekyler er »to-farvede« m.h.t. cirkulært polariseret lys. CD defineres som forskellen i absorbans imellem venstre- og højre-polariseret lys. CD optages normalt på molekyler i opløsning i det synlige og ultraviolette spektralområde, dvs. til detektion af elektronovergange. CD anvendes rutinemæssigt til analyse af makromolekyler, som nukleinsyrer og proteiner. Traditionelle, kommercielle CD-instrumenter kan typisk måle i spektralområdet fra det synlige (700 eller 800 nm) ned i det fjerne ultraviolette (ca. 180 nm). I praksis er det dog ofte svært at måle under 200 nm på en protein-opløsning. For en generel introduktion til CD henvises til [1].

Nyt om en carbonhydridpropel

Der er efterhånden syntetiseret carbonhydrider med mange ejendommelige former. Et af de sidste skud på stammen er et carbonhydrid, der ser ud som en propel, tetracyclopropylmethan, se figur. Forbindelsen, der er en væske, er for nylig fremstillet af en forskergruppe ved universitetet i Göttingen.



Carl Th.

Tetracyclopropylmethan: A Unique Hydrocarbon, *Angewandte Chemie, International Edition* 40 (2001): 180.

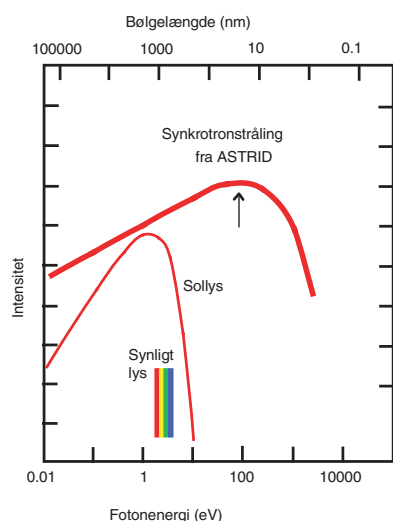
PUNKTUDSUGNING

- for et bedre arbejdsmiljø

For sikrere arbejdspladser i alle brancher: elektronik, ortopædi, farmaci, universiteter, skoler, hospitaler, frisørsaloner, laboratorier, maskinindustri...

Standard eller individuelle løsninger

Tlf. 86 96 50 00 Fax 86 96 50 10
www.alsident.com e-mail: info@alsident.com



Figur 1. Spektrum af synkrotronstrålingen fra ASTRID. Til sammenligning er vist solens spektrum.

primær interesse for atomfysik (der foregår dog i øjeblikket særdeles interessante forsøg med molekylære ioner ved den mindre lagring ELISA, ligeledes ved ISA). Men når der lagres elektroner i ringen, frigives der såkaldt synkrotronstråling, når elektronerne accelereres. Den udsendte stråling dækker et meget stort spektralområde som vist på figur 1. For en nærmere redegørelse omkring ASTRID henvises til [2].

Der udsendes stråling, når de lagrede elektroner afbøjes i et magnetfelt – som f.eks. ved dipolmagneterne i lagringens »hjørner«. For at anvende strålingen som lyskilde etableres »beamlines« som tangenter til elektronernes bane i lagringens hjørner. UV1 er placeret ved en af de fire dipolmagneter, som ses bag den blå kappe på figur 2. Selve CD-instrumentet ses øverst til venstre, mens styrecomputeren kan skimtes til højre.

Synkrotronstrålingen er i meget høj grad lineært polariseret i det horisontale plan – og er derfor meget velegnet til f.eks. cirkulær dikroisme spektroskopi. I et traditionelt CD-instrument indsættes en simpel lineær polarisator efter lyskilden, og inden der genereres cirkulært polariseret lys. UV1 har specielt konstrueret optik, der sørger for at den lineært polariserede synkrotronstråling bevarer sin høje grad af polarisering. I et vakuum, som er direkte forbundet til lagringens vakuum, sidder et spejl, som fokuserer strålingen. Her sidder ligeledes to udskiftelige gitter: et til det synlige (700-300 nm) og et til det ultraviolette område (350-100 nm). Dette vakuum er adskilt fra CD-instrumentet med et calciumfluorid-vindue. Efter dette vindue omdannes det lineært polariserede lys til alternerende højre- og venstrehåndes cirkulært polariseret lys vha. en photo-elastisk modulator (PEM) med en modulations-frekvens på 50 kHz. Efter PEM'en fortsætter lyset til prøvekompartimentet, og CD-instrumentet ved UV1 er herefter konstrueret som et traditionelt CD-instrument. Lysstrålen passerer prøven og detekteres vha. et fotomultiplikatorrør. Signalet fra fotomultiplikatorrøret består af en jævnstrømsdel samt den lille vekselstrømskomponent ved 50 kHz, som stammer fra CD-signalet. Mens jævnstrøms-signalet holdes konstant ved at regulere spændingen over fotomultiplikatoren, så udtrækkes CD-signalet vha. en såkaldt lock-in-forstærker, som kun opfanger signaler, der varierer med 50 kHz. En nærmere beskrivelse af UV1 findes på ISA's hjemmeside (www.isa.au.dk), og en publikation er under udarbejdelse [3].



Figur 2. Foto af hjørnet af ASTRID, der hvor UV1-linien udtages.



Figur 3. Quartz Suprasil celle fra Hellma til CD-spektroskopi.

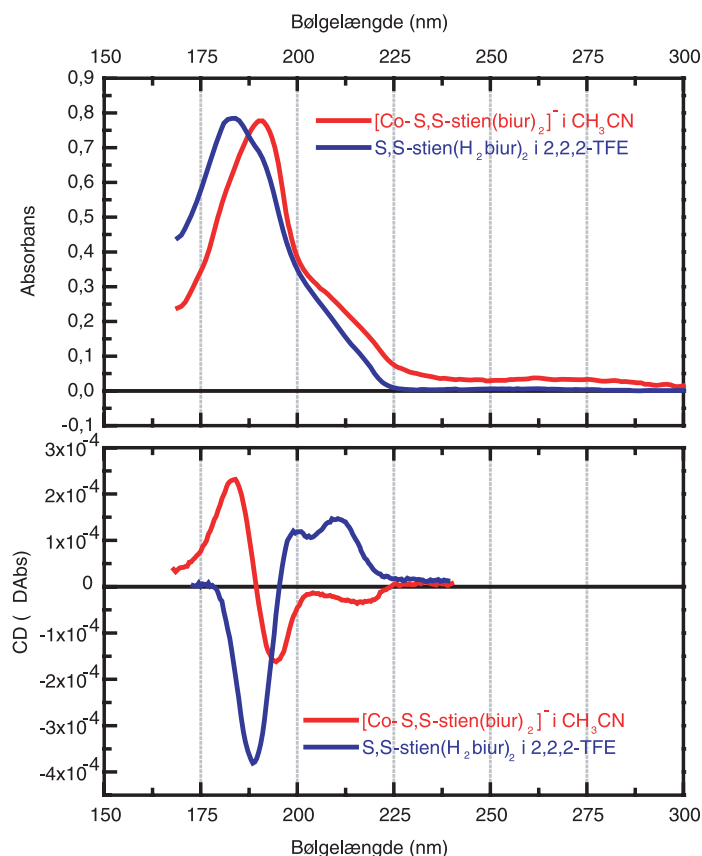
Hvordan måles der ved UV1?

Alt styring og dataopsamling ved UV1 foregår vha. en Windowsbaseret computer med et styreprogram programmeret i Visual Basic. Der er endda computerstyret temperaturkontrol af prøven vha. et Peltier-element i temperaturintervallet fra ca. -10 til $+80^{\circ}\text{C}$. Måling af CD og absorbans foretages i to separate målinger, idet CD-opstillingen ikke giver de bedste betingelser for detektion af prøvens samlede absorbans. Men med en let ombytning af et par kabler kan man optage fotomultiplikator-spændingen som funktion af bølglængden. Når dette er gjort for både prøve og en reference, er det let at beregne absorptionsspektret, idet absorbans er defineret som logaritmen til brøken af signalet for referencen over signalet for prøven.

Til såvel absorbans- som CD-målinger benyttes cirkulære kvartskuvetter, naturligvis af den bedste kvartskvalitet, som f.eks. Quartz Suprasil fra Hellma som er vist på figur 3. Kvaliteten af disse celler er af stor betydning, hvis man ønsker at måle ved bølglængder under 200 nm. Selv mindre ridser eller andre fejl i kvartsen har stor betydning for, hvor meget lys der kan komme igennem cellen. Andre faktorer har også indflydelse på tab af lys ved små bølglængder, og hvis man ønsker at måle i det fjerne ultraviolette område, er det derfor nødvendigt

Solvent	10 mm celle	0,1 mm celle
Pentan	190 nm	170 nm
2,2,2-Trifluorethanol	190 nm	170 nm
Vand	205 nm	172 nm
Acetonitril	190 nm	180 nm
Methanol	205 nm	186 nm

Tabel 1. Grænser for anvendelighed ved lave bølglængder for udvalgte solventer [4].



Figur 4. Absorption og CD-spektre i det fjerne UV af den neutrale ligand (S,S-stien(H₂biur)₂) og cobalt(III) forbindelsen ([Co-S,S-stien(biur)₂]⁺).

så vidt muligt at minimere lystabet på andre områder. Da oxygen i luften vil absorbere den hårde UV-stråling – og i øvrigt omdannes til ozon pga. den, er det nødvendigt at foretage en effektiv udskiftning af luften i prøvekommeret med nitrogen eller en anden inert gas. Da prøvekommeret er konstrueret med et meget lille volumen og den kortest mulige lysvej til detektor, er det som regel tilstrækkeligt at bruge en strøm på 3-5 liter nitrogen i minuttet. Den sidste måde at minimere lystabet på er naturligvis i prøve-præparationen. Det er klart, at der er en stor fordel i at minimere solventets absorption ved at bruge kvartsceller med meget kort vejlængde (fra 1 mm ned til 0,005

mm) og tilsvarende høj prøvekoncentration. Det er også muligt at vælge solvent med en vis omhu. Rent vand er ikke noget helt dårligt valg, D₂O er bedre, og endelig er der muligheden for en række forskellige organiske solventer som vist i tabel 1.

Som eksempel på spektre optaget ved UV1 er på figur 4 vist absorbans og CD-data for en cobalt(III) koordinationsforbindelse og den tilsvarende protoniserede ligand. Liganden er tetradentat, sammensat af to biuret-enheder med en bro afledt af chiralt stilbendiamin. Strukturformlen for kompleks og ligand er vist på figur 5. På et normalt spektrofotometer, der kan måle ned til 190 nm, har liganden et ganske uinteressant absorptionsspektrum, men ved UV1 kan man få meget mere information. Ud fra CD-spektrene af både ligand og koordinationsforbindelse kan man bl.a. få information om molekylernes konfiguration i opløsning. I begge tilfælde ses et exciton-bånd, hvor CD-signalet skifter fortegn ved en bølgelængde, der svarer til absorptionsmaksimum. Det er tegn på, at der er en vinkel forskellig fra 0 og 90 grader for de vekselvirkende biuret-chromoforer.

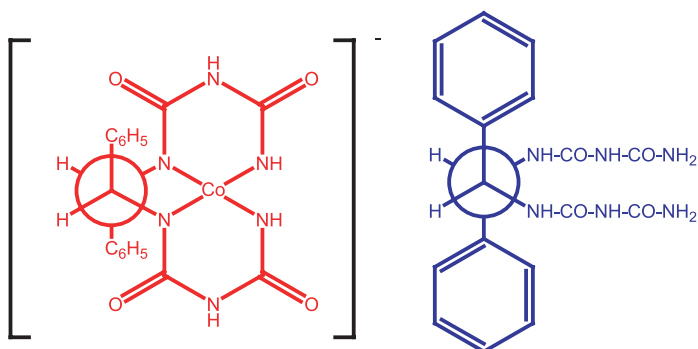
CD med synkrotronstråling er en teknik på vej frem

Der findes i øjeblikket ikke mange muligheder for at udøve CD-spektroskopi med synkrotronstråling (forkortet: SR-CD for Synchrotron Radiation CD), men det er en teknik, der ser ud til at være i fremgang. Der findes p.t. kun tre SR-CD-faciliteter: Én ved National Synchrotron Light Source (NSLS) ved Brookhaven National Laboratory (USA) [5], én ved Synchrotron Radiation Source (SRS) i Daresbury (UK) [6] og endelig UV1 ved ASTRID. Der er dog i øjeblikket planer om at etablere SR-CD-faciliteter flere steder ved synkrotronfaciliteter rundt om i verden. Som nævnt er det, der adskiller synkrotronstrålingen fra konventionelle lyskilder, at lysintensiteten er langt højere, hvilket giver mulighed for at få et meget bedre signal/støj-forhold i datamaterialet. Man kan således på kortere tid få data af en bedre kvalitet, og dermed udvides mulighederne også for at anvende CD som teknik til at studere dynamiske fænomener. Den største fordel ved synkrotron-lyskilden og UV1-målestationen må dog nok siges at være muligheden for at optage CD- og absorptionsspektre af molekyler i opløsning helt ned til ca. 160 nm. Nogle vil måske tænke, at det netop primært er fysikere, der er interesseret i så hård UV-stråling. Men det er et faktum, at der ved at studere CD-spektre i det fjerne UV-område er store mængder information at hente om struktur og dynamik af biologiske makromolekyler som proteiner og DNA. Det er specielt muligheden for at studere proteinstruktur i vandig opløsning, som gør SR-CD så attraktiv.

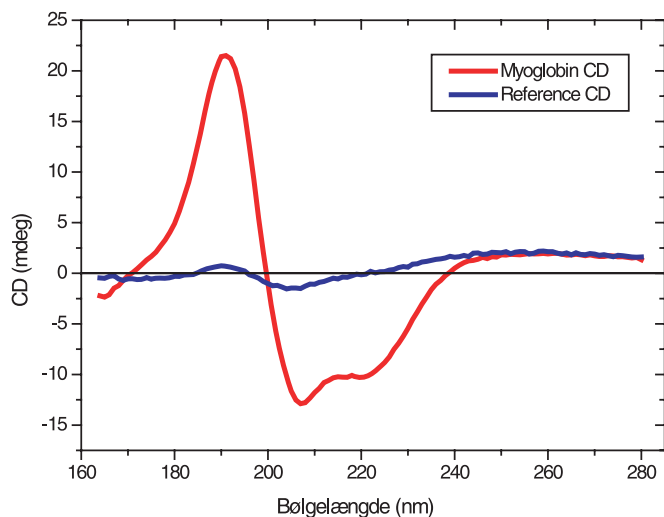
På figur 6 er vist et eksempel på rå data fra UV1 uden nogen form for manipulation. Det er et CD-spektrum af myoglobin opløst i 2,2,2-trifluorethanol (ca. 5mg/mL) med tilhørende referencespektrum, begge i en 0,005 mm kvartscelle. Reference-spektret af solventet viser selve instrumentets baggrundssignal. Spektret er skåret af ved 163 nm, hvor lystabet bliver for stort til, at detektoren kan følge med. Der er skannet fra 280 til 160 nm med skridt på en nm og en tælle tid på seks sek. for hvert målepunkt. Prøven er skannet to gange, referencen kun en gang, hvilket giver en samlet måle tid på 1 time. CD-spektret for myoglobin er typisk for proteiner med højt indhold af α-helix: to negative bånd ved 220 nm og 208 nm, samt et kraftigt positivt bånd ved 190 nm. Spektret af myoglobin i 2,2,2-trifluorethanol er meget lig spektret for en vandig opløsning, selvom det fluorerede solvent normalt modificerer proteinstruktur [7].

Cirkular dikroisme af biologiske molekyler

Hvordan kan man i praksis anvende CD til analyse af proteinstruktur? Svaret på dette spørgsmål ligger i, at de forskellige,



Figur 5. Repræsentation af strukturen for liganden S,S-stien(H₂biur)₂ og cobalt(III) forbindelsen [Co-S,S-stien(biur)₂]⁺.



Figur 6. CD-spektrum af myoglobin opløst i 2,2,2-trifluorethanol samt referencespektrum af solventet.

velkendte sekundære strukturelementer for proteiner har helt karakteristiske CD-spektre [8]. Disse karaktertræk opstår ved, at de enkelte peptid-kromoforer kobler med hinanden og danner et »makroskopisk« CD-signal, som er afhængigt af peptid-kromoforenes rumlige orientering. Således giver α -helix, β -sheets, β -turns og random-coil unikke CD-spektre. CD-spektrum for et vilkårligt protein kan opfattes som en sum af spektrale bidrag fra disse forskellige sekundære strukturer. Ud fra et basis-sæt af CD-spektre for proteiner og peptider med velkendt sekundær struktur er det muligt at foretage en beregning af bidrag fra de forskellige sekundære strukturelementer i et eksperimentelt CD-spektrum for en proteinopløsning. Metoden må dog påregnes at have en rimelig stor usikkerhed, hvis man ikke har et meget godt (støjfrit) datamateriale og helst med data til så lave bølgelængder som muligt [9].

Gruppen omkring SR-CD-faciliteten i Daresbury har været meget aktive omkring anvendelsesmulighederne af teknikken til strukturanalyse af proteiner. De har bl.a. etableret en omfattende internetside DICHROWEB: www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb, hvor der adgang til online-analyse af CD-data med en række af de mest udbredte programmer. Fra Daresbury brugergruppen er der også planer om at etablere to helt nye databaser med protein-CD-spektre, så man får udvidet mulighederne for strukturanalyse ved CD. Én database skal være for membranproteiner, som er utrolig svære at krystallisere og derfor vil være meget interessante at studere med CD. Det er nødvendigt med en separat database for membranproteiner, idet de normalt har lidt

ændrede CD-spektre pga. de associerede lipider. Den anden database skal dække proteiner i vandig opløsning, men med et datamateriale der udnytter hele SR-CD-spektralområdet, dvs. ned til 160 nm. For nylig har B.A. Wallace fra brugergruppen i Daresbury publiceret SR-CD-data, der tydeligvis viser, at man ved CD-signaler under 170 nm faktisk ikke bare kan skelne mellem sekundære strukturelementer af proteiner, men også kan skelne tertiære foldningsmotiver [10]. Disse meget opsigtsvækkende observationer og fortolkninger er dog ikke bekræftet uafhængigt på nuværende tidspunkt.

Ud over den umiddelbart tilgængelige information om proteiners sekundære struktur har SR-CD en stor rolle at spille ved studier af strukturelle ændringer af proteiner. Pga. det forbedrede signal/støj-forhold, kan man optage CD-spektre hurtigt. Derved kan man lettere studere ting som proteinfoldning og -stabilitet, som funktion af eksterne faktorer som temperatur, pH, solvent osv. Men også hurtige kinetiske målinger er mulige ved brug af f.eks. stopped-flow-teknikker [11].

Muligheder for nye brugere ved UV1

UV1 er tilgængelig for interesserede brugere i det omfang, der er tilgængelig måletid. Man ansøger om at få måletid ved henvendelse til ISA. Afhængig af den enkelte brugers behov vil der kunne træffes aftale omkring teknisk assistance eller et egentlig samarbejde med ISA. Som beskrevet er der mulighed for både at måle absorption og CD af såvel opløsninger som gasser. Selvom vi ikke har lagt vægt på det i denne artikel, er UV1 også særdeles interessant for f.eks. atmosfærekemikere, der kan udnytte den hårde UV-stråling som ASTRID og UV1 kan levere.

IASTRID kan der som nævnt lagres både ioner og elektroner. Men dette gøres naturligvis ikke på samme tid. Året er inddelt i fire perioder, to med ionlagring og to med elektronlagring. Den næste periode med elektronlagring, og dermed synkrotronstråling er fra den 21. januar til den 5. maj 2002. Man kan i øvrigt finde en mere detaljeret tidsplan og også den øjeblikkelige status for ASTRID på ISA's hjemmeside.

Referencer

1. Rodger, A. & Nordén, B.: Circular Dichroism & Linear Dichroism. Oxford University Press, UK (1997).
2. Hertel, N.; Pape Møller, S.: Lagringen ASTRID og hendes lillesøster ELISA. KVANT, Danmark; 10(3): 3-11 (1999).
3. Hoffman, S.V. & Kenney, J.: A UV-Visible Synchrotron Radiation Beamline for Circular Dichroism and UV Photo-absorption. Manuscript In Preparation.
4. Lambert, J.B., Shurvell, H.F., Lightner, D.A. & Cooks, R.G.: Organic structural spectroscopy. Prentice Hall, USA (1998).
5. Sutherland, J.C., Emrick, A., France, L.L., Monteleone, D.C. and Trunk, J.: Circular Dichroism User Facility at the National Synchrotron Light Source: Estimation of Protein Secondary Structure. Biotechniques 13(4): 588-590 (1992).
6. Clarke, D.T. and Jones, G.R.: Extended Circular Dichroism Measurements Using Synchrotron Radiation Show That the Assembly of Clathrin Coats Requires No Change in Secondary Structure. Biochemistry 38:10457-10462 (1999).
7. Buck, M.: Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. Quar.Rev.Biophys 31(3):297-355 (1998).
8. Johnson, W.C. Jr.: Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. Ann.Rev.Biophys.Biophys.Chem. 17:145-166 (1988).
9. Johnson, W.C. Jr.: Protein secondary structure and circular dichroism: A practical guide. PROTEINS: Structure, function and genetics 7:205-214 (1990).
10. Wallace, B.A. & Janes, R.W.: Synchrotron radiation circular dichroism of proteins: secondary structure, fold recognition and structural genomics. Curr.Opin.Chem.Biol. 5:567-571 (2001).
11. Wallace, B.A.: Conformational change by synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy. Nat.Struct.Biol.7(9):708-709 (2000).

Er du interesseret i at ansøge om måletid ved UV1?

Kontakt da:
Søren Pape Møller (e-mail: fyssp@ifa.au.dk;
telefon 89423778)

Institute for Storage Ring Facilities (ISA)
Aarhus Universitet
Ny Munkegade, Bygn. 520
8000 Aarhus C
www.isa.au.dk