

# Skripta iz predmeta Biofizička hemija 1

## 2

### Cirkularni dihidroizam (CD)

Ana Popović Bijelić

2023.

Citirati kao:

Ana Popović Bijelić, Skripta iz Biofizičke hemije 1, Univerzitet u Beogradu – Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, 2023.

Dihroizam = dve boje (grčki)



Određeni minerali, poput turmalina, imaju različite boje kada se posmatraju duž različitih kristalnih osa.

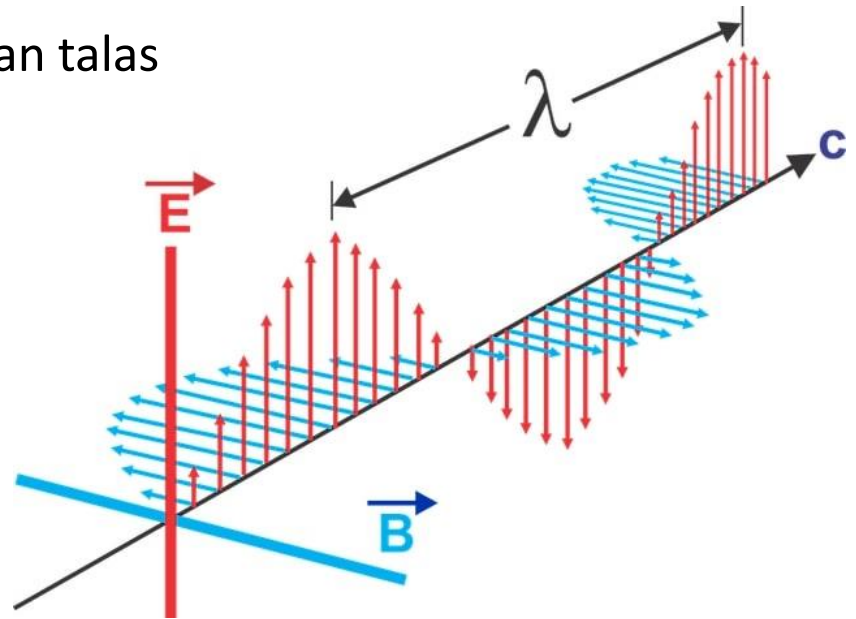
Cirkularni dihroizam (CD)

**CD je osobina** nekih molekula da različito apsorbuju levo i desno cirkularno polarizovanu svetlost.

**CD je spektroskopska tehnika** koja meri razliku u apsorpciji levo i desno cirkularno polarizovane svetlosti.

## Pojmovi:

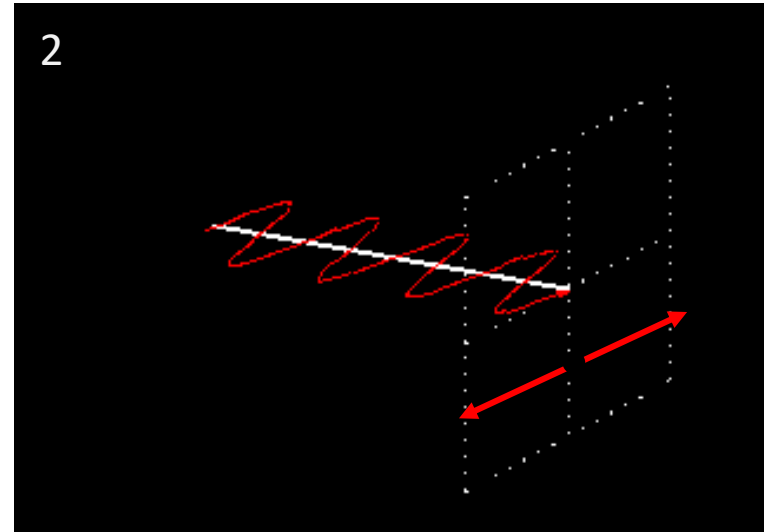
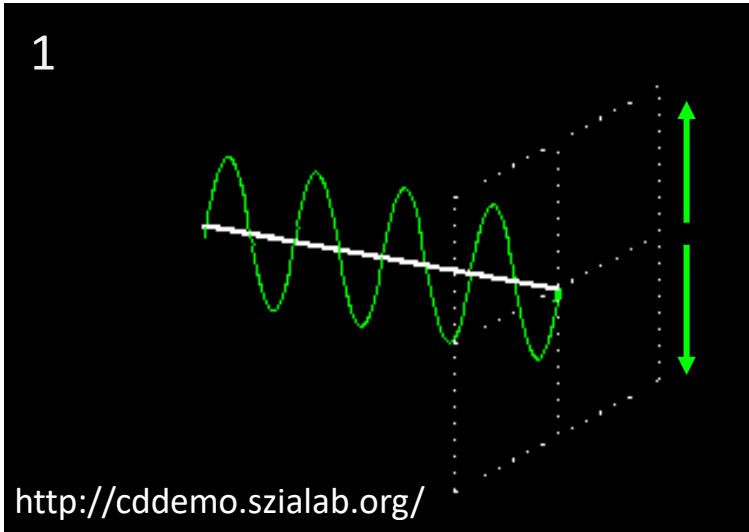
- Elektromagnetni (EM) talasi
- **Linearno (ravanski, planarno) polarizovan** talas
- **Cirkularno** polarizovan talas
- **Eliptično** polarizovan talas



EM talas se sastoji od električne i magnetne komponente koje osciluju normalno jedna na drugu, periodično u vremenu i prostoru.

**Linearno polarizovan EM talas** – električna komponenta osciluje samo u jednoj ravni (i magnetna komponenta osciluje u jednoj ravni koja je normalna na ravan u kojoj osciluje električna komponenta).

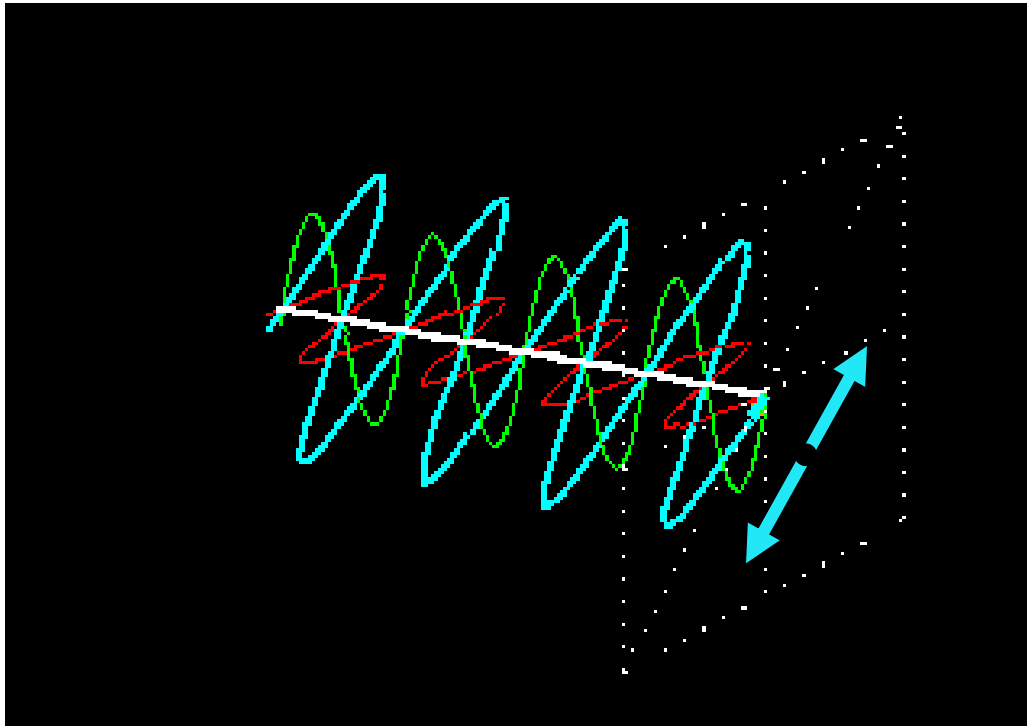
# Linearno (ravanski) polarizovan talas



Da bi nam bilo lakše za razumevanje, razmatramo samo električnu komponentu EM talasa: ako vektor električnog polja osciluje duž prave linije (shematski prikazano strelicama) onda je to linearno tj. ravanski polarizovan talas. Na slikama su prikazani linearno polarizovani talasi u vertikalnoj (zeleni) i horizontalnoj (crveni) ravni.

Ako ova dva linearno polarizovana talasa, zeleni i crveni, osciluju zajedno u dve ravni koje su normalne jedna na drugu, sabiraju se njihovi vektori električnog polja i nastaje novi talas, prikazan plavom bojom na sledećoj stranici. Osobine ovog novog talasa zavise od amplitude, talasne dužine i fazne razlike između crvenog i zelenog talasa.

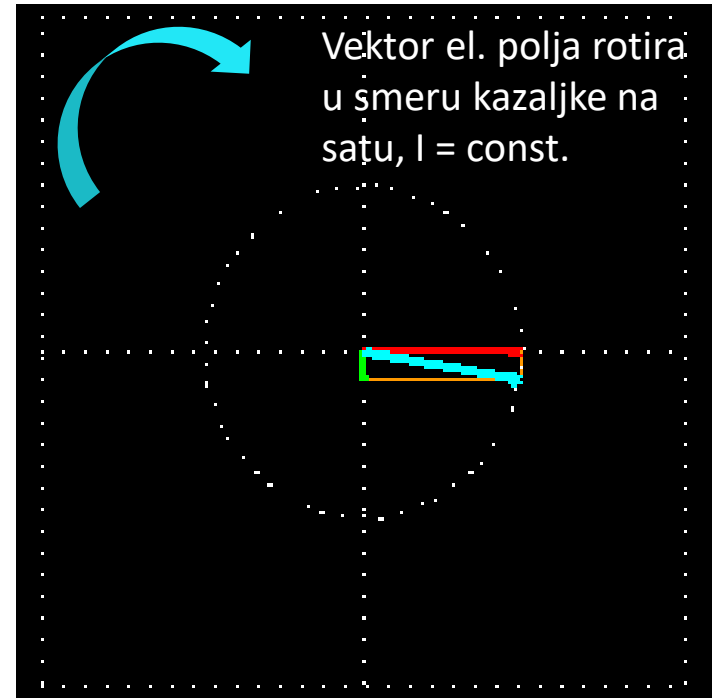
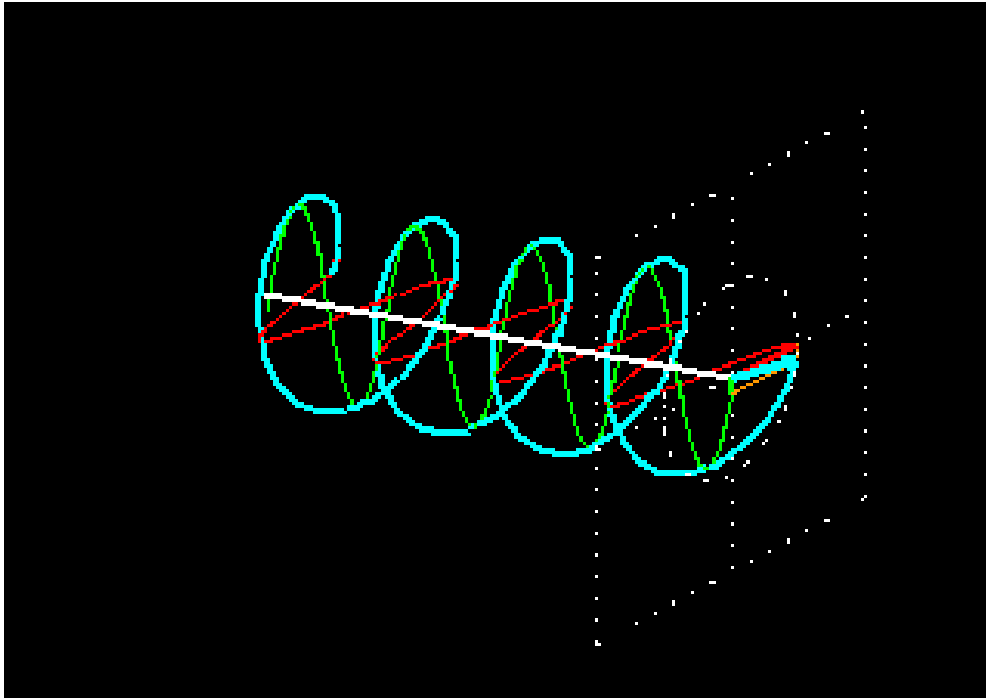
Ako dva ravanski polarizovana talasa koji imaju **iste  $A$ ,  $\lambda$  i fazu** osciluju u dve normalne ravni – vektori električnog polja se sabiraju i nastaje novi ravanski polarizovan talas.



Vektor električnog polja osciluje duž prave linije (plave strelice označavaju oscilovanje po dijagonali kvadrata iz nule).

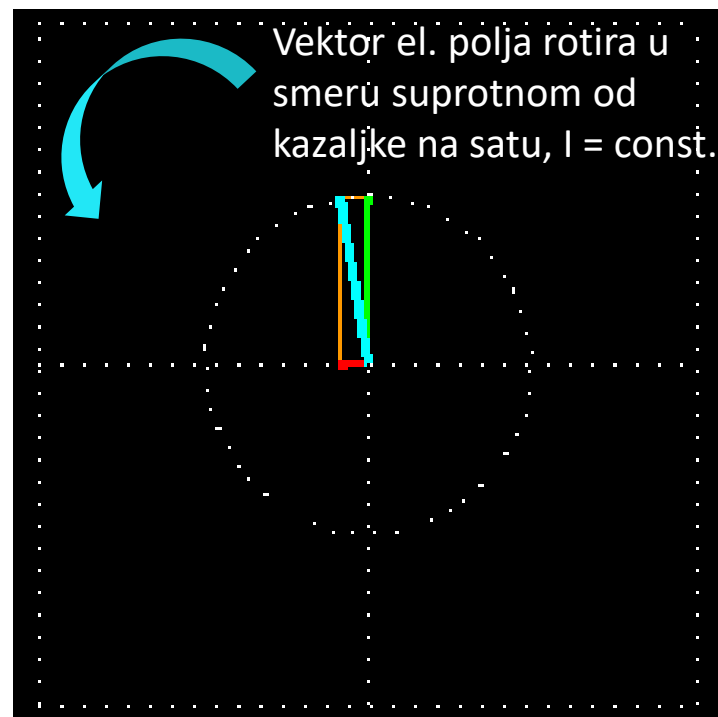
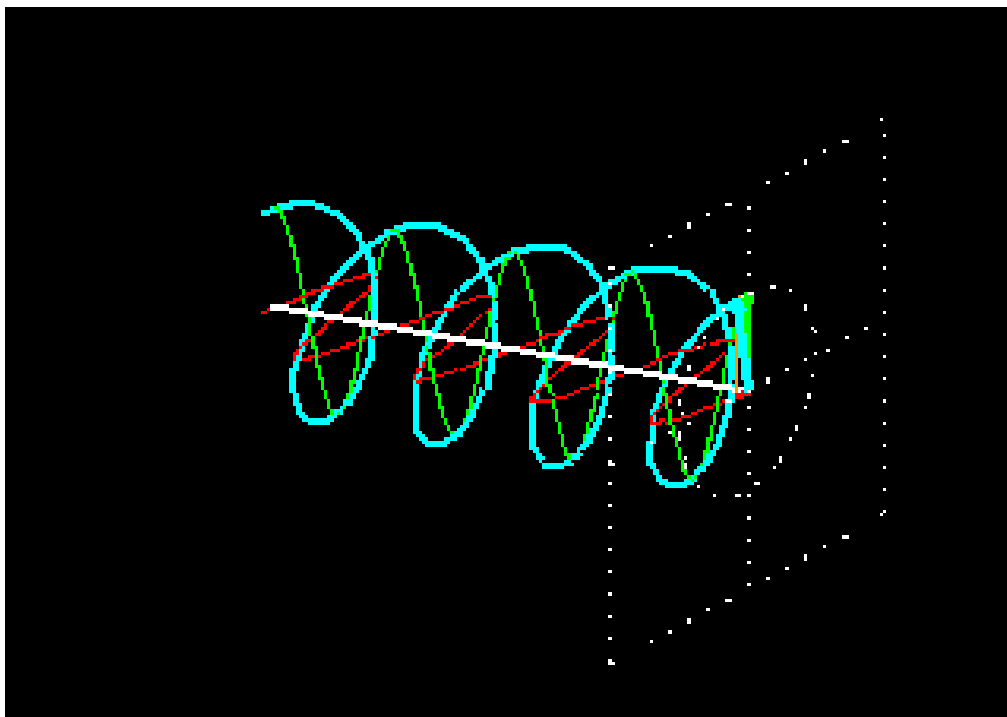
**Plavi talas:** superpozicija crvenog i zelenog.  
Rezultat je ponovo **ravanski polarizovan talas**.

Ako dva ravanski polarizovana talasa koji imaju **iste A** i  $\lambda$ , ali sa **faznom razlikom od 90°**, osciluju u dve normalne ravni – vektori električnog polja se sabiraju i nastaje cirkularno polarizovan talas.



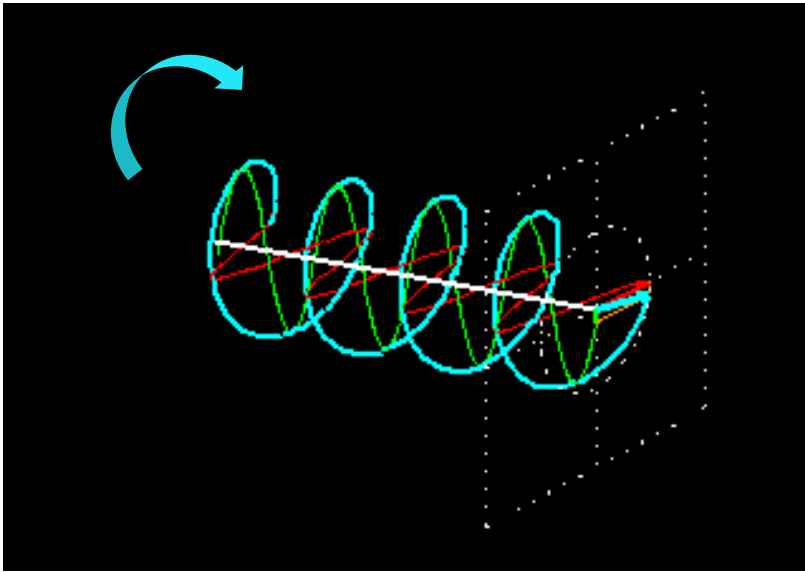
**Plavi talas:** superpozicija crvenog i zelenog.  
Rezultat je **cirkularno polarizovan talas**.

Ako dva ravanski polarizovana talasa koji imaju **iste  $A$  i  $\lambda$** , ali sa **faznom razlikom od  $-90^\circ$** , osciluju u dve normalne ravni – vektori električnog polja se sabiraju i ponovo nastaje cirkularno polarizovan talas, ali sada vektor električnog polja rotira u suprotnom smeru.

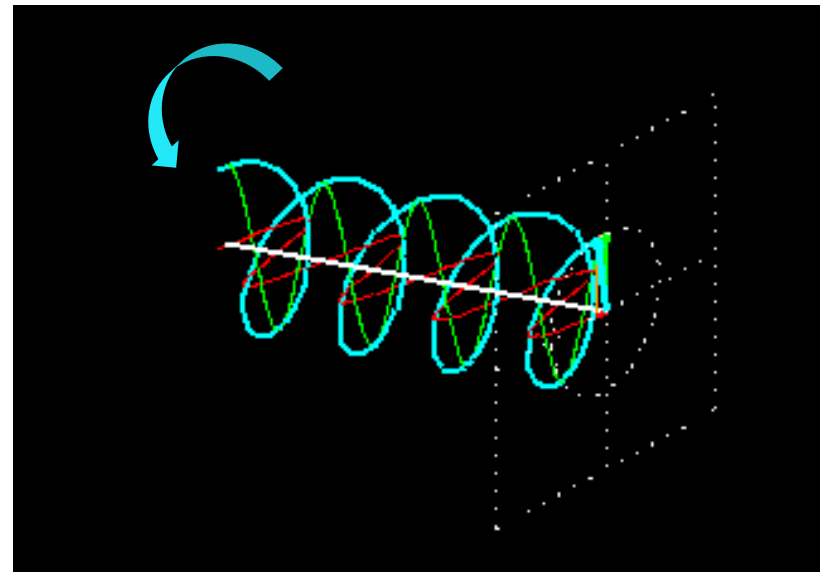


**Plavi talas:** superpozicija crvenog i zelenog.  
Rezultat je **cirkularno polarizovan talas**.

## Desno i levo cirkularno polarizovani talasi



Izgleda kao **desna spirala**, rotira u smeru kazaljke na satu.



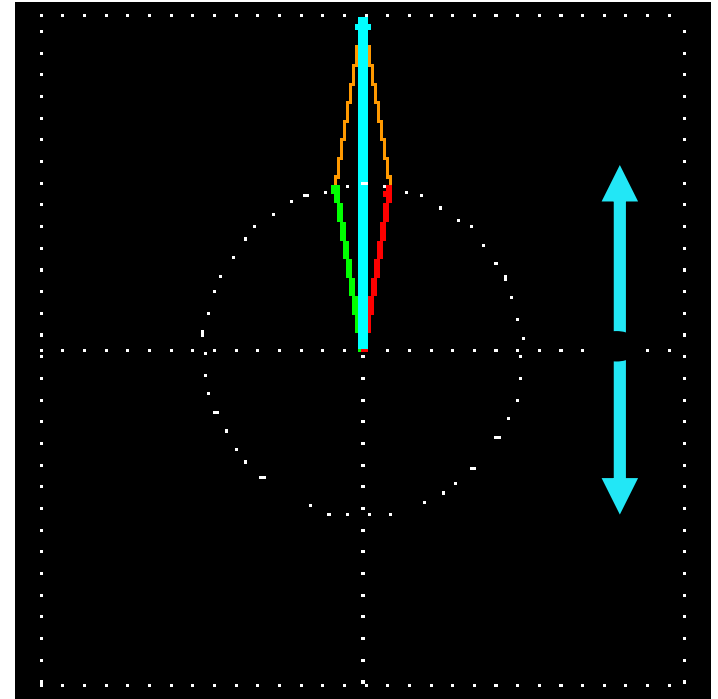
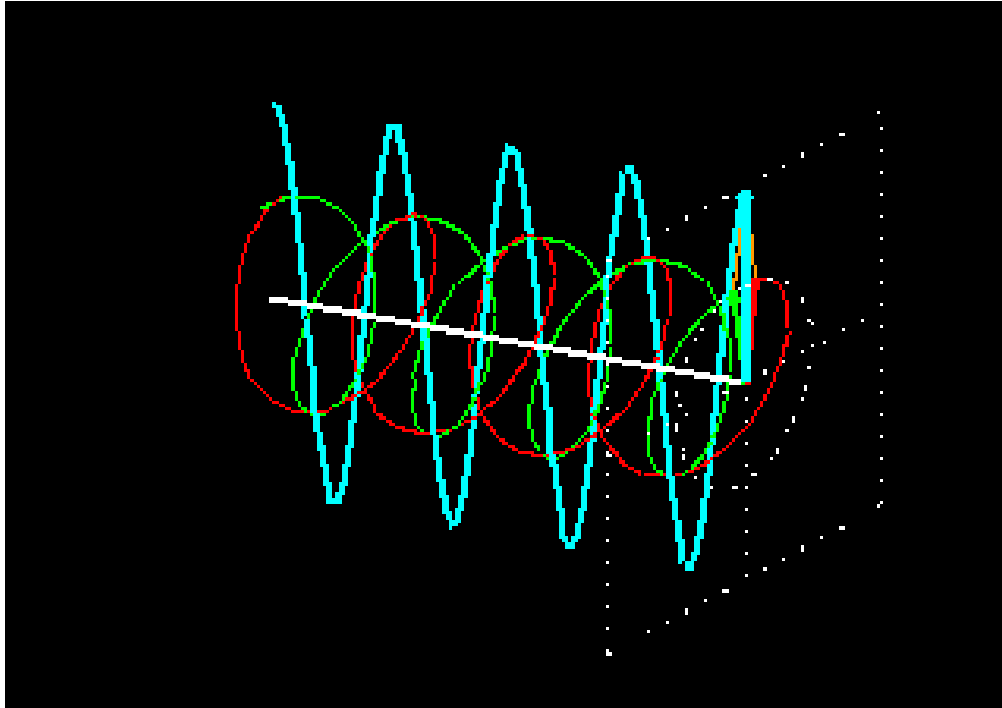
Izgleda kao **leva spirala**, rotira u smeru suprotnom od kazaljke na satu.

Odavde potiču nazivi levo i desno cirkularno polarizovana svetlost.

Ako ova dva cirkularno polarizovana talasa, desni i levi, koji imaju iste  $A$  i  $\lambda$ , osciluju u fazi u dve ravni koje su normalne jedna na drugu, oni se sabiraju i daju **ravanski polarizovan talas**. Znači možemo da zaključimo da **ravanski polarizovan talas može nastati superpozicijom levo i desno cirkularno polarizovanih talasa**.



Superpozicijom dva cirkularno polarizovana talasa sa istim  $A$ ,  $\lambda$  i fazom nastaje **ravanski polarizovan talas**.



Na ovom fenomenu se zasniva princip CD merenja:  
svaki ravanski polarizovan talas može nastati superpozicijom levo  
i desno cirkularno polarizovanih talasa sa istim amplitudama.

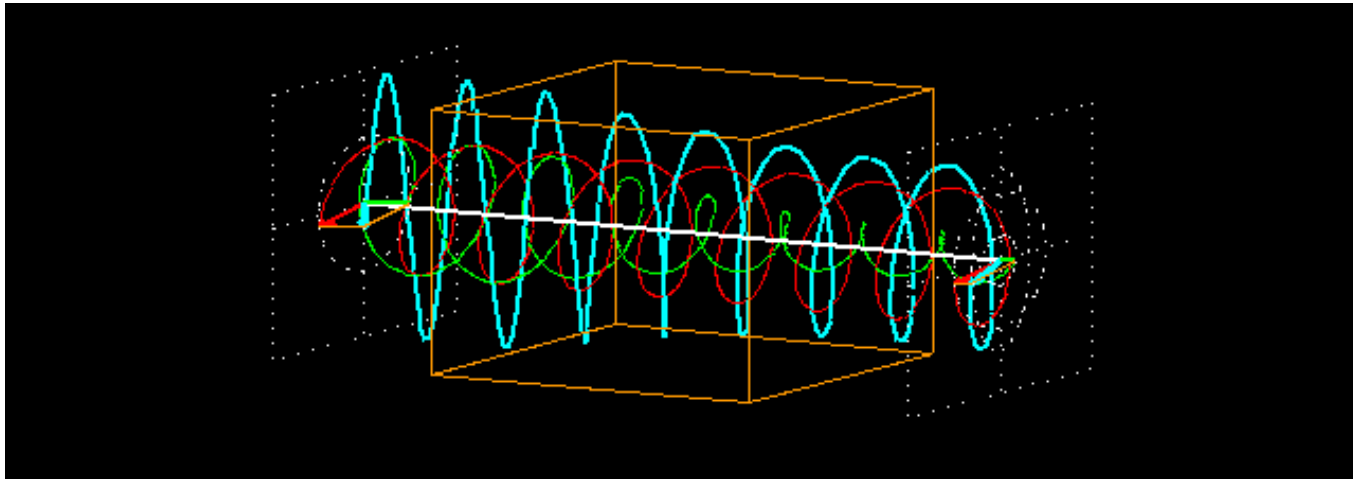
## Cirkularni dihroizam – suština

Na određenoj  $\lambda$ , **hiralni** molekuli različito apsorbuju levo i desno cirkularno polarizovanu svetlost.

Zbog toga, kad ravanski polarizovan talas prođe kroz takvu supstanciju, leva i desna komponenta neće biti apsorbovane u istim % i rezultujući talas (nakon izlaska iz supstancije) će biti eliptično polarizovan.

Elipticitet može da se izmeri i da pruži informacije o sekundarnoj strukturi proteina. Detaljnije objašnjenje je u nastavku.

Na primer, ako **ravanski polarizovan talas** prolazi kroz hiralnu supstanciju koja NE apsorbuje njegovu **levo cirkularno polarizovanu komponentu** ali delimično apsorbuje **desno cirkularno polarizovanu komponentu** – kao rezultat nejednake apsorpcije L i D komponenti, nakon prolaska kroz supstanciju talas će biti **eliptično polarizovan**.



Šta se dešava:

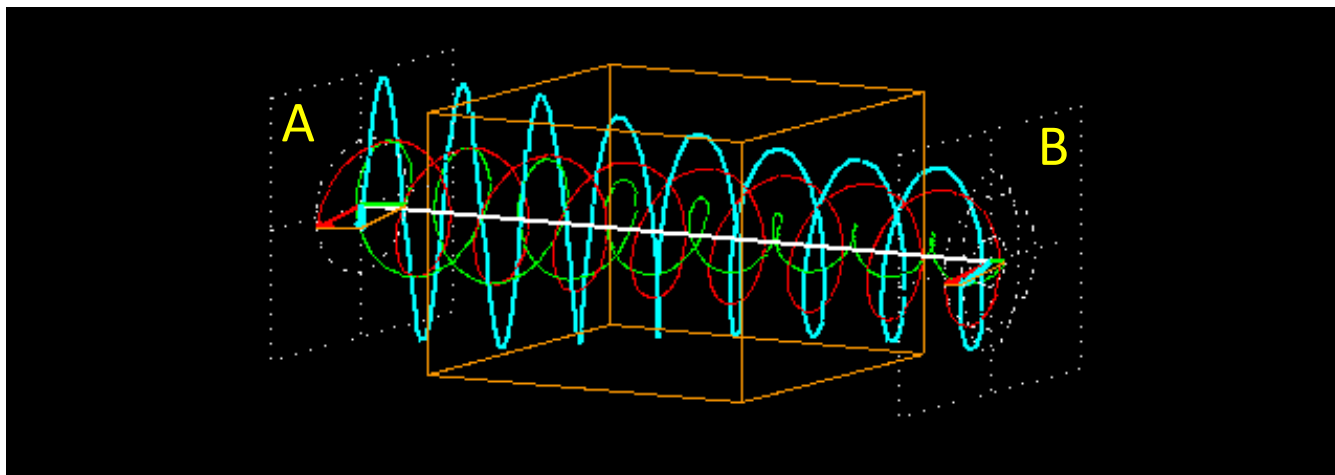
Crvena komponenta prolazi kroz supstanciju nepromenjena.

Intenzitet zelene komponente slabi dok prolazi kroz supstanciju.

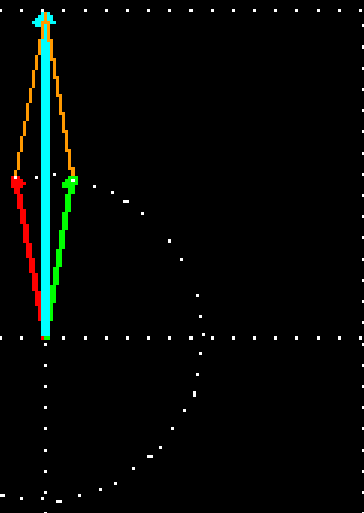
Tako da kad oba prođu kroz supstanciju, njihovom superpozicijom više neće nastati ravanski, već **eliptično polarizovan talas** (rezultujući vektor električnog polja rotira duž eliptične putanje).

Ulaz

Izlaz

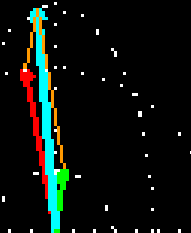


A



**Ravanski polarizovan talas**

B



**Eliptično polarizovan talas**

# Osnovno

## Koncept

Kada **ravanski** polarizovana svetlost prođe kroz **hiralnu** supstanciju nastaje **eliptično** polarizovana svetlost, zato što **hiralni** molekul različito apsorbuje **levo i desno cirkularno** polarizovanu svetlost (tj. ima različite **molarne ekstinkcione koeficijente** ( $\epsilon$ ) za levo i desno cirkularno polarizovanu svetlost).

## CD spektroskopija

- CD spektroskopija meri razliku u apsorpciji levo i desno cirkularno polarizovane svetlosti koja je posledica strukturne asimetrije.
- CD spektroskopija je vrsta **apsorpcione** spektroskopije.

## CD spektar

- CD spektar je grafički prikaz zavisnosti molarog elipticiteta neke supstancije od talasne dužine upadnog zračenja,  $[\theta] = f(\lambda)$ .
- CD spektar proteina je odraz njegove sekundarne strukture.

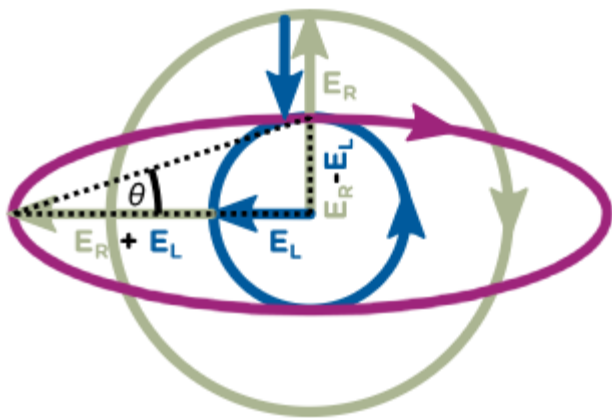
Sa prethodnog slajda: CD spektroskopija meri razliku u apsorpciji levo i desno cirkularno polarizovane svetlosti merenjem elipticiteta.

Elipticitet se definiše kao  $\theta = 32,98 \Delta A$

$\theta$  je veoma mali ugao, jedinice su milistepeni.

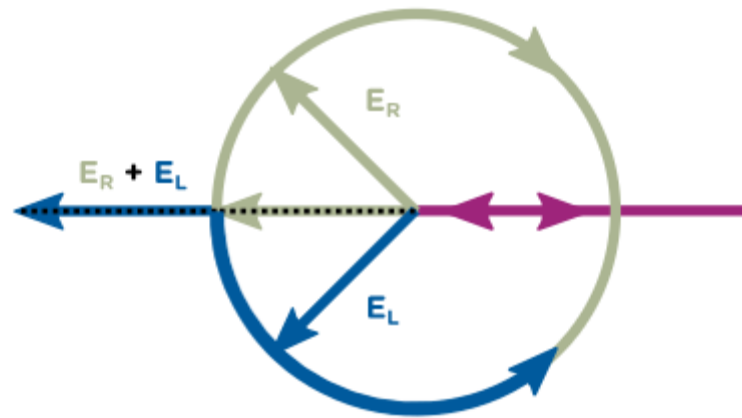
$\Delta A = A_L - A_R$  je razlika u apsorbancijama (L-levo, R-desno)

Za  $A_R < A_L$



$\tan \theta = (E_R - E_L)/(E_R + E_L) \approx \theta$   
(aproximacija važi samo za male uglove)

Za  $A_R = A_L$



Supstancija ne poseduje osobinu cirkularnog dihroizma.

Da bi poredili  $\theta$  za uzorke različitih koncentracija, treba izraziti  $\theta$  po jedinicama koncentracije, pa se uvodi:

**Molarni elipticitet  $[\theta] = 3298 \Delta\varepsilon$**  (jedinice su  $\text{stepen}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$ )

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_{\text{levo}} - \varepsilon_{\text{desno}}$$

$\varepsilon$  - molarni ekstinkcioni koeficijent

Da bi se izračunao  $[\theta]$  moraju da se znaju  $c$ ,  $M_r$ ,  $l$

$c$  - koncentracija uzorka (g/L)

$M_r$  - mol. masa uzorka (g/mol)

$l$  – dužina optičkog puta (cm)

Rekli smo da **hiralna** supstancija ima različite **molarne ekstinkcione koeficijente** ( $\epsilon$ ) za levo i desno cirkularno polarizovanu svetlost, ali ima i različite **indekse prelamanja** ( $n$ ) za levo i desno cirkularno polarizovanu svetlost.

- **Različiti  $\epsilon$**  uzrokuju različitu **apsorpciju** desno i levo cirkularno polarizovane komponente i rezultuju pojavom cirkularnog dihiroizma.
- **Različiti  $n$**  uzrokuju različitu **refrakciju** desne i leve komponente i rezultuju pojavom cirkularne birefringencije (birefrakcije, dvostrukog prelamanja). Ovaj fenomen još nazivamo i **optička rotacija** - pojava rotacije ravni ravanski polarizovane svetlosti prilikom prolaska svetlosti kroz optički aktivan uzorak. Optička aktivnost se određuje polarimetrijski ( $d(+)$  i  $l(-)$  optički izomeri).

Konkretno, kada ravanski polarizovana svetlost prolazi kroz hiralnu supstanciju, svaka cirkularna komponenta (leva i desna) putuje malo drugačijom brzinom jer ima drugačiji indeks prelamanja. Zbog toga, nakon izlaska iz supstancije, postoji fazna razlika između leve i desne komponente. Novi zbir dva vektora električnog polja će biti ravanski polarizovana svetlost koja je rotirana od prvobitne ravni. Stepenn rotacije zavisi od specifične rotacije materijala, njegove koncentracije, talasne dužine svetlosti i dužine putanje kroz materijal.

**Refrakcija** nastaje usled interakcije svetlosti sa materijom - dolazi do smanjenja brzine kretanja svetlosti kroz materiju i to tako da frekvencija ostaje ista, a talasna dužina se menja. Indeks prelamanja predstavlja odnos brzina kretanja svetlosti kroz vakuum i kroz dati materijal,  $n = c_0/c$ , i zavisi od talasne dužine upadne svetlosti,  $n = f(\lambda)$ .

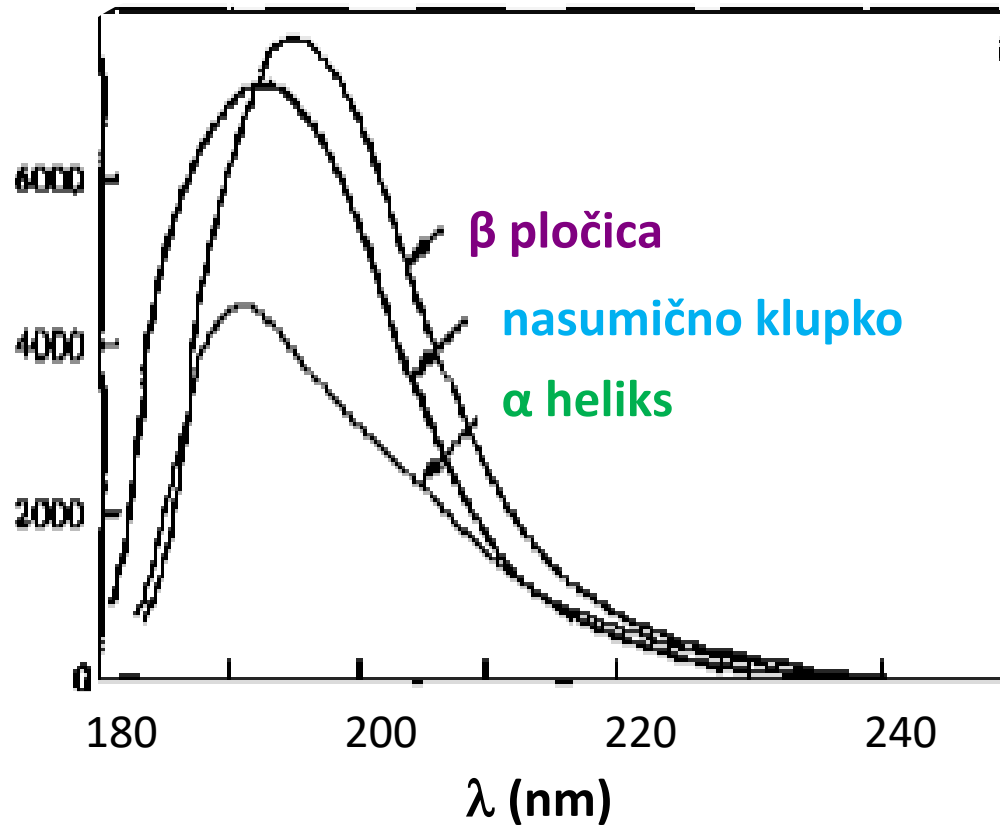
Cirkularni dihiroizam i optička rotacija su posledice strukturne asimetrije tj. **hiralnosti** supstancije.



Osnovna primena CD je za  
**određivanje sekundarne strukture proteina**



Apsorpcioni spektri tri proteina sa različitim sekundarnim strukturama su prikazani niže:

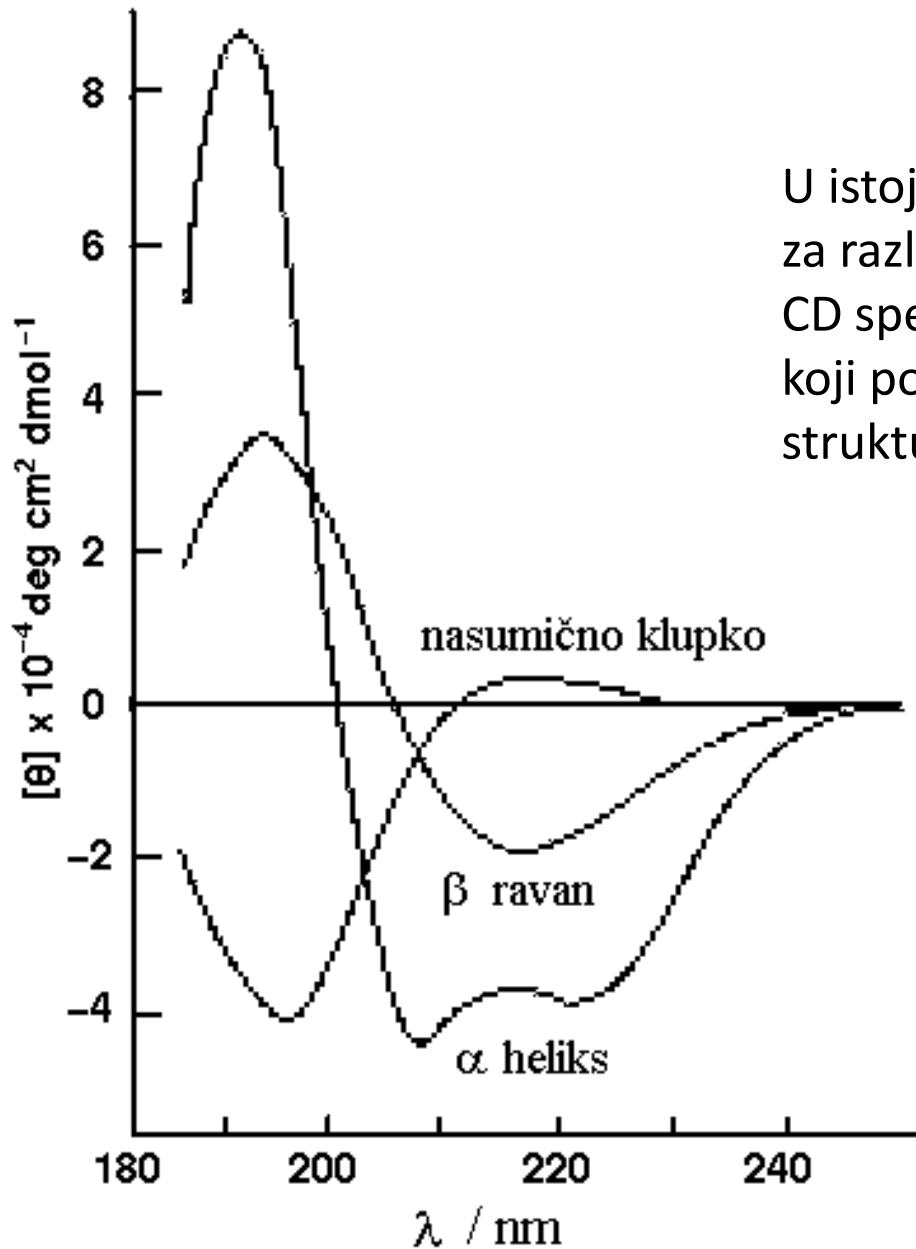


Sekundarnu strukturu **ne možemo** odrediti iz apsorpcionog spektra.

Sa slike se vidi da razlike u spektrima različitih sekundarnih struktura nisu očigledne u oblasti 180 – 240 nm.

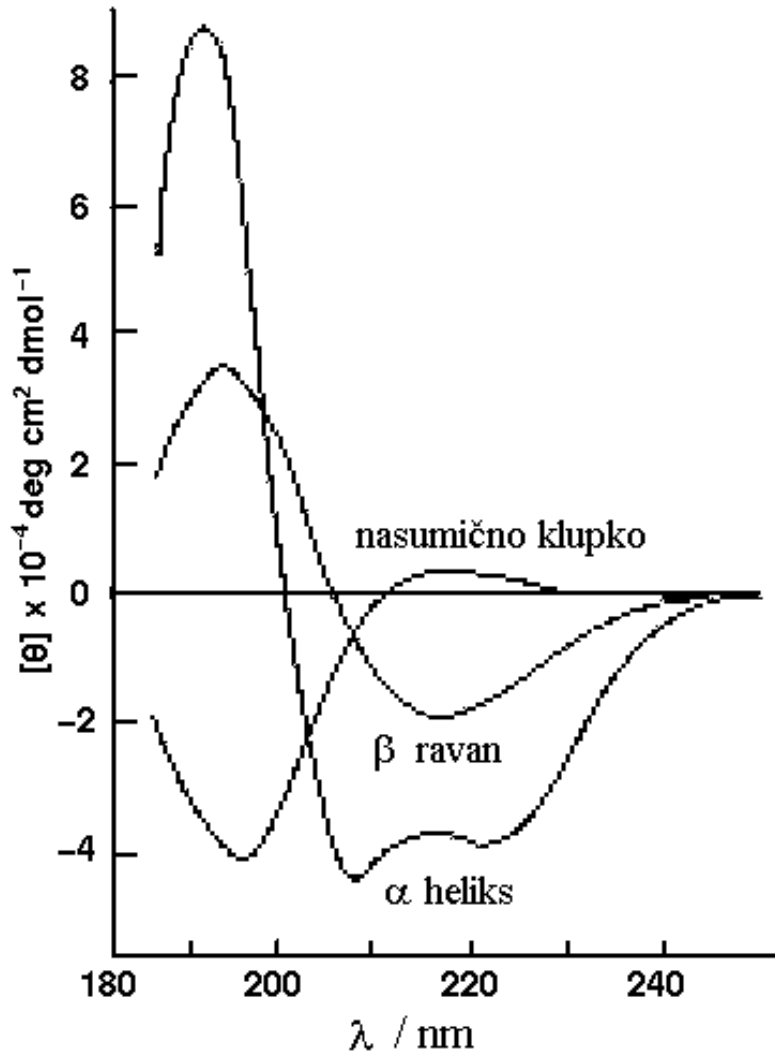
Međutim u CD spektrima u ovoj spektralnoj oblasti nije tako →

Podsećanje: peptidna veza je optički aktivna.



U istoj spektralnoj oblasti 180 – 240 nm, za razliku od UV apsorpcionih spektara, u CD spektrima je moguće razlikovati signale koji potiču od različitih sekundarnih struktura.

# Pozitivne i negativne trake u CD spektru?



Da!

$$[\theta] = 3298 \Delta\varepsilon$$

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_{\text{levo}} - \varepsilon_{\text{desno}}$$

Ako je  $\varepsilon_{\text{levo}} > \varepsilon_{\text{desno}}$ , supstancija više apsorbuje **levo** cirkularno polarizovanu svetlost, nastaje **pozitivna traka**.

Ako je  $\varepsilon_{\text{desno}} > \varepsilon_{\text{levo}}$ , supstancija više apsorbuje **desno** cirkularno polarizovanu svetlost, nastaje **negativna traka**.

UV aps  
spektar

$\alpha$  heliks

$\beta$  ploča

Nasumično  
klupko



$\pi \rightarrow \pi^*$

190 nm

$n \rightarrow \pi^*$

210-220 nm

CD  
spektar

$\alpha$  heliks

pozitivna

$\pi \rightarrow \pi^*$

190-195 nm

negativna

$\pi \rightarrow \pi^*$

208 nm

negativna

$n \rightarrow \pi^*$

222 nm

$\beta$  ploča

pozitivna

$\pi \rightarrow \pi^*$

195-200 nm

negativna

$n \rightarrow \pi^*$

215-220 nm

Nasumično  
klupko

negativna

$\pi \rightarrow \pi^*$

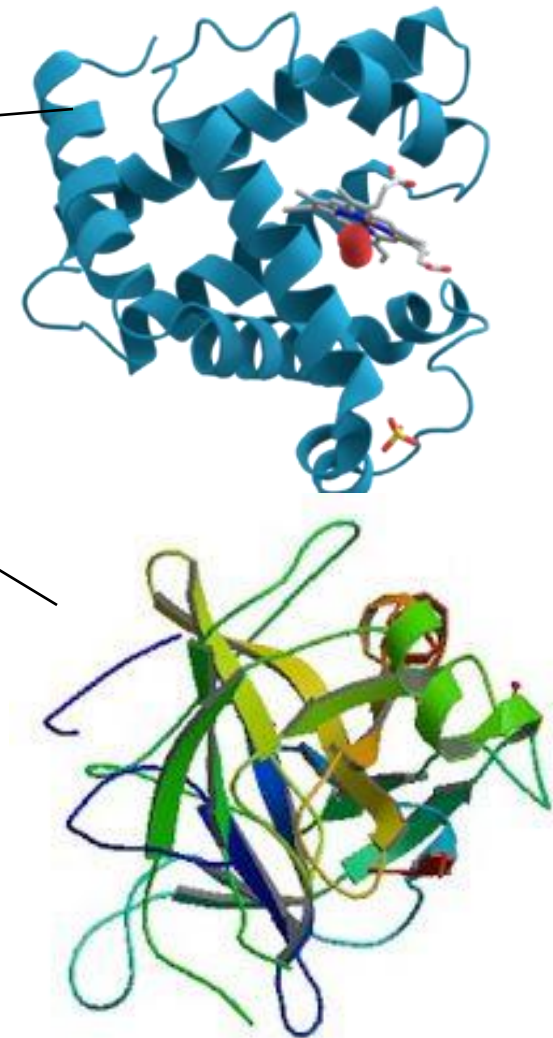
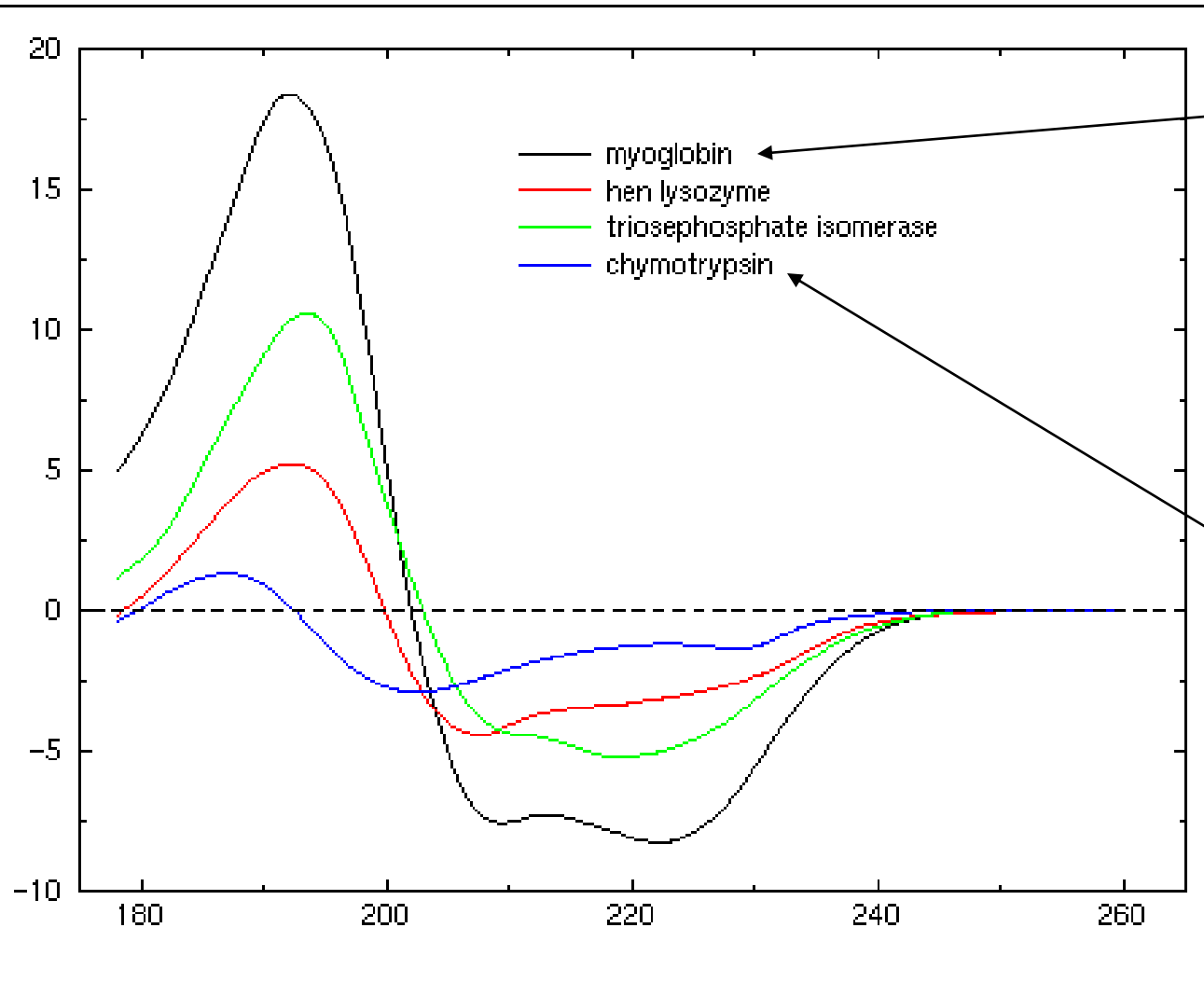
200 nm

pozitivna

$n \rightarrow \pi^*$

220 nm

# Neki primeri CD spektara



## CD od 180-240 nm

- CD spektroskopija u dalekoj UV oblasti (180-240 nm) se koristi za određivanje sekundarne strukture proteina.
- Signal potiče od peptidne veze (peptidne hromofore).
- CD daje informacije o ukupnoj strukturi, **ne zna** se koja aminokiselina učestvuje u kom tipu strukture.
- Osetljivost je 50 µg/ml proteina.
- Interpretacija spektra: potrebno je odrediti doprinose svake sekundarne strukture ukupnom signalu, u najjednostavnijem slučaju je to linearna kombinacija svih doprinosa.

CD za određivanje  
**promena** u terciarnoj strukturi proteina



## CD od 240-350 nm

CD spektri proteina u bliskoj UV oblasti (240-350 nm) su osetljivi na male **promene** u tercijarnoj strukturi.

Phe: 250-270 nm

Tyr: 270-290 nm

Trp: 280-300 nm

S-S veze: široka slaba traka 250-350 nm

Ako nema signala u bliskoj UV oblasti – protein nije savijen u nativnu konformaciju.

Signal u bliskoj UV oblasti je slabiji od signala u dalekoj, pa je za merenje potrebno 250 µg/ml proteina.

# CD spektroskopija u oblasti 180 – 350 nm

Peptidna veza

Aromatične amino kiseline

180 nm

240 nm

350 nm

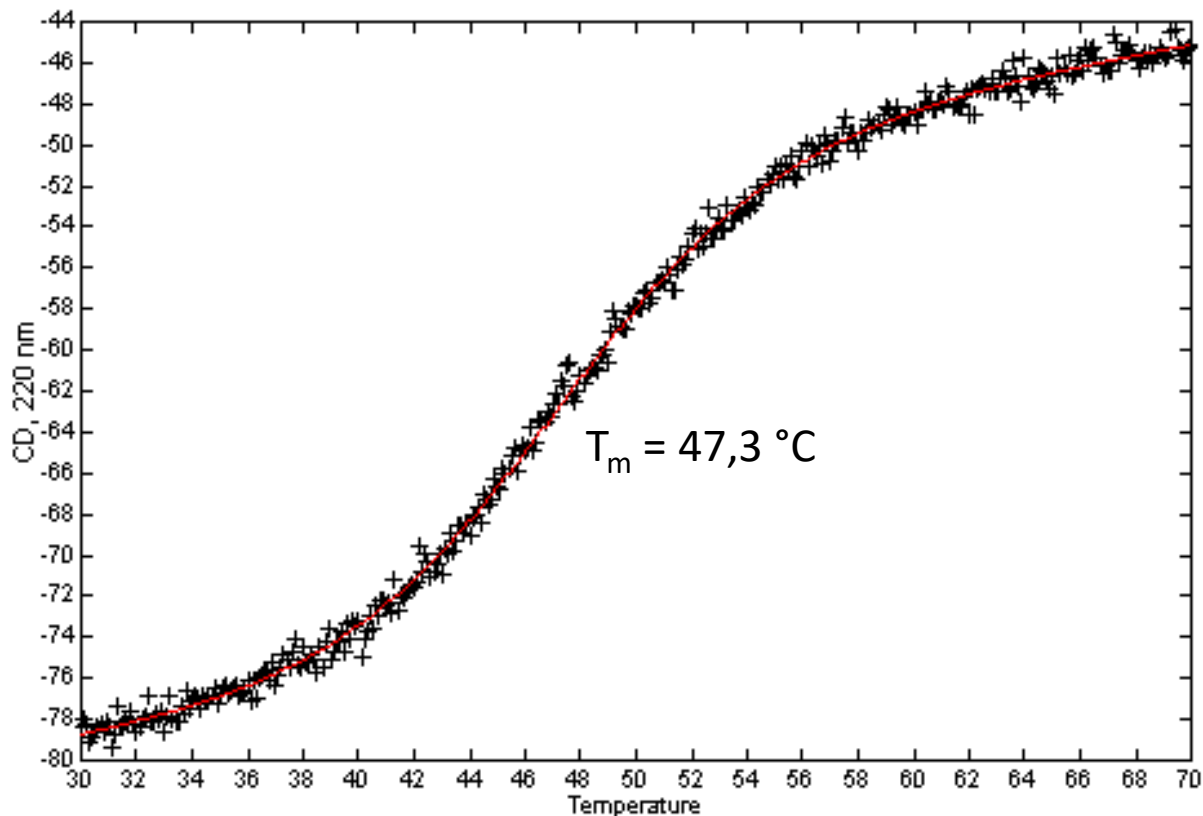
Identifikacija sekundarne  
strukture  
( $\alpha$ ,  $\beta$ , nasumično klupko)

Promene u tercijarnoj strukturi

CD za određivanje  
Van't Hoff-ove entalpije ( $H_{vH}$ )

# CD umesto DSC

- Zahteva mnogo manje količine proteina od DSC.
- Izabere se  $\lambda$  gde je najveća promena u spektru prilikom povećanja  $T$ , obično 220 nm.
- Meri se  $[\theta]$  na rastućim  $T$ , obično na svakih 0,2 °C.
- Računar fituje tačke i sa dobijene krive  $[\theta] = f(T)$  određuje  $T_m$ ,  $C_p$  i  $H_{vH}$



**Entalpija reakcije denaturacije** (toplota koja je potrebna proteinu za prelazak iz nativnog u denaturisani oblik, odnosno toplota koja se koristi za kidanje nekovalentnih veza) može da se odredi na 2 načina:

1. direktno iz kalorimetrijskih merenja (DSC-om) – kalorimetrijska entalpija  $\Delta H_m$
2. indirektno merenjem zavisnosti konstante ravnoteže od temperature tzv. Van't Hoff-ovom metodom - Van't Hoff-ova entalpija  $\Delta H_{vH}$ .

Eksperimentalno je pokazano da  $\Delta H_m$  i  $\Delta H_{vH}$  nemaju istu vrednost osim u prostom slučaju kada jedan reaktant direktno prelazi u proizvod bez nastanka intermedijera.

# Primene CD

1. Određivanje (identifikacija) **sekundarne** strukture proteina.

2. Proučavanje **promena u terciarnoj** strukturi proteina:

- Određivanje da li je protein savijen u nativnu konformaciju.
- Određivanje kojoj familiji proteina pripada.
- Poređenje struktura proteina koje se dobijaju različitim procesima: nativni i rekombinantni protein, ili poređenje strukture različitih mutantnih formi jednog proteina.
- Ispitivanje konformacione stabilnosti proteina kada je izložen „stresu“: odgovor na temperaturske i pH promene, kao i dodatak različitih supstancija koje stabilizuju ili destabilizuju strukturu.
- Ispitivanje kako protein-protein ili protein-ligand interakcije menjaju konformaciju.

3. Određivanje termodinamičkih parametara **denaturacije** proteina:  $T_m$ ,  $C_p$  i  $H_{vH}$ .