

Lektion 1 (CD-spektroskopi)

Uppgift 1:1

- a) I vänsterspalten visas CD-spektra som funktion av våglängden. I högerspalten visas ellipticiteten vid en vald våglängd (216 nm) som funktion av temperaturen. Vi kan i högerspalten läsa av ellipticiteten för proteinet vid 216 nm både i sin nativa form, vid låg temperatur (innan denaturering) och i sin denaturerade form (hög temperatur, efter denaturering). Om vi jämför med figuren i vänsterspalten så måste alltså den svarta kurvan som motsvarar veckat protein.
 - OBS: mängden struktur behöver inte vara ett bevis på vilken form som är veckat. Ett kokt ägg innehåller mycket protein i denaturerad form som är strukturerat (β -sheet). Den aktiva, nativa formen kan ha lågt strukturinnehåll!
- b) Ur högerspaltens diagram kan vi avläsa att den mutant som har störst negativ ellipticitet vid 216 (β -sheet) i sitt nativa tillstånd (svart linje) är rSm14-M20. Det tyder på högst strukturinnehåll eftersom ett negativt ellipticitetsmaximum vid denna våglängd indikerar β -struktur.
- c) Det denaturerade tillståndet verkar innehålla random coil (negativt maximum vid 200 nm) men även något annat. Att döma av intensiteterna är random coil-bidraget störst (200 nm), men skuldran vid ca 220 nm tyder på tendenser till helix- eller sheet-bildning. Den otydliga skuldran gör att vi inte riktigt kan säga vilket det skulle kunna vara av helix eller sheet. Det kan också vara en dynamisk struktur som bildas transient ('blinker till') under kortare eller längre tid i det uppveckade proteinet.
- d) Om vi jämför denatureringskurvorna för de olika mutanterna ser vi att rSm14-M20 har högst smältpunkt (mittpunkten på denatureringskurvan, vi kallar denna punkt för smältpunkten, T_m). Det betyder att det protein som har mest struktur också är stabilast. Det behöver inte nödvändigtvis vara så men i det här fallet är det på det sättet.

Uppgift 1:2

- a) I detta våglängdsområde (Far-UV) absorberar peptidgruppen, och genom att studera ellipticiteten (hur den vrider ljus, skillnaden mellan absorbans av höger- och vänsterpolariserat ljus) kan man med CD få en uppfattning om sekundärstruktur-innehåll. Vid 222 nm har α -helix-struktur ett negativt maximum i ellipticitet, och utslaget är proportionellt mot mängden helix. Helixinnehållet kan alltså uppskattas ur storleken på signalen.
- b) Mängden helix ökar eftersom det negativa signalutslaget från 0 ökar.
 - OBS: det är differensen- skillnaden- mellan komplexet och de ingående komponenterna som visas,
 - OBS: det är inget spektrum som visas i den vänstra figuren, utan en titreringskurva! Titta på axlarna!
- c) För apo 1:1 och för holo 2:1 (peptid:CaM). Fram till dessa kvoter ökar absolutvärdet av ellipticiteten nästan linjärt, men efter att 1:1 resp 2:1 förhållanden uppnåtts sker inte längre någon ändring i ellipticiteten, vilket tyder på att bindningen är mättad.
- d) I våglängdsområdet i den högra bilden (Near-UV) absorberar aromater (Trp, Tyr, Phe), och signifikanta utslag i CD i detta område tyder på

ordnade sidokedjor (som alltså vrider polariserat ljus i en preferentiell riktning).

- e) I Tr1C blir både ellipticiteten och finstrukturen mer uttalad i närvaro av peptid. Det innebär troligen att tryptofaner och/eller phe/tyr blir mer ordnade i komplexet. Detta kan ske antingen genom att Trp finns i interaktionsytan, eller att core blir mer ordnat.

Uppgift 1:3

- a) Det nativa proteinet, som har stor andel helixstruktur, vecklar upp sig till random-konformation vid 75 °C. Vid ytterligare höjd temperatur bildas β -struktur (minimum vid 216 nm) som sedan bibehålls då proteinet kyls ned till 25 °C.
- b) Kanske proteinet bildar fibriller/plack, som ju innehåller stor mängd β -struktur? Kan dessa isåfall aggregera och accumuleras i cancercellerna?
- c) Spektra som visats gäller bara vildtypen. Det vore intressant att se hur mutationerna påverkar proteinets struktur- och fibrillbildningsegenskaper.