

Skripta iz predmeta Biofizička hemija 1

2

Cirkularni dihidroizam (CD)

Ana Popović Bijelić

2023.

Citirati kao:

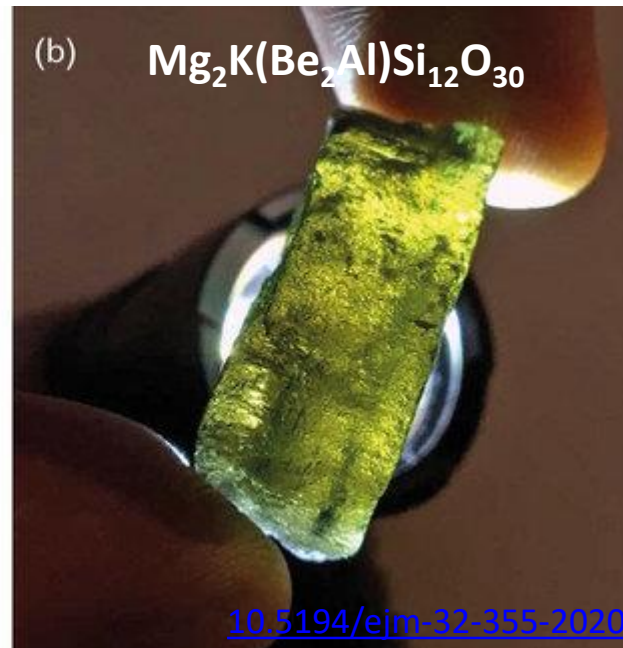
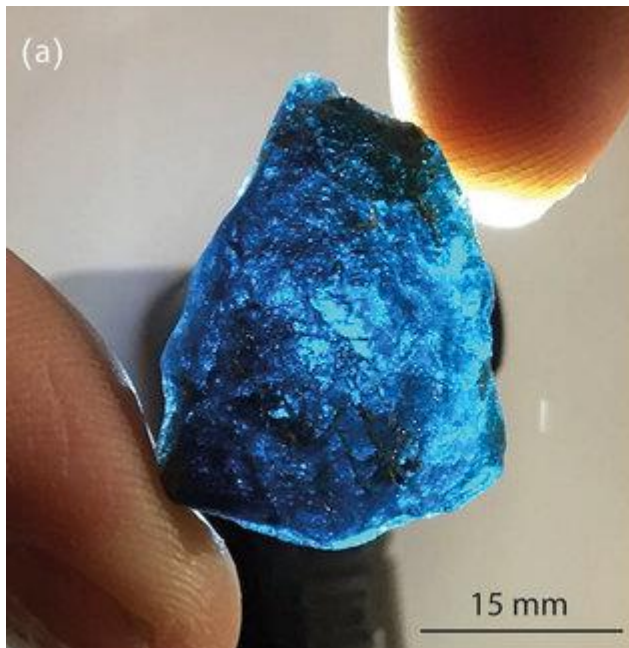
Ana Popović Bijelić, Skripta iz Biofizičke hemije 1, Univerzitet u Beogradu – Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, 2023.

Dihroizam (grčki: dve boje)

Turmalin



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



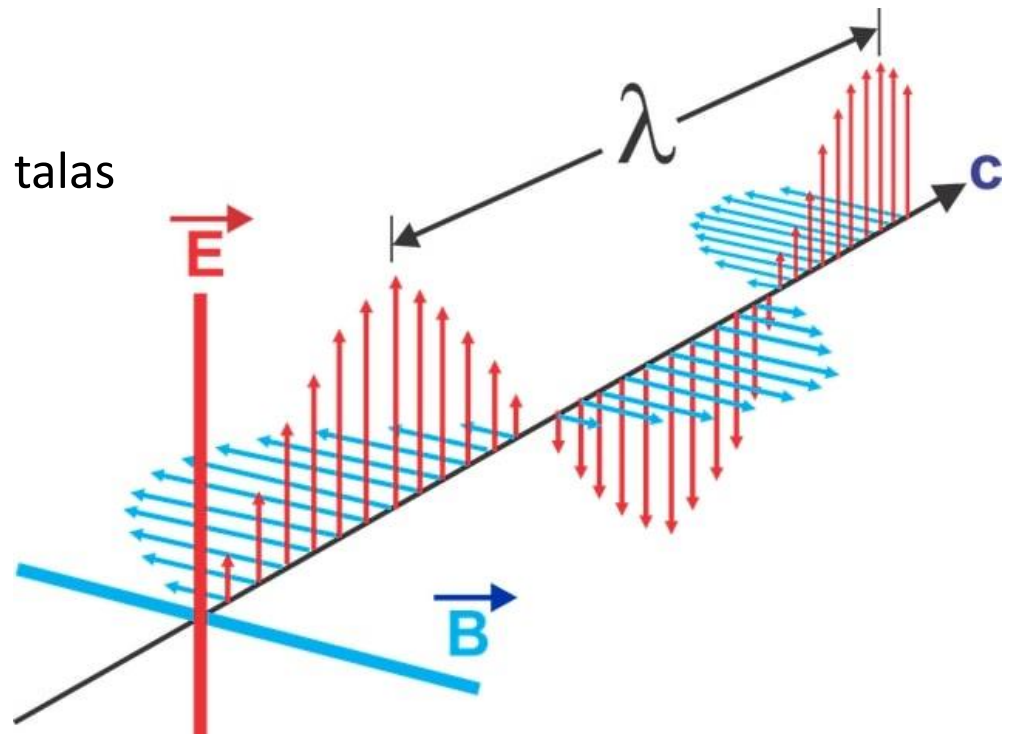
Cirkularni dihroizam je:

Osobina nekih molekula da različito apsorbuju levo i desno cirkularno polarizovanu svetlost.

Spektroskopska tehnika koja meri razliku u apsorpciji levo i desno cirkularno polarizovane svetlosti.

Pojmovi:

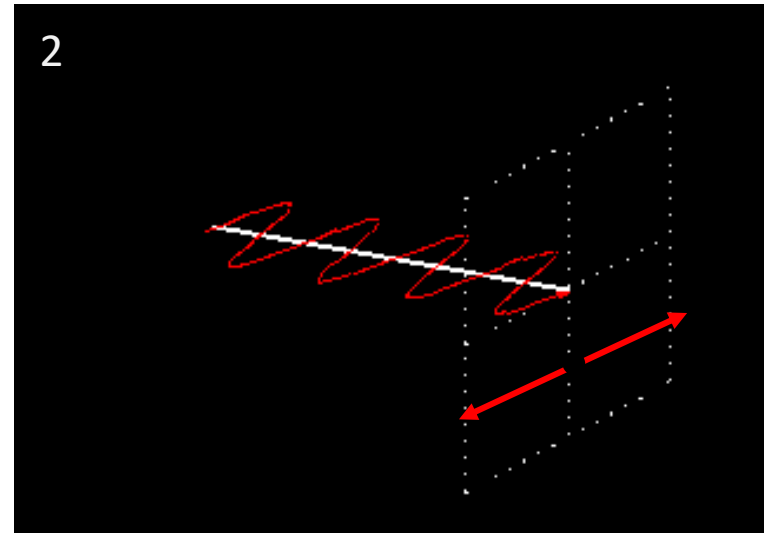
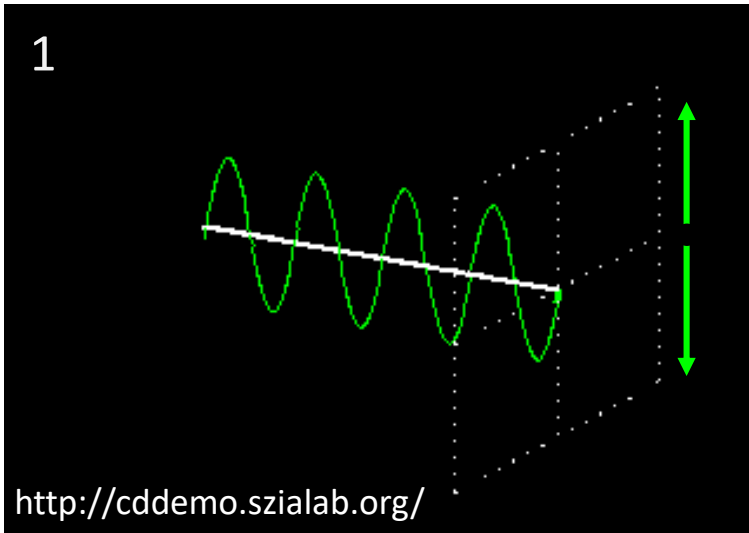
- Elektromagnetni talasi
- **Linearno (ravanski) polarizovan talas**
- **Cirkularno polarizovan talas**
- **Eliptično polarizovan talas**



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 (normalnoj na na ravan u kojoj osciluje el. komp).

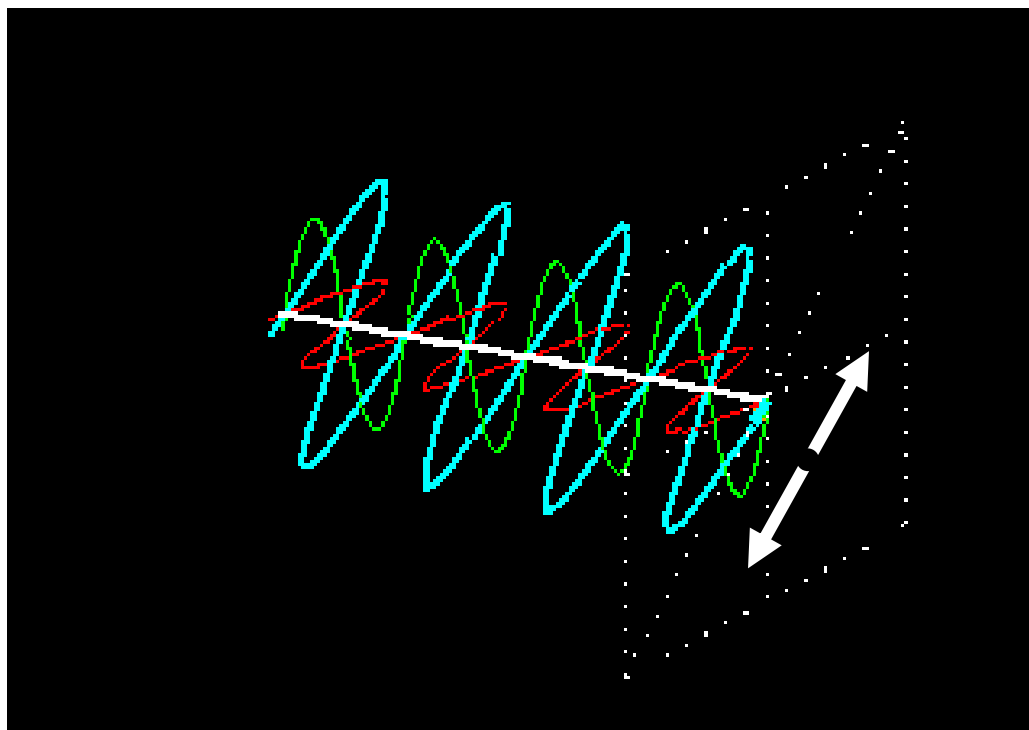
Linearno (ravanski) polarizovana talasa



Da bi nam bilo lakše za posmatranje razmatramo samo električnu komponentu EM talasa: ako vektor električnog polja osciluje duž prave linije (shematski prikazano strelicama) onda je to ravanski tj. linearno 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.

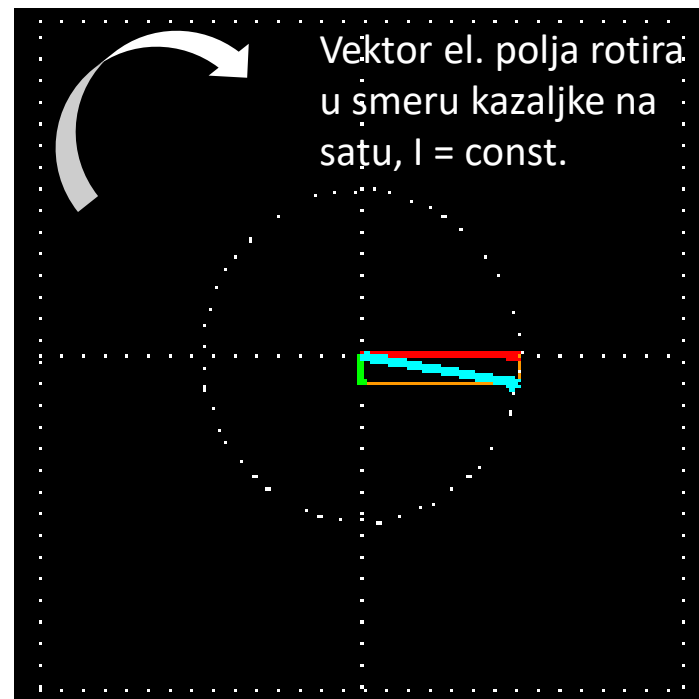
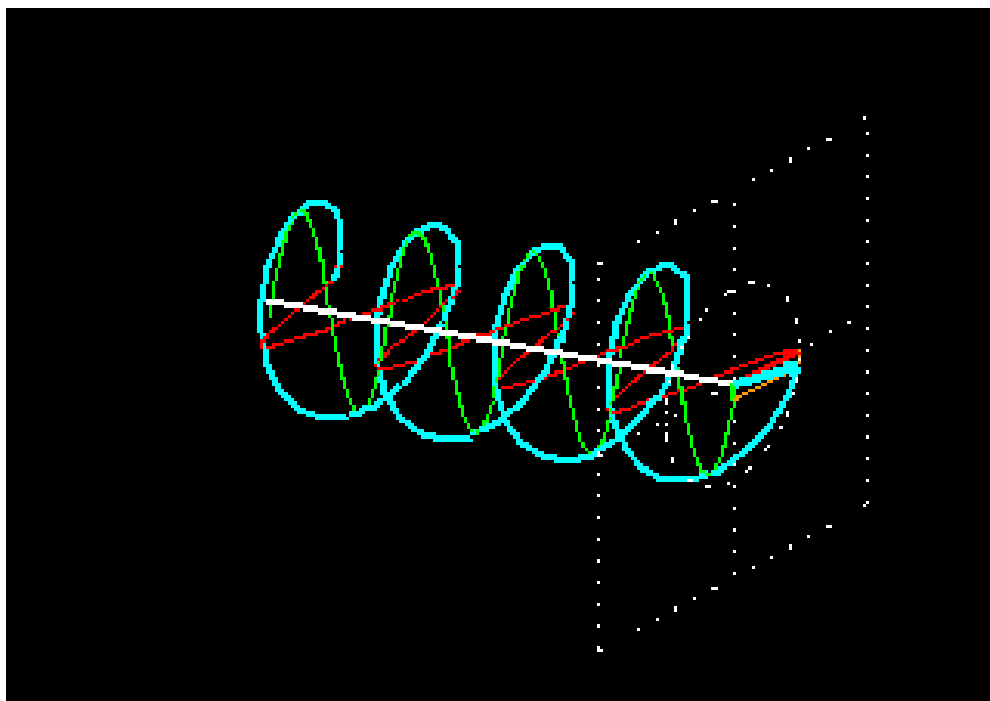
Ako dva ravanski polarizovana talasa koji imaju **istu A , λ i fazu** osciluju u dve normalne ravni – vektori električnog polja se sabiraju:



Vektor električnog polja osciluje duž prave linije (bela strelica označava oscilovanje po dijagonali kvadrata iz nule)

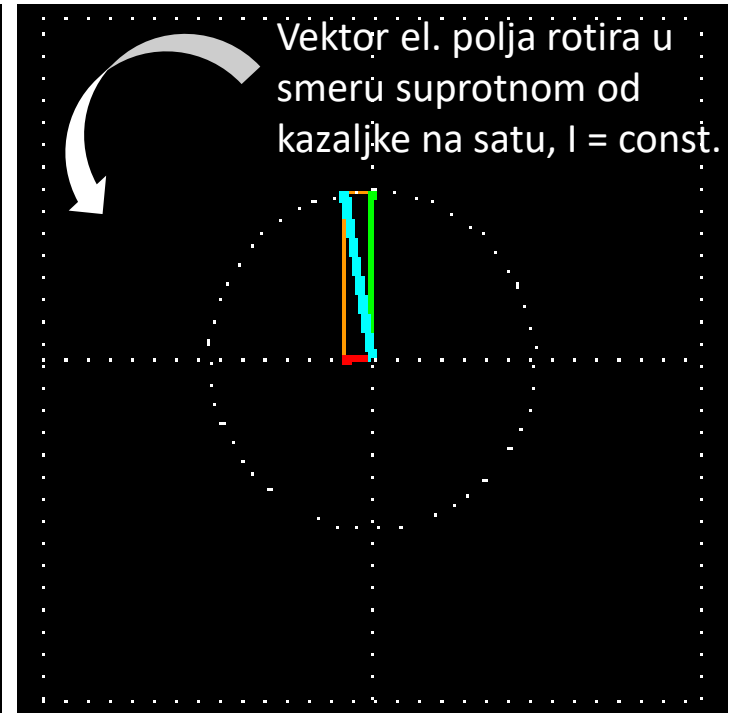
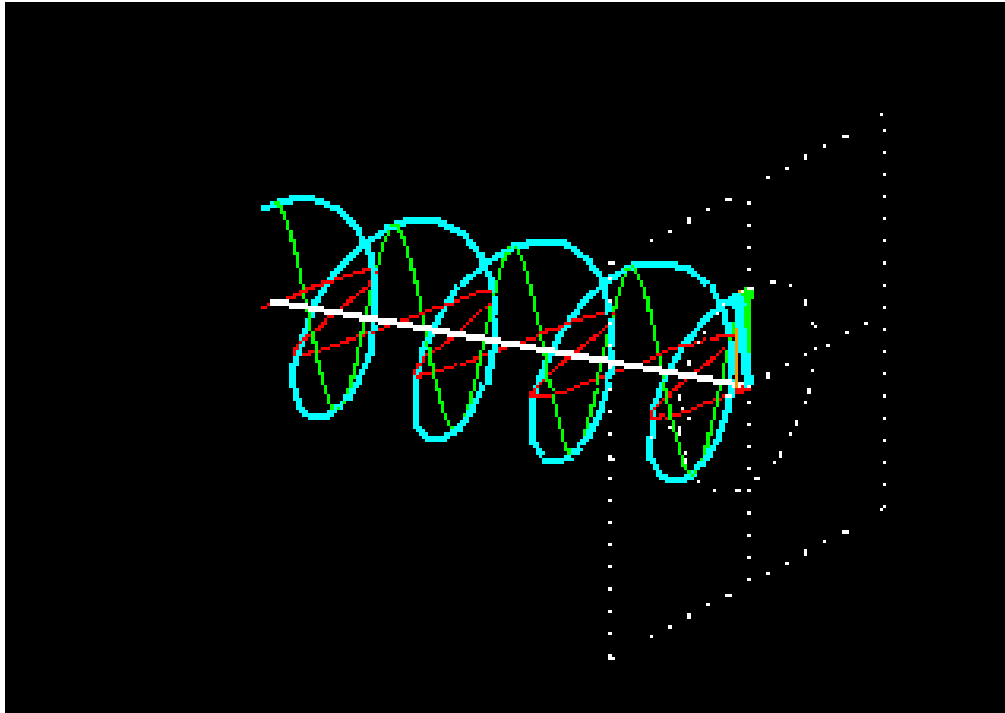
Plavi talas: superpozicija crvenog i zelenog.
Rezultat je ponovo **ravanski polarizovan talas.**

Ako dva ravanski polarizovana talasa koji imaju **istu A** i λ , ali sa **faznom razlikom od 90°** , osciluju u dve normalne ravni – vektori električnog polja se sabiraju:



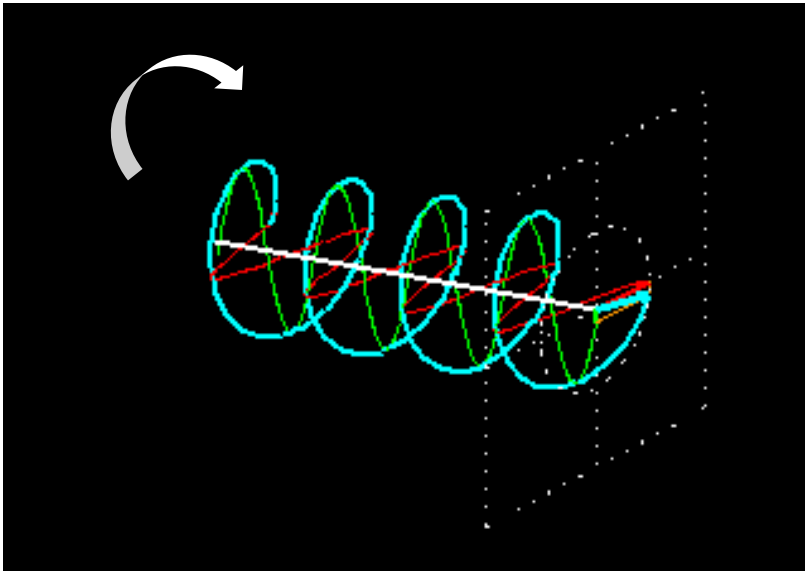
Plavi talas: superpozicija crvenog i zelenog.
Rezultat je **cirkularno polarizovan talas.**

Ako dva ravanski polarizovana talasa koji imaju **istu A** i λ , ali sa **faznom razlikom od -90°** , osciluju u dve normalne ravni – vektori električnog polja se sabiraju:

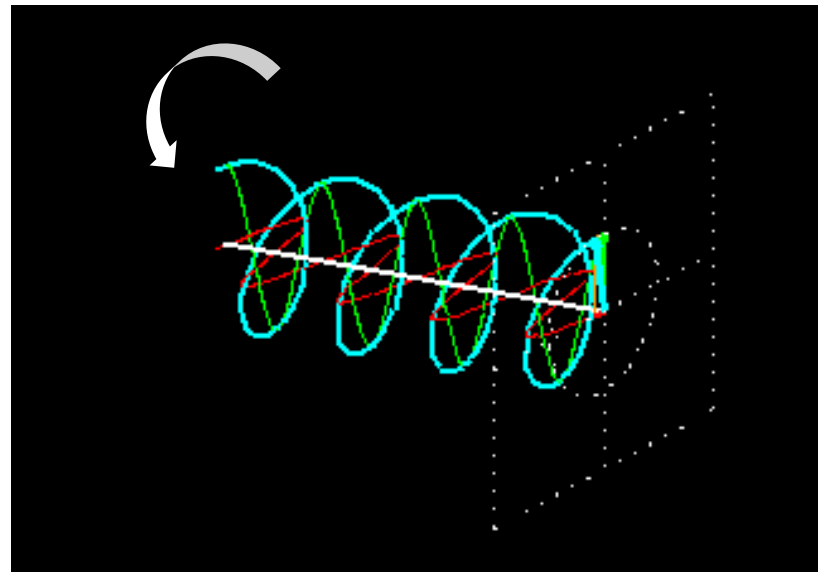


Plavi talas: superpozicija crvenog i zelenog.
Rezultat je **cirkularno polarizovan talas.**

Desno i levo cirkularno polarizovani talasi



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

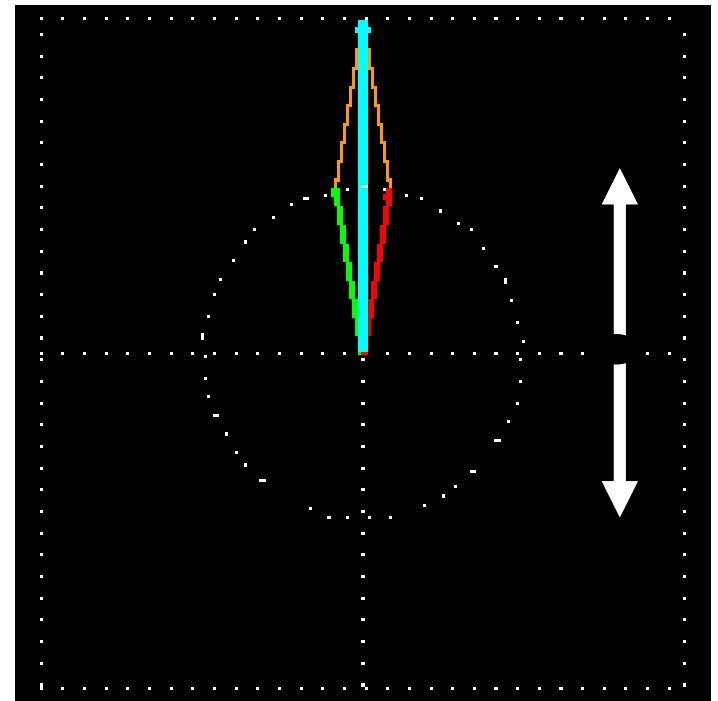
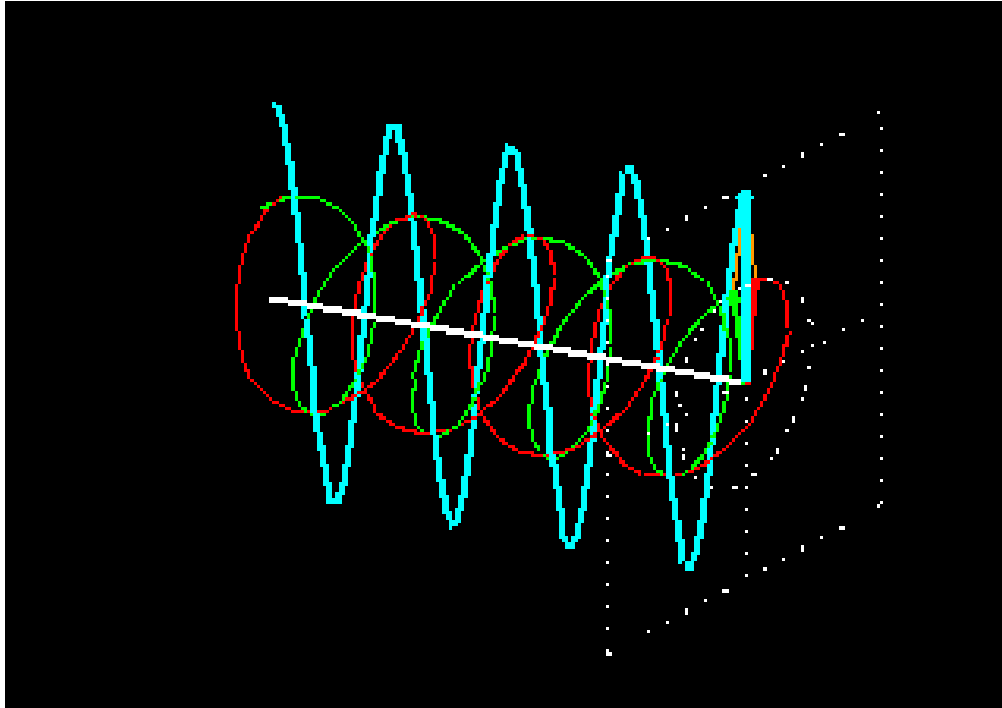


Izgleda kao **leva spirala**, rotira u smeru suprotnom od kazaljke na satu.

Oдавде potiču nazivi levo i desno cirkularno polarizovana svetlost

Ako ova dva cirkularno polarizovana talasa, desni i levi, koji imaju istu A i λ , 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 , λ 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.

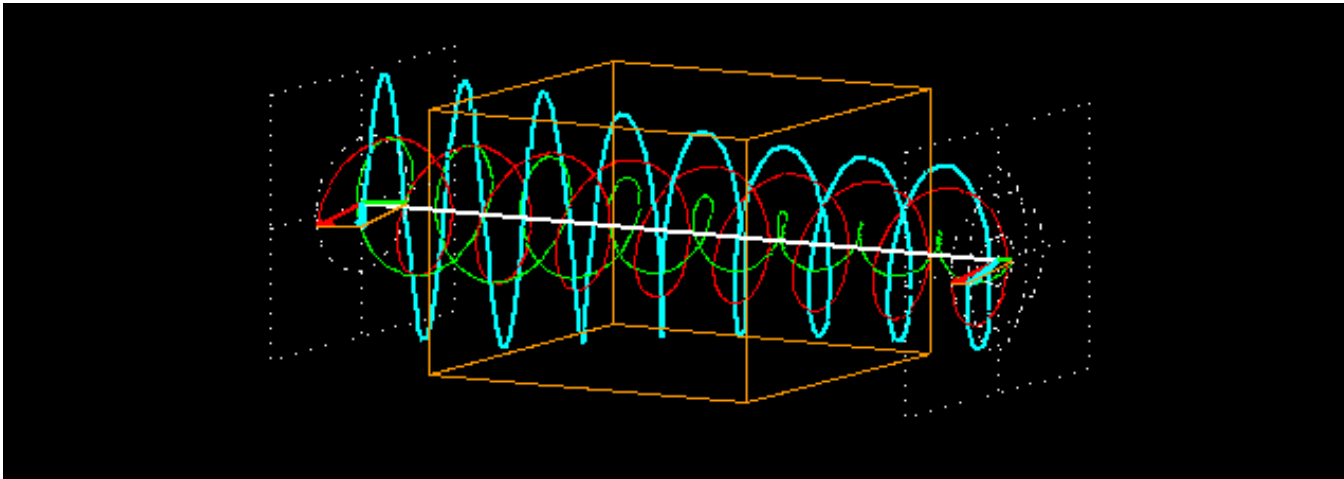
Cirkularni dihroizam – suština

Na određenoj λ , hiralni molekuli različito apsorbuju levo i desno cirkularno polarizovanu svetlost.

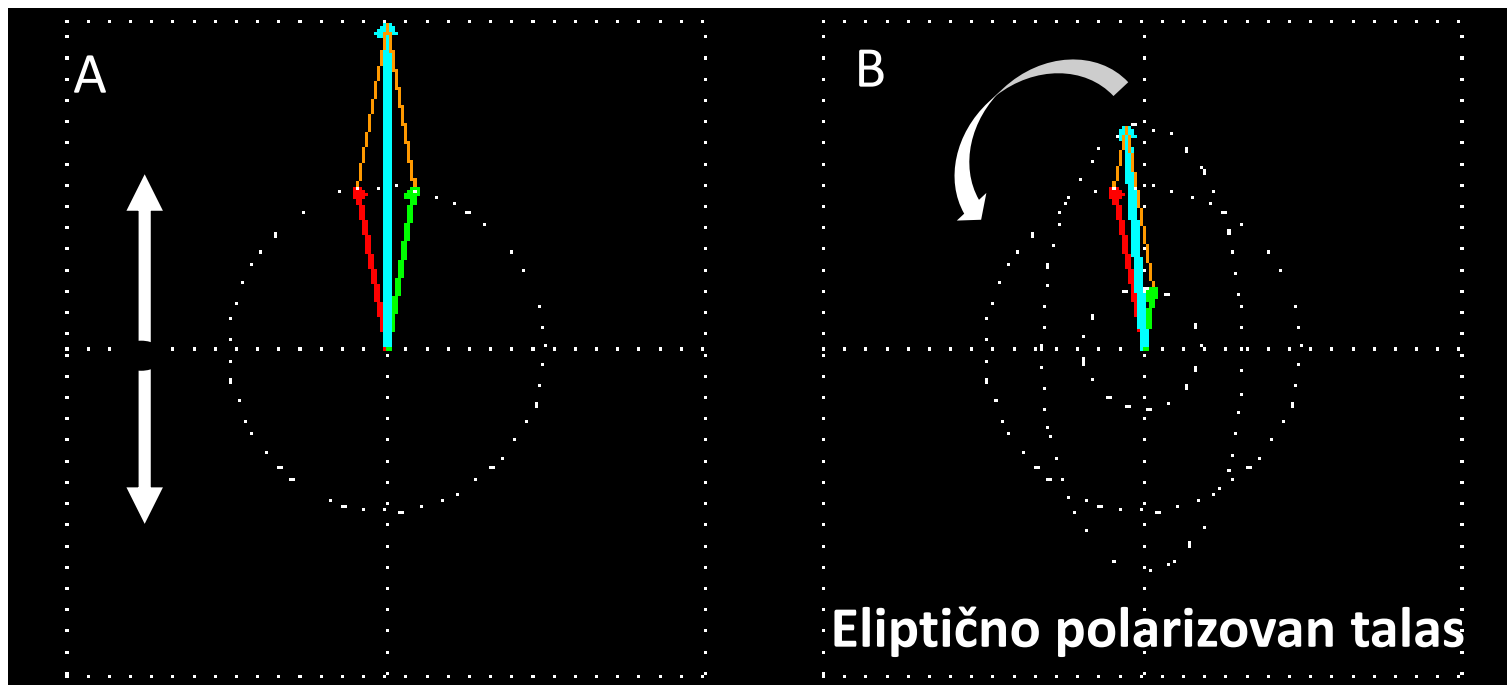
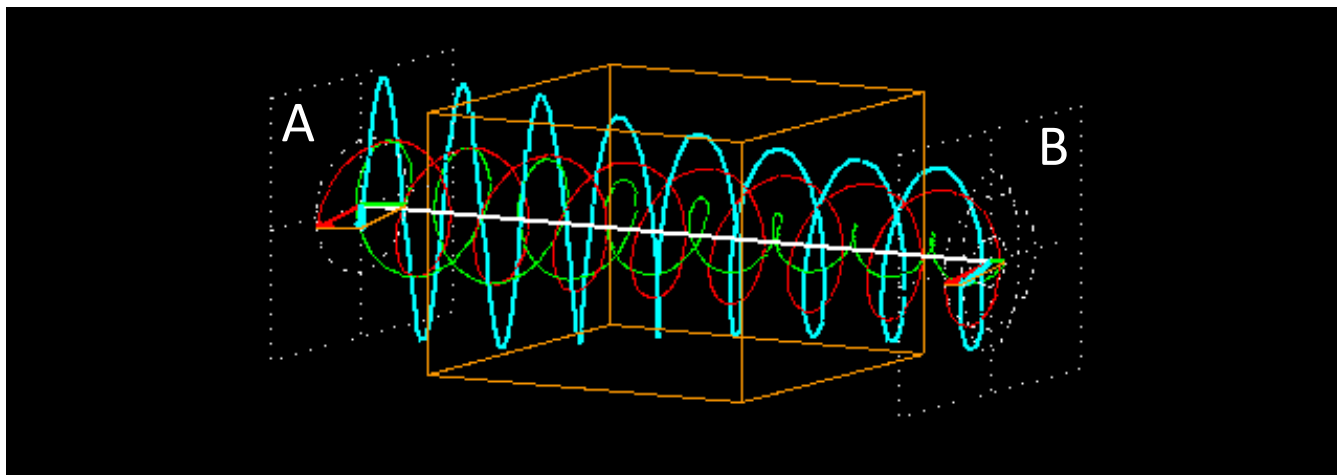
Ako propustimo ravanski polarizovan talas kroz takvu supstanciju, a znamo da ravanski polarizovan talas nastaje superpozicijom dva cirkularno polarizovana talasa istih amplituda, onda će **leva i desna komponenta biti apsorbovane u različitim %**

Primer:

Ravanski polarizovan talas prolazi kroz supstanciju koja NE apsorbuje **levo cirkularno polarizovanu komponentu** ali delimično apsorbuje **desno cirkularno polarizovanu komponentu** - rezultat će biti **eliptično polarizovan talas**.



Crvena komponenta prolazi kroz supstanciju nepromenjena. Intenzitet zelene komponente slabi dok prolazi kroz supstanciju. Tako da kad izađu iz supstancije, njihovom superpozicijom više neće nastati ravanski polarizovan talas. Rezultujući vektor elektičnog polja rotira duž eliptične putanje – rezultat je **eliptično** polarizovana svetlost.



Osnovno!

Kada ravanski polarizovana svetlost prolazi kroz supstanciju koja poseduje osobinu cirkularnog dihiroizma nastaje eliptično polarizovana svetlost.

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



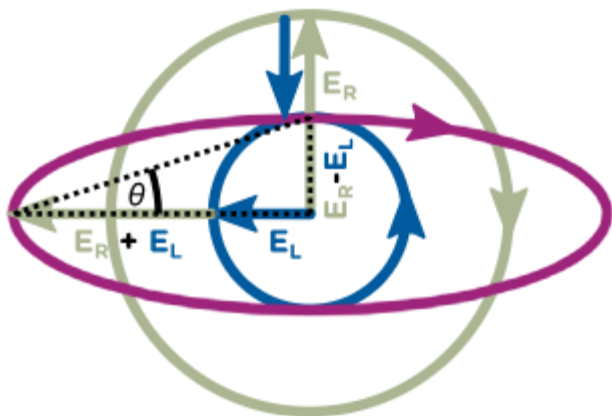
CD spektroskopija meri razliku u apsorpciji levo i desno cirkularno polarizovane svetlosti merenjem elipticiteta:

Elipticitet: $\theta = 32,98 \Delta A$

θ je veoma mali ugao, jedinice su milistepeni

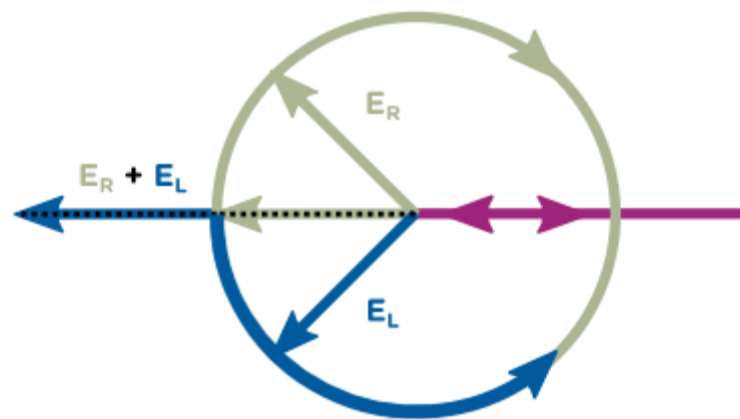
$\Delta A = A_L - A_R$ je razlika u apsorbancijama (L-levo, R-desno)

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 θ za uzorke različitih koncentracija, treba izraziti θ po jedinicama koncentracije, pa se uvodi:

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

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

ε - 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)

Optički aktivna supstancija koja ima osobinu cirkularnog dihroizma ima različite:

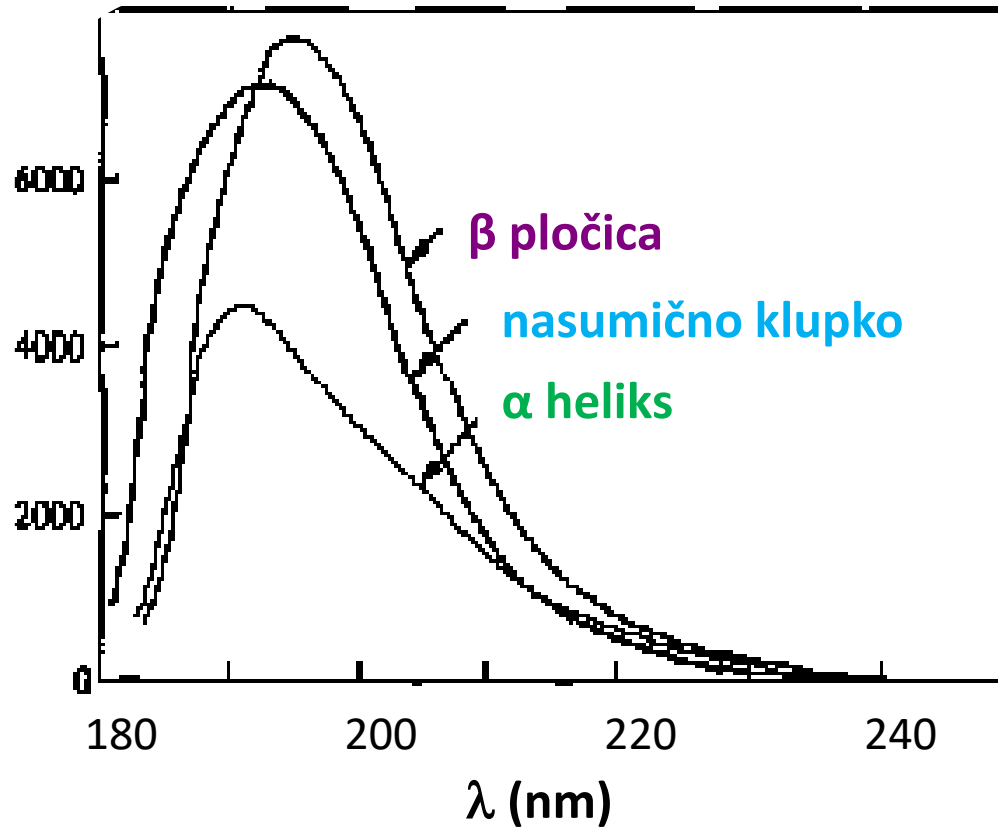
- **Ekstinkcione koeficijente** za levo i desno cirkularno polarizovanu svetlost, ϵ apsorpcija
- **Indekse prelamanja** za levo i desno cirkularno polarizovanu svetlost, $n = f(\lambda)$, $n = c_0/c$ refrakcija
- Naše razmatranje na prethodnim slajdovima je najjednostavnije (za $n=1$), u realnosti nije tako

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.

Osnovna primena CD je za
određivanje sekundarne strukture proteina



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

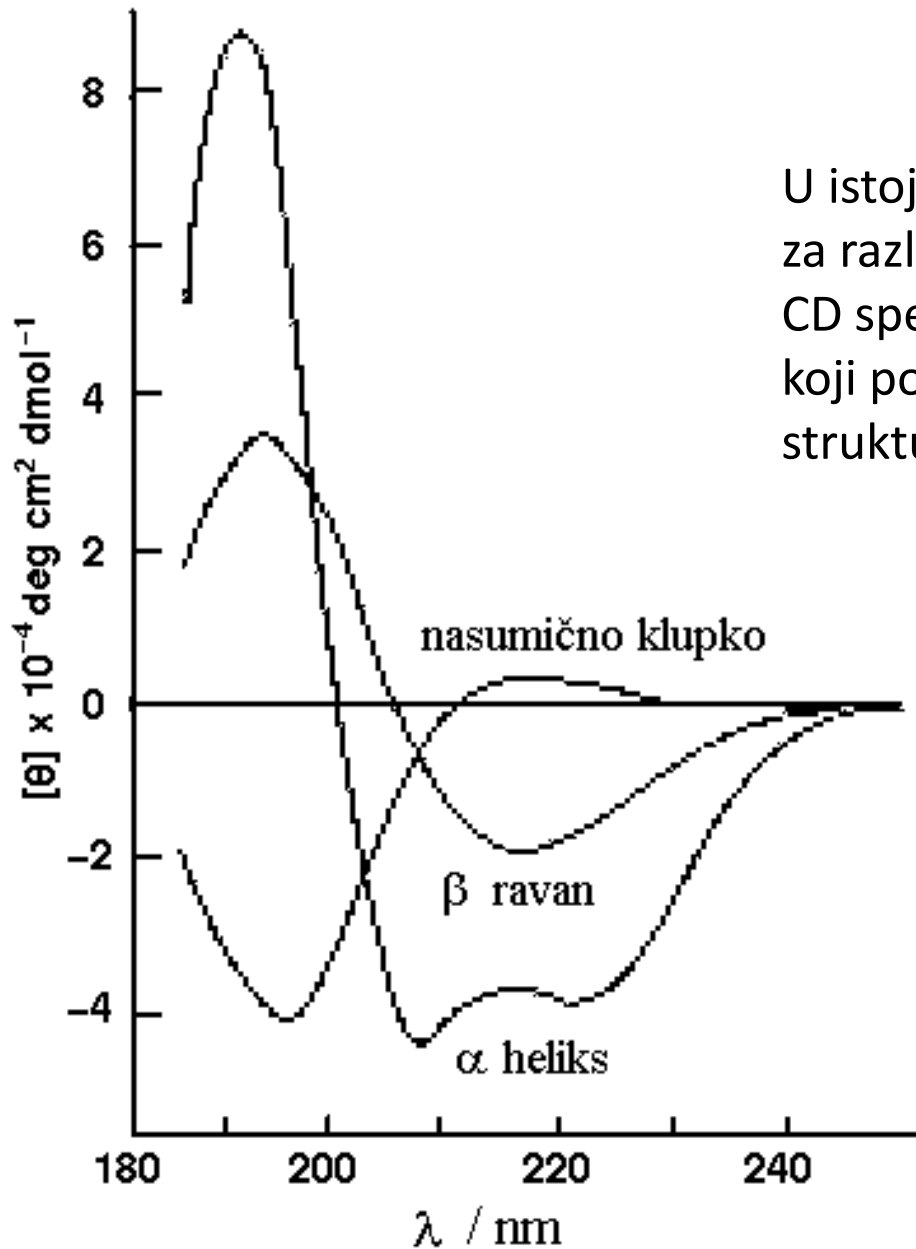


Sekundarnu strukturu **ne možemo** odrediti iz apsorpcionog spektra.

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

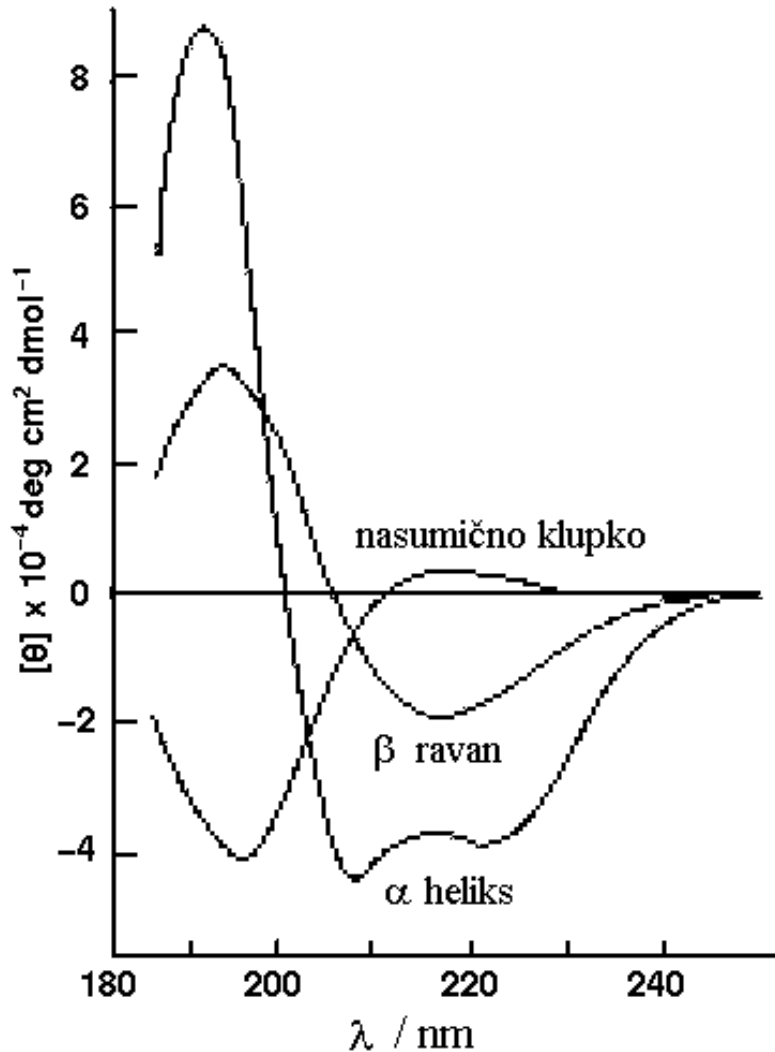
Međutim u CD spektrima u ovoj spektralnoj oblasti nije tako →

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?



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

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

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

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

UV aps
spektar

α heliks

β ploča

Nasumično
klupko



$\pi \rightarrow \pi^*$

190 nm

$n \rightarrow \pi^*$

210-220 nm

CD
spektar

α heliks

pozitivna

$\pi \rightarrow \pi^*$

190-195 nm

negativna

$\pi \rightarrow \pi^*$

208 nm

negativna

$n \rightarrow \pi^*$

222 nm

β ploča

pozitivna

$\pi \rightarrow \pi^*$

195-200 nm

negativna

$n \rightarrow \pi^*$

215-220 nm

Nasumično
klupko

negativna

$\pi \rightarrow \pi^*$

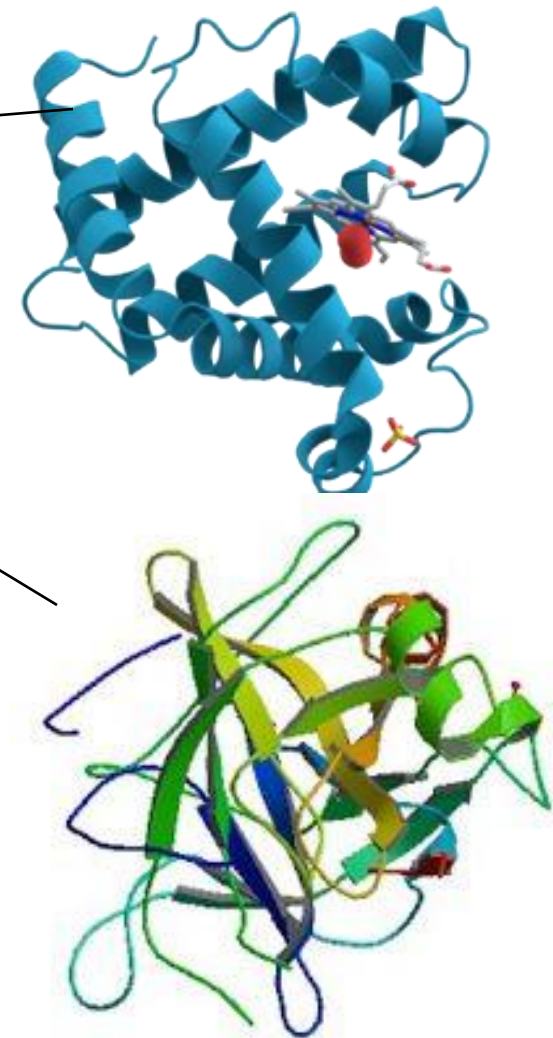
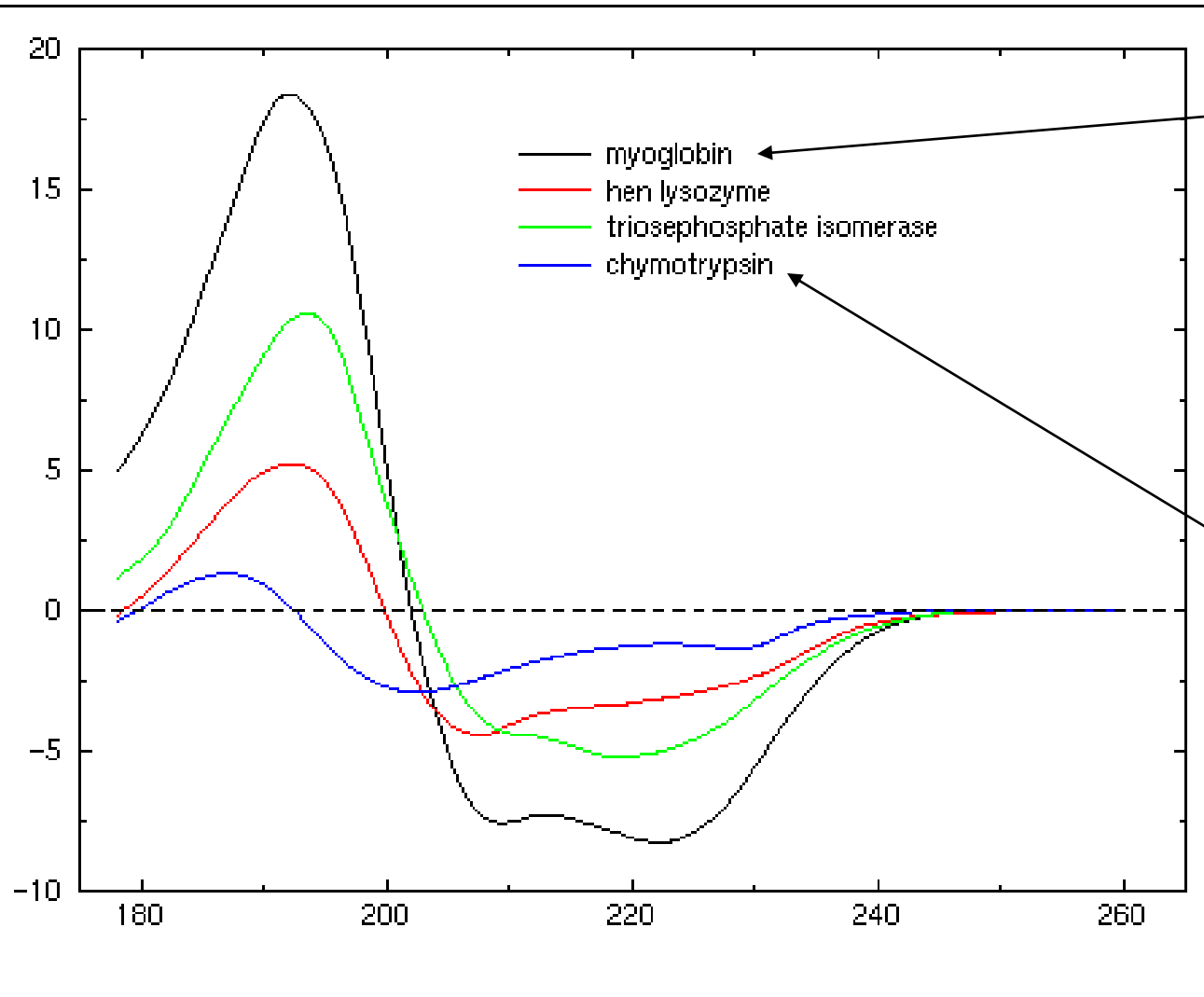
200 nm

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

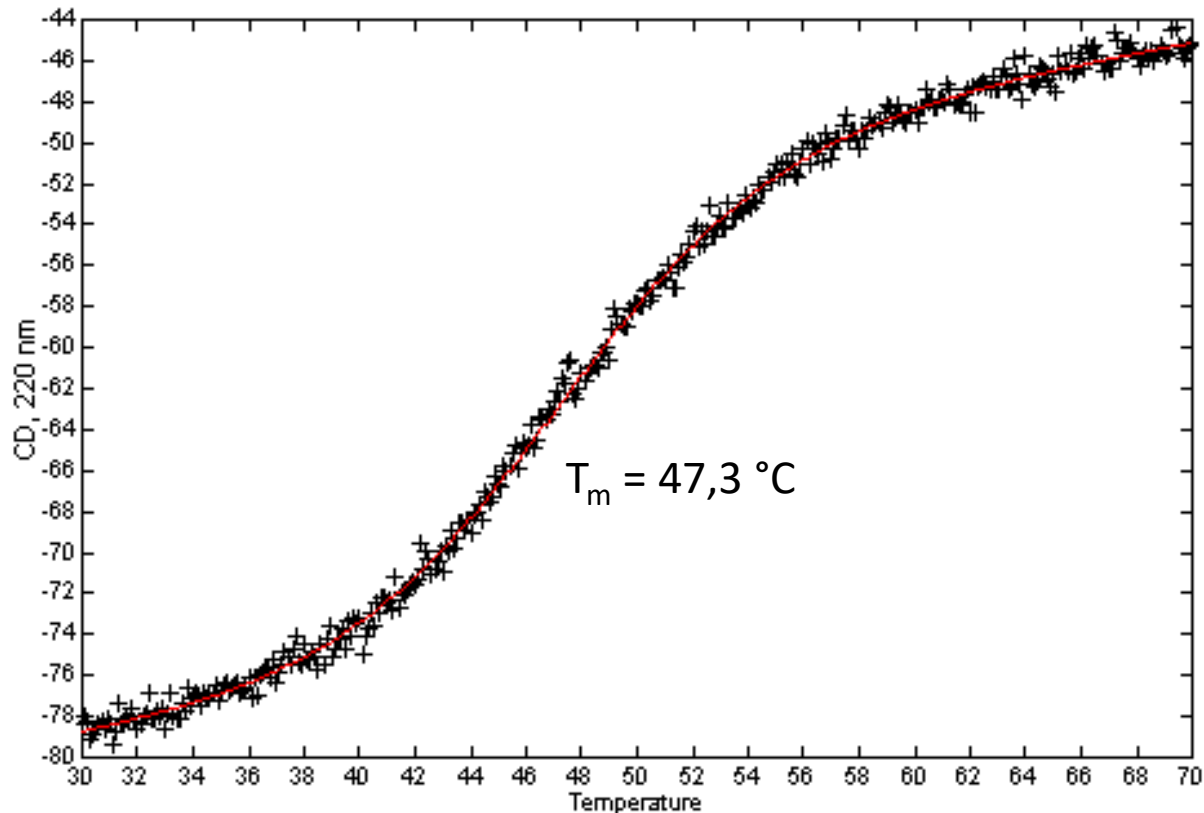
Identifikacija sekundarne
strukture
(α , β , nasumično klupko)

Promene u tercijarnoj strukturi

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

CD umesto DSC - zahteva mnogo manje količine proteina

- Izabere se λ gde je najveća promena, obično oko 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) ΔH_m
2. indirektno merenjem zavisnosti konstante ravnoteže od temperature tzv. Van't Hoff-ovom metodom (ΔH_{vH}).

Eksperimentalno je pokazano da ΔH_m i ΔH_{vH} nemaju istu vrednost, osim u veoma prostim slučajevima kao što su:

- jedan reaktant direktno prelazi u proizvod bez nastanka intermedijera
- jedan supstrat se vezuje za jedan enzim.

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. Umesto DSC