

Metode i metodologije u biofizičkoj hemiji

Uzorak

- ▶ Organizam
 - ▶ Tkivo
 - ▶ Ćelija
 - ▶ Ćelijska organela
 - ▶ Biomolekul
 - ▶ Biohemijska reakcija
-
- ▶ In vivo
 - ▶ Ex vivo
 - ▶ In vitro

Pitanja i zadaci za biofizičara

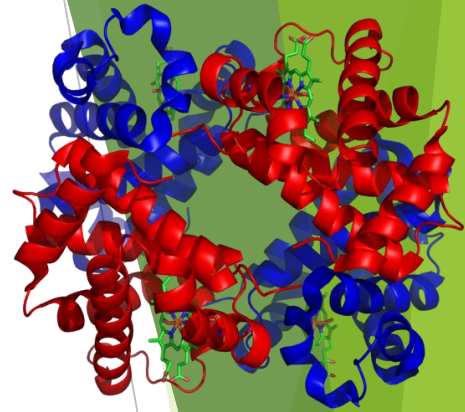
- ▶ Fundamentalna istraživanja
- ▶ Primena u medicini, farmaciji, ekologiji
- ▶ Najvažnije je znati izabrati odgovarajući model sistem i pravu tehniku
- ▶ To znači, razumeti
 - Pitanje na koje treba da se odgovori
 - Biologiju/biohemiju/fizičku hemiju
 - Princip rada tehnike

Pitanja i zadaci za biofizičara

- ▶ Odrediti strukturu biomolekula
- ▶ Povezati je sa njenom funkcijom
- ▶ Biohemijski proces - reaktanti, intermedijeri, produkti, aktivatori, inhibitori
- ▶ Kako rade lekovi, sa kojim biomolekulima interaguju, da li biomolekul ili reakcija mogu da budu meta
- ▶ Dizajn novih lekova - nove rute za isporuku lekova
- ▶ Pronalaženje biomarkera za bolesti

Proteini - struktura - funkcija

Primer: **Hemoglobin** - samo jedna AK u primarnoj strukturi je pogrešna, izmenjen oblik Hb, izmenjen oblik eritrocita, srpasta anemija



10 μ m

Val	His	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	...
1	2	3	4	5	6	7	

Normalni eritrociti i 1^o struktura Hb



10 μ m

Val	His	Leu	Thr	Pro	Val	Glu	...
1	2	3	4	5	6	7	

Eritrociti kod srpaste anemije
i 1^o struktura njihovog Hb

Ciljana isporuka lekova

FORTIFERRUM® 
...for an iron health

DEFICIENCY FORTIFERRUM®+ MEET FORTIFERRUM®+ ABOUT US CONTACT  

WHAT IS FORTIFERRUM®+?

FORTIFERRUM®+ is a liposomal iron supplement indicated for iron deficiency states and increased needs of this mineral, such as occurs during pregnancy and lactation, as well as for conditions that can cause iron deficiency anemia (iron deficiency anemia) or other diseases associated with iron deficiency.

FORTIFERRUM®+ is a last generation liposomal iron with a complete formula designed to meet all daily needs of iron supplementation recommended by WHO and Medical Associations worldwide.

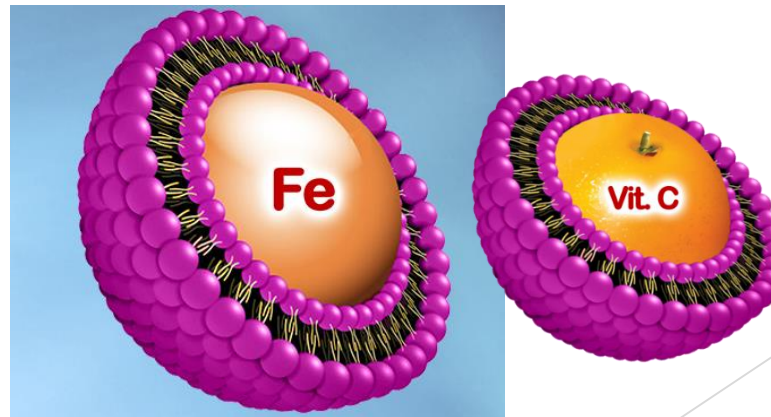
FORTIFERRUM®+ is presented in an innovative format of powder that can be taken directly without water, being indicated for all people but especially children's, pregnant women and vegetarians, because they don't eat meat, poultry or seafood and their needs of iron are almost twice than others.

FORTIFERRUM®+ HEALTH BENEFITS:

According to (EU) REGULATION No 432/2012 from EUROPEAN COMMISSION, the iron presents a group of healthy properties that contribute to a reduction of the risk related to the onset of diseases caused by deficiency of this mineral.

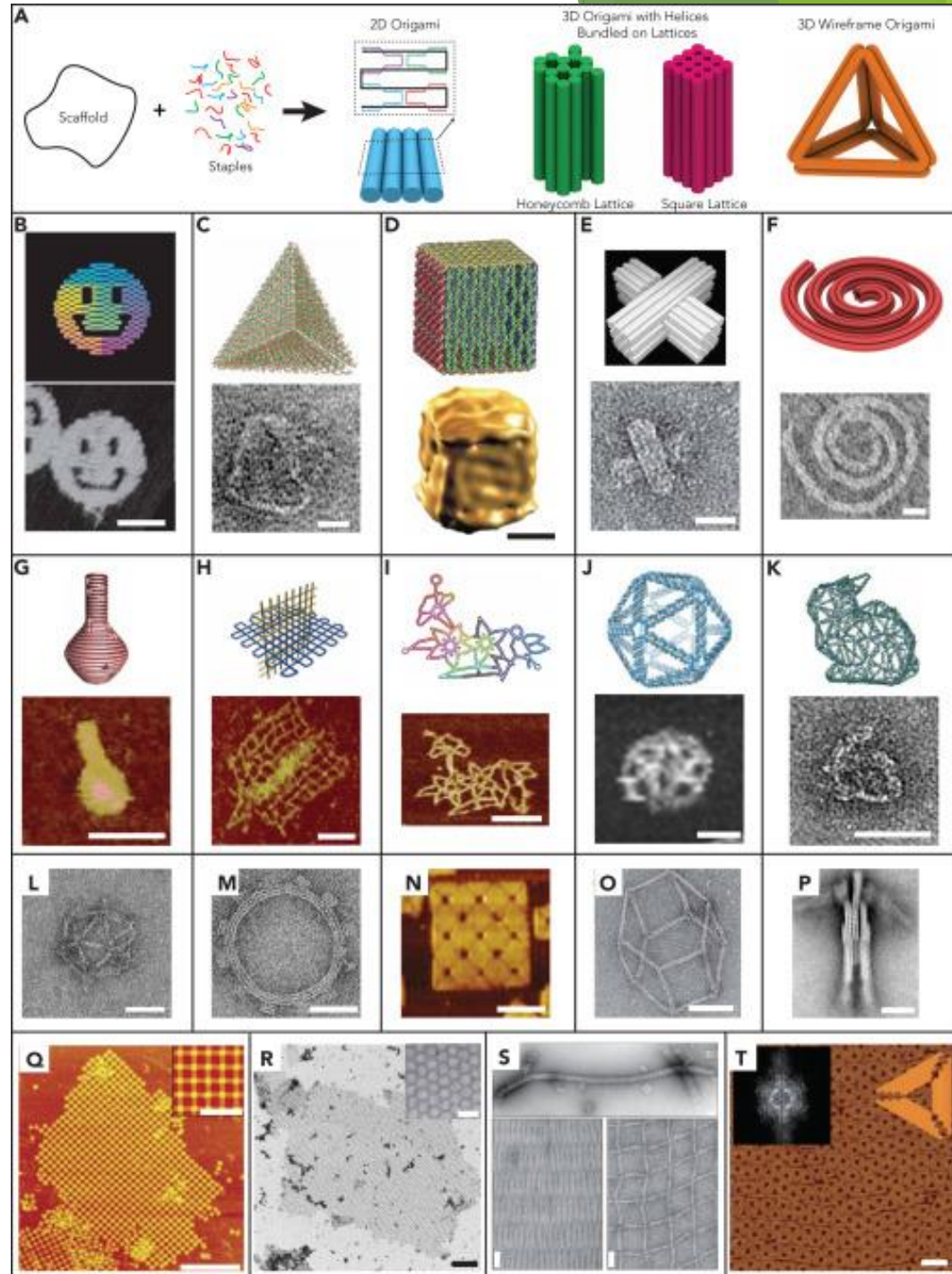
The benefits from **FORTIFERRUM®+** for the health are:

- Contributes to the normal formation of red blood cells and hemoglobin;
- Contributes to normal oxygen transport in the body;
- Contributes to the normal functioning of the immune system;
- Contributes to the normal energy metabolism;
- Contributes to the normal cognitive function;
- Contributes to increase iron absorption;
- Contributes to the reduction of tiredness and fatigue.



DNK origami

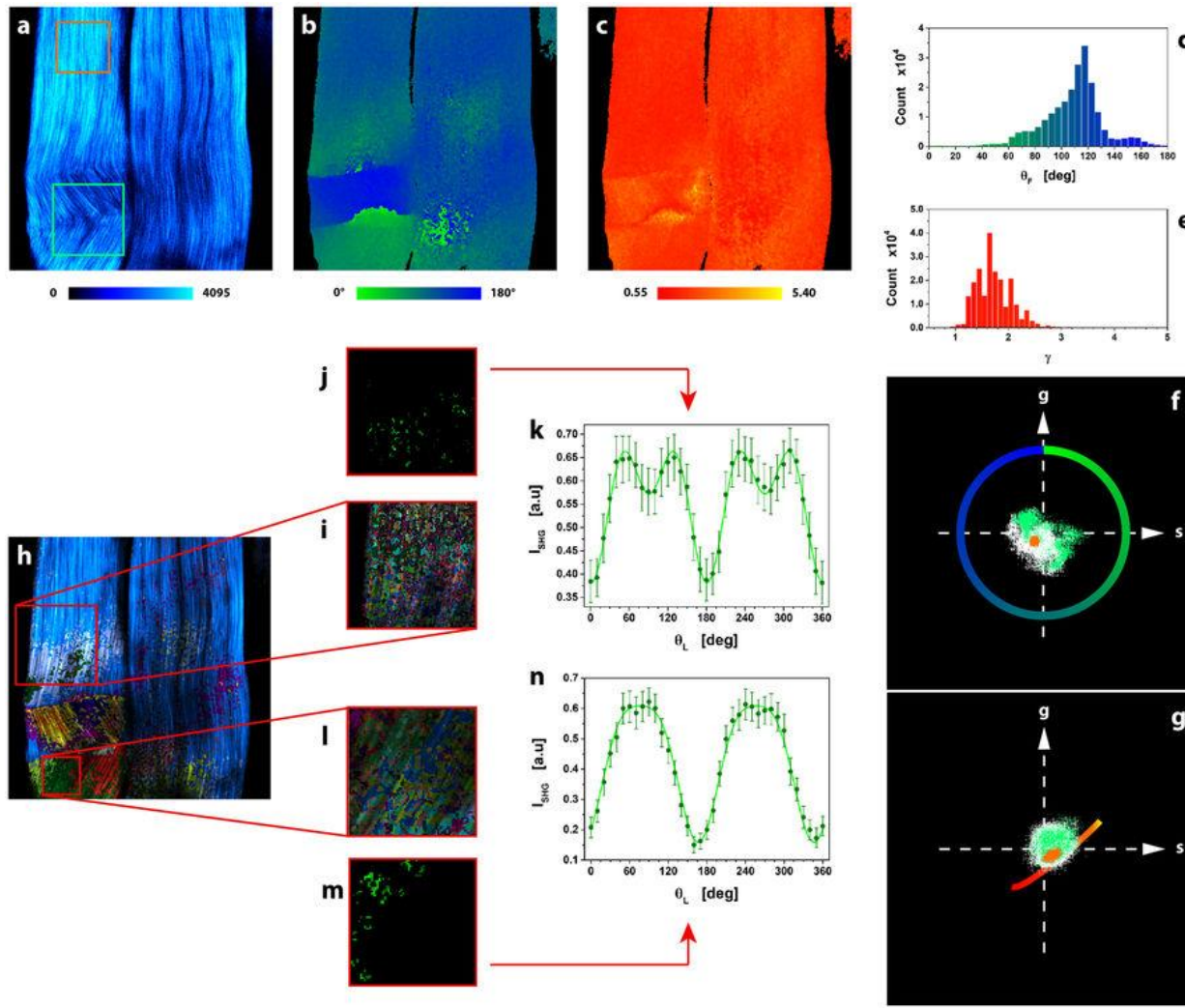
Posebno važna
primena za ciljanu
dostavu antikancer
lekova koji su slabo
rastvorljivi, nestabilni,
citotoksični



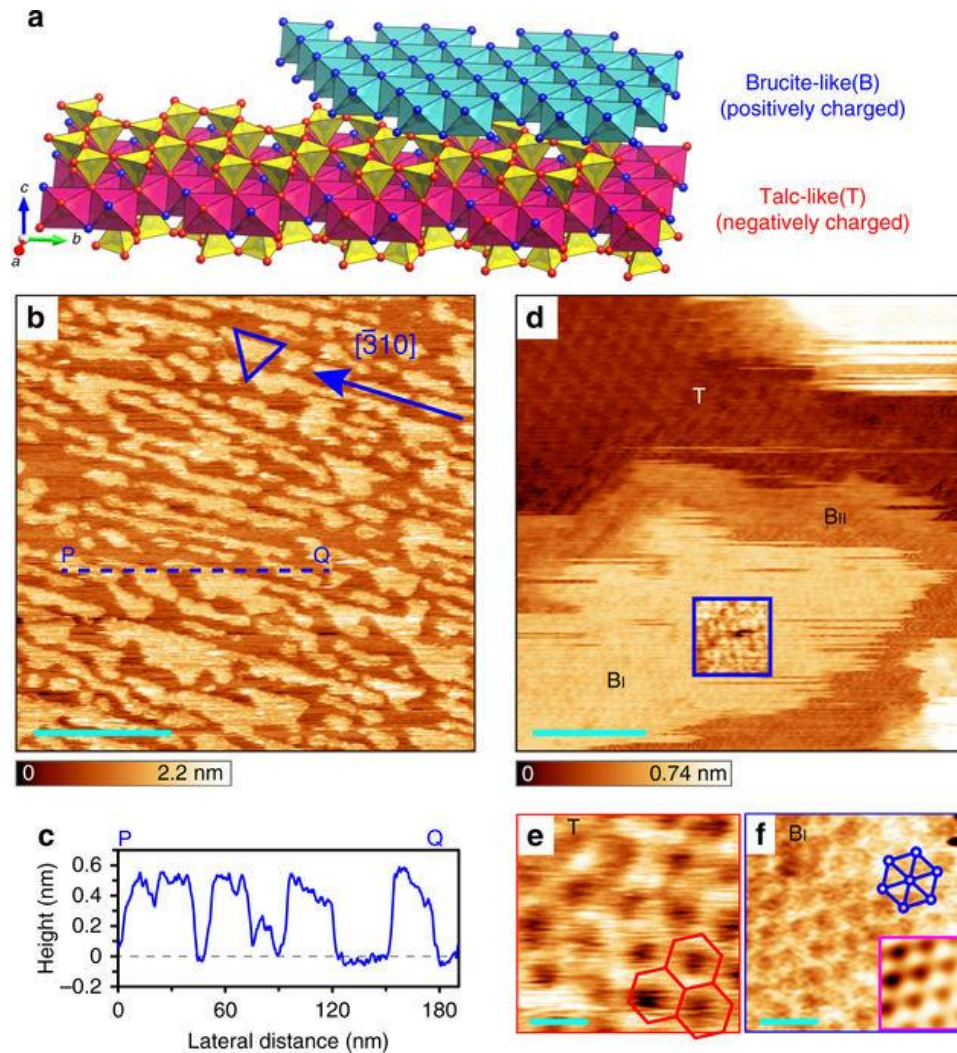
Pregled fizičko-hemijskih metoda u biofizičkoj hemiji

- ▶ UV/vis (ULj/vid) spektroskopija
- ▶ Infracrvena spektroskopija
- ▶ Ramanska spektroskopija
- ▶ Cirkularni dihiroizam
- ▶ Fluorescentna spektroskopija
- ▶ Dinamičko rasejanje svetlosti DLS
- ▶ Konfokalna mikroskopija
- ▶ Rentgeno-strukturna analiza (spektroskopija X-zracima)
- ▶ NMR/MRI
- ▶ EPR/EPRI
- ▶ Masena spektrometrija
- ▶ SEM, TEM, AFM
- ▶ Peč-klemp tehnika (metoda nametnute voltaže)

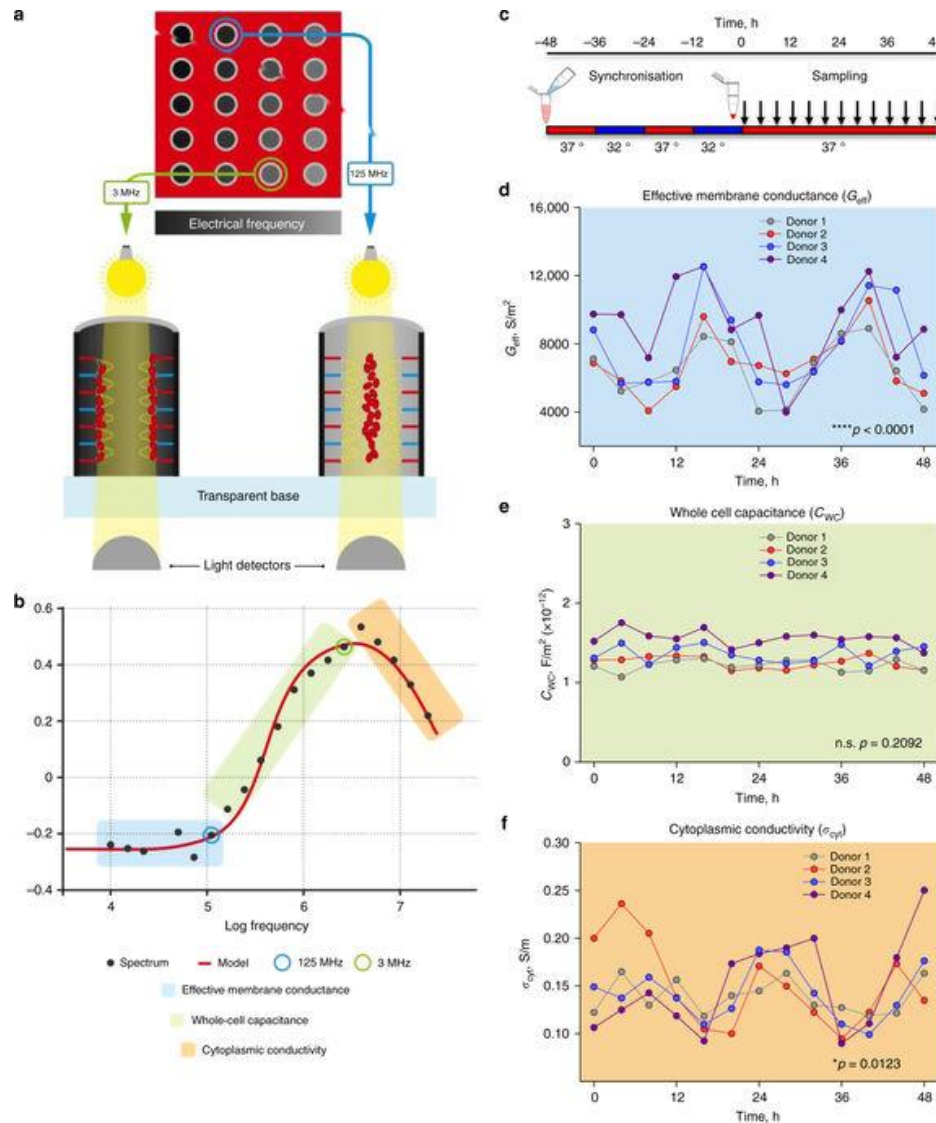
Second Harmonic Generation (SHG) microscopy za proučavanje strukture kolagena kod oštećenih tkiva, posle operacije tumora
Nelinearna koherentna optička mikroskopija, dva upadna fotona frekvencije ω se konvertuju u jedan foton frekvencije 2ω



Atomic-scale three-dimensional mapping of the local hydration structures by ultra-low noise frequency-modulation atomic force microscopy (FM-AFM)



Detekcija cirkadijalnog ritma u crvenim krvnim zrnima tehtnikom dielektroforeze



Single particle tracking

Real time gledate šta radi jedan molekul
u fiziološkim uslovima

Kojom brzinom helikaza razmotava DNK

Prolaz jona/molekula kroz membranu

Spektroskopije

Za bilo koju spektroskopiju su nam potrebni

Izvor zračenja

Uzorak

Detektor

Za magnetnu spektroskopiju nam još treba

Spoljašnje magnetno polje

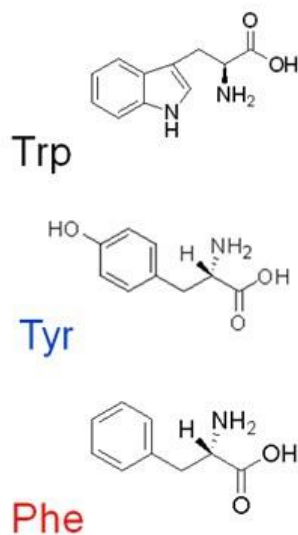
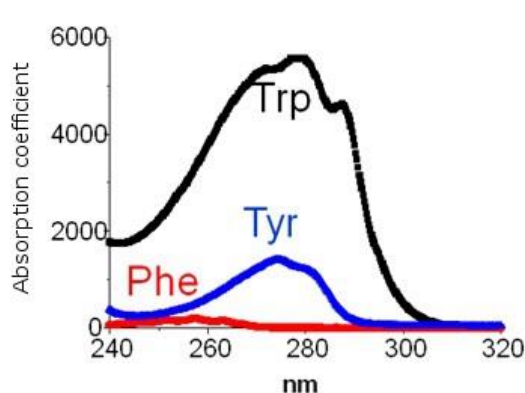
U spektroskopijama, skeniramo po ν tj. λ

I u magnetnim, može da se varira ν (NMR, MCD, MS)

a kod EPR; $\nu = \text{const}$, i skeniramo po B (“klasični” *continuous wave* spektrometri)

UV/VIS spektroskopija

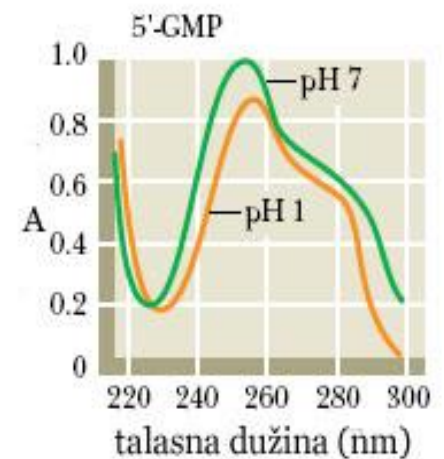
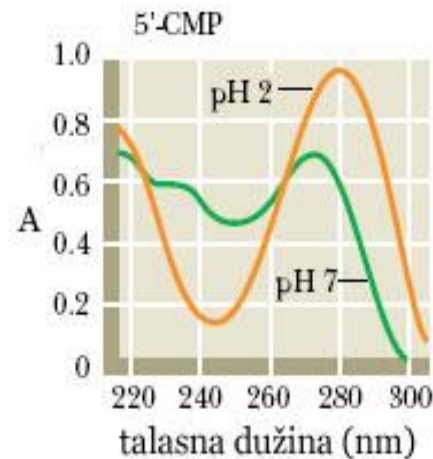
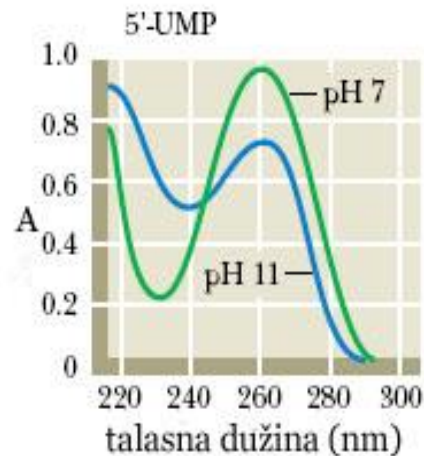
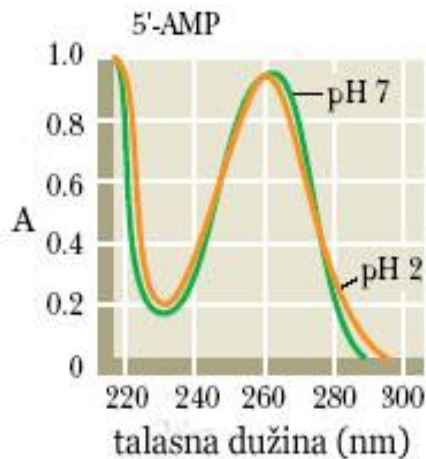
- ▶ Najčešće korišćena metoda. Lamber-Beerov zakon i aditivnost apsorbancije.
- ▶ Ultraljubičasti spektri proteina - ispituje se koncentracija na 280 nm, zbog apsorpcije amino-kiselina - fenilalanin, tirozin i triptofan ($\pi \rightarrow \pi^*$).
- ▶ Spektri amino-kiselina i peptidne veze zavise od lokalnog okruženja, pa se može koristiti za ispitivanje konformacije.



Osim aromatičnih apsorbuju :
Cys, max na 230 nm,
u disulfidnoj vezi na
250-270 nm
peptidna veza, 190 - 230 nm

Optička svojstva nukleotida

- Nukleotidi intenzivno apsorbuju u UV oblasti

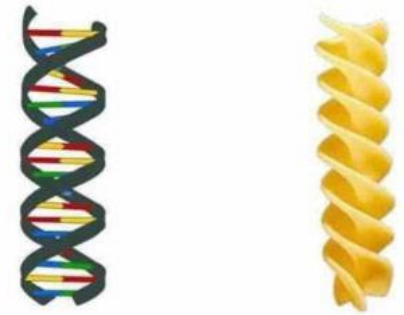


Spektri osetljivi na pH; protonizacija C i G, i deprotonizacija U i T → **crveni pomeraj**

Oblik spektra indicira stepen jonizacije

Fosfati ne utiču na spektre; npr. $\lambda_{\max}$ i $\epsilon_{\max}$ isti za ATP, ADP, AMP i A

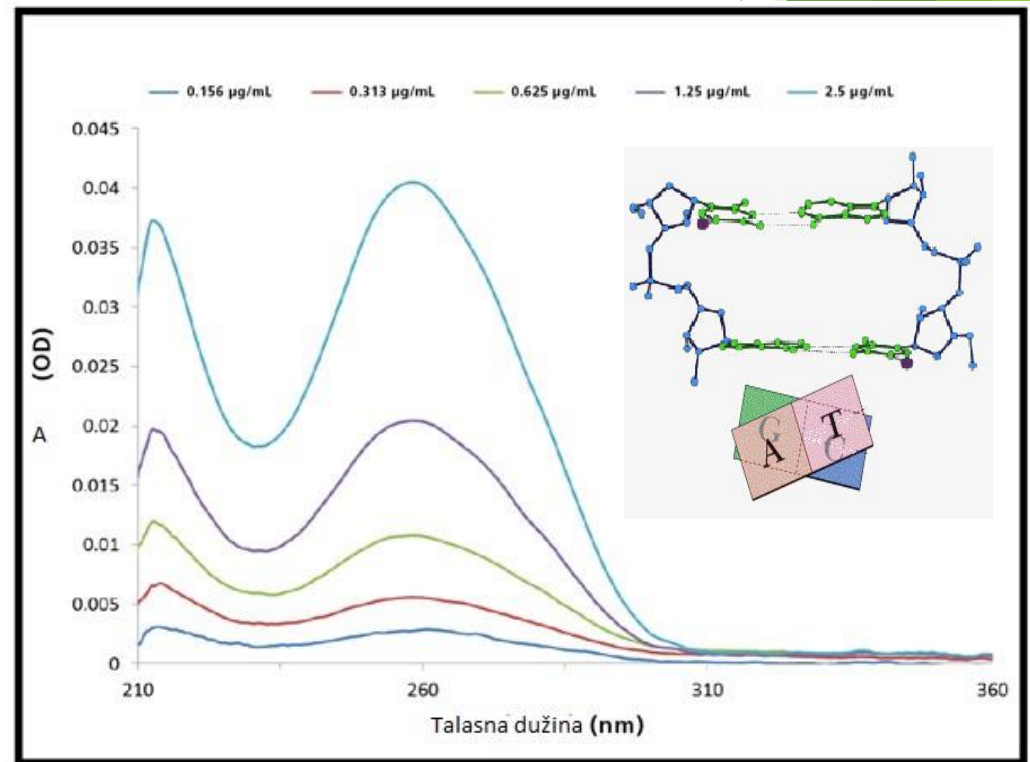
Ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija nukleinskih kiselina



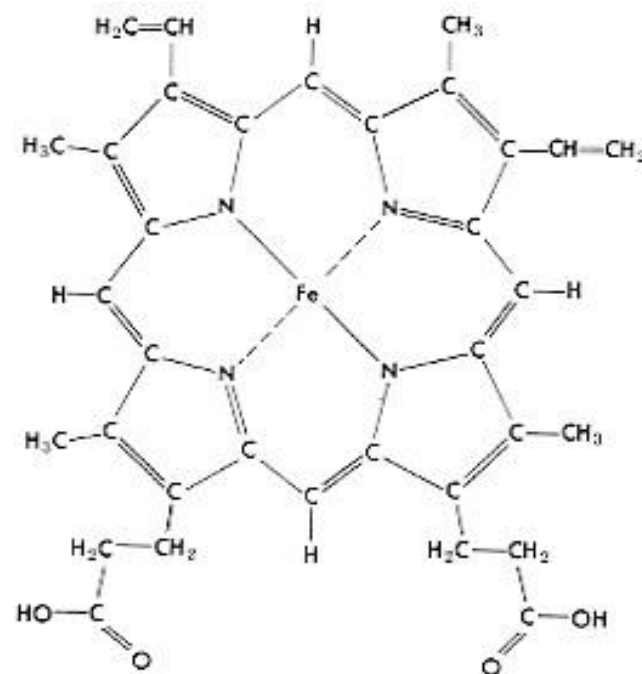
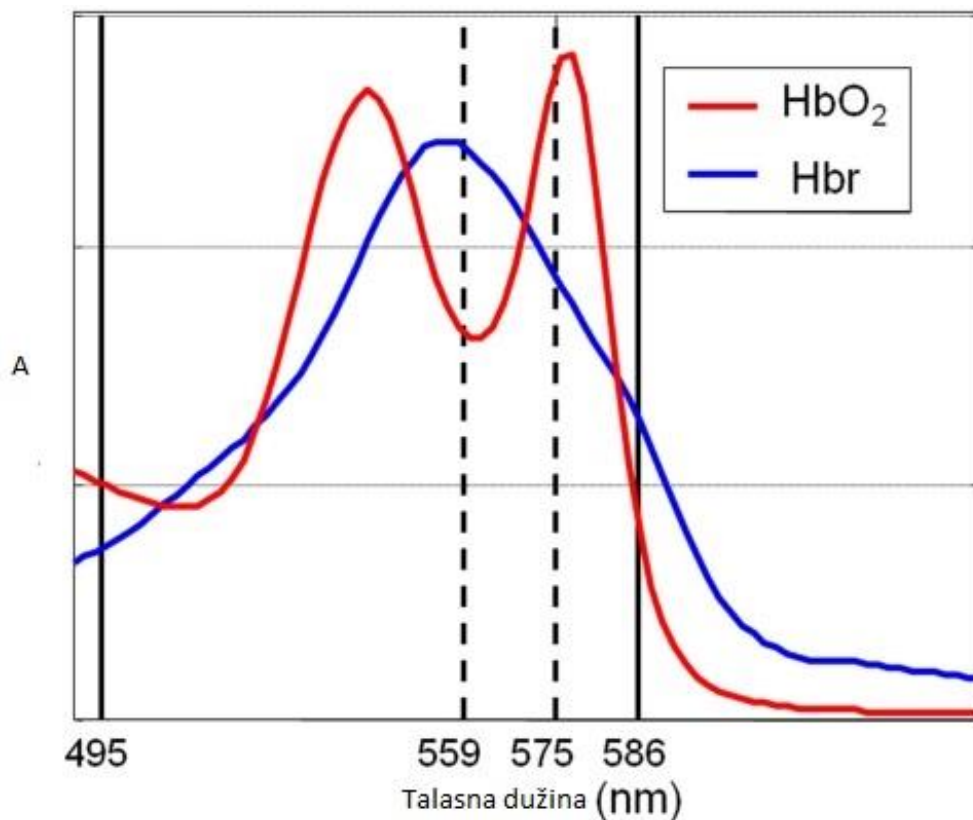
- ▶ Sve azotne baze imaju sličan elektronski spektar zbog aromatične strukture.
- ▶ Baze se “pakuju” jedna na drugu paralelno ili skoro paralelno.
- ▶ Stabilizovano vdW silama.
- ▶ Pojava hipohromizma (manja apsorbancija od zbira apsorbancija) zbog *stacking*-a baza.
- ▶ Sa zagrevanjem i gubljenjem strukture dvostrukog heliksa, menja se apsorbancija na 260 nm.

UV spektar DNK

<http://oceanoptics.com/measuring-dna-absorbance-sts-uv-microspectrometer/>



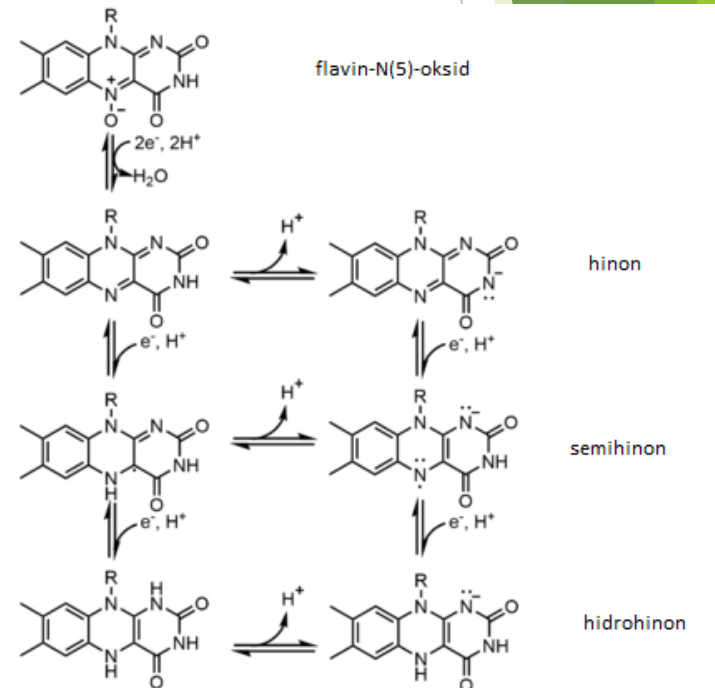
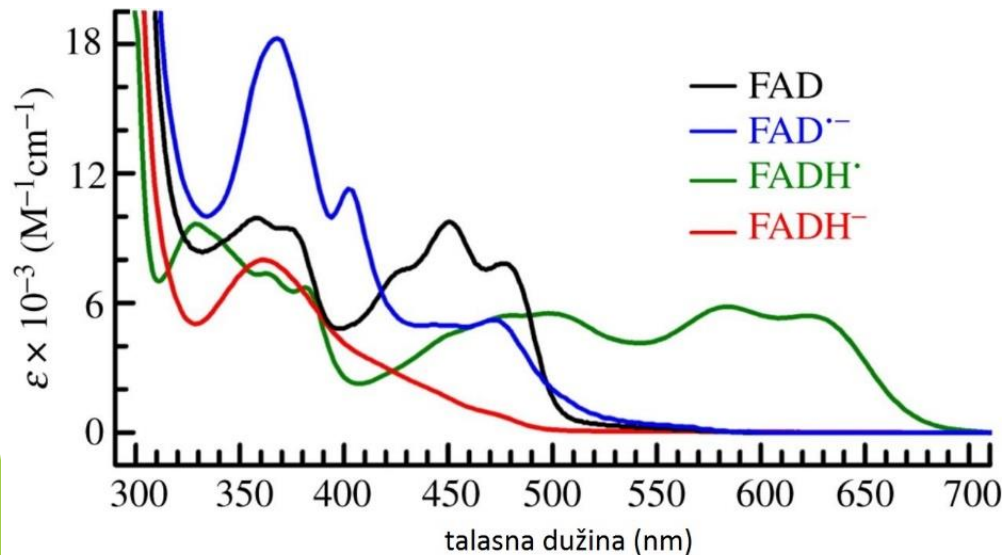
Ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija obojenih makromolekula - HEM



HEM

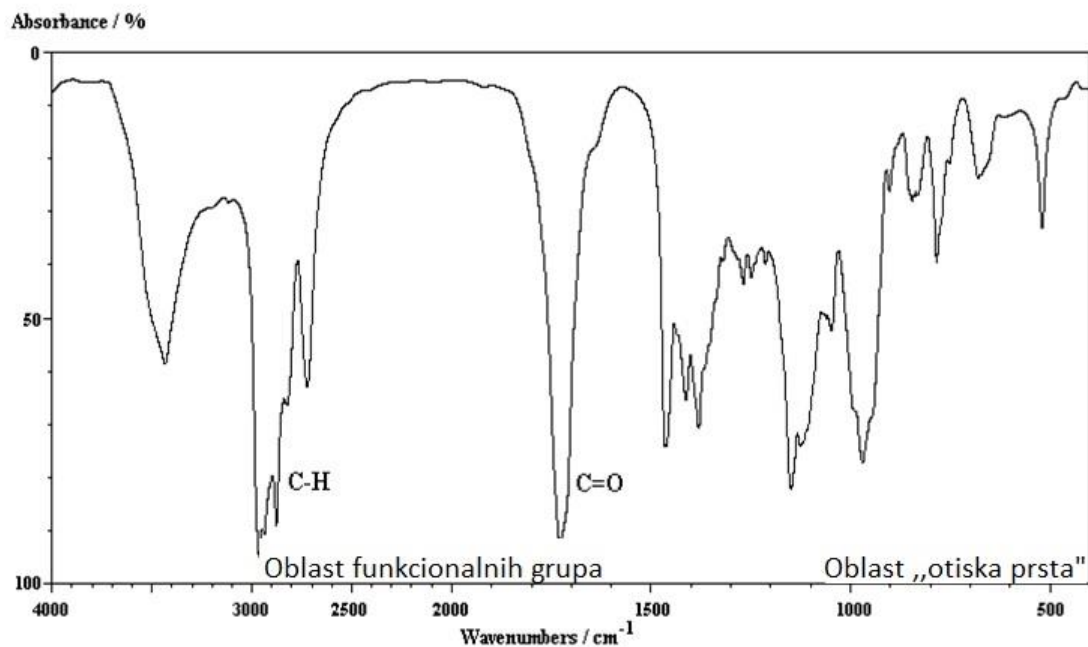
Ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija nukleotidni koenzimi

- Flavini su važna prostetička grupa i učestvuju u enzimskim redoks reakcijama. Mogu da postoje u tri oblika - oksidovanom, semihinonskom (radikal) i redukovanom, sa različitim spektrima.



IC spektroskopija (FTIC)

Tipovi molekulskih vibracija



-CH ₃	1460 cm^{-1}
-CH ₂ -	2930/2860 cm^{-1}
C-H	3300 cm^{-1}
-C-C-	1165 cm^{-1}
C=O	1730 cm^{-1} (ali zavisi dodatno od supstituenata)
Arom.	3060 cm^{-1} (fenilalanin, tirozin, triptofan)
SH	2580 cm^{-1} (cistein)
-C=N-	1600 cm^{-1}

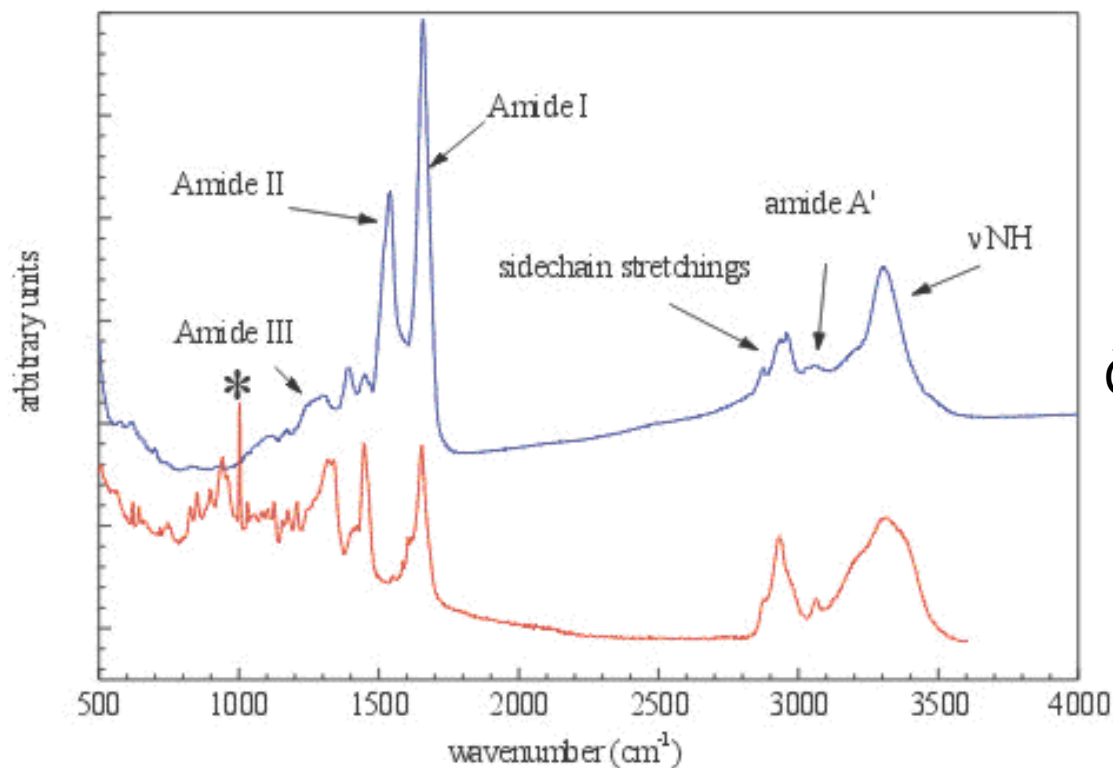
IC spektroskopija (FTIC)

Tri oblasti IC dela spektra:

- ▶ Bliska ($14000-4000\text{ cm}^{-1}$) - javljaju se trake viših tonova i kombinacione trake, slab intenzitet i voda nije problem zbog toga što nema mnogo traka. Ova oblast se koristi za kvantitativnu analizu proteina, masti, ugljovonika sa malim molekulskim masama. Zbog širine traka, koriste se programi za kalibraciju i dekonvoluciju. Koristi se posebno za ispitivanje primarnih i sekundarnih amina u prisustvu tercijarnih na osnovu oblasti 10000 do 3300 cm^{-1} .
- ▶ Srednja ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) - najčešće korišćena oblast, osnovni modovi vibracija, jak intenzitet spektra
- ▶ Daleka ($400-10\text{ cm}^{-1}$) - nije značajna, ali postoje rotacioni prelazi složenijih molekula, od male važnosti u analitici.

Ramanska spektroskopija

Komplementarna sa IC - trake koje su slabe u IC su jake u Ramanskim spektrima i obrnuto



Čvrst uzorak (film)

U rastvoru

Ramanska spektroskopija

Laseri

UV: 244 nm, 257 nm, 325 nm, 364 nm

Vis: 457 nm, 473 nm, 488 nm, 514 nm, 532 nm, 633 nm, 660 nm

Bliska IC: 785 nm, 830 nm, 980 nm, 1064 nm

Izbor lasera utiče na rezultat:

Senzitivnost - Intenzitet Ramanskog rasejanja je proporcionalan sa λ^{-4}

Prostorna rezolucija - prečnik “spot-a” je određen,
 $d = 1.22 \lambda / NA$ (NA apertura objektiva)

Npr: za 0.90/100x objektiv, 532 nm laser će dati spot od 0.72 μm , dok će 785 nm laser dati spot od 1.1 μm .

IC i Raman poređenje

Apsorpcija svetlosti

Promena dipolnog momenta

Ne može H_2O

Zahteva pripremu uzorka

Nije mnogo skupo



Symmetrical stretch

Nema promene
dipolnog
momenta -
IC neaktivno

Promena
polarizabilnosti

Raman aktivno



Asymmetrical stretch

Promena dipolnog
momenta -
IC aktivno

Raman neaktivno

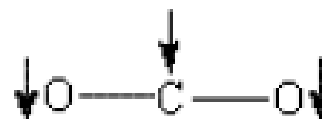
Rasipanje svetlosti

Promena polarizabilnosti

Može H_2O

Ne zahteva pripremu uzorka

Skupo je



In plane bending

IC aktivno

Nema promene polarizabilnosti

Raman neaktivno



Out of plane bending

IC spektroskopija (FTIC)

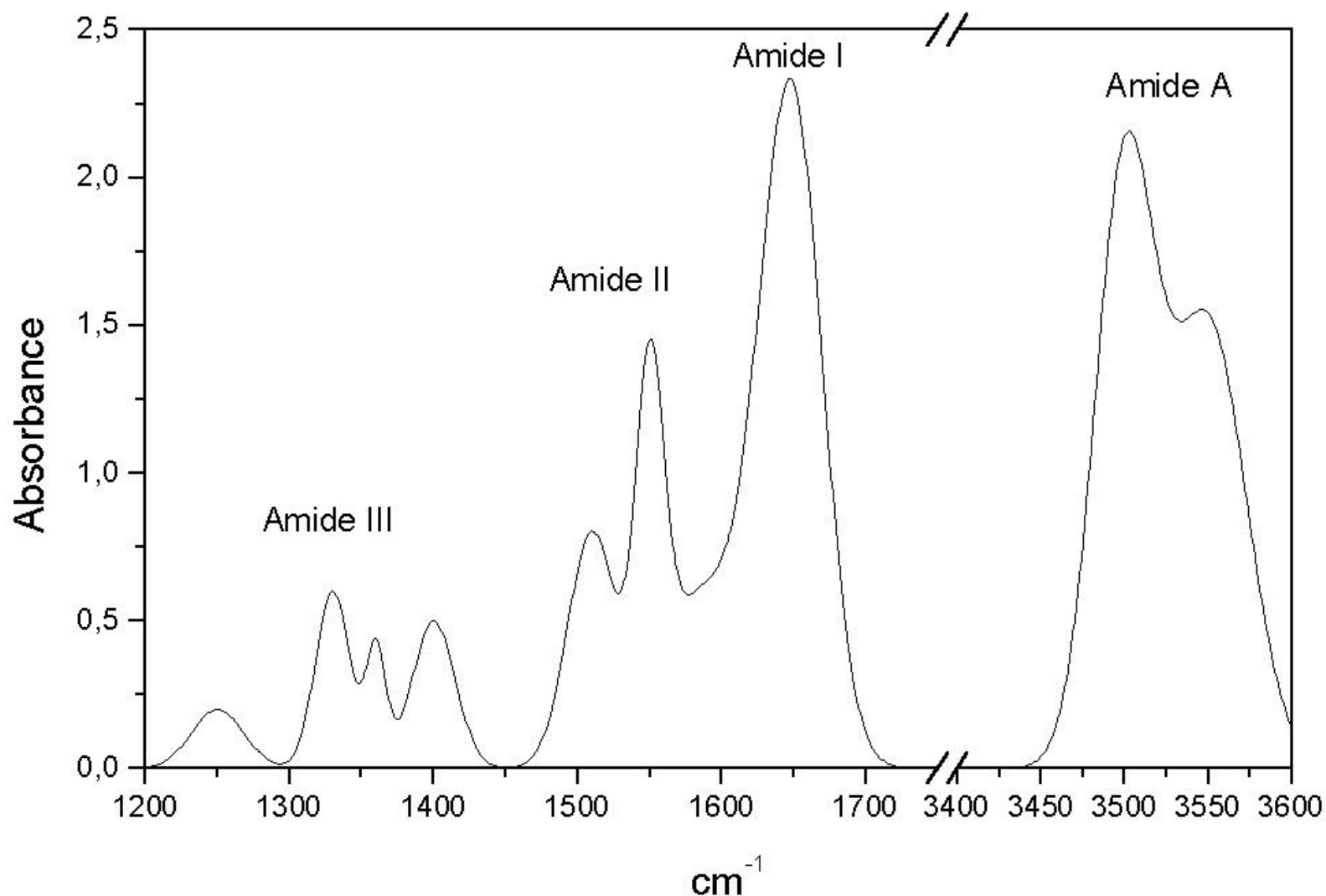
- ▶ 3 trake u IC spektru proteina su posebno važne (tabela)
- ▶ Sve 3 su apsorpcione trake peptidne grupe

Karakteristike IC apsorpcionih traka peptidnih grupa		
Vibracije	ν (cm ⁻¹) za α -heliks	ν (cm ⁻¹) za β -ravan
Amid A N-H istezanje $\leftarrow \text{N} - \text{H} \rightarrow$	3290-3300	3280-3300
Amid I (C=O istezanje) $\leftarrow \text{C} = \text{O} \rightarrow$	1650-1660	1680-1700
Amid II $\begin{array}{c} \uparrow \\ \text{H} \\ \\ \leftarrow \text{C} - \text{N} \rightarrow \\ \\ \downarrow \end{array}$	1540-1550	1520-1525

Najintenzivnija

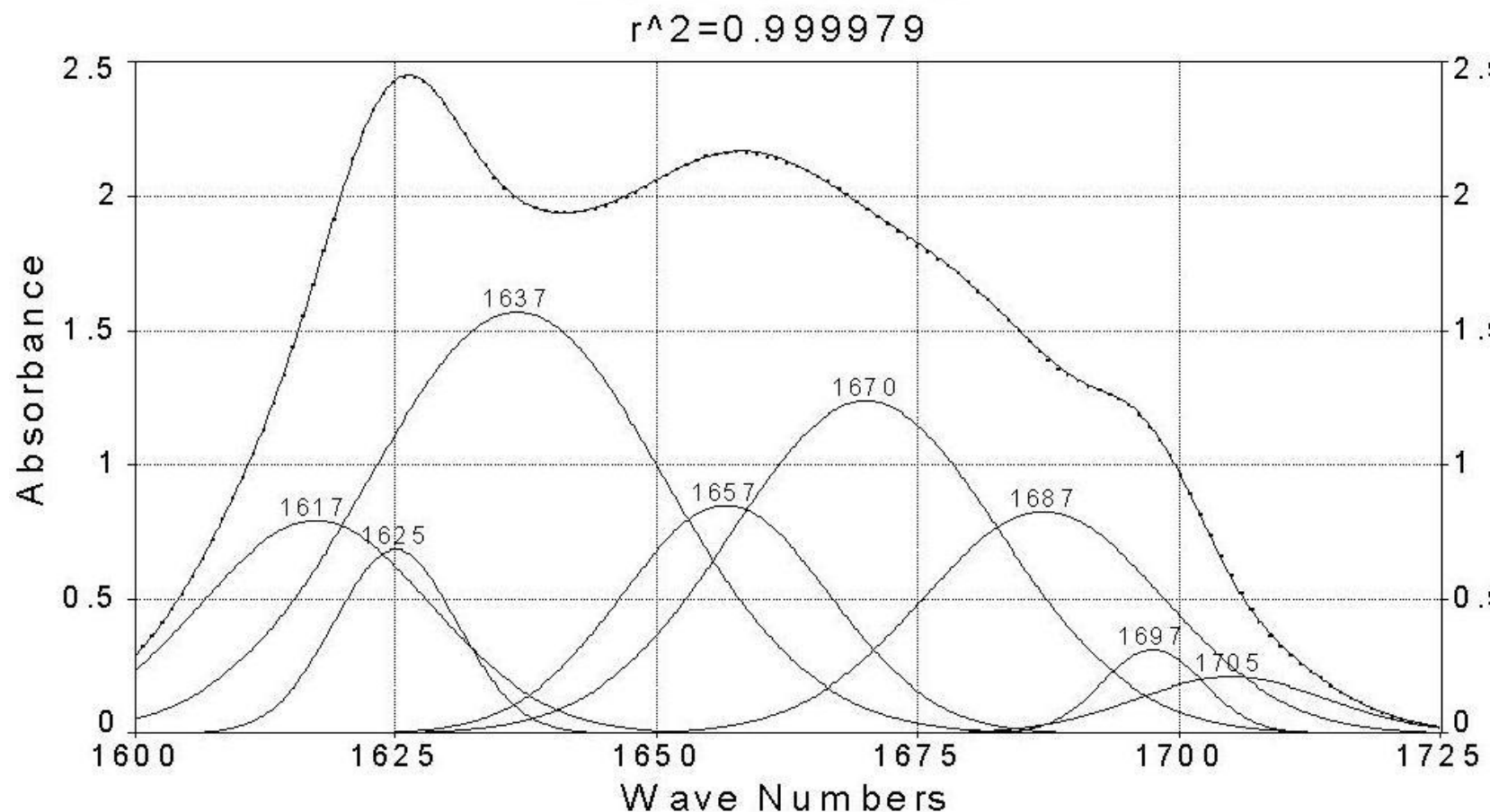
- Ukupno 9 traka od peptidne grupe: amid A, B, I, II, III, IV, V, VI, VII
- Vibracije bočnih grupa u oblasti 1800 and 1400 cm⁻¹

FTIC spektroskopija



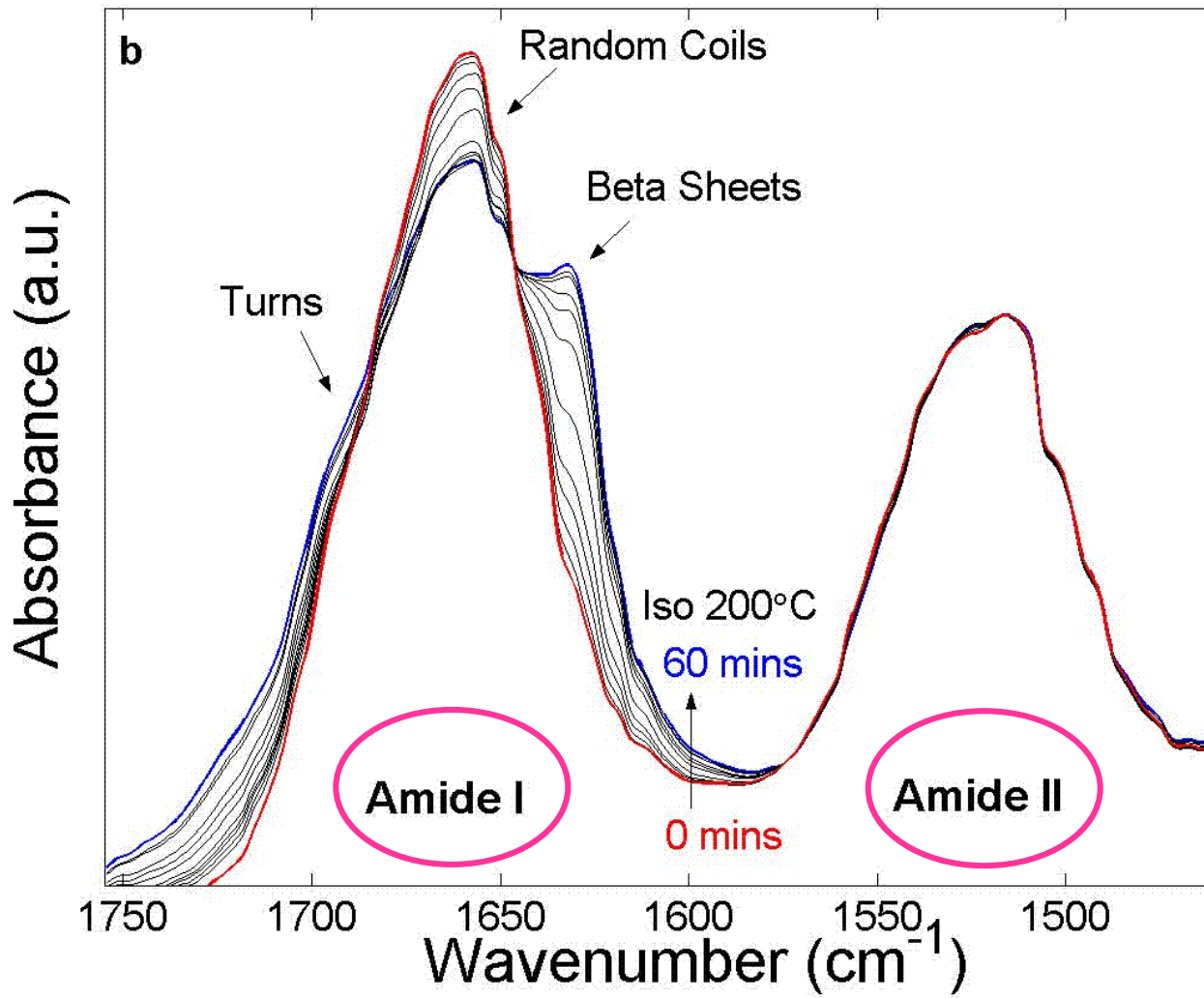
FTIC spektroskopija

Dekonvolucija signala - exp. spektar lizozima



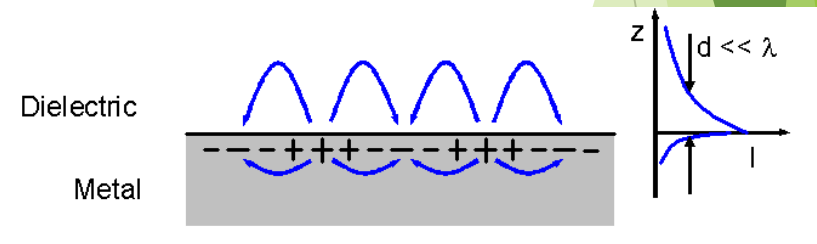
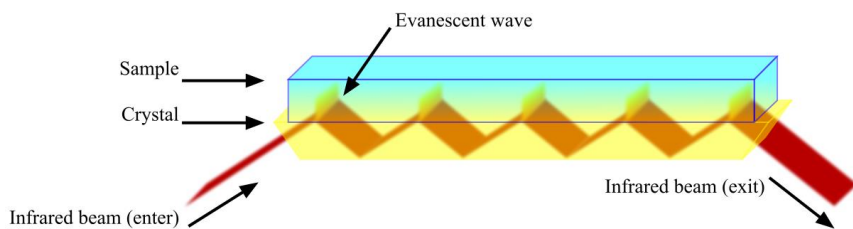
FTIC spektroskopija

Primer: promena sek. strukt. fibroina tokom kristalizacije



Tehnike IC spektroskopije - ATR

- ▶ ATR (Attenuated Total Reflection) - primena kod čvrstih i tečnih uzoraka - polimerna vlakna, guma, hrana, biološki uzorci.
- ▶ Nema pripreme uzoraka. Spektri refleksije daju iste informacije kao apsorpcioni, iako ne izgledaju isto.
- ▶ Ukoliko je prisutan propusni kristal velikog indeksa refrakcije, onda se zrak odbija i prolazi kroz uzorak do nekoliko mikrometara (prolazni zrak - *evanescent wave*). Ukoliko postoji apsorpcija svetlosti, zrak je prigušen.
- ▶ Dobro za ispitivanje bioloških uzoraka zbog malog prolaska zraka u uzorak, tako da nema pripreme i oštećenja uzorka.



Evanescentni talas - gde se električno ili magnetno polje ne prostire kao EM talas, već se zadržava u okolini izvora.

Primeri primene IC spektroskopije

- ▶ Ispitivanje koncentracije klinički značajnih supstanci u biološkim fluidima, kroz pretpostavku da spektar daje sumu svih aktivnih vibracija molekula u fluidu. Koristi se metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (kroz kalibraciju spektara sa poznatim koncentracijama molekula od interesa).
- ▶ Ove metode mogu da se koriste kvalitativno (ukoliko se u biološkim fluidima nalaze markeri) ili kvantitativno (promena koncentracije) - primer je artritis i promena koncentracije hijaluronske kiseline i njenih produkata. Često se posmatraju spektri razlike kako bi se lakše uočila promena.
- ▶ Primena multivarijantne analize omogućava da se na osnovu visine i širine maksimuma odrede promene koncentracija.

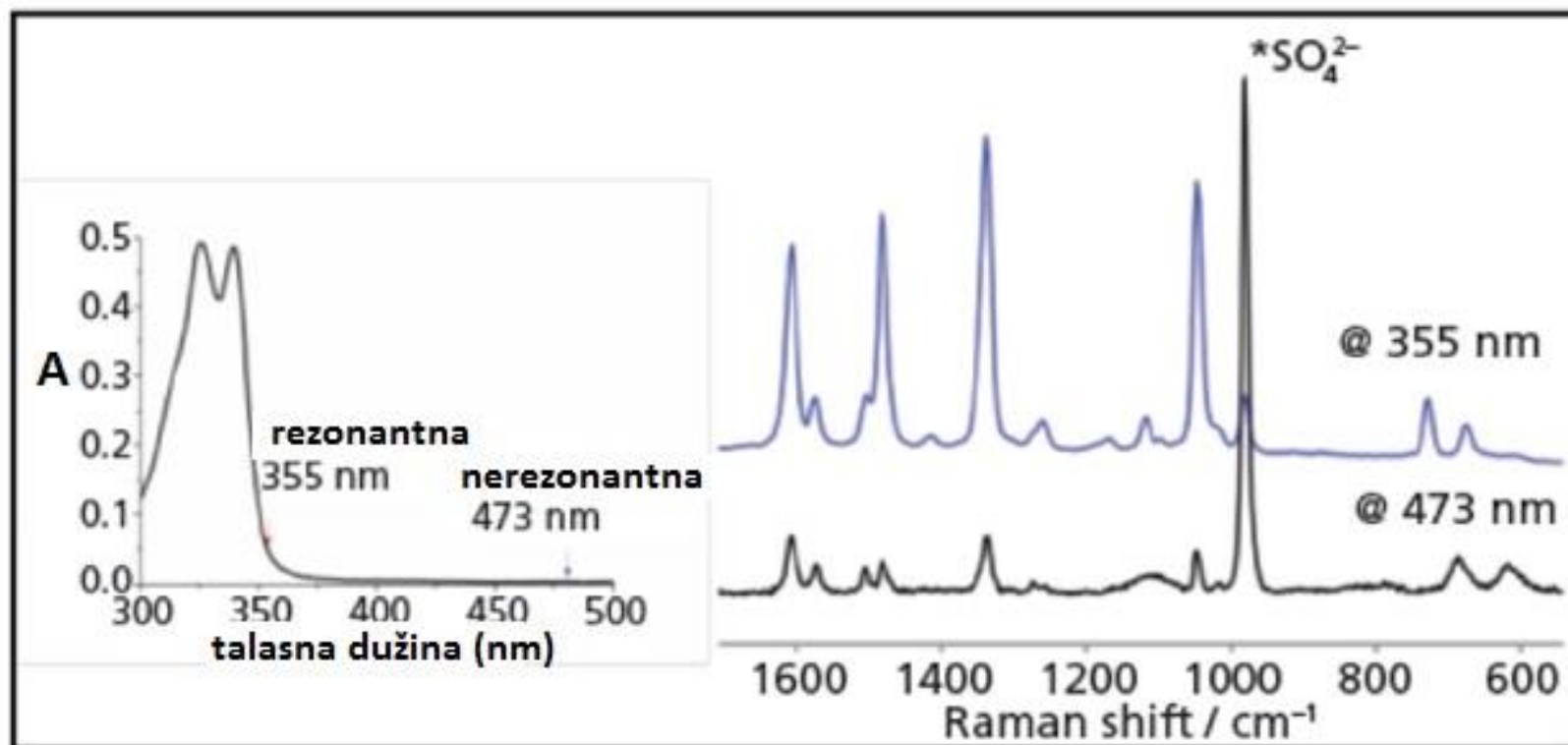
Primena metoda IC spektroskopije u analizi bioloških uzoraka

- ▶ Mogu se ispitivati različiti tipovi uzoraka: krv, urin, znoj, pljuvačka, serum, amniotska tečnost, izolovane ćelije, brisevi, uzorci tkiva, bakterijske kulture.
- ▶ IC spektroskopija zahteva pripremu uzorka - brzo sušenje i oduzimanje spektra vode ili korišćenje ATR tehnike, tkiva se presuju između pogodnih supstrata.
- ▶ Kod složenih sistema se može koristiti kombinacija D_2O i H_2O u analizi, ali ograničeno zbog bioloških uzoraka.
- ▶ Optimalna količina uzorka - tkiva (zapremina $1mm^3$, ćelijske suspenzije 10-50000 ćelija).

Rezonantna ramanska spektroskopija

- ▶ Koristimo laser sa frekvencijom bliskom onom iz apsorpcione trake molekula.
- ▶ Trake simetričnih vibracija se intenziviraju i pojavljuju se trake viših harmonika koji se ne opažaju u običnoj ramanskoj spektroskopiji (rezonantno pojačane).
- ▶ Interferencija sa fluorescencijom, ali zbog različitog mehanizma se mogu razlikovati primenom vremenski razložene spektroskopije.
- ▶ Prednosti: sadrži trake samo hromofore koja apsorbuje zračenje, granica detekcije smanjena do 10^{-6} mol/dm³, bolja kvantitativna analiza, posebno kompleksa prelaznih metala koji su obojeni.
- ▶ Sa razvojem lasera, ispituju se proteini i nukleinske kiseline.
- ▶ Primenom impulsnih lasera ispituju se ultrabrzi procesi i intermedijeri.
- ▶ Primjenjuje se standardno osvetljenje ali uz rotirajuću ćeliju ili refleksionu površinu kako se ne bi pregrijao uzorak.

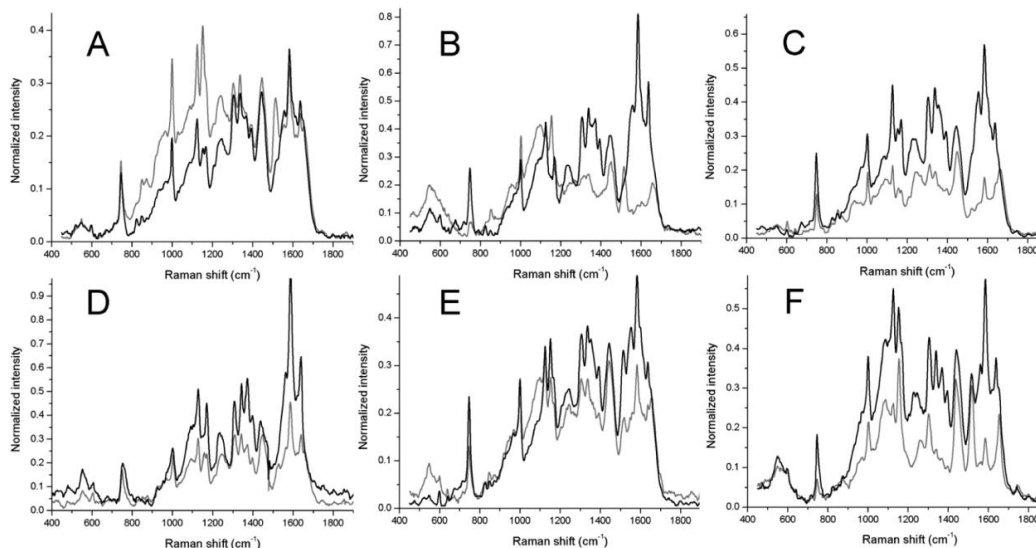
Rezonantna ramanska spektroskopija



Selektivno pojačanje traka <http://www.cobolt.se/applications/raman-spectroscopy/>

Primena metoda ramanske spektroskopije u analizi bioloških uzoraka

- ▶ Ramanska spektroskopija ne zahteva uvek pripremu uzorka.
- ▶ Nepoželjni su uzorci koji imaju fluorescenciju (česta pojava u biološkim uzorcima, ali primenom lasera veće talasne dužine se može kontrolisati) + opcija fotoblićinga.
- ▶ Dobijeni spektri su veoma komplikovani, primena različitih metoda dekonvolucije spektara.

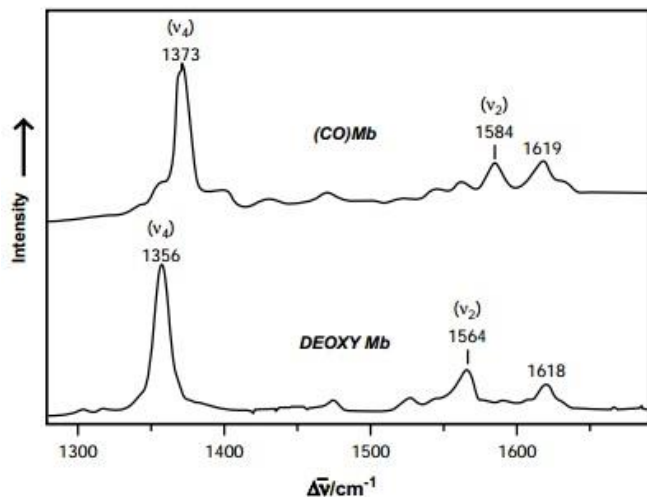


Spektri se analiziraju upotrebom PCA, a rezultati se dalje obrađuju pomoću NN.

FIGURE 1. Examples of the mean Raman spectra of different types of diseased (gray line) and surrounding healthy (black line) tissues: (A) chondrosarcoma, (B) malignant peripheral nerve sheath tumor, (C) lung squamous carcinoma, (D) lung adenocarcinoma, (E) rhabdomyosarcoma, and (F) hepatocellular carcinoma.

Primena rezonantne ramanske spektroskopije - hem protein

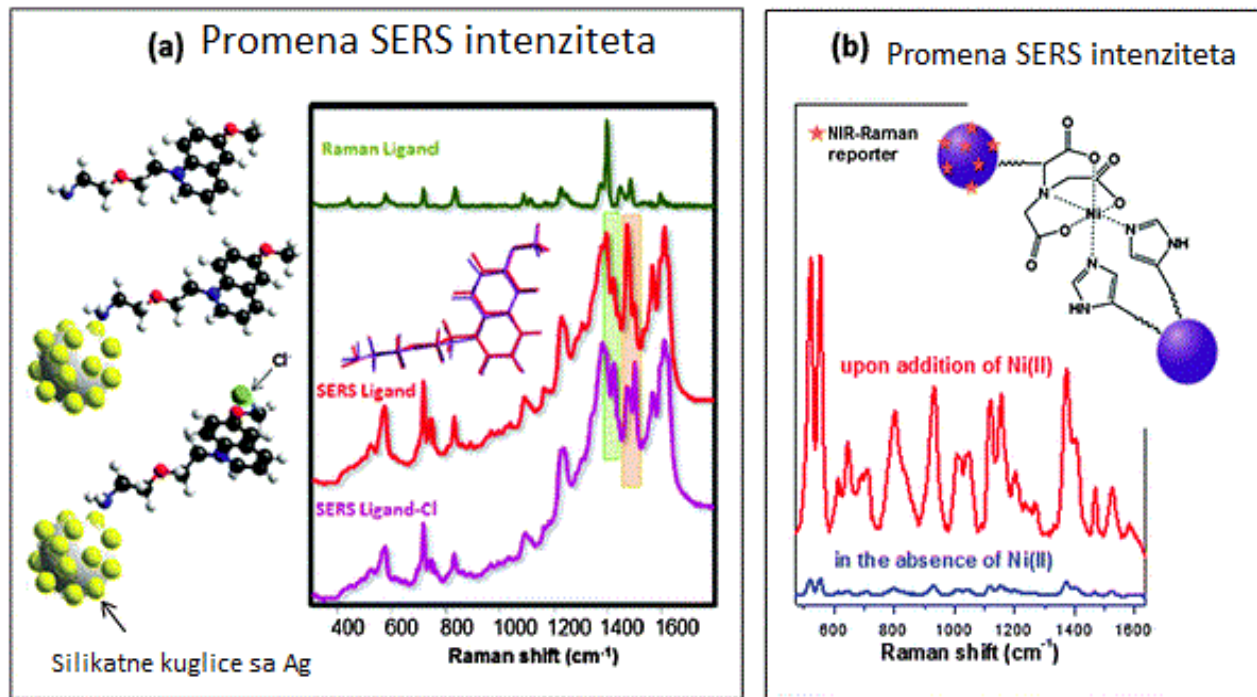
- ▶ Ovom tehnikom se ispituju obojeni kompleksi metala (kao što je hem protein). Oblast $1650\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ je veoma osetljiva na stanje Fe u kompleksu, tako da se mogu odrediti spinsko i koordinaciono stanje u oba oksidaciona stanja.
- ▶ Prikazani su rezonantni ramanski spektri deoksimioglobina i ugljenmonoksid-mioglobina.



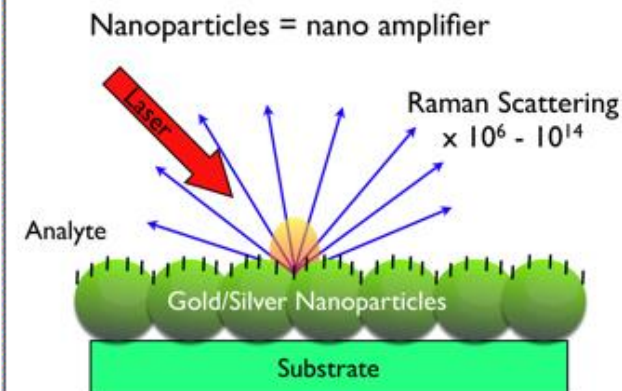
- a) Rezonantni ramanski spektar ugljenmonoksid-mioglobina
- b) Rezonantni ramanski spektar deoksi-mioglobina.

Površinski pojačana ramanska spektroskopija

Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)

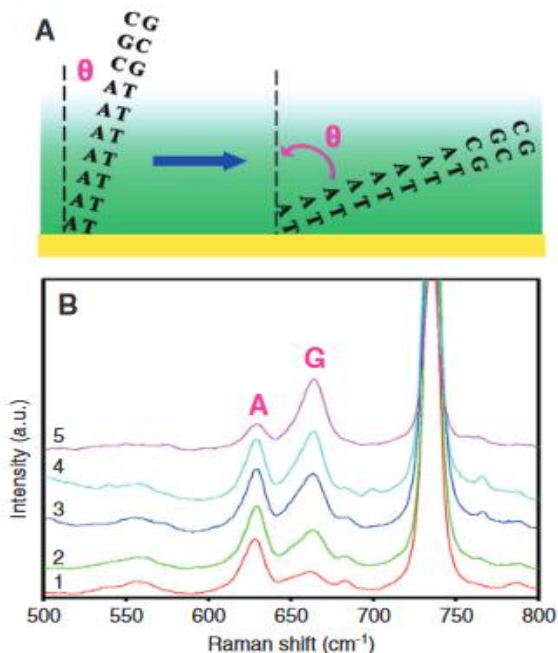


Mehanizam nastanka SERS-a.



- Adsorbujemo biomolekule koje posmatramo na površinu metala (srebro ili zlato) (često se koristi i koloidni rastvor metala).
- Pojačavanje signala do 10^{10} - 10^{11} (naročito kod surface-enhanced resonant Raman scattering (SERRS)).
- Mehanizmi nastanka - elektromagnetni (rezonancija plazmona sa fotonima) i hemijski (preklapanje orbitala metala i molekula i transfer naelektrisanja, što menja polarizabilnost).

Primena SERS-a u analizi nukleinskih kiselina



A - eksperimenti sa uglom DNK lanca u odnosu na metalnu površinu. B - promena SERS spektra sa koncentracijom DNK

Cialla, D., Pollok, S., Steinbrücker, C., et al. (2013). SERS-based detection of biomolecules. *Nanophotonics*, 3(6), pp. 383-411.

- ▶ Vibracioni modovi adenina su najizraženiji u SERS spektrima nukleinskih kiselina. Ova baza ima intenzivnu traku na 730 cm^{-1} , što odgovara vibraciji u ravni.
- ▶ Na SERS spektar utiču vreme interakcije metalne površine i molekula, kao i njihova koncentracija.
- ▶ Pri velikim koncentracijama DNK (gusto pakovanje) traka adenina je intenzivnija. Odavde se zaključuje da veći adeninski signal ukazuje na manje ugao između DNK i metalne površine.

Cirkularni dihroizam (CD)

- ▶ **CD spektroskopija** meri razliku u apsorpciji levo i desno polarizovane svetlosti koja je posledica strukturne asimetrije.
- ▶ **Peptidna veza** je optički aktivna.
- ▶ CD spektar proteina je odraz njegove **sekundarne strukture** - uređene strukture imaju CD signale dok neuređene nemaju.
- ▶ **CD spektar** - grafički predstavljena zavisnost molarnog elipticiteta neke supstancije od talasne dužine upadnog zračenja, $[\theta] = f(\lambda)$

CD za proučavanje sekundarne strukture proteina

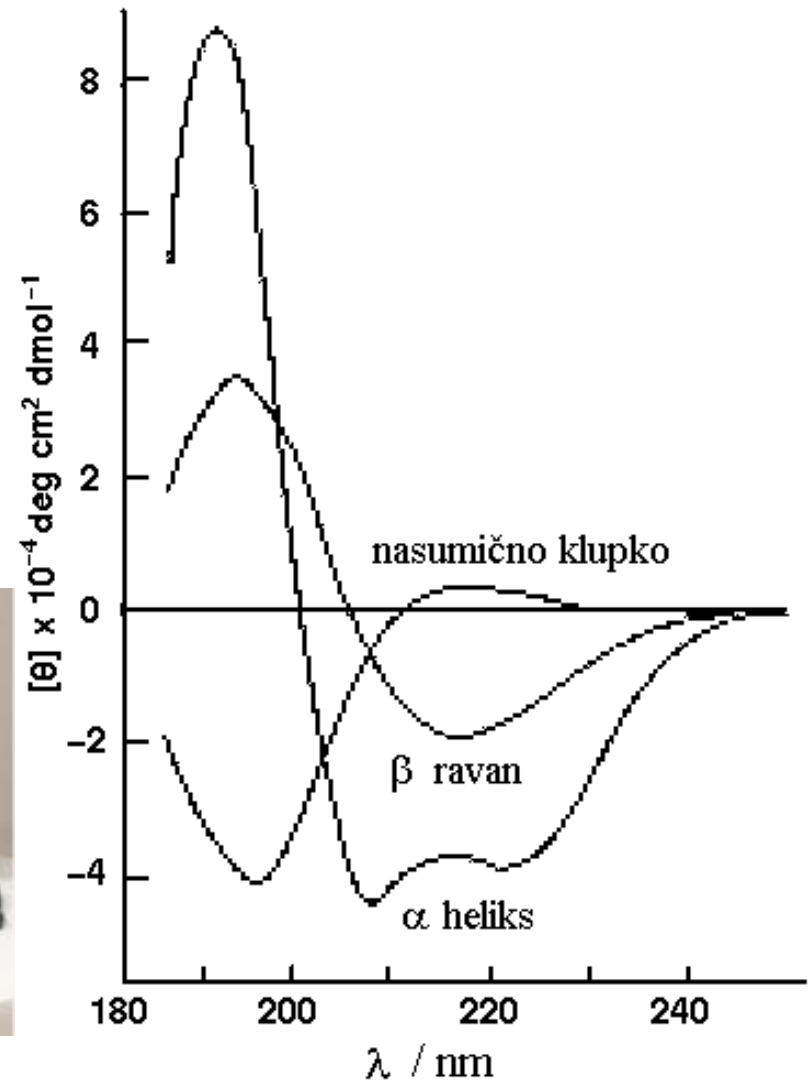
- Daleka UV oblast (180-250 nm)
- Ukoliko je protein u nativnoj konformaciji - peptidna hromofora će davati CD signal.

Peptidna hromofora:

$n \rightarrow \pi^*$ 210-220 nm

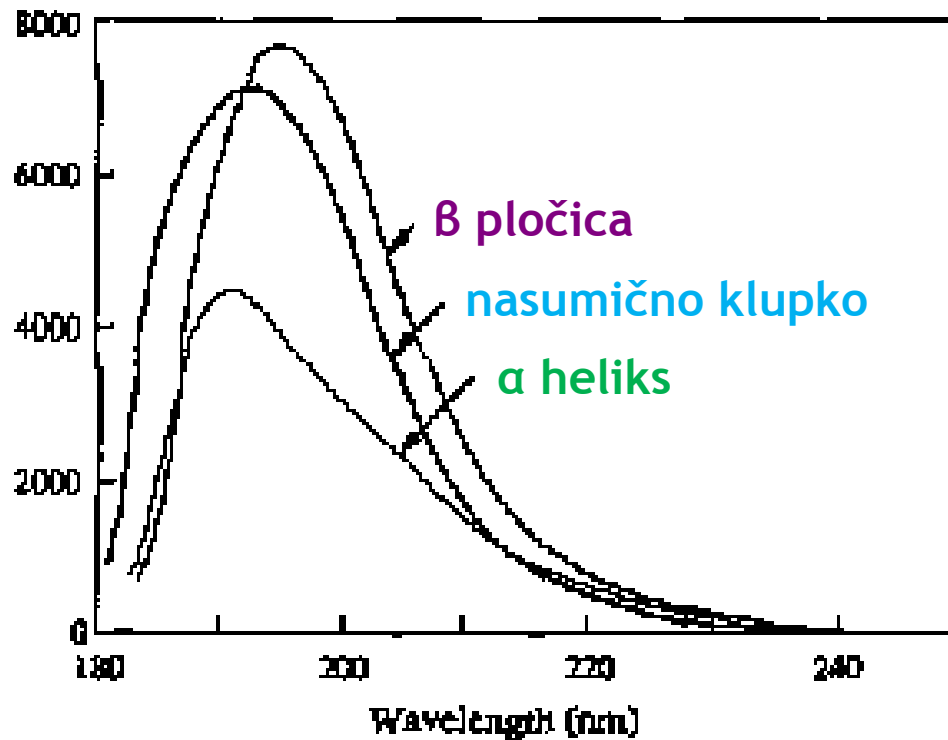
$\pi \rightarrow \pi^*$ 190 nm (najintenzivnija)

$n \rightarrow \sigma^*$ 175 nm

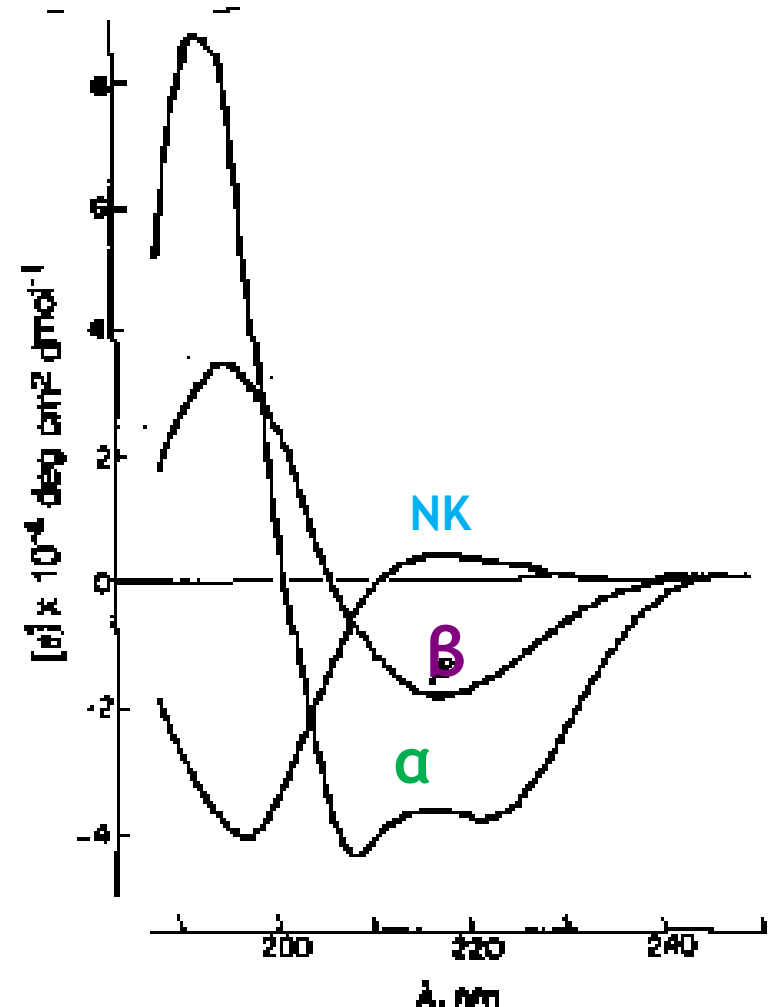


Cirkularni dihroizam

Apsorpcioni spektar



CD spektar



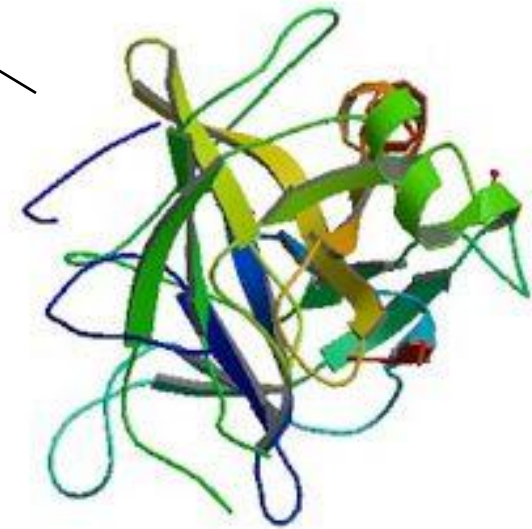
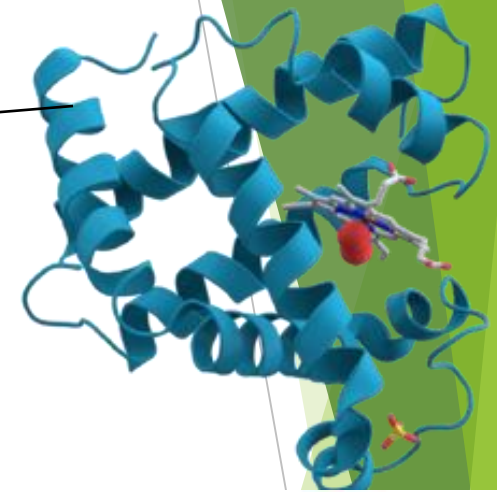
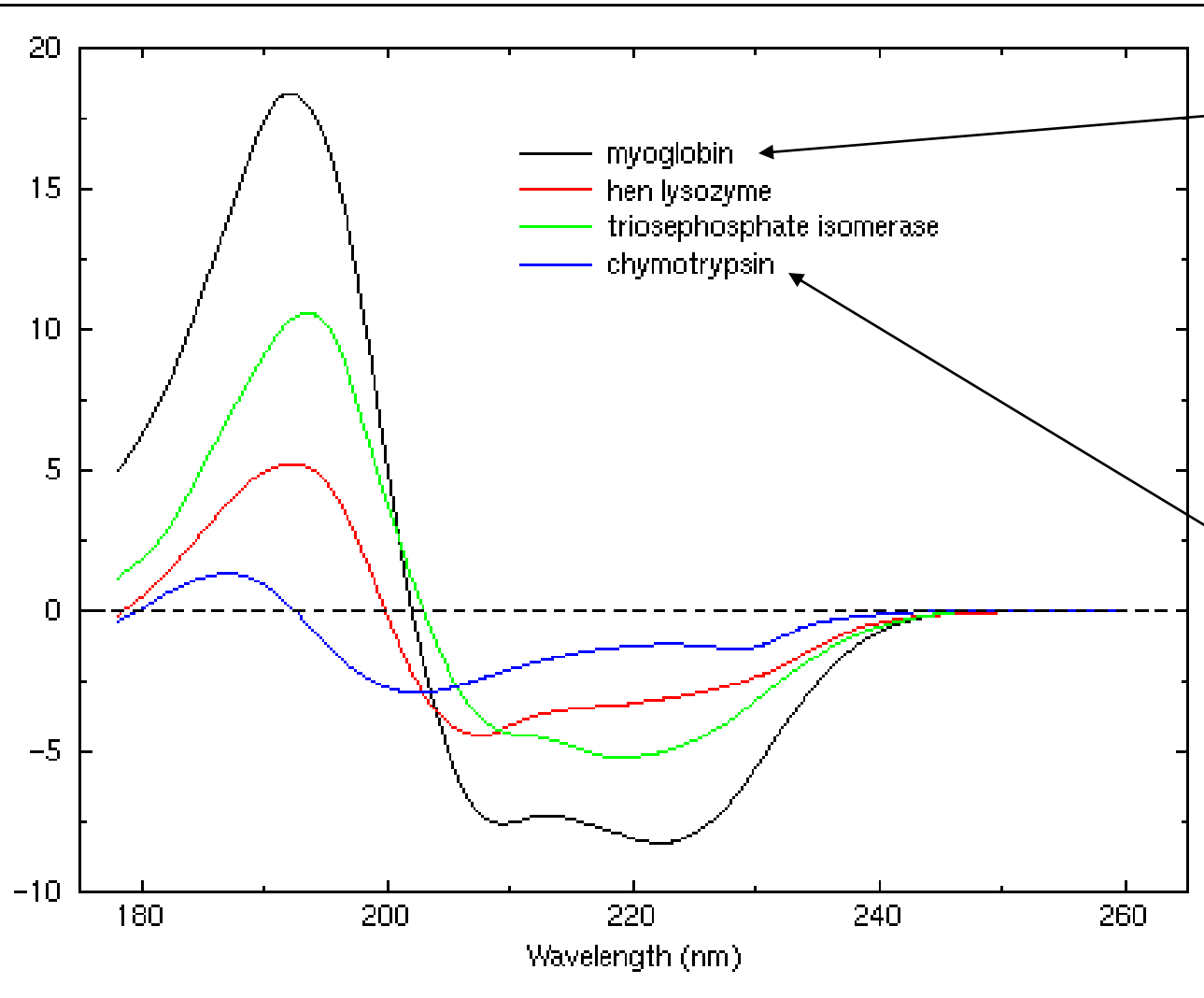
Peptidna hromofora:

$n \rightarrow \pi^*$ 210-220 nm

$\pi \rightarrow \pi^*$ 190 nm (najintenzivnija)

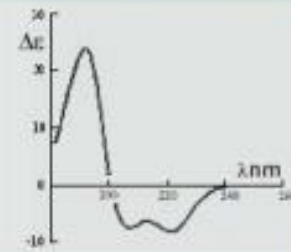
$n \rightarrow \sigma^*$ 175 nm

Cirkularni dihroizam

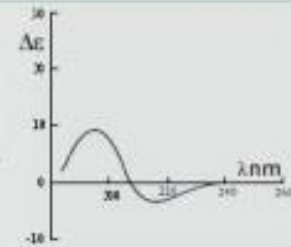
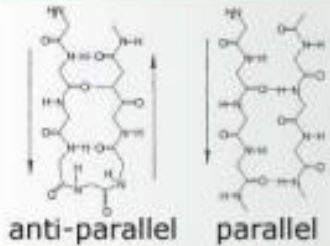


Primeri CD spektara

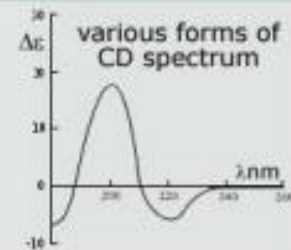
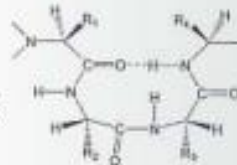
α -helix
(H-bonded)



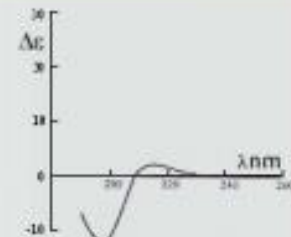
β -sheet
parallel and
anti-parallel
(H-bonded)



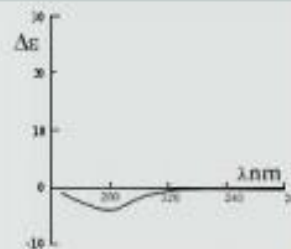
β -turn
(Type I, II, III.....)
 γ -turns
(some turns not
H-bonded in proteins)



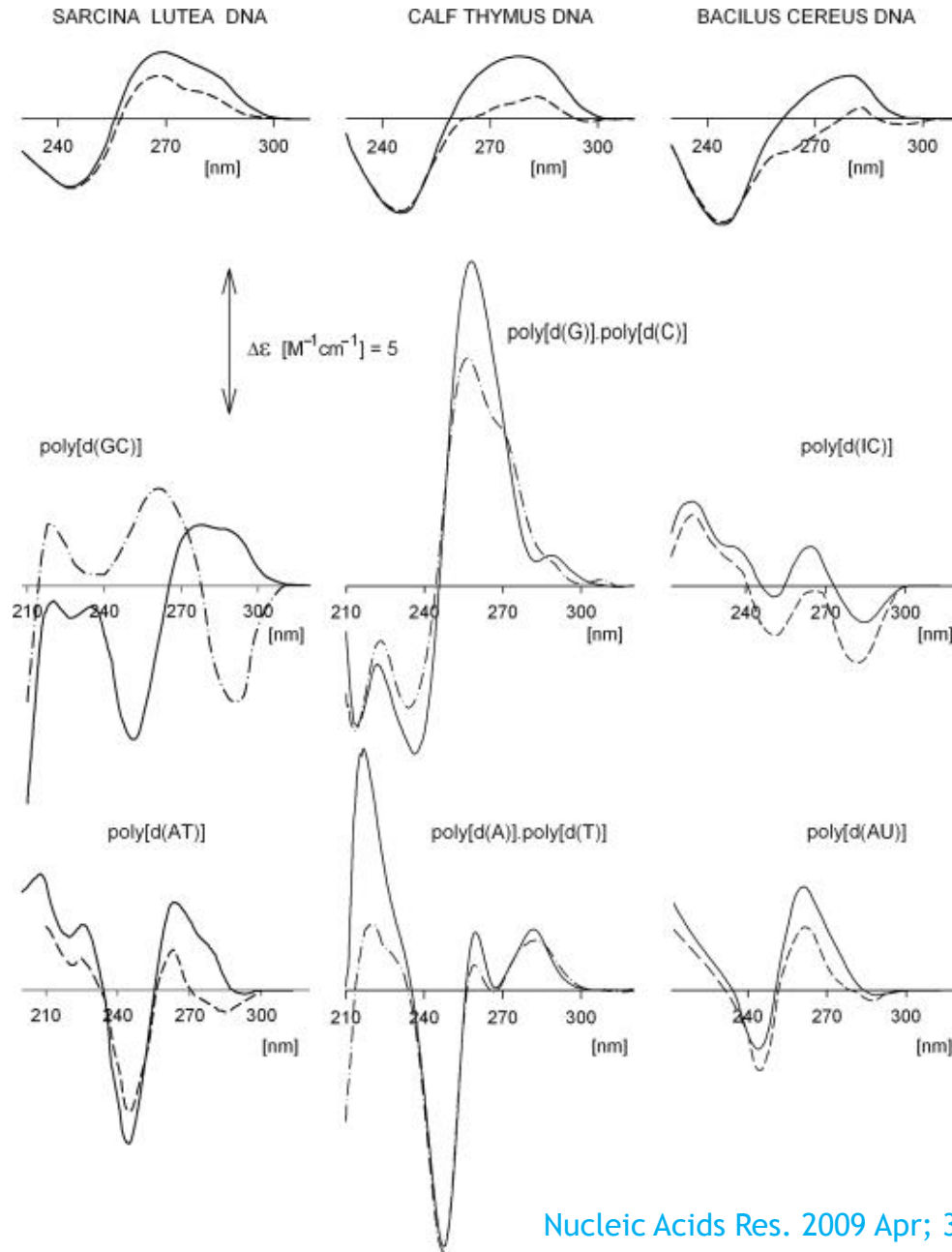
Polyproline
PII helix
3₁-helix
(H-bonded)
(left hand
extended helix,
no intramolecular H-bonds)



Irregular
(Disordered)



CD nukleinskih kiselina



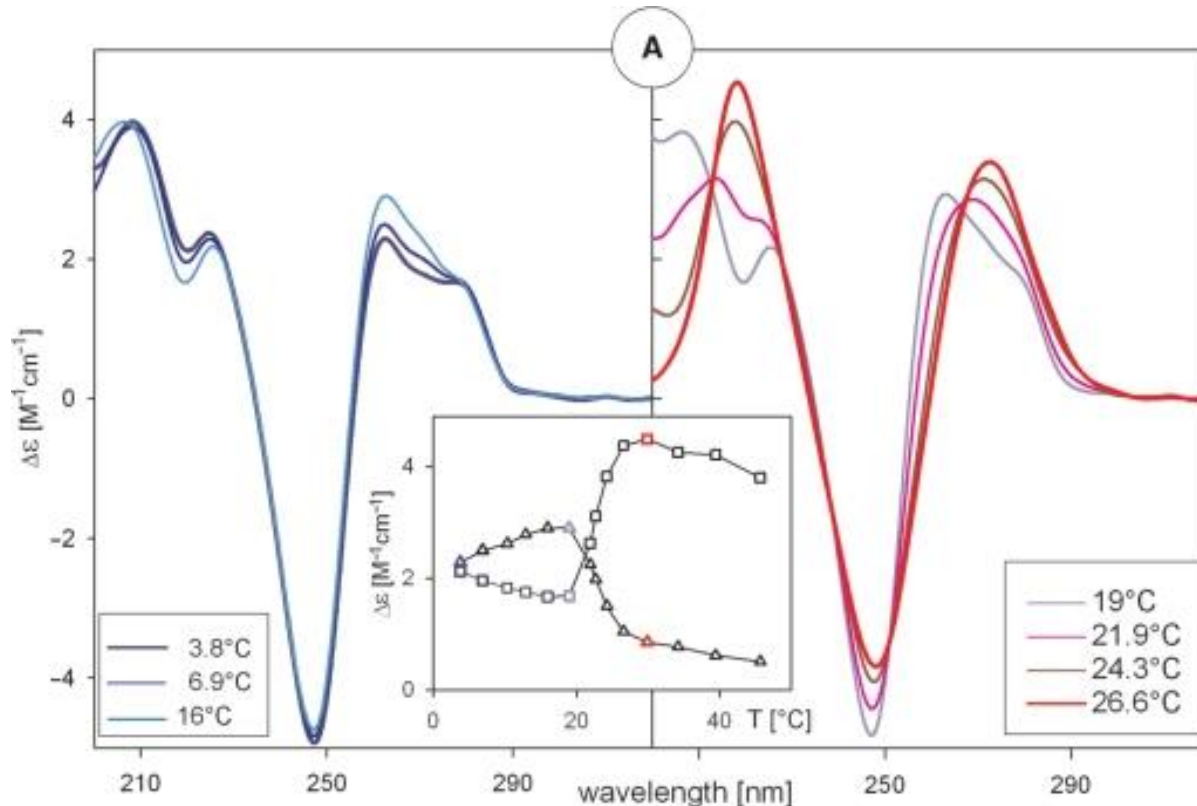
CD nukleinskih kiselina

Denaturacija

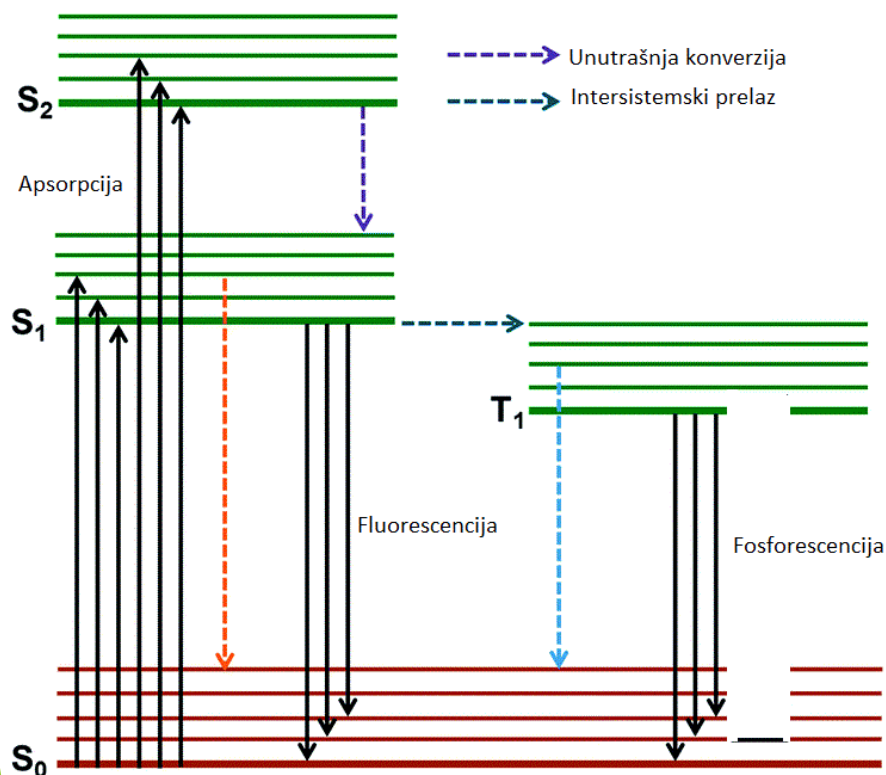
Vezivanje liganada, lekova:

Groove binders - vezuju se u malom džepu

Intercalators - izmedju baznih parova



Fluorescencija i fosforescencija



Dijagram Jablonskog sa prikazanim elementarnim procesima.

Vibraciona relaksacija 10^{-9} - 10^{-12} s.

Unutrašnja konverzija 10^{-7} - 10^{-9} s

Intersistemski prelaz

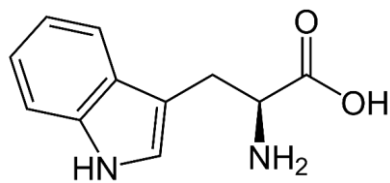
Fluorescencija 10^{-6} - 10^{-9} s

Fosforescencija 10^{-4} - 10^2 s

Kvantni prinos za svaki od procesa

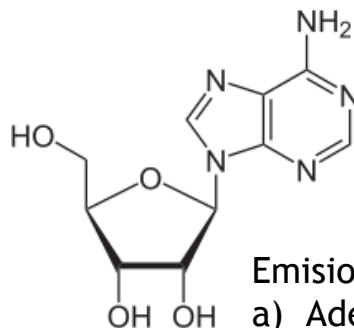
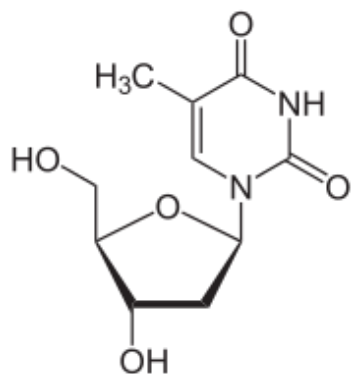
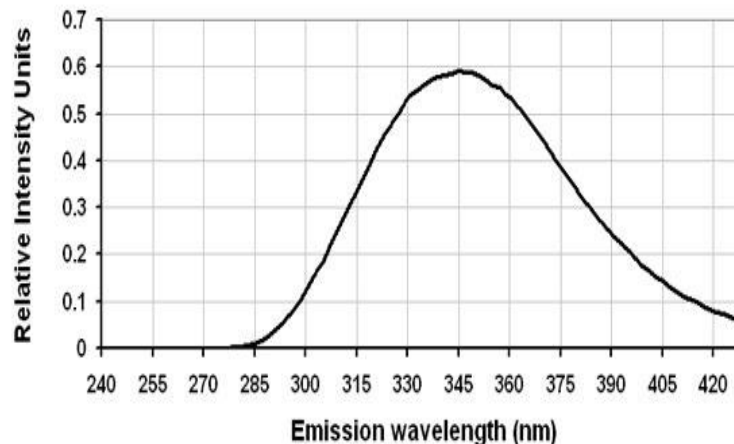
$$Q = \frac{\text{broj molekula dezakt. datim procesom}}{\text{ukupan broj apsorbovanih fotona}}$$

Fluorescencija biološki važnih molekula



Struktura i emisioni spektar triptofana.

<http://icecube.berkeley.edu/~bramall/work/astrobiology/fluorescence.htm>

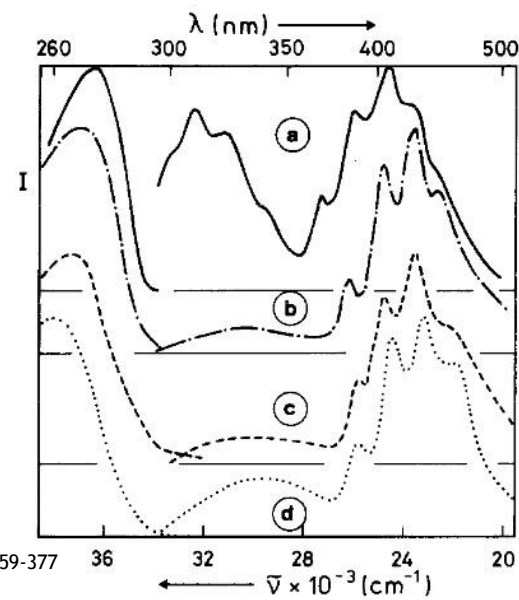


Nukleozidi: Timidin i adenozin.

www.wikipedia.com

Emisioni i fluorescentni spektar

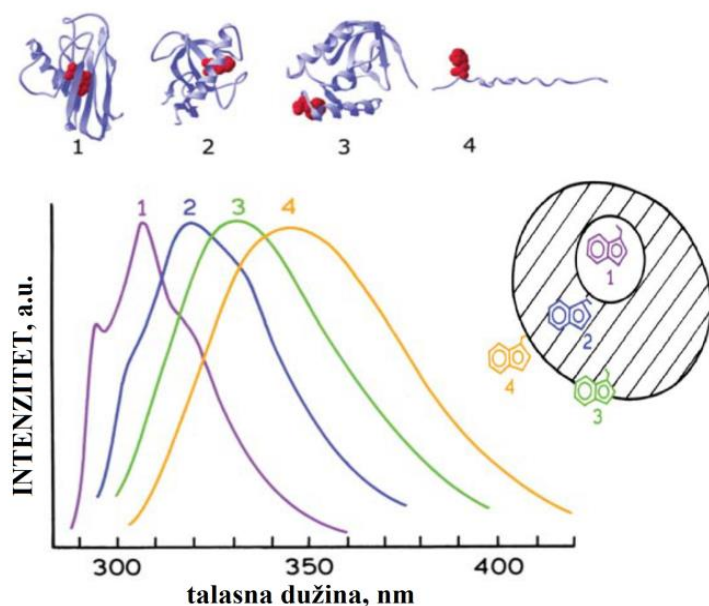
- a) Adenina
- b) Adenozina
- c) 5'-AMP
- d) poliA



Gorner, H., Journ. Of Photochem and Photobio, B: Viology, 5(1990),359-377

Fluorescentna spektroskopija proteina

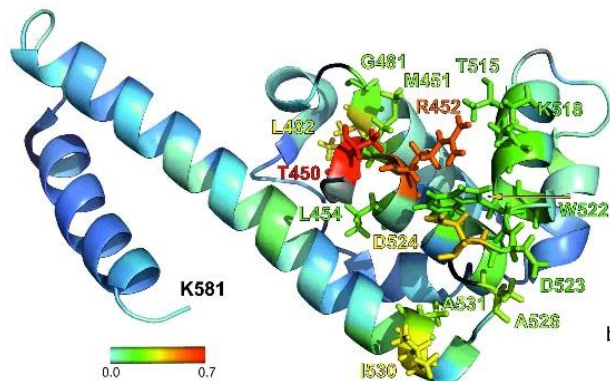
- ▶ Proučavanju strukture, funkcije, konformacionih promena, ligand-protein interakcija
- ▶ Samo proteini imaju sopstvene fluorofore: Trp, Phe, Tyr
- ▶ Visoka osetljivost indolovog prstena Trp na promenu polarnosti njegovog lokalnog okruženja što dovodi do promena u njegovom emisionom spektru



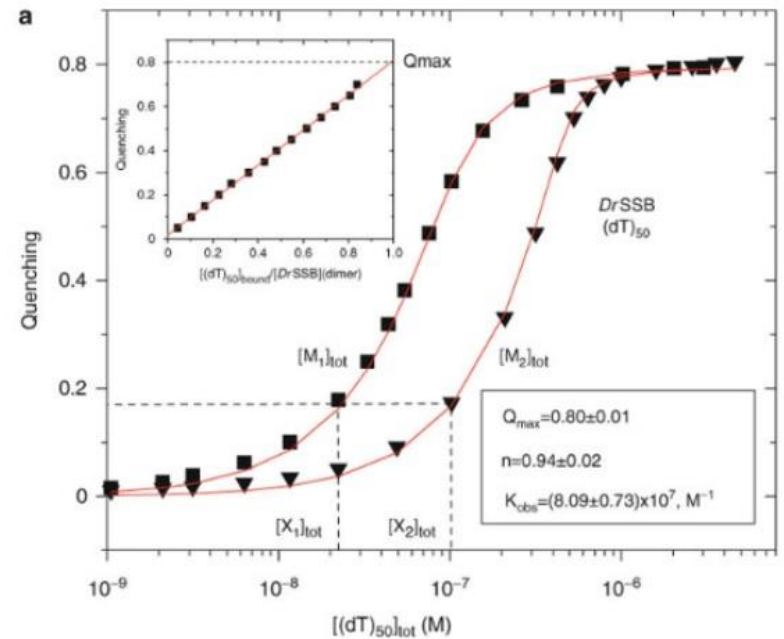
Uticaj okruženja Trp na emisioni spektar proteina. *Methods Biochem. Anal*, 1990, 35, 117-129.

Primena fluorescencije - SSB protein

- ▶ Single-stranded protein (SSB) se vezuje za jednolančanu DNK.
- ▶ Kada je SSB povezan sa DNK gasi se fluorescencija triptofana.
- ▶ Smanjenje fluorescencije je direktno proporcionalno količini razvezane DNK.



SSB protein.
<http://schmieder.fmp-berlin.info/research/ssb.htm>

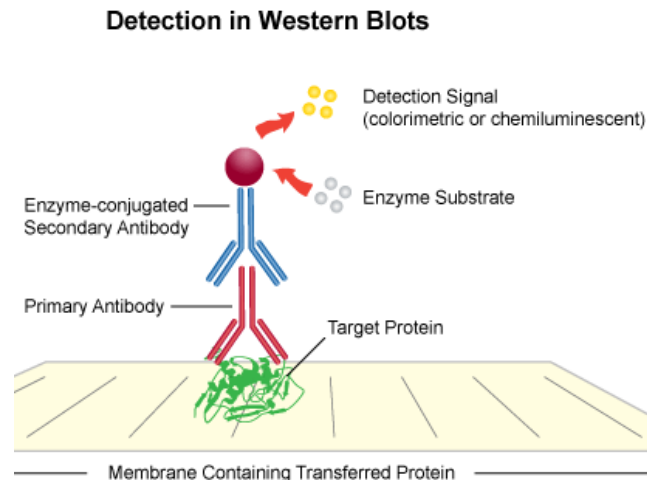
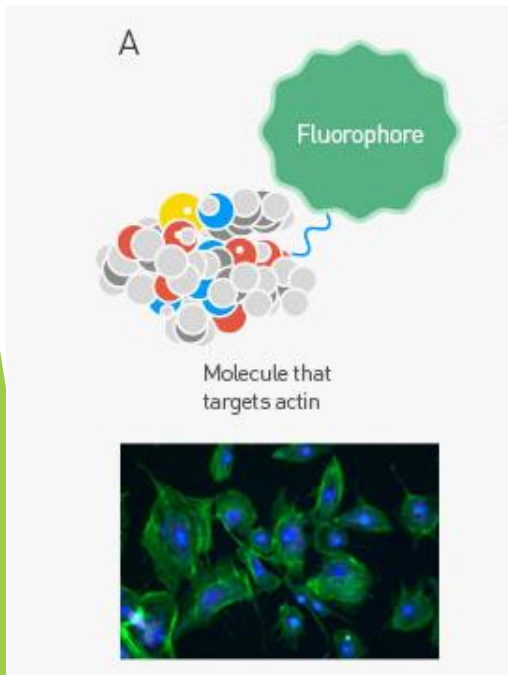


Procenat gašenja fluorescencije SSB u zavisnosti od koncentracije poli(T) na dve koncentracije 0,1 (kvadrati) i 0,5 (trouglovi).

Kozlov, A. G., Galletto, R., Lohman, T. M., *Methods Mol. Biol.*, 922 (2012), 55-83.

Fluorescentno obeležavanje

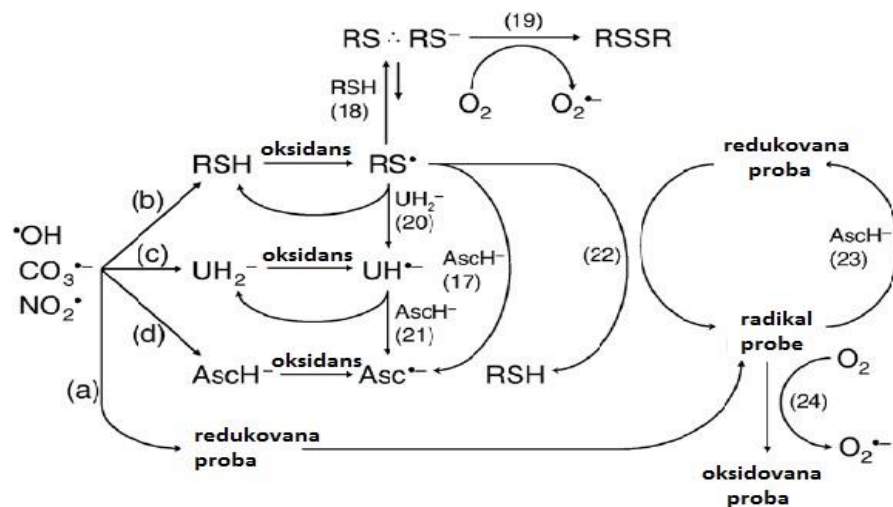
- ▶ Fluorescentno bojenje proteina, nukleinskih kiselina i drugih važnih biomolekula.
- ▶ Kada se specifična antitela ili drugi biomolekuli hemijski vežu (obeležavaju se) fluorescentnom bojom, postaju fluorescentne probe za detekciju ciljanih antigena.
- ▶ Ova metoda se koristi za ćelijski imidžing, citometriju (flow cytometry), western-blot analizu i ELISA testove.



Transgenic mouse glowing because of green **fluorescent** protein from jellyfish (U. Penn)

Fluorescentne probe za slobodne radikale

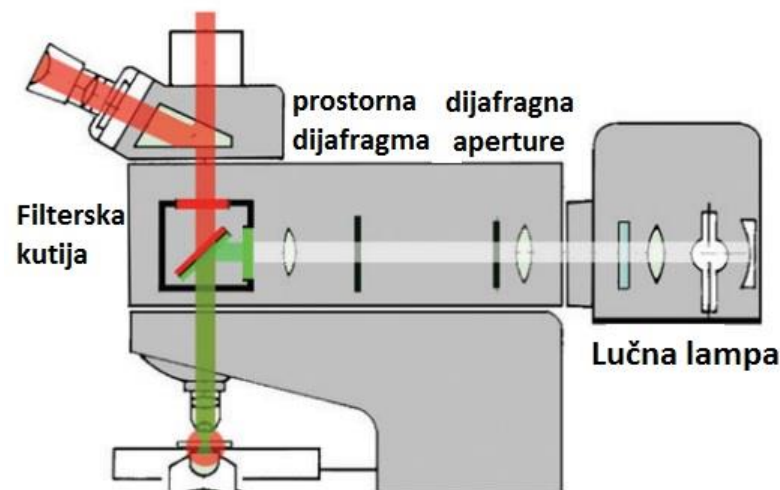
- ▶ Nalaženje specifičnih proba za reaktivne vrste kiseonika (anjon ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoksil ($HO_2^{\cdot}$), hidroksil ($OH^{\cdot}$), peroksil ($ROO^{\cdot}$) i alkoksil ($RO^{\cdot}$) radikal, vodonik-peroksid (H_2O_2) i singletski kiseonik (1O_2)), azota (azot-dioksid ($^{\cdot}NO_2$), diazot-trioksid (N_2O_3), peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$), nitrit ($NO_2^{\cdot}$), nitrat ($NO_3^{\cdot}$) i nitroksil (HNO)) i hlora (hipohlorasta kiselina ($HClO$)).
- ▶ Potrebno obratiti pažnju - specifičnost reakcije, upotreba katalizatora, reakcije sa intermedijerima, prisutnim antioksidansima, produktima reakcija, instrumentalni zahtevi.
- ▶ Česti artefakti - nepouzdana metoda iako se jako koristi.



Reakcije oksidujućih radikala sa redukovanim probama (a) i antioksidansima (b)-(d), kao i interakcija antioksidanasa i proba; RSH, tioli, UH_2 , ureati, $AsCH^{\cdot-}$, askorbat.

Mikrofluorescentne metode

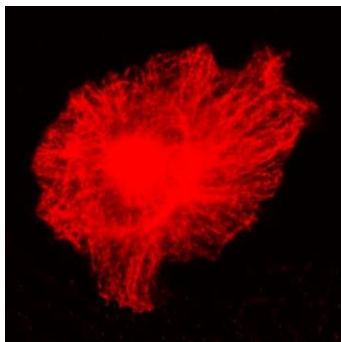
- Koristi se mikroskop.
- Ispitivane vrste interaguju sa probama i posmatra se fluorescencija.
- Posle uzorka svetlost opet prolazi kroz polupropusno ogledalo koje blokira reflektovanu svetlost.
- Može se izdvojiti 1 foton od 10000 fotona i na taj način analizira vrsta od interesa.
- Prednost je snimanje određenih delova uzorka i bolje fokusiranje.
- Ukoliko se uzorak ne pomera, onda promenom upadne svetlosti mogu da se pobude različite fluorofore.



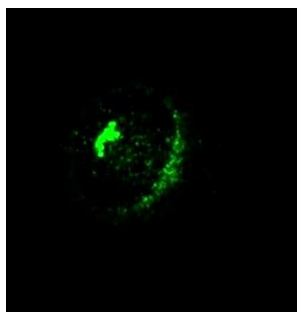
Prikaz fluorescentnog mikroskopa.

Primena mikrofluorescentnih metoda

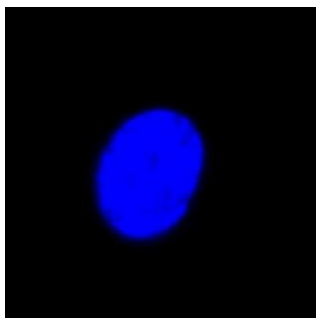
mikrotubule



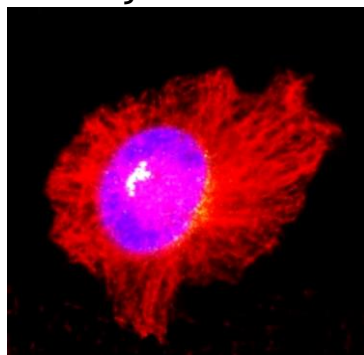
centrozomi



jezgro



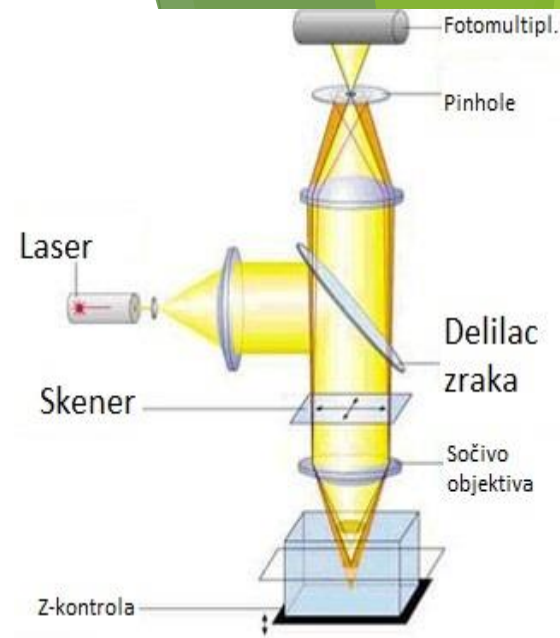
zajedno



- ▶ Za različite organele postoje specifične probe - mitohondrije (MitoTracker), lizozomi (LysoTracker), Goldžijev aparat (Konjugati lektina), jezgra (DAPI koji se vezuje za DNK).
- ▶ Da bi se ispitivao biološki uzorak potrebno je da se uradi fotoizbeljivanje kako bi se ugasila fluorescencija ostalih fluorofora.
- ▶ Gašenje fluorescencije može da se desi i zbog prisustva slobodnih radikala, tako da se dodaju agensi koji vezuju slobodne radikale i održavaju emisiju proba.

Konfokalna mikroskopija

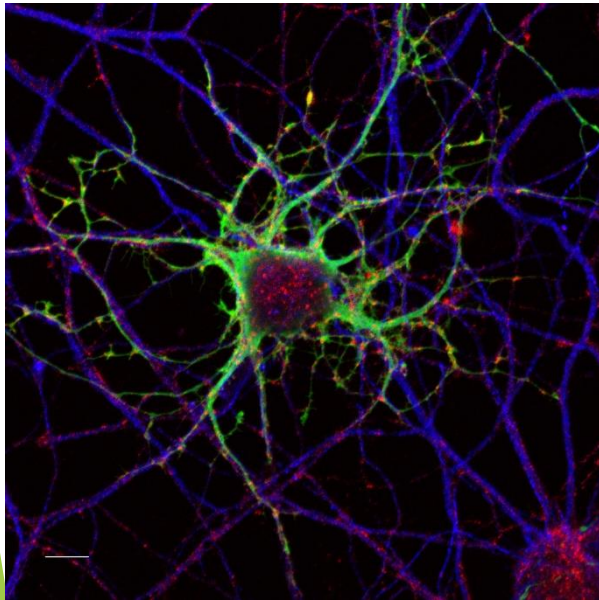
- ▶ Dobija se slika visoke rezolucije (u odnosu na fluorescentnu mikroskopiju).
- ▶ Lasersko zračenje se fokusira na fluorescentnu vrstu kroz objektiv i posmatra se mešavina odbijene i emitovane svetlosti i prenosi do dihroičnog ogledala i emitovana svetlost prolazi do konfokalne aperture (pinhole), kako bi se fokusirala svetlost, i do fotomultiplikatora.
- ▶ Da bi se dobija 2D slika, jedna po jedna tačka je skenirana preko uzorka.
- ▶ Fluorofore se pobuđuju jedna za drugom, zbog postojanja sistema za praćenje većeg broja talasnih dužina.
- ▶ Dobija se 3D rekonstrukcija uzorka sa povećanom rezolucijom



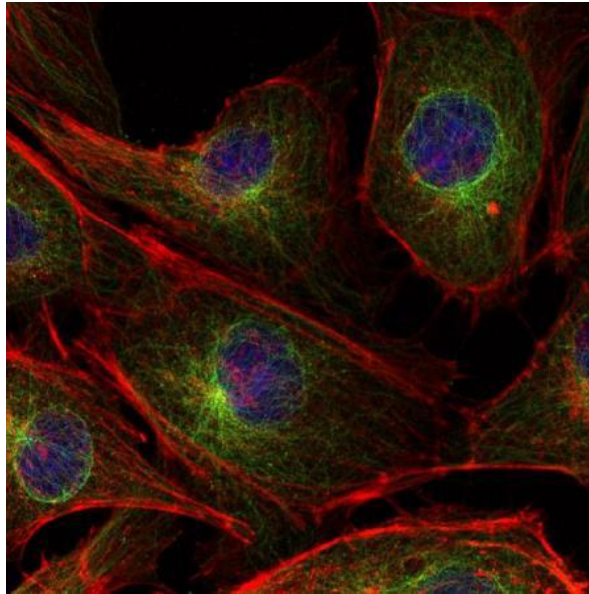
Prikaz konfokalnog mikroskopa.



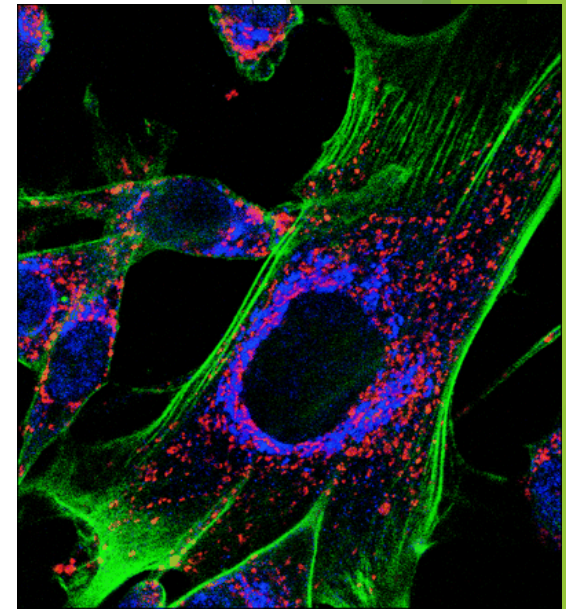
Primeri primene konfokalne mikroskopije



Neuron



Epitelijalne
ćelije



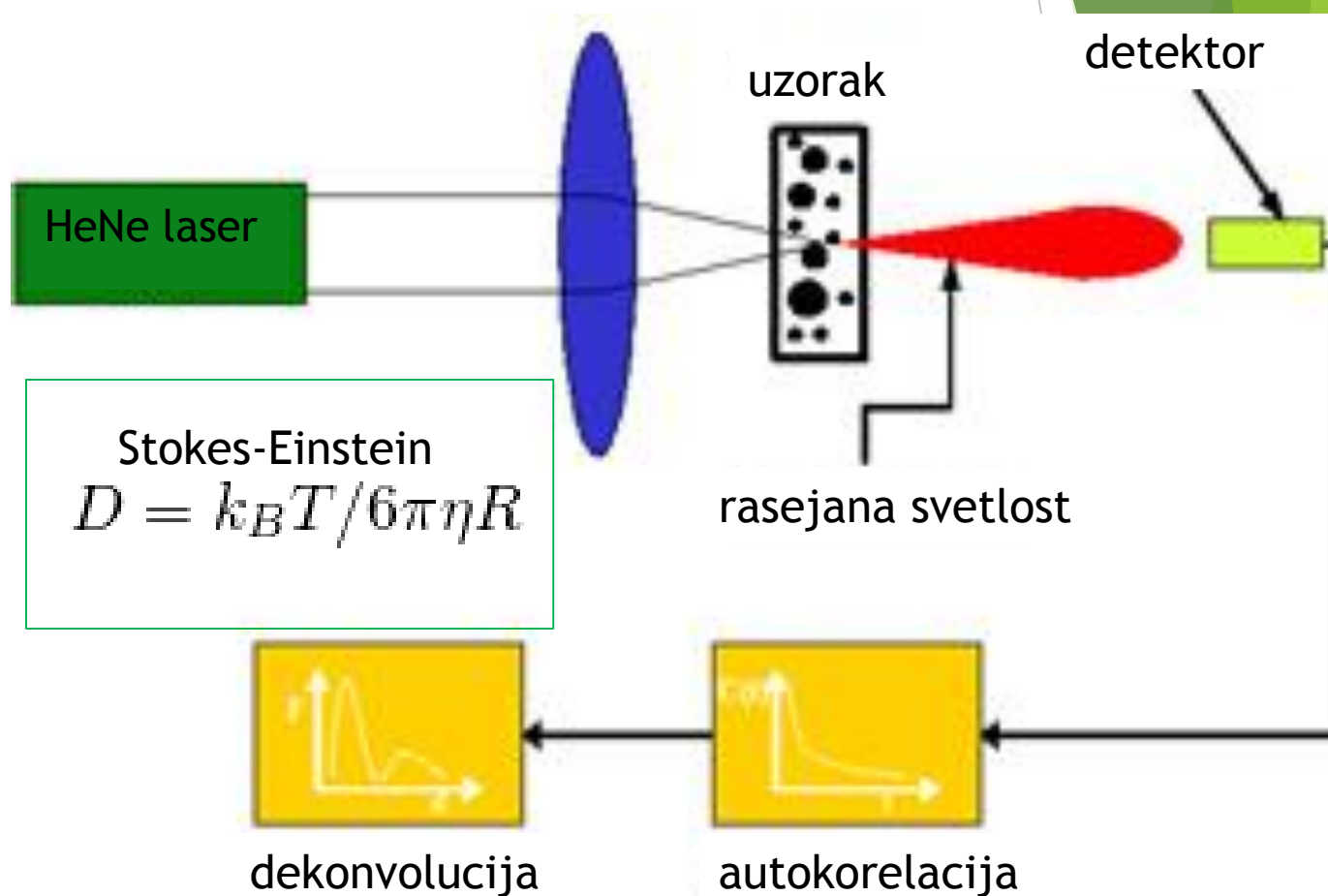
Mitochondrije
(crveno) i Goldži
kompleks
(plavo)

Dinamičko rasejanje svetlosti

Određivanje raspodele veličine i dimenzije čestica
Određivanje zeta (ζ) potencijala

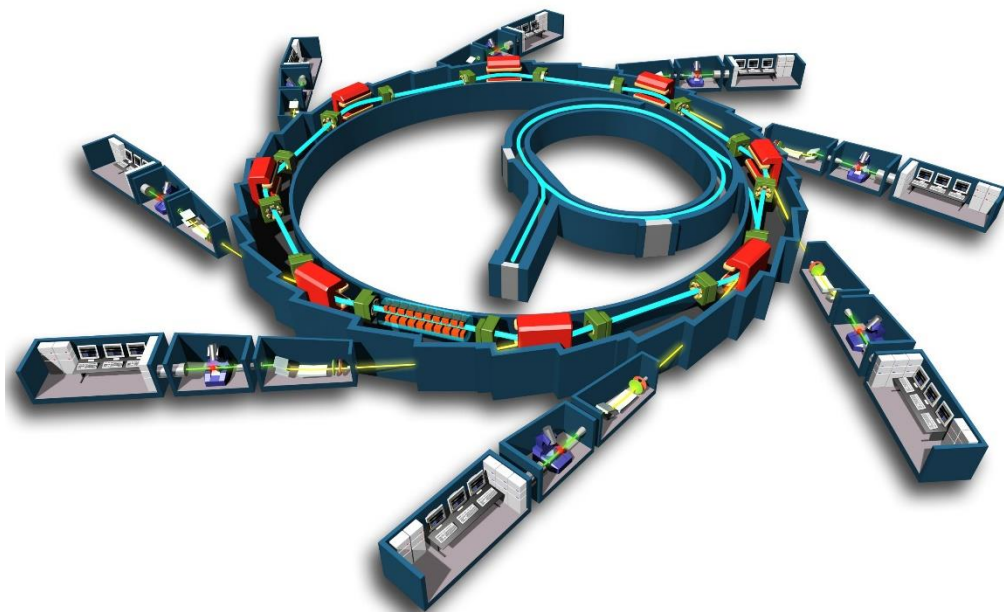
D- koeficijent difuzije
k – Bolcmanova konstanta
T – temperatura
 η – viskoznost sredine
 R_h – hidrodinamički radijus sfernih čestica

Lipozomi
Proteini



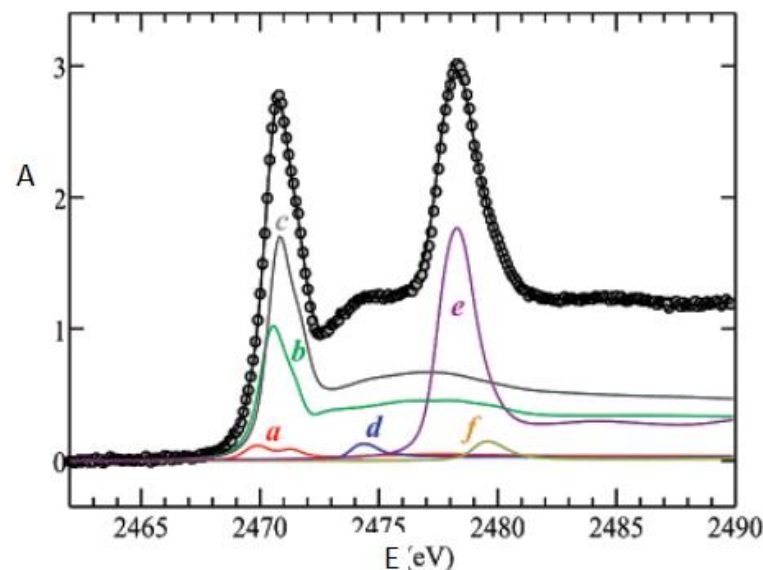
Apsorpciona spektroskopija X-zraka

- ▶ Apsorpcija zračenja rezultuje izbacivanjem elektrona sa unutrašnjih orbitala. Spektri imaju oštre maksimume koji su jedinstveni za svaki element periodnog sistema. Male oscilacije energija su posledica okoline u kojoj se element nalazi.
- ▶ Izvor zračenja je najčešće sinhrotron.
- ▶ Metoda se najčešće koristi za ispitivanje metaloproteina, farmaceutika, toksičnih komponenti (neorganskih elemenata, radiokativnih elemenata i nanočestica) i elemenata sa fiziološkim dejstvom.
- ▶ Najčešće se radi u kriogenim uslovima da bi se sprečilo termalno neuređenje.
- ▶ Uzorci se pripremaju krioifiksacijom i ispituju u kriogenim uslovima (u tečnom helijumu ili azotu).



Apsorpciona spektroskopija X-zraka: fiziološki aktivni elementi

- ▶ Primer elementa sa fiziološkim dejstvom je sumpor, koji se nalazi u dovoljnim količinama da se može detektovati.
- ▶ Redukovana i oksidovana forma S može da se odredi iz K-granice apsorpcionom spektroskopijom kao redukovani i oksidovani tioli, cistein i metionin sulfoksid.
- ▶ Metoda omogućava praćenje metabolizma taurina, sulfonske kiseline u živom organizmu.
- ▶ Ispitivana je i uloga S u neurodegenerativnim bolestima. Pored S, ispitivani su Br i I u organizmima za koje se zna da akumuliraju ove elemente.

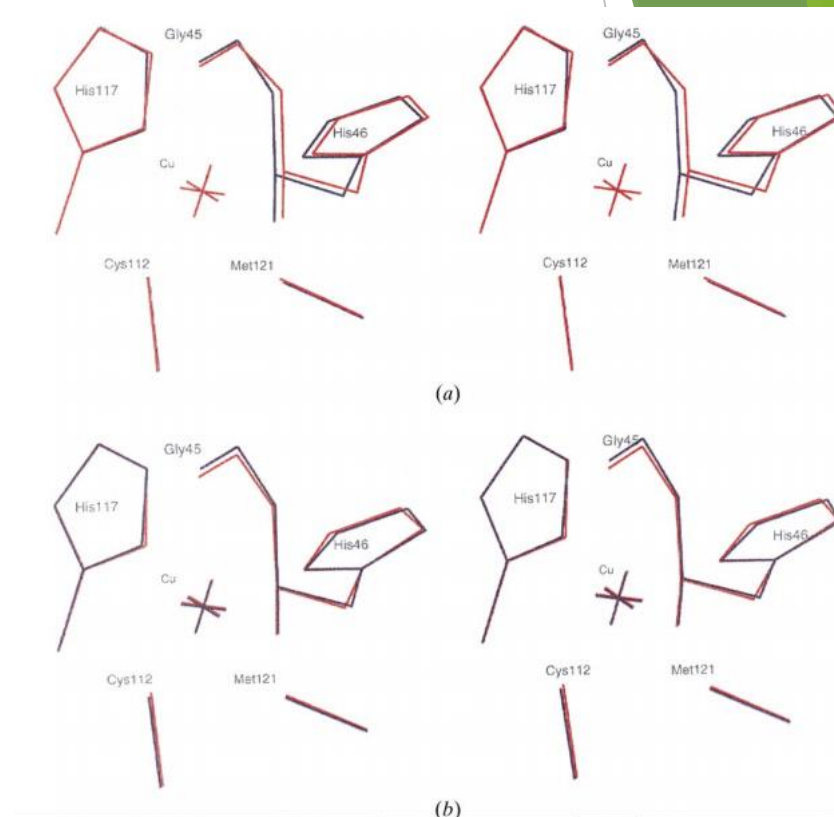


Dekonvolucija spektra sa različitim udelima S u jedinjenjima a) RSSR, b) RSH, c) RSSR', d) RSO_2^- , e) RSO_3^- i f) SO_4^{2-} .

<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi701979h>

Apsorpciona spektroskopija X-zraka: metaloproteini

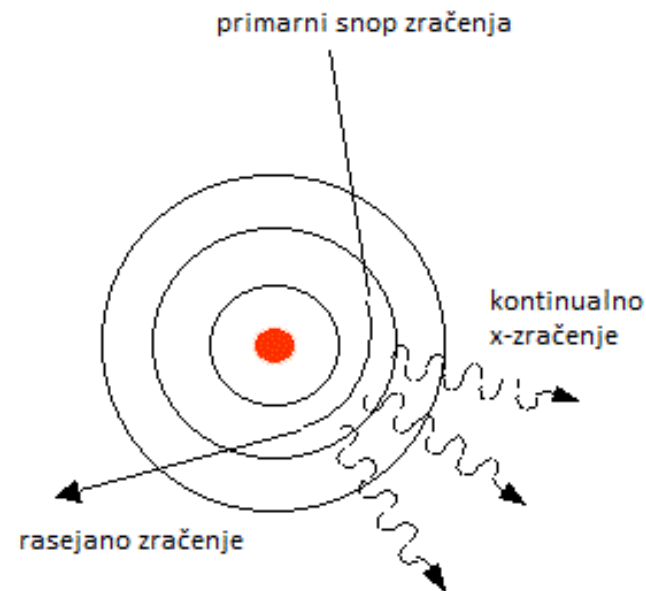
- ▶ Ispituje se lokalna koordinacija metala u proteinima
- ▶ Značajno zato što 1/3 svih proteina od značaja u organizmu sadrži metal.
- ▶ Priprema uzorka je značajna za ispitivanje proteina i mogu da se analizirati metalni centri koji često nisu dostupni drugim metodama.



Poređenje strukture dobijene kristalografski i XAS, struktura je dopunjena podacima iz XAS - azurn (metaloprotein sa bakrom).

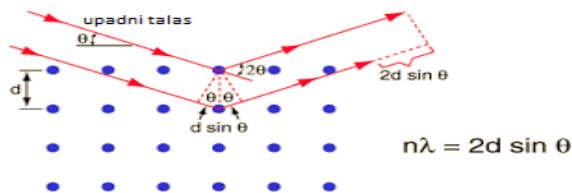
Kristalografija X-zracima

- ▶ Najviše korišćena tehnika određivanja strukture biomolekula. Da bi se koristila potreban je kristal (mada se razvijaju i metode koje koriste nekristalne strukture).
- ▶ Koriste se X-zraci zbog rasejanja na elektronima kristalne rešetke. Sočiva sakupljaju informacije o amplitudi rasejanog zračenja, primene se metode dobijanja faze i na kraju molekulska struktura.
- ▶ Zračenje se dobija bombardovanjem metalne mete visokoenergetskim elektronima. Značajan izvor su i sinhrotoni.



Nastanak x-zračenja

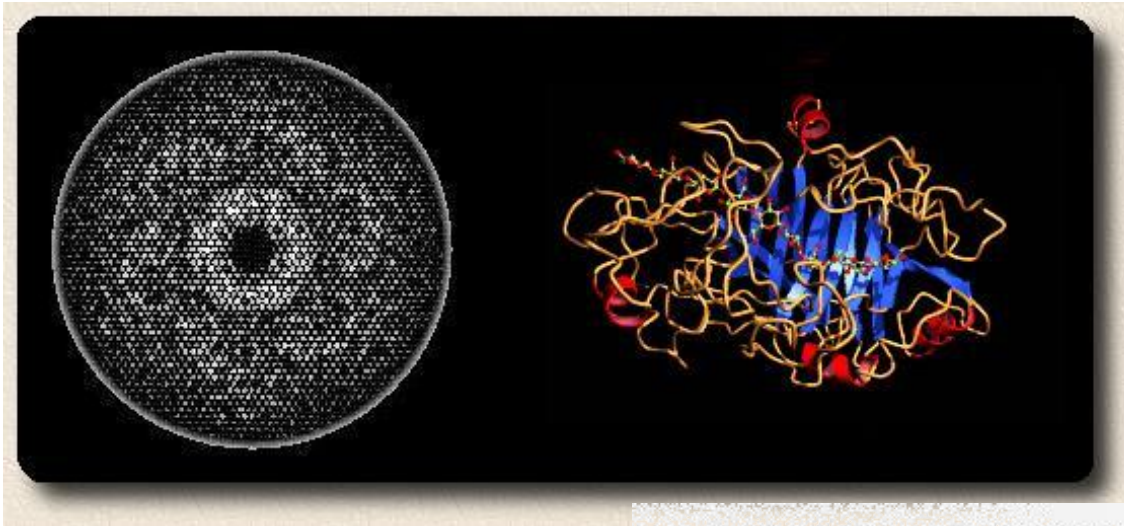
http://www2.rgu.ac.uk/life_semweb/xray.html



Izvođenje Bragovog uslova za konstruktivnu interferenciju.

<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/quantum/bragg.html>

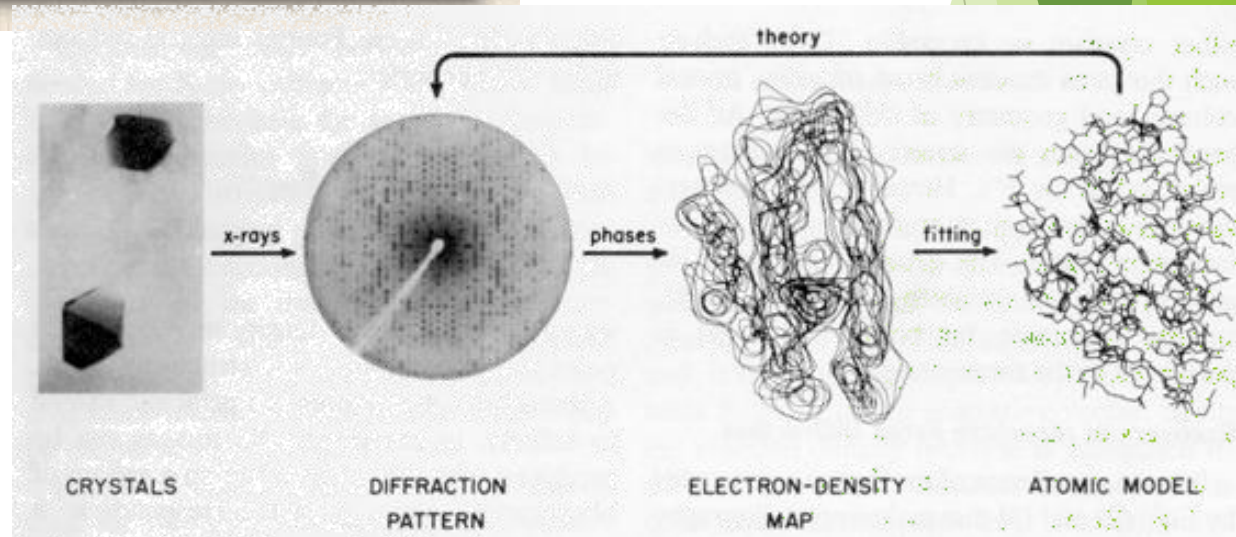
Kristalografija X-zracima, osnovi metode



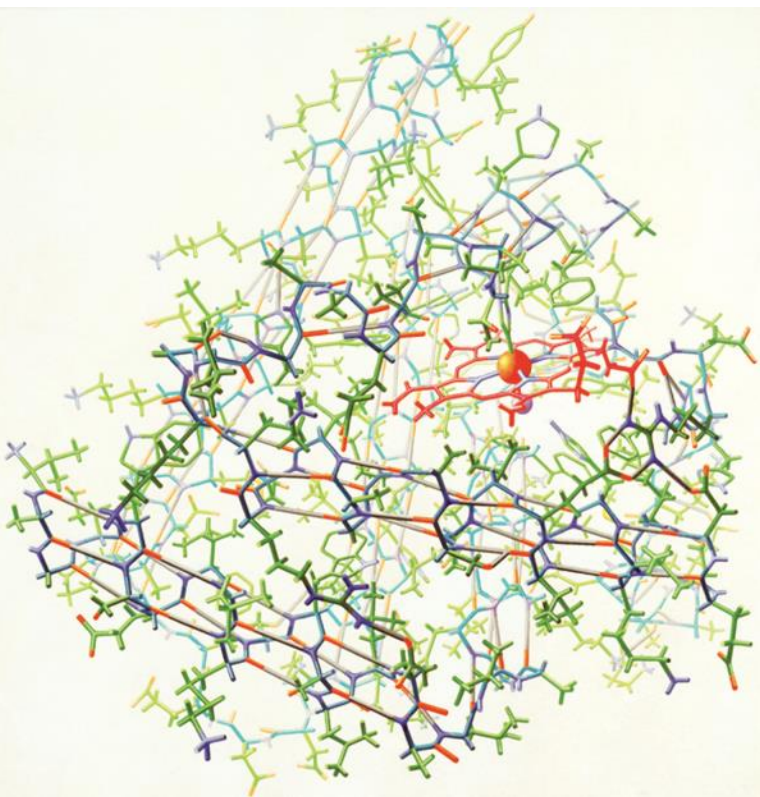
Od difraktograma do strukture. <http://xray.bmc.uu.se/xtal/>

Teorijski proračuni su značajni za dobijanje strukture, kao i prethodno određene strukture.

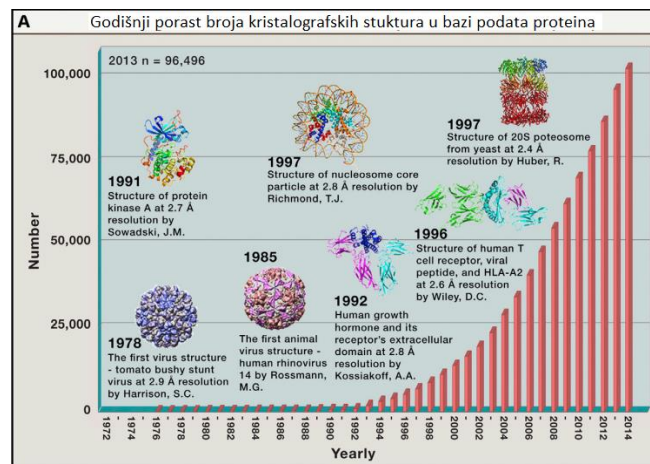
<http://www.sci.sdsu.edu/TFrey/Bio750/Bio750X-Ray.html>



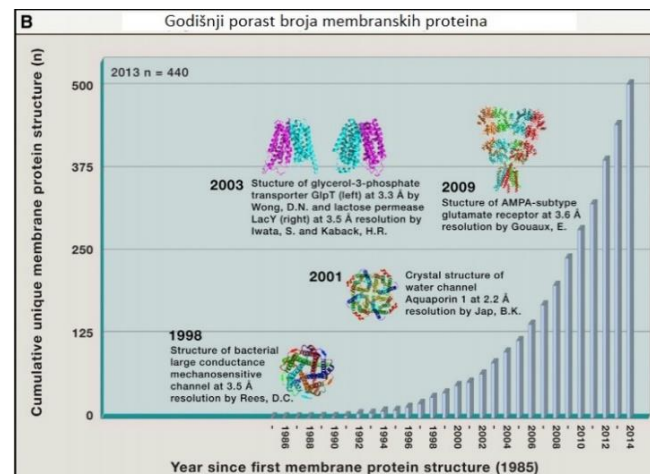
Primena kristalografije X-zraka



Prva kristalna struktura - mioglobin,
Kendrew (1962). <http://pdb101.rcsb.org/motm/1>

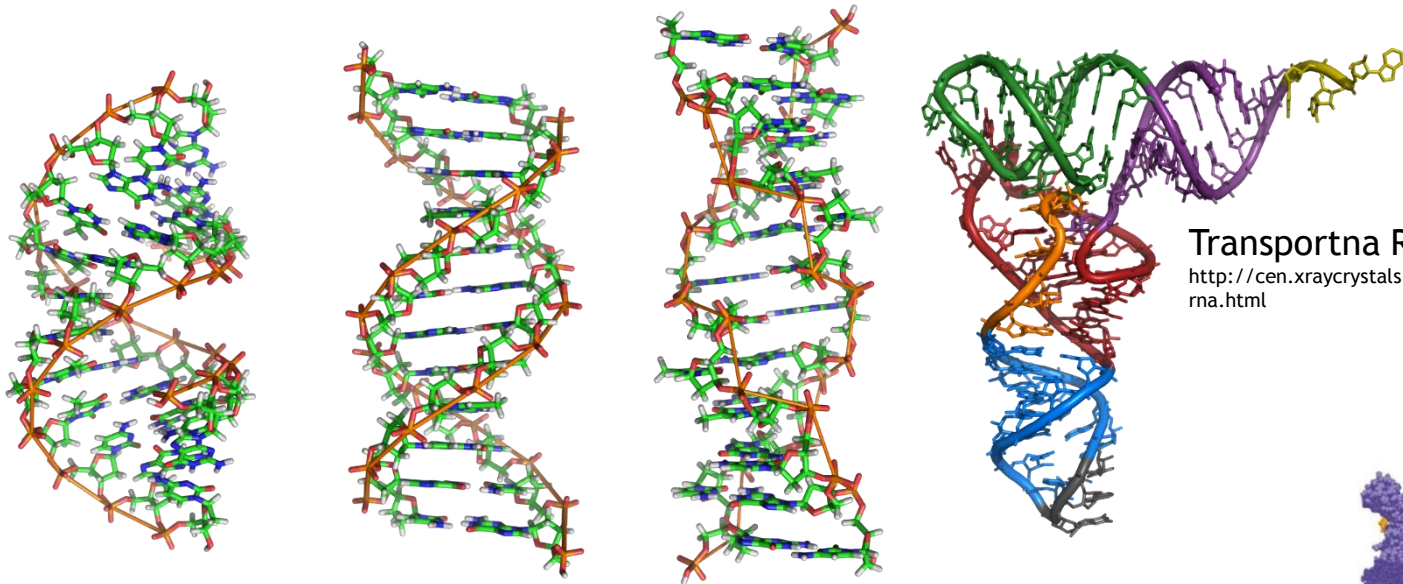


Godišnji porast
broja
kristalografskih
struktura u bazi
podataka proteina.



Godišnji porast
broja
kristalografskih
struktura
membranskih
proteina u bazi
podataka proteina.

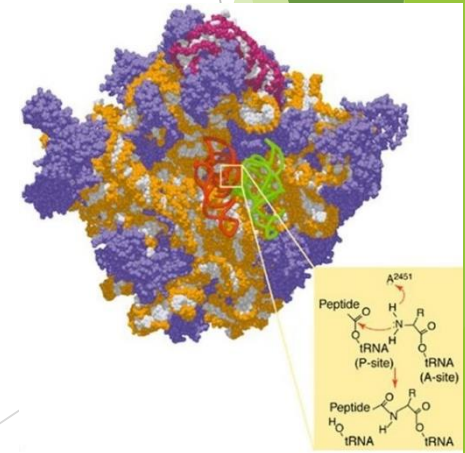
Kristalografija X-zraka nukleinskih kiselina



Strukture DNK: A, B i Z.
<https://en.wikipedia.org/wiki/DNA>

Transportna RNK
<http://cen.xraycrystals.org/transfer-rna.html>

Ispitivanje RNK je zanimljivije zbog većeg broja struktura.

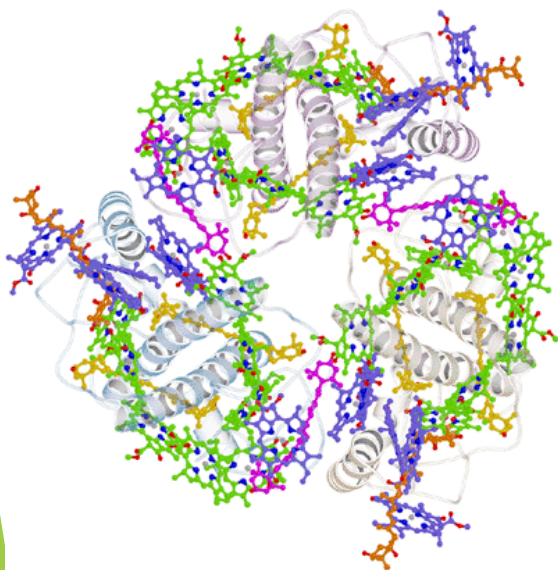


Ribozomalna RNK, katalitička uloga u formiranju peptidne veze. http://www.daviddarling.info/encyclopedia/R/ribosomal_RNA.html

Kristalografija X-zraka proteina

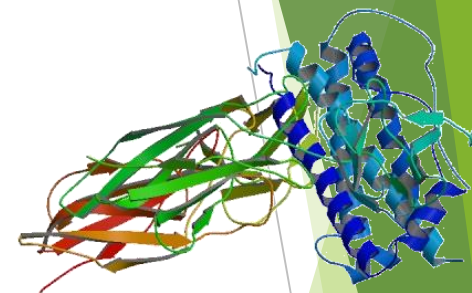
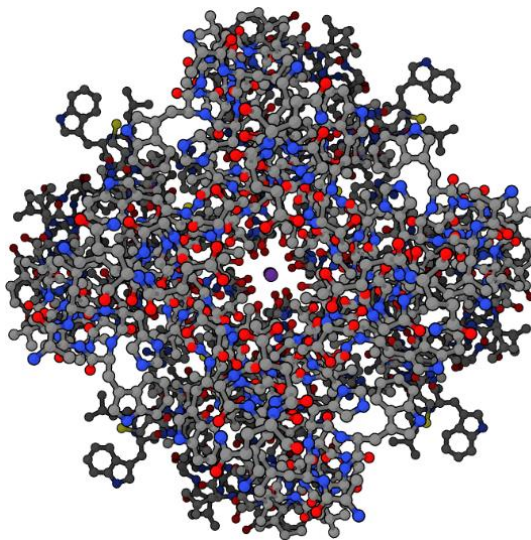
Kanal za K, podaci o provodljivosti i selektivnosti za ovaj element

https://en.wikipedia.org/wiki/Potassium_channel



Kompleks za sakupljanje svetla kod spanaća, rezolucija 2,72 Å

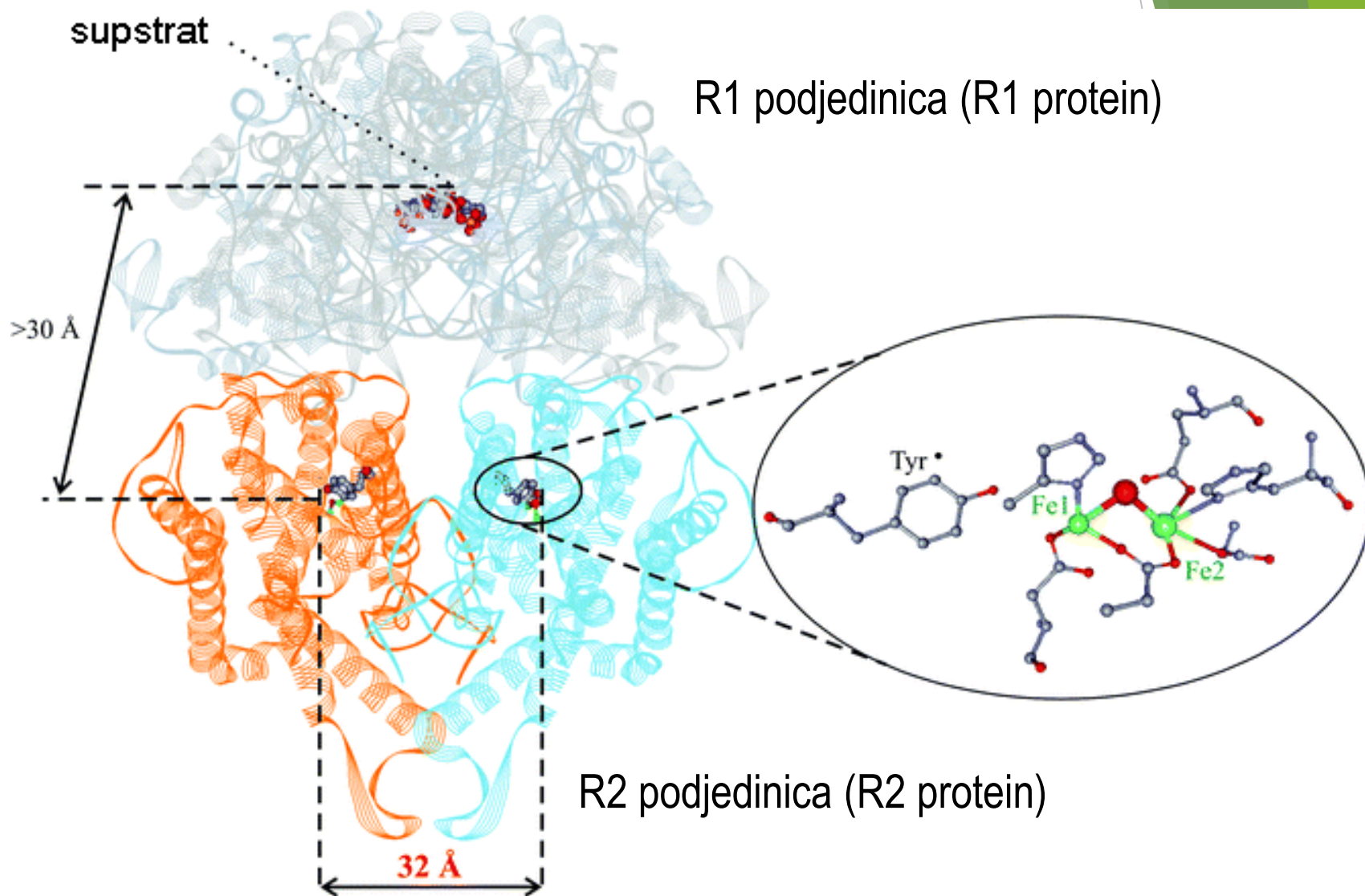
<http://archive.sciencemag.com/inter/pod/extras/09novLiu/>



Hormon rasta čoveka i ekstraćelijski receptor - kompleks koji objašnjava prepoznavanje ovog molekula.

<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3hhr>

Primer: Ribonukleotid reduktaza RNR

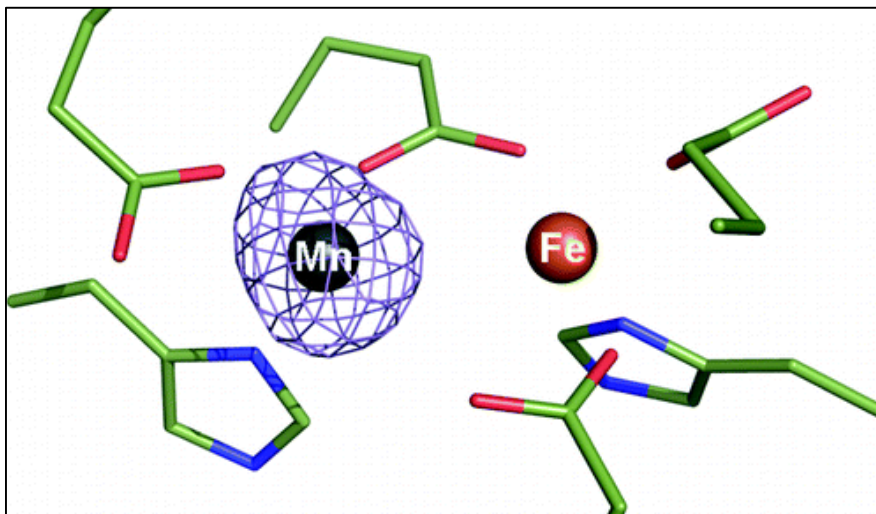
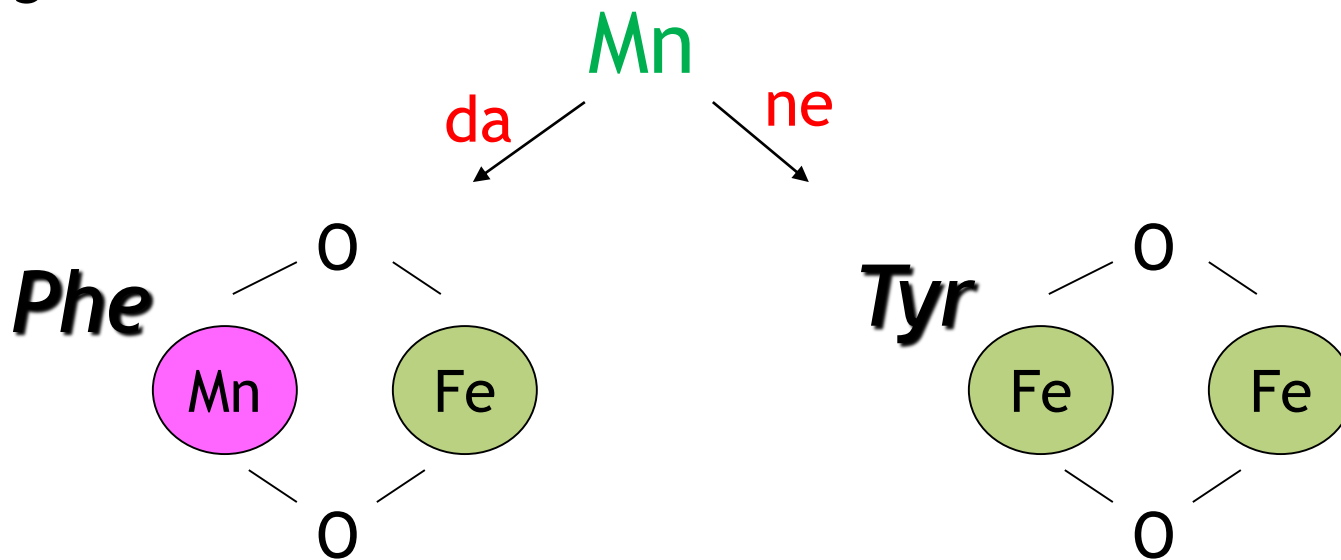


Proizvodnja mutantnih enzima

Određivanje aktivnosti korišćenjem $^3\text{HCDP}$ (scintilacioni detektor)

EPR spektroskopija na niskim T

EXAFS

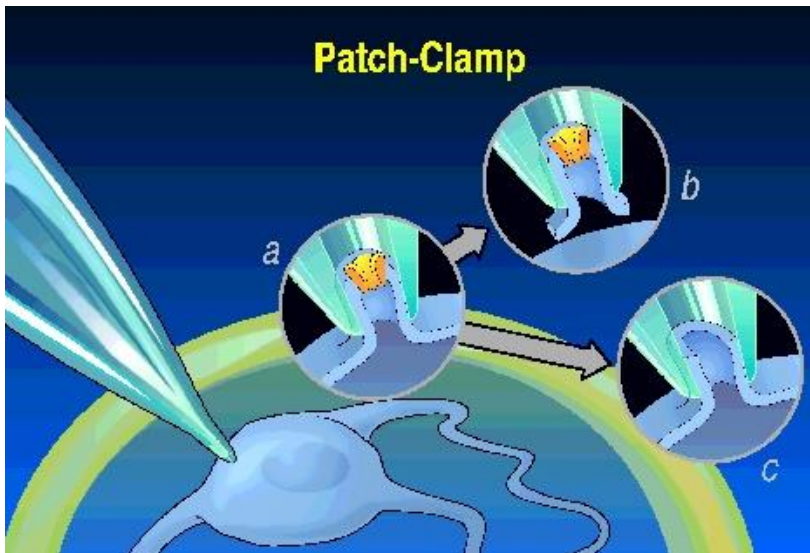


Rentgeno-strukturna
analiza

*J. Am. Chem.
Soc.*, 2012, 134 (1), pp
123-125

Peč-klemp tehnika

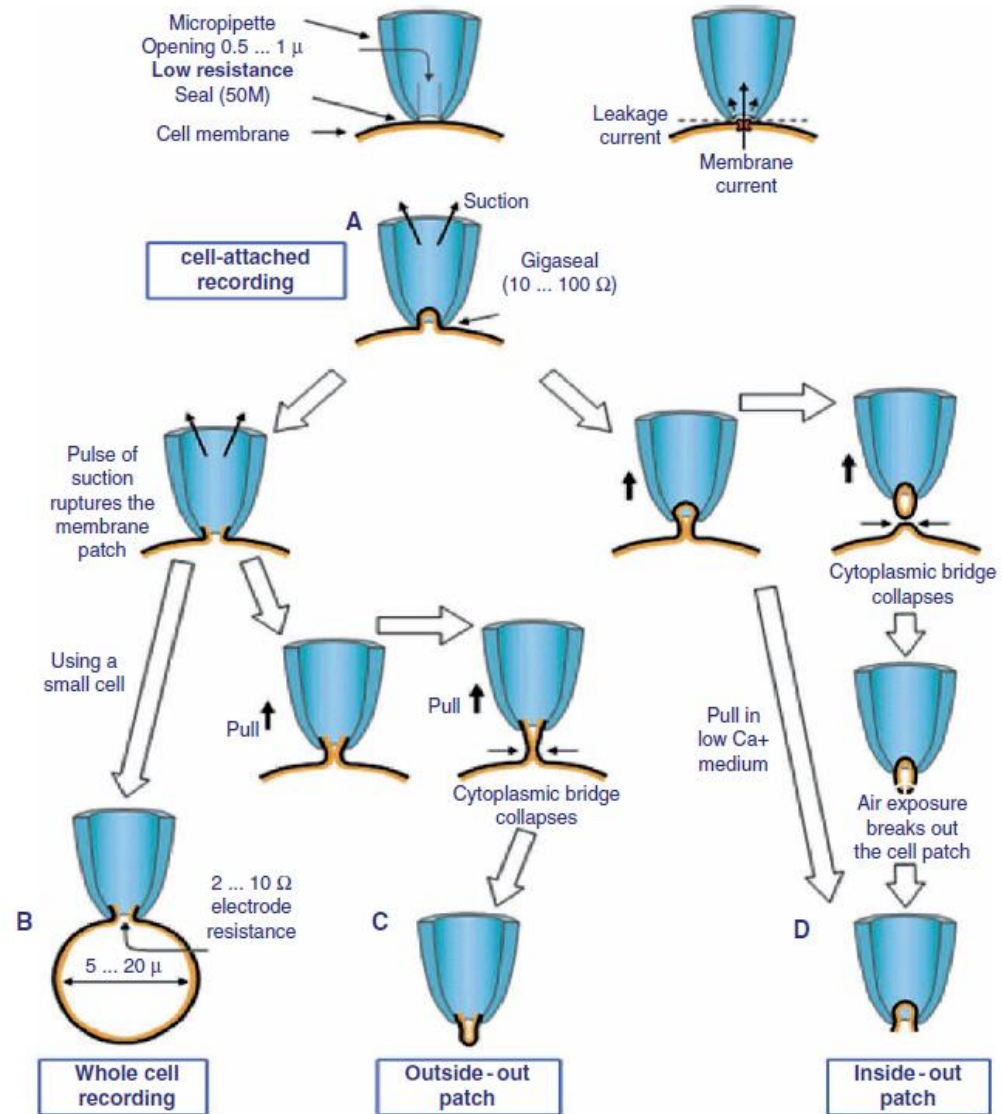
- ▶ Električne metode za ispitivanje jonskih kanala su korišćene davno pre nego što je bila poznata njihova struktura.
- ▶ Patch-clamp tehnika koristi pojačavač transmembranskog potencijala i staklene pipete sa vrhom mikrometarskih dimenzija (za merenje struje).
- ▶ Princip je sledeći:
 - okrugli vrh pipete (prečnika oko $1\mu\text{m}$) se pritisne uz ćelijsku membranu
 - primeni se mali vakum da bi se osigurao kontakt sa ćelijom
 - unutrašnjost ćelije je ispunjena elektrolitom da bi se kontrolisalo ponašanje jonskih kanala prisutnih u "uhvaćenom" delu membrane.



- Da bi se mogle meriti male struje stvorene prolaskom jona kroz kanale, otpor između pipete i membrane mora biti veliki tzv. *gigaseal*.
- Zato je vakum veoma važan jer ne dozvoljava da medijum oko ćelije prodre u elektrolit.

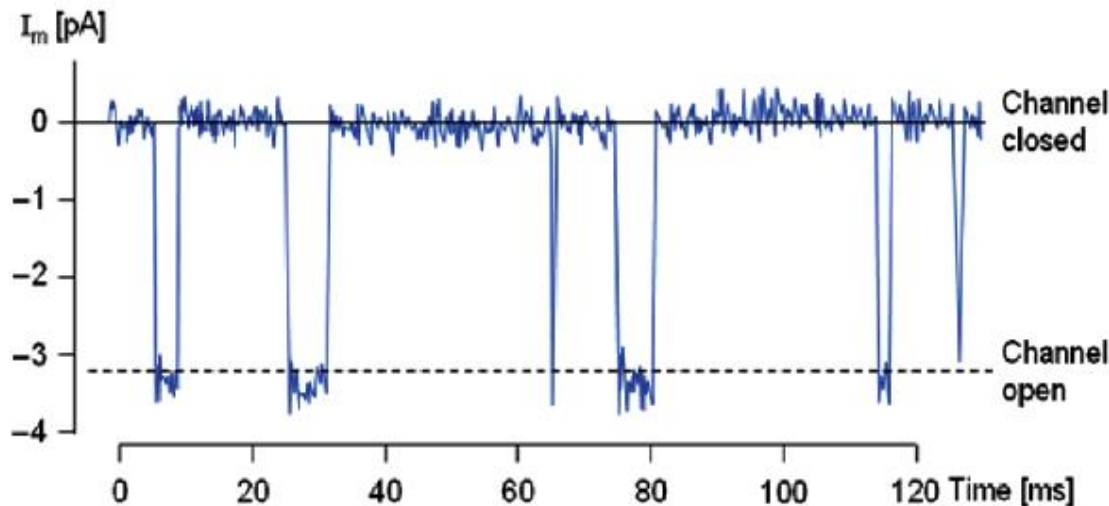
Peč-klemp tehnika

- ▶ U zavisnosti od tipa kontakta između pipete i ćelije postoji četiri tipa snimanja:
- ▶ - *cell attached* (za merenje signala pojedinih kanala koji su unutar "zakrpe" - veliki otpor.
- ▶ - *whole cell* (vakumski puls ostvaruje električni kontakt sa unutrašnjošću ćelije) membrana puca - snimaju se svi jonski kanali u membrani + mogućnost ubacivanja hem. reagensa u ćeliju.
- ▶ - *inside out* (kao *whole cell* uz odvajanje pipete od ćelije prikom čega se otkida kanal uz zatvaranje u odnosu na okolni medijum. Za ispitivanje jednog kanala u citoplazmičnom medijumu.
- ▶ - *outside out* (kao *whole cell* uz odvajanje pipete od ćelije kada se stvara vezikula na njenom vrhu. Za ispitivanje ponašanja jednog kanala pod uticajem spoljašnjih receptora.



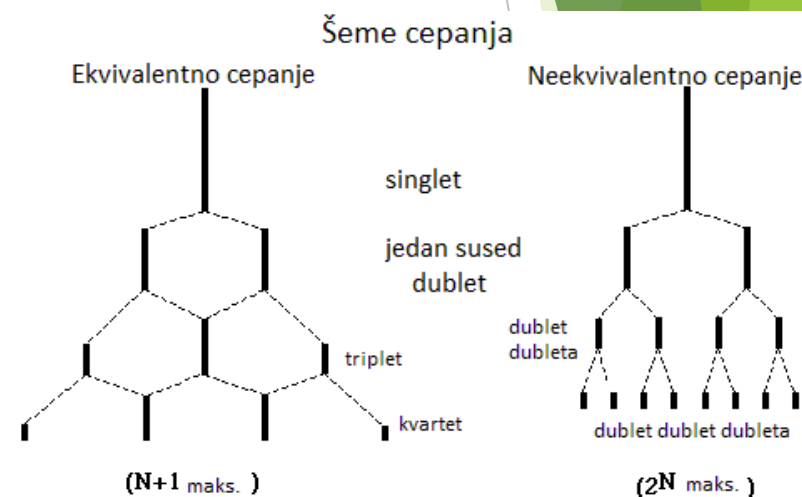
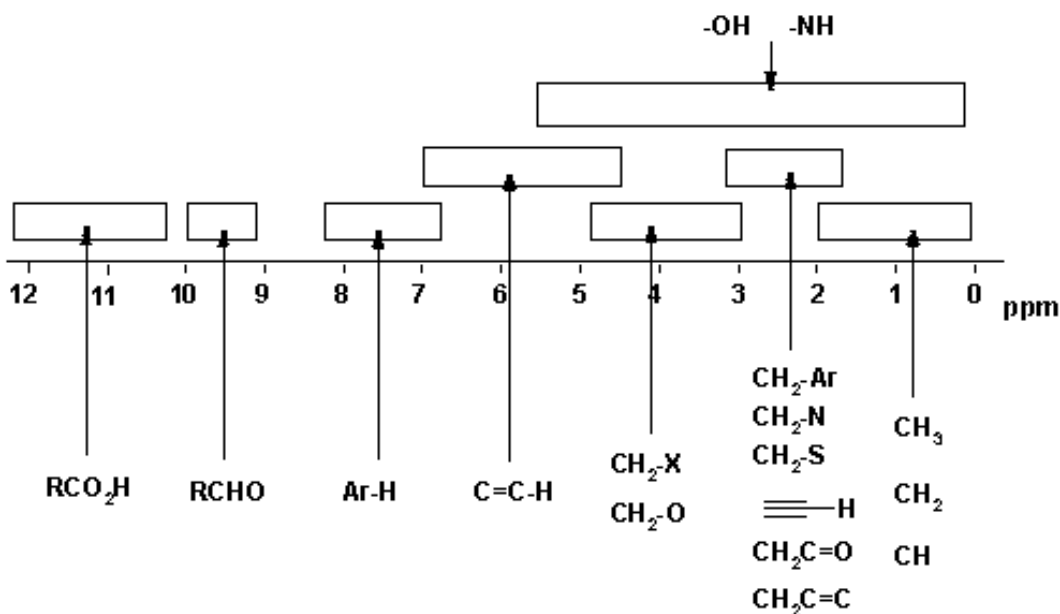
Peč-klemp tehnika

- ▶ Tri od opisanih metoda snimanja služe za merenje pojedinačnih jonskih kanala pod uticajem različitih agenasa.
- ▶ Kakve informacije dobijamo iz *patch-clamp* merenja?
 - na slici je tipičan *patch-clamp* signal jednog kanala
 - prisustvo ili odsustvo struje govori nam o tome da li je kanal otvoren ili zatvoren



Elektrofiziološka ispitivanja jonskih kanala dokazala su hipotezu o postojanju membranskih struktura koja se ponašaju kao jonski kanali

NMR - hemijski pomeraj i sprezanje jezgara



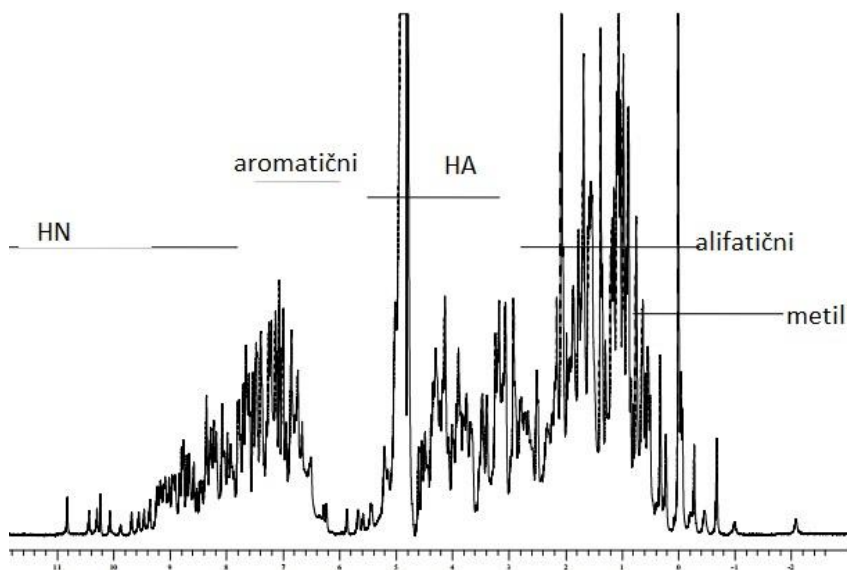
Hemijski pomeraj - uticaj okoline.

<http://www.mhhe.com/physsci/chemistry/carey/student/olc/ch13nmr.html>

Šeme cepanja signala.

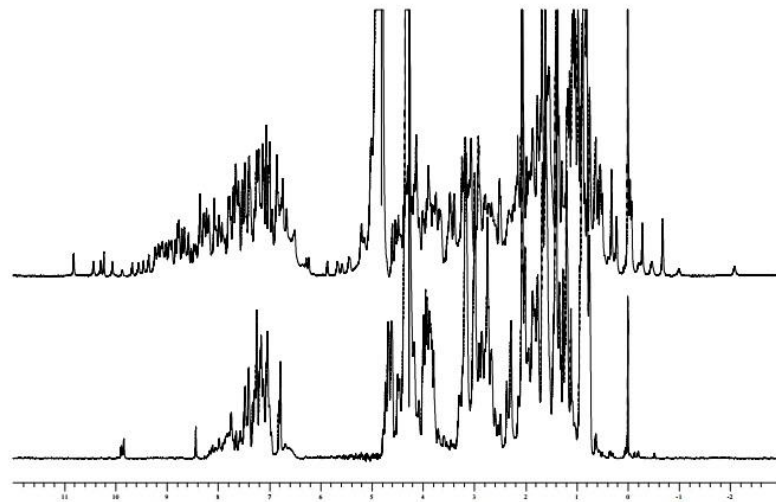
<http://www2.ups.edu/faculty/hanson/Spectroscopy/NMR/coupling.htm>

NMR - određivanje strukture proteina



Oblasti od značaja u analizi amino-kiselina u proteinu (jaje sa lizozimom)

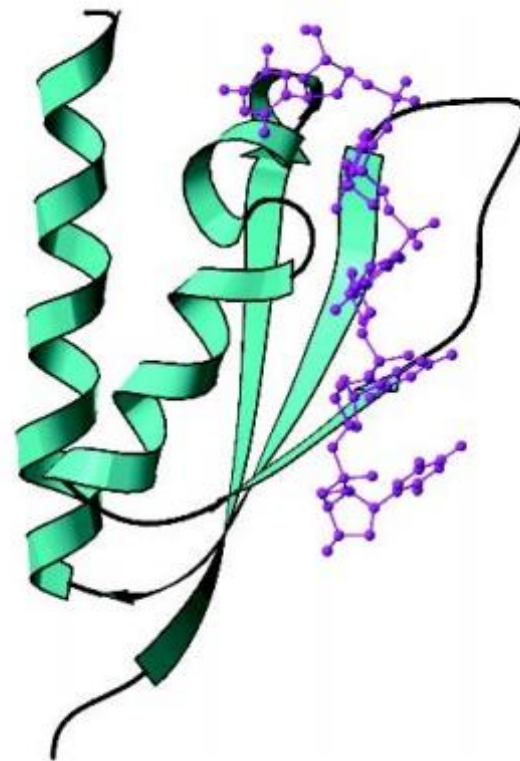
Posebno su značajne amino-kiseline na krajevima lanca.



Uporedni prikaz uvijeno proteina (gornja slika) i neuvijenog (donja slika).

Isptivanje protein-DNK interakcija NMR-om

- ▶ Proto-onkogeni su delovi DNK koji kodiraju proteine koji imaju normalnu funkciju, ali pri mutaciji postaju onkogeni koji izazivaju rak.
- ▶ Jedan od ovih delova DNK je onaj koji kodira protein uključen u transkripciju.
- ▶ Ovaj protein se vezuje za jednolančanu DNK i sadrži četiri homologna ponavljanja i linkere različite dužine. Najmanji domen koji se vezuje za DNK je označen kao KH3-KH4 i struktura je rešena pomoću višedimenzionog NMR-a. Molarna masa kompleksa je 30000 D.
- ▶ Važnost otkrića je u konceptu da se transkripcija DNK može kontrolisati sa značajne distance duž lanca DNK kroz prepoznavanje jednolančane DNK dobijene transkripcijom. Nastavak studija omogućiće razvoj mehanizma za kontrolu transkripcije.

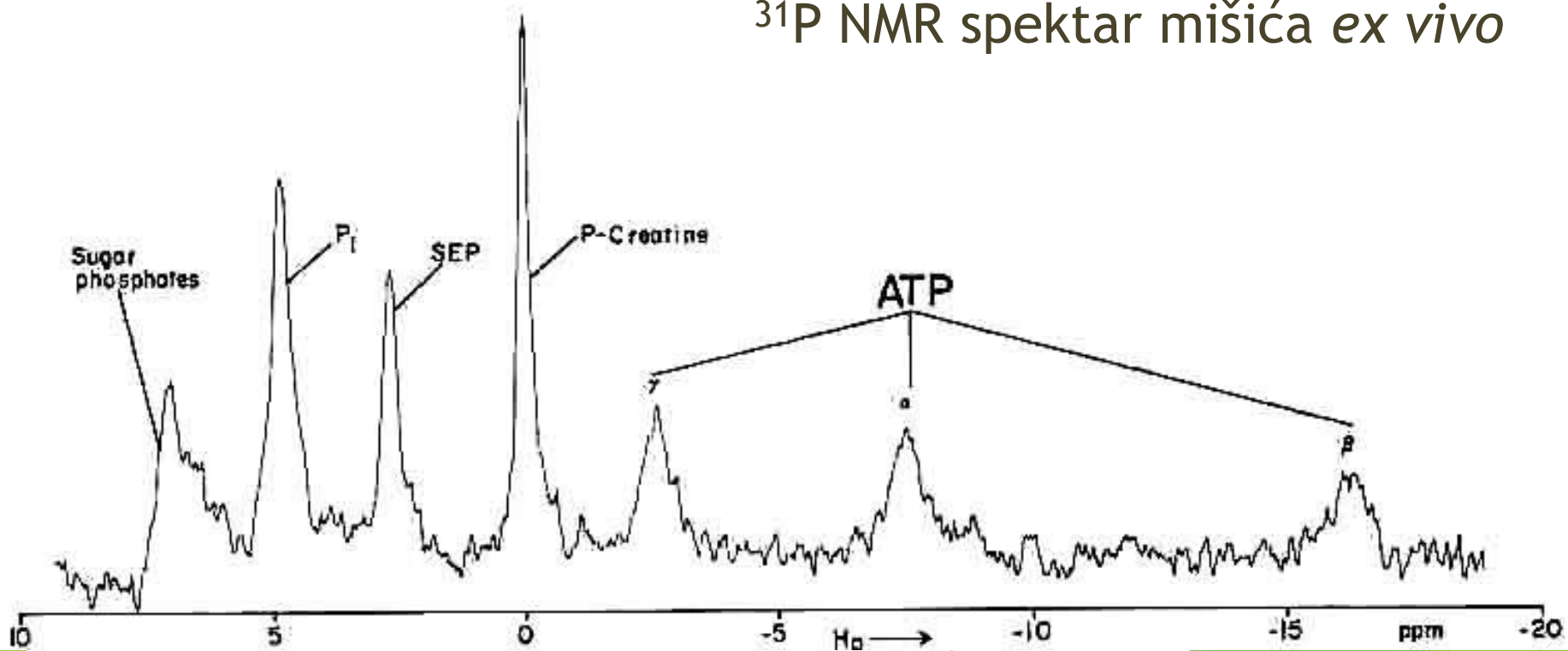


Struktura kompleksa određena NMR-om, DNK (ljubičasto) i protein (zeleno).

^{31}P NMR

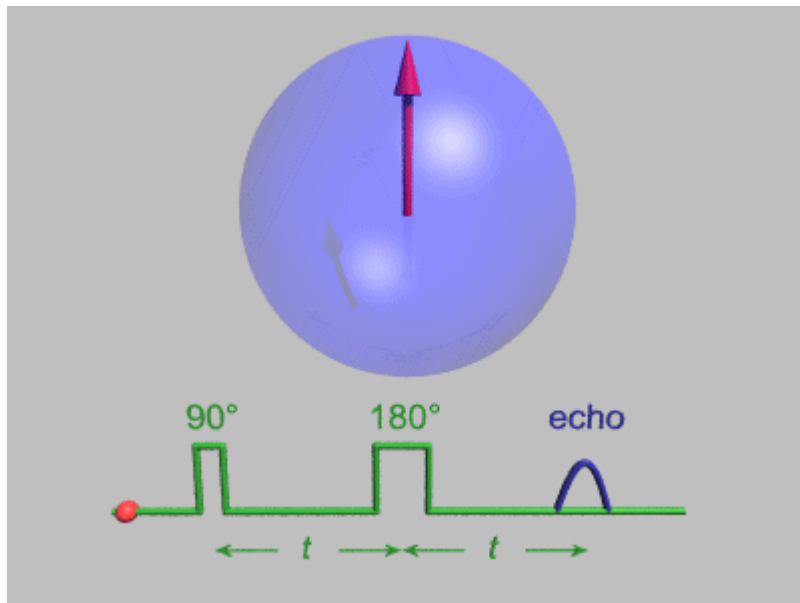
- ▶ ATP je ključan molekul za normalno funkcionisanje ćelija, zato je bitno znati promene u njegovoj koncentraciji
- ▶ ^{31}P NMR spektroskopija - *in vitro* i *in vivo*

^{31}P NMR spektar mišića *ex vivo*

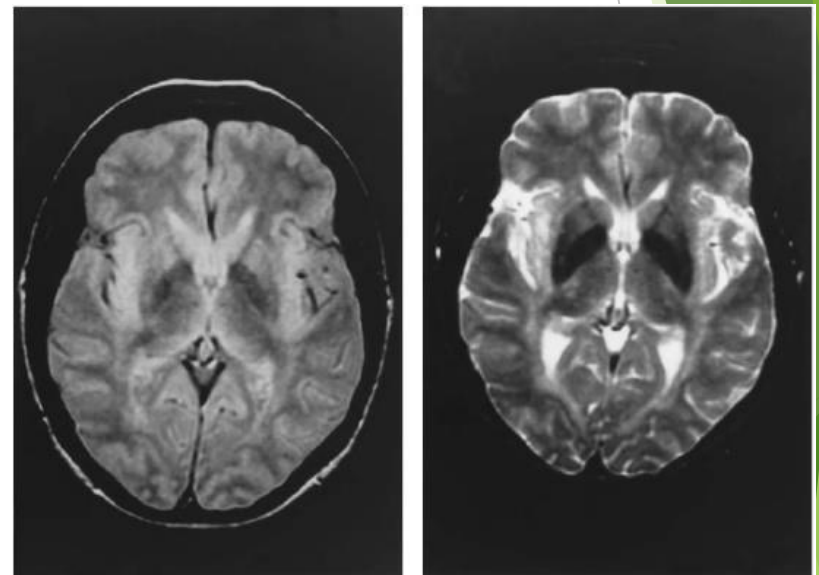


MRI

- ▶ Uzorak se ozračuje RF zračenjem uz gradijenta magnetnog polja.
- ▶ Koristimo razne sekvencije (spin-exo, inversion-recovery, gradijent- exo ...).



Spin-exo sekvencija



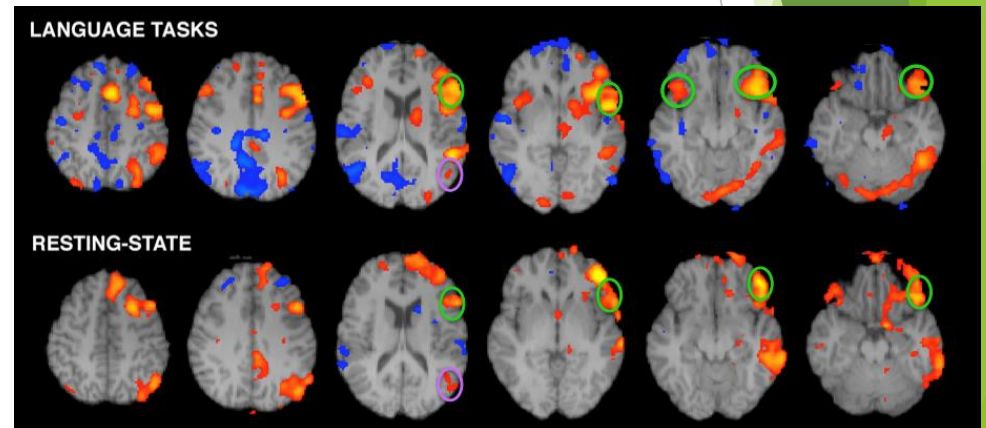
Slike zasnovane na relaksaciji protona u vodi i masti.

Imidžing magnetnom rezonancom (MRI)

- Metoda za razlikovanje tipova tkiva. Od značaja su jezgra ^1H , ^{13}C , ^{31}P i ^{19}F . Koristi se gradijent magnetnog polja i apsorpcija zavisi od gustine protona, tako da se menja T1 vrednost i direktno određuje sadržaj vode i masti.
- Nizom poprečnih preseka i rekonstrukcijom dobija se 3D slika.
- Funkcionalni MRI.



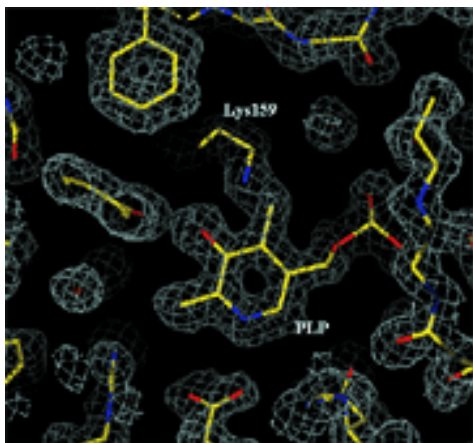
MRI



FMRI

Metode za određivanje strukture proteina

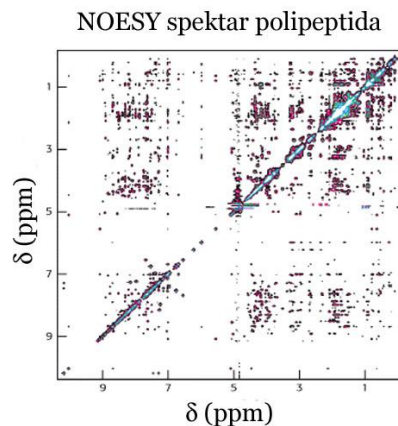
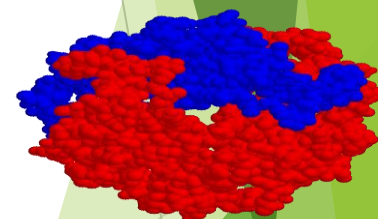
- Kombinacija X kristalografije, NMR-a i mnogo sati kompjuterskih simulacija i proračuna je dobitna kombinacija u najaktuelnijoj disciplini savremene biofizike - određivanju strukture proteina



+

+

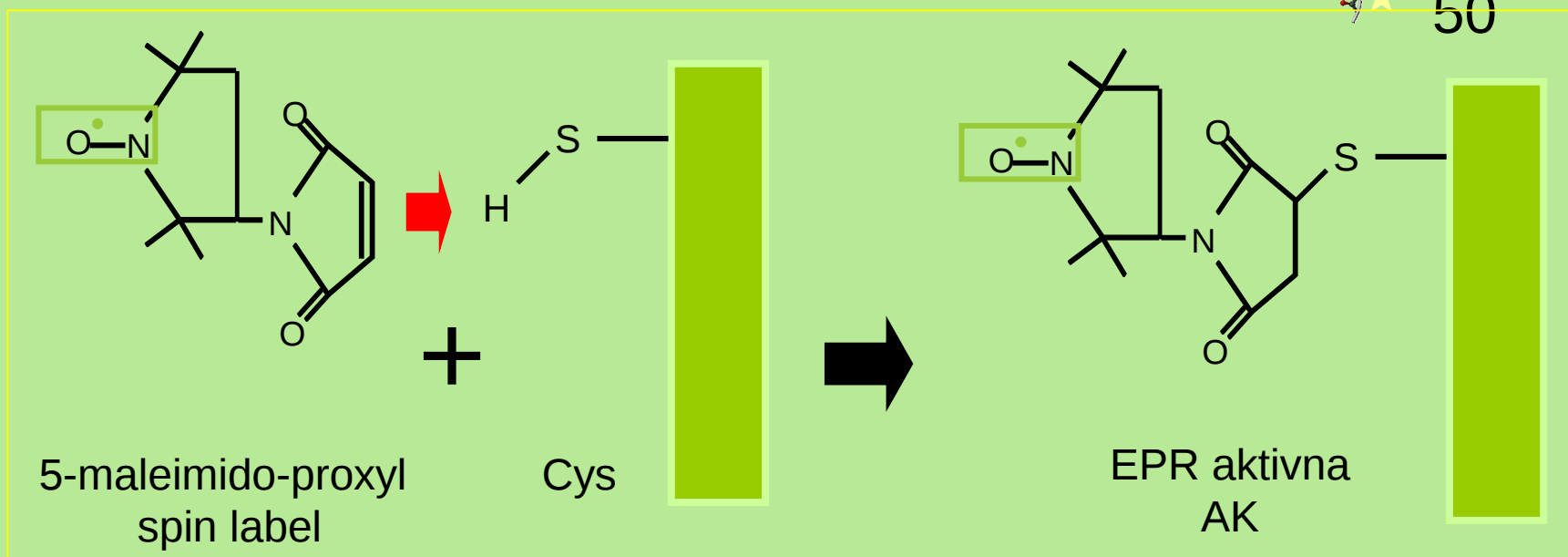
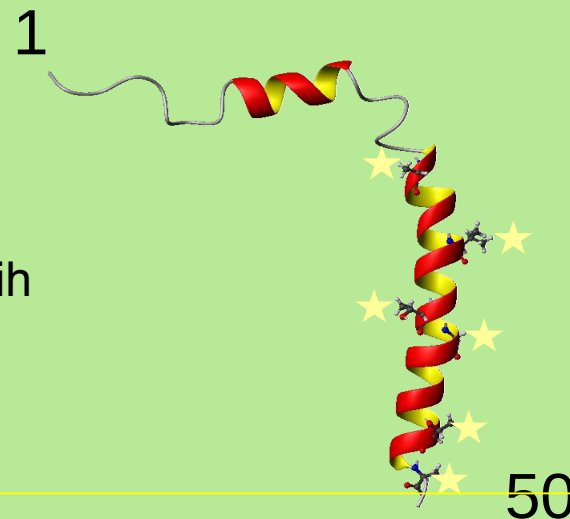
=



A membranski proteini?

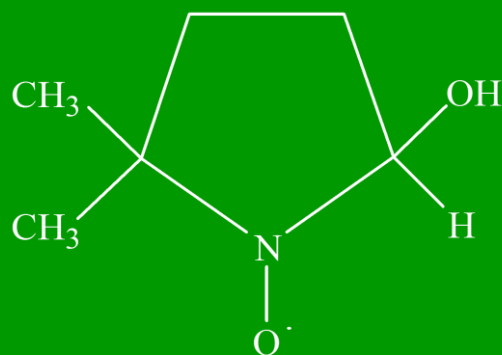
EPR - obeležavanje spinskim obeleživačem

- Na Cys se nakači spin-label
- Može se raditi i izmena Ala, Ser ili Thr sa Cys (pravljenje proteina-mutanata).
- Analiza EPR spektara dobijenih labela može nam pomoći da odredimo strukturu membranskih proteina.
- Evo kako se to radi ...



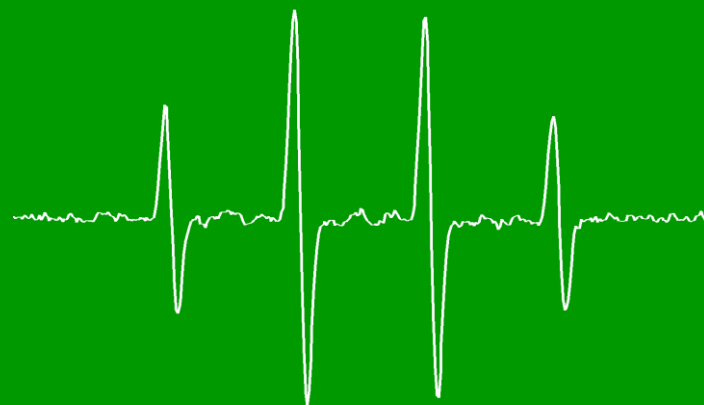
Reakcija maleimido-proxyl spin labela sa proteinom koji ima cisteine

EPR spin-trapovi (kratkoživeći radikali)



DMPO/OH adukt

EPR spektar
DMPO/OH adukta

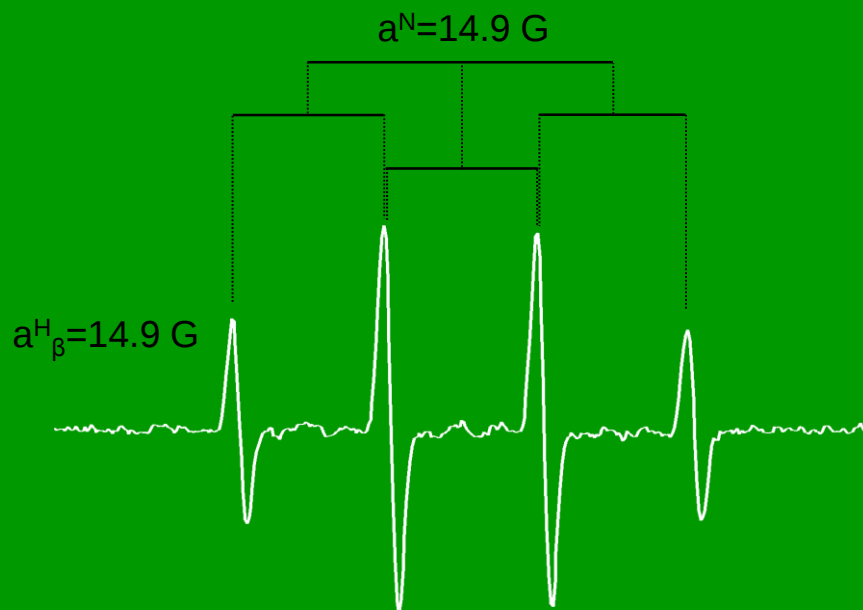


Zašto je spektar baš ovakav?

Nuklearni spinovi:

$$I(^{14}\text{N}) = 1$$

$$I(^1\text{H}) = 1/2$$

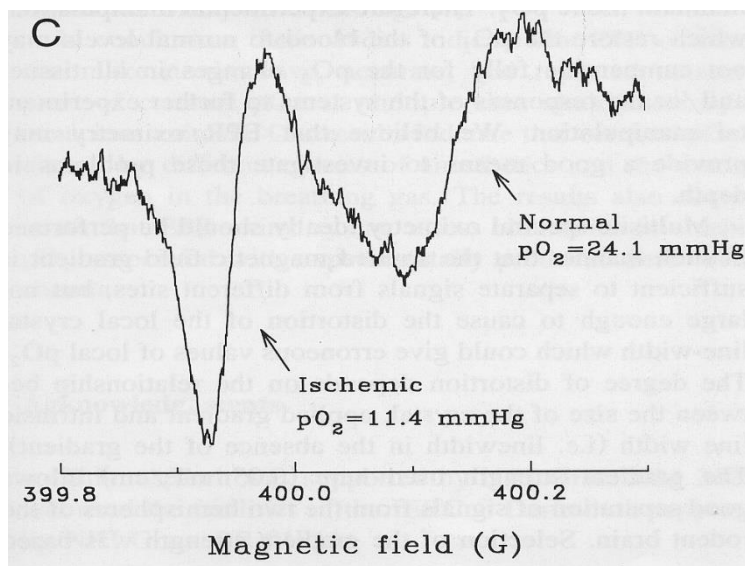


a = konstanta
hiperfinog
cepanja

EPR oksimetrija. Lokalizovane (implantirane) EPR oksimetrijske probe (pO_2)

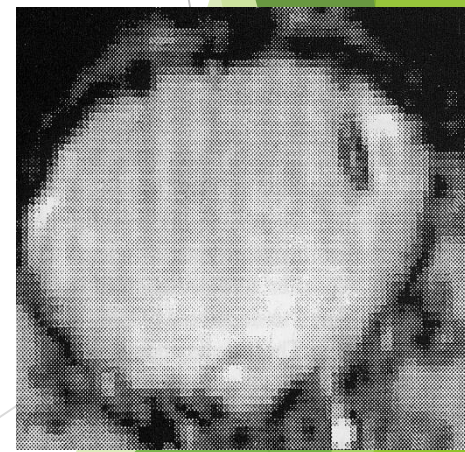
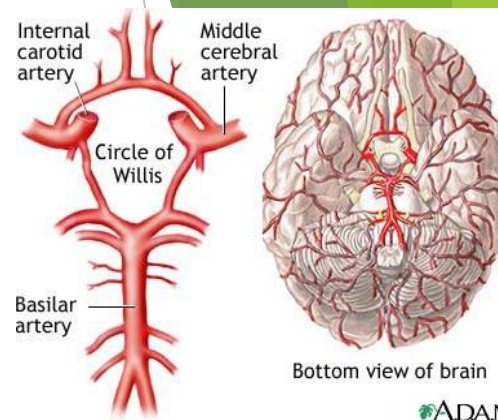
Simultano merenje pO_2 na 2 mesta u mozgu korišćenjem LiPC kristala

- Subjekat: Mongolski gerbils
- Nekopletan Willisov krug dozvoljava indukciju ishemije samo jedne strane mozga unilateralnom karotidnom okluzijom
- Metod za praćenje ishemije



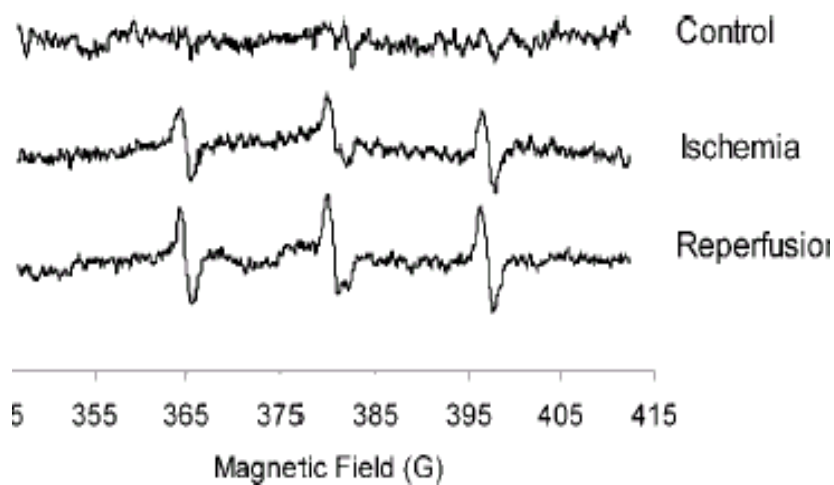
Gradijant magnetnog polja

EPR spektar dva LiPC kristala u dva reznja odražava razliku pO_2 nakon unilateralne karotidne okluzije.

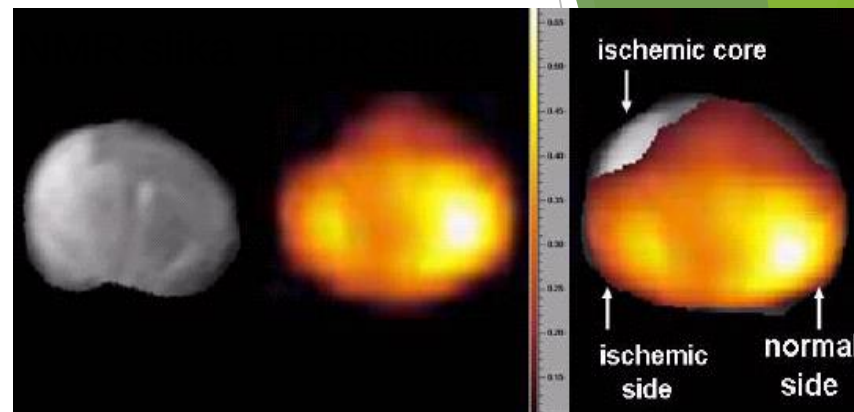


T_2^* - nagnašena MRI slika mozga u koji su implantirani LiPC (po jedan u stvaki rezanj mozga). Tamne regije su veće od veličine LiPC kristala ($<100 \mu m$) zbog namerno izazvanih artefakata susceptibilnosti

Kombinovana MRI & EPRI tehnika za proučavanje ROS upotrebom hidroksilamina

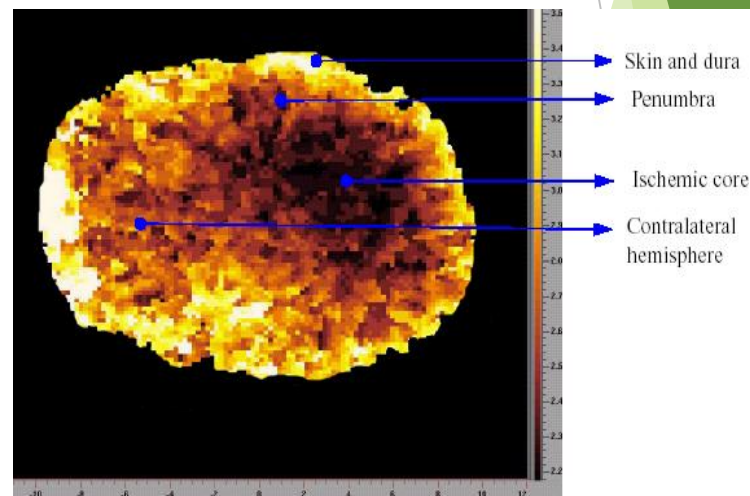


- Oksidativni stres koji je izazvan reperfuzijom.
- EPR signal dobija se tek oksidacijom hidroksilamina koji nije EPR aktivna vrsta a koji se injektuje u miša pre ishemije.
- Poređenjem MRI i EPRI slike može se lokalizovati ishemično mesto i izvršiti kiseonično mapiranje.



EPR i NMR slike miša koji je doživeo šlog

Preklopljena EPR/NMR slika



Kiseonično mapiranje mišjeg mozga tokom ishemije

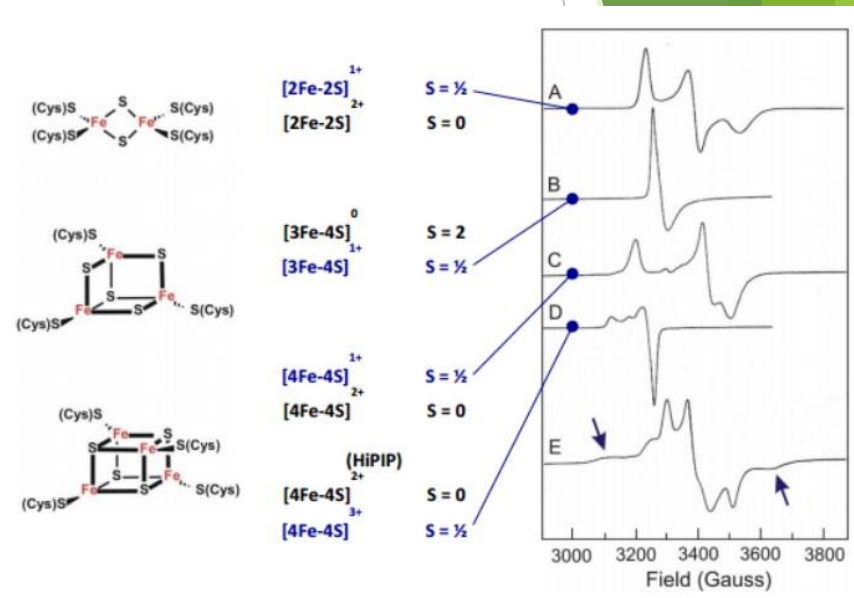
EPR ispitivanje metaloproteina

- Jedna od najboljih metoda ispitivanja spinski aktivnih metalnih jona.

Metal Ion	Electron Configuration	Spin State
Fe ²⁺	d ⁶	S = 0 (ls) or S = 2 (hs)
Fe ³⁺	d ⁵	S = 5/2 (hs)
Ni ²⁺	d ⁸	S = 1
Ni ³⁺	d ⁷	S = 1
Cu ²⁺	d ⁹	S = 1/2

Najčešće ispitivana jezgra

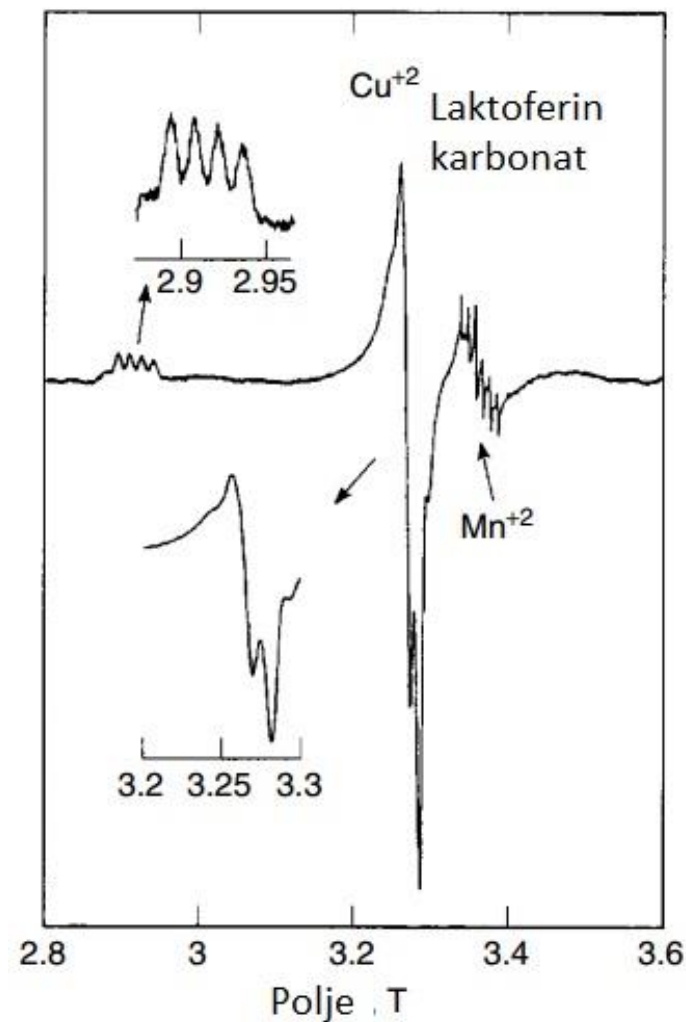
1. Prilikom pripreme uzorka moguće je oksidovati/redukovati metal u proteinu.
2. Na osnovu g-faktora se određuje metalni jon, visoko/nisko spinsko stanje, i hipefina struktura daje podatke o spinski aktivnim jezgrima u ligandima
3. $g > g_e$ ukoliko je više od pola orbitale popunjeno, i obrnuto (podaci o samom jezgru)



Zavisnost izgleda signala od naelektrisanja i tipa Fe-S kompleksa

EPR ispitivanje metaloproteina

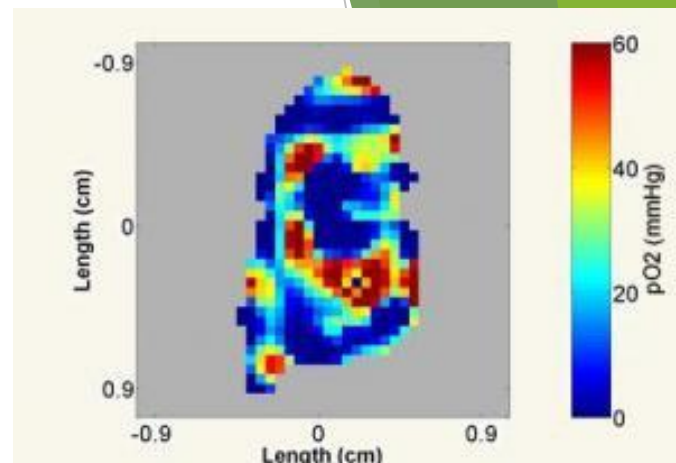
- Posebno je važno ispitivanje na višim frekvencijama posebno ukoliko je prisutno nekoliko različitih metala.
- Na spektru se uočava pored bakra, i signal mangana (6 maksimuma) koji je nečistoća u laktoferinu. Ovo nije vidljivo na nižim frekvencijama zbog smanjene rezolucije. U oblasti od 2,9-2,95 T postoji signal molekula koji su postavljeni paralelno u odnosu na korišćeno polje, i od 3,2-3,3T molekula koji su postavljeni normalno. Postojanje četiri maksimuma ukazuje na interakciju nesparenih elektrona sa 4 spinska stanja bakra.



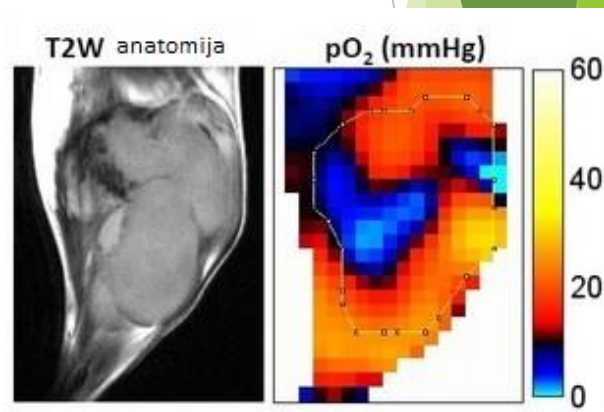
EPR spektar
laktoferina

EPR Imidžing (EPRI)

- ▶ EPRI omogućava snimanje spektara sa određene površine. Zbog male koncentracije paramagnetnih supstanci dodaju se hvatači spinova ili probe. Moguće je merenje i uslova okoline - pritiska kiseonika, koncentracije tiola, pH, visokoznosti i temperature kroz promenu spektra veštački ubačene probe. Spektralno-prostorno snimanje se radi u svakoj tački i na taj način meri koncentracija. Ukoiko se pored 3D meri i neki drugi parametar, može se govoriti o 4D EPRI.
- ▶ Ubrizgavanje probe se radi u krvotok ili lokalizovano, zavisno od dela koji se snima. Moguće je ubacivanje eksperimentalne životinje u magnet. Koriste se frekvencije od 250 MHz i 1 GHz zbog dobrog prolaska kroz organizam. Merenje parcijalnog pritiska kiseonika ukazuje na oporavak posle tretmana tumora, na primer.
- ▶ Merenje oksimetrije - širenje maksimuma usled prisustva kiseonika u uzorku (superhiperfina struktura).



EPRI - prikaz parcijalnog pritiska kiseonika <https://epri.uchicago.edu/>

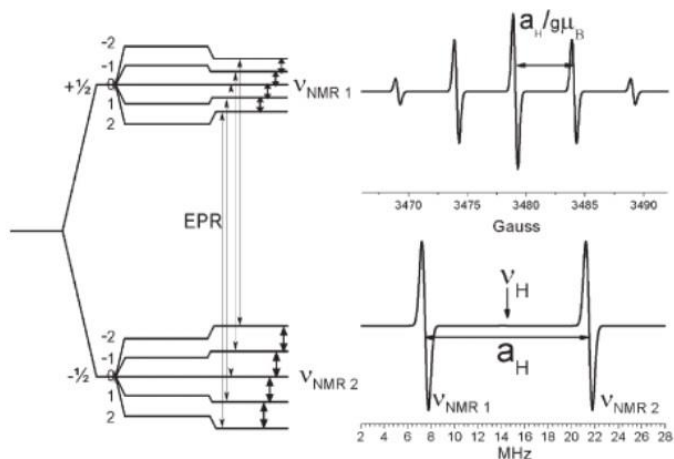


Ispitivanje tumora preko hipoksije.

<http://www.wmis.org/abstracts/2011/data/papers/P292.html>

Nove EPR tehnike: ENDOR, ESEEM i HYSCORE

- ▶ Dve pulsne tehnike - Electron Spin Echo Envelope Modulation (ESEEM) i Electron-Nuclear Double Resonance (ENDOR).
- ▶ Ove tehnike omogućavaju da se na osnovu promena u signalu odredi koji se od spinski aktivnih molekula nalazi u blizini metalnog jona (^1H , ^2H , ^{13}C , ^{14}N , ^{15}N , ^{17}O , ^{31}P i ^{33}S). Pod povoljnim okolnostima, mogu se odrediti i rastojanja metala od liganda i uglovi. Iako obe metode daju iste podatke, njihova osetljivost može dosta zavistiti od uslova snimanja.



ENDOR prelaz - prelaz NMR. Spektrometar se sastoji od standardnog cwEPR i radiofrekventnog izvora, tako da se jezgra ispituju na osnovu njihove Larmorove frekvencije. Smanjena je osetljivost u odnosu na EPR.

Interakcija elektrona $S=1/2$ i četiri ekvivalentna jezgra spina $I=1/2$

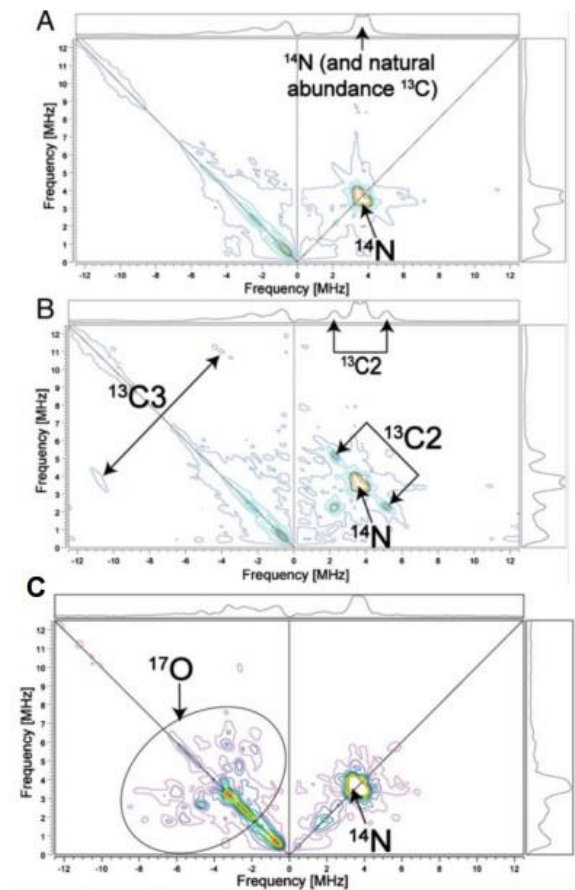
Murphy, D.M., Farley, R.D., Chem.Soc.Rev., 35(2006), 249-268.

HYSCORE

- ▶ ESSEM je važna tehnika za ispitivanje interakcije spinova i okolnih jezgara. Poboljšanje tehnike je Hyperfine Sub-Level Correlation (HYSCORE), koja je u suštini 2D tehnika i omogućava analizu uzoraka sa složenim interakcijama među jezgrima i elektronima. Mogu se dobiti informacije o spinskoj gustini, dužini veza i uglovima.
- ▶ Kao primer prikazan je enzim koji prikazuje pikove zbog prirodne zastupljenosti ^{13}C i ^{14}N .
- ▶ Da bi se detaljnije ispitalo kako se metabolički intermedijer MEcPP vezuje za klaster, različite oblasti su obeležene ^{13}C i ^{17}O . Pojava novih maksimuma u spektru pokazuje kako bi trebalo rasporediti delove proteina i pokazuju kratke Fe-O veze.

HYSCORE spektri na $g=2,019$. a) bez obeleživača, b) obeleženo ^{13}C , c) obeleženo i ^{17}O .

https://www.auburn.edu/~duinedu/epr/1_theory.pdf



Masena spektrometrija

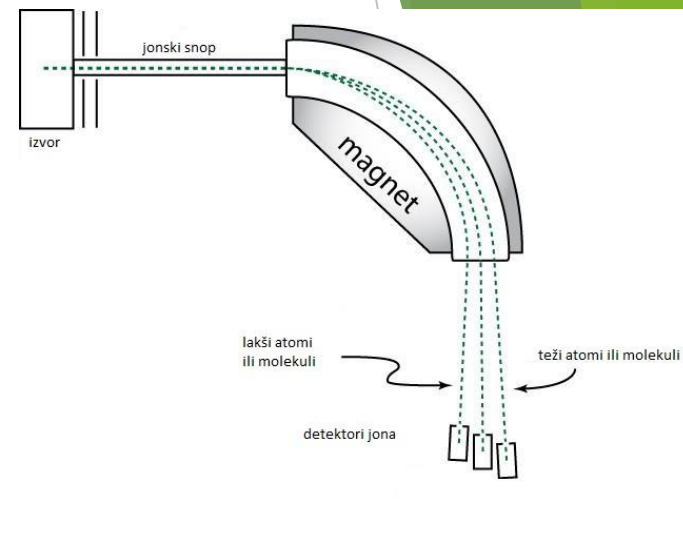
- ▶ Tri osnovna koraka - jonizacija, analiza masa i detekcija jona.
- ▶ Kuplovani sa metodama razdvajanja (hromatografija).
- ▶ Zasnovana na analizi odnosa m/z , zbog kretanja naelektrisanih čestica u električnom i magnetnom polju.

- ▶ $\frac{z}{m} = \frac{H^2 r^2}{2V}$ - osnovna jednačina kretanja u električnom i magnetnom polju.

- ▶ Najjednostavniji su magnetni analizatori $r = \frac{1}{H} \left(\frac{2mV}{z} \right)^{1/2}$ i $\frac{\Delta r}{r} = \frac{1}{2} \frac{\Delta m}{m} + \frac{1}{2} \frac{\Delta V}{V}$

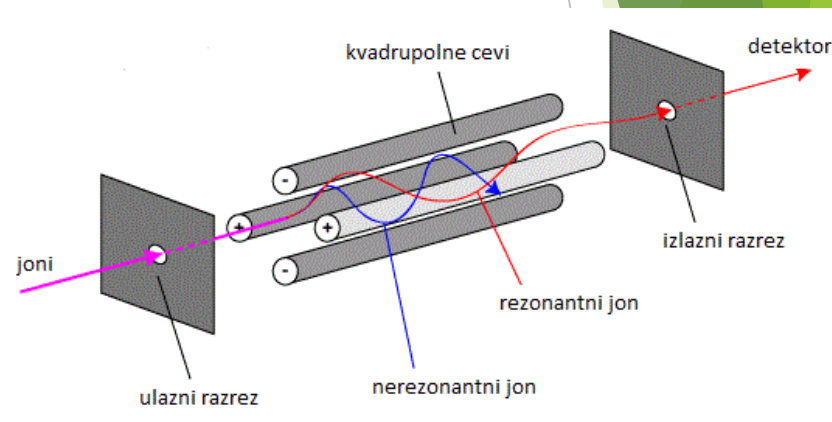
(smanjuje se relativna greška visokim naponom (8000 V))

- ▶ Ispituju se vrste do 15000 D, ukoliko su povezani magnetsko fokusiranje sa elektrostatičkim analizatorom.



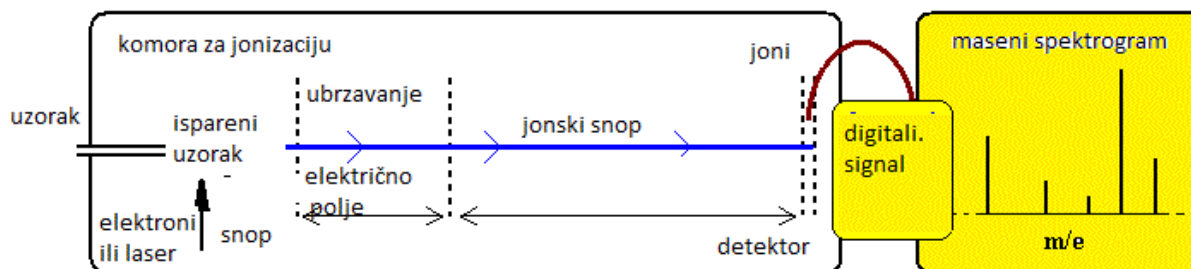
Kvadrupolni analizatori

- ▶ Promena električnog polja, tako što se primeni stalno polje i dodatno oscilatorno polje sa faznom razlikom od 180° , prolaze joni samo da određenom razlikom m/z .
- ▶ Ispitivanja do 10000 D.
- ▶ Povezani sa jonskim zamkama, tako da se i vreme preleta može ispitivati. Time se povećava rezoluciju i osetljivost.
- ▶ Primenjuju se konstatno i oscilujuće polje, i sa povećanjem polja neki od jona se sudaraju sa zidom suda.



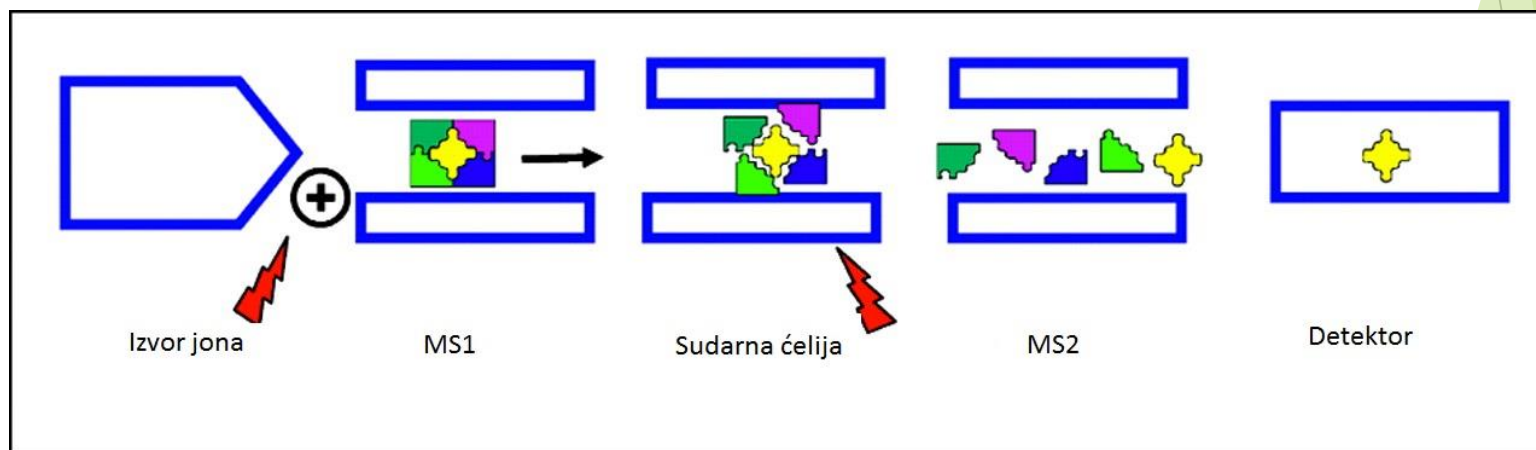
Analizatori vremena preleta

- ▶ $v = \left(\frac{2mV}{z}\right)^{1/2}$ lakši joni brže stižu.
- ▶ Da bi se koristila ova metoda, potrebno je da joni istovremeno budu u analizatoru, razlike vremena pristizanja su reda μs . Da bi se povećala osetljivost i rezolucija, joni se usporavaju, preko „sočiva“ električnog polja.
- ▶ Prednost je neograničena oblast masa koje se ispituju i visoka osetljivost (rezolucija do 15000)



Tandem masena spektrometrija

- Povezivanja dva i više analizatora, kako bi se bolje razdvojili joni sličnih masa. Posebno značajno za biološke uzorke.
- Koraci - odabir oblasti masa, fragmentacija i analiza masa. Odabrani joni se fragmentiraju u sudarima sa atomima inertnog gasa i analiziraju drugim analizatorom. Zavisno od metode fragmentacije, dobijaju se joni koji mogu biti istovetni onim iz prvog analizatora.
- Triplkvadrupol - prvi selektuje jone, drugi za sudare i disocijaciju i treći za analizu produkata.



Načini jonizacije

- ▶ Uvođenje uzorka u vakum, zbog sudara nastalih jona sa molekulima iz vazduha.
- ▶ 1. **Jonizacija elektronima** - bombardovanje elektronima energije 50-100 eV, zagrevanjem metala. Da bi došlo do jonizacije, elektroni moraju da imaju veću energiju od energije jonizacije ispitivanog materijala. Fragmentacija je jedinstvena za svaki molekul, ali je problem što se molekul dosta fragmentiše, nekad nije prisutan roditeljski jon. Istorijski najviše korišćena, velike baze podataka.
- ▶ 2. **Bombardovanje brzim jonima (FAB)** - omogućava analizu velikih molekula (preko 4000 D). Koriste se Ar, Xe i Cs^+ , a uzorak se nalazi na površini metala. Mogu da nastanu i pozitivni i negativni joni.
- ▶ 3. **Laserski potpomognuta desorpcija iz matriksa (MALDI)** - uzorak se nalazi unutar kristalnog matriksa (odnos 1/1000) i koristi se laser talasne dužine koju kristal apsorbuje dobro, uzorak se desorbuje i jonizuje. Ispituju se molekuli do 300000 D.
- ▶ 4. **Elektrosprej jonizacija (ESI)** - sprej naelektrisanih kapljica se pravi od uzorka i nalazi na metalnom vrhu sa 4000 V. Sa smanjenjem površine zbog kulonovih interakcija, nestaje kapljica i nastaje sprej. Nastaju višestruko naelektrisani joni, ispituju se molekuli do 100000 D, dobra osetljivost - piko i femtomolarna oblast. Problem je analiza zbog nesigurnosti o naelektrisanju jona.

Ispitivanje bioloških uzoraka

Komponenta	Metoda jonizacije	Mehanizam jonizacije
Peptidi	FAB, MALDI i ESI	Protonovanje, deprotonovanje
Proteini	MALDI i ESI	Protonovanje, deprotonovanje
Ugljenihidrati	FAB, MALDI i ESI	Protonovanje, deprotonovanje, katjonizacija
Oligonukleotidi	MALDI i ESI	Protonovanje, deprotonovanje, katjonizacija
Mali biomolekuli	FAB, MALDI i ESI	Protonovanje, deprotonovanje, katjonizacija, izbacivanje e^-

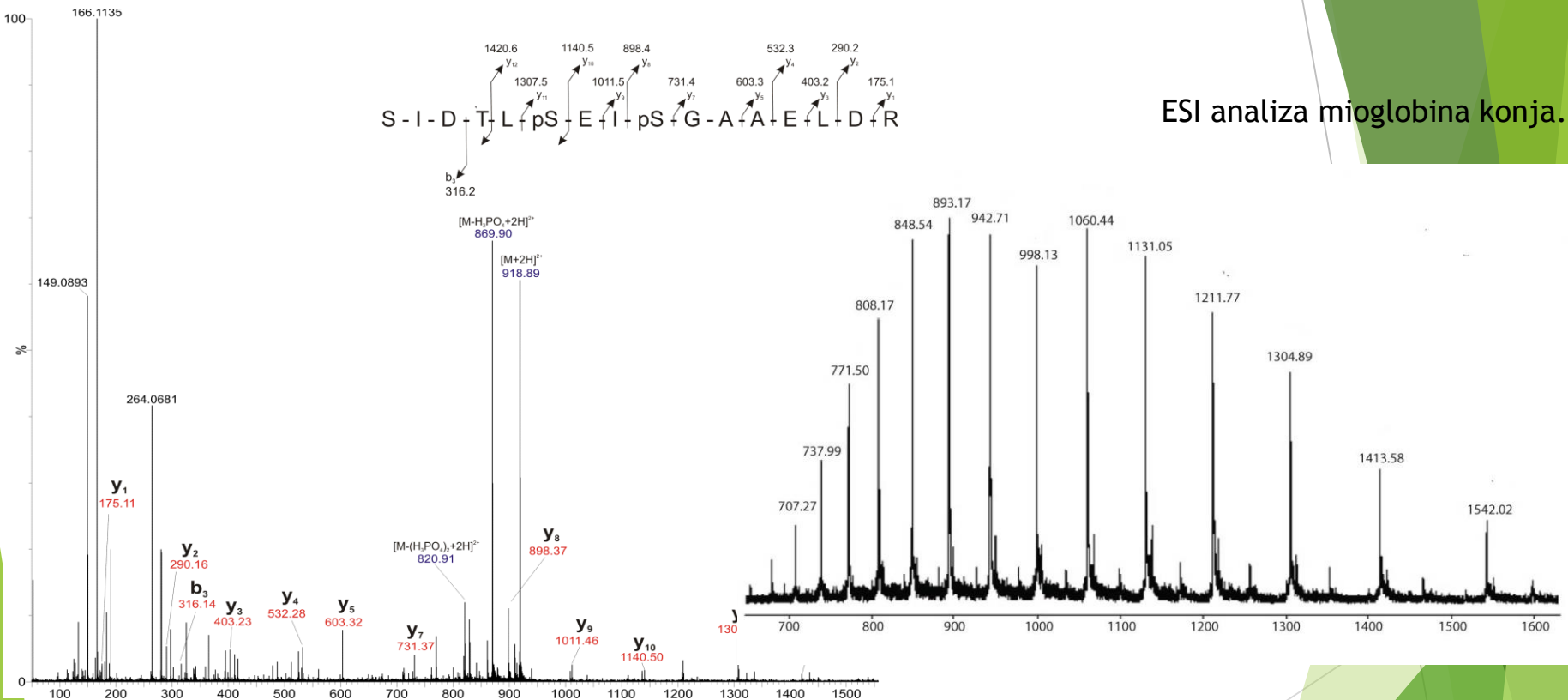
Ispitivanje bioloških uzoraka

- proteini -

- ▶ Potrebno 5-100 μM rastvora, često je potrebno prečišćavanje i odvajanje (gasna i tečna hromatografija). Kalibracija instrumenta standardnim supstancama i unutrašnjim standardima se radi zbog boljeg određivanja mase. Masa se određuje sa preciznošću od nekoliko desetina daltona za makromolekul od 100000 D.
- ▶ Proteini - Koriste se meke metode jonizacije. Rutinska analiza, do reda fM koncentracija. MALDI i ESI omogućavaju određivanje promene u masi ukoliko je zamenjena samo jedna amino kiselina, primenjuje se kod prostorno-specifične mutageneze (*site-specific mutagenesis*).
- ▶ Ispitivanje nepoznatih proteina - korišćenjem eksopeptitaza (karboperoksidaze i aminoperoksidaze), koje odsecaju jednu po jednu aminokiselinu. Poređenjem sa poznatim polipeptidnim lancima određuje se detaljno struktura. Ili se može koristiti tripsin koji razdvaja amino-kiseline. Ukoliko postoje disulfidni mostovi, onda se redukuju disulfidi prvo (moguće odrediti broj disulfidnih mostova na osnovu promene mase nakon redukcije).
- ▶ *Genome project* i proteomika.

Maseni spektri proteina

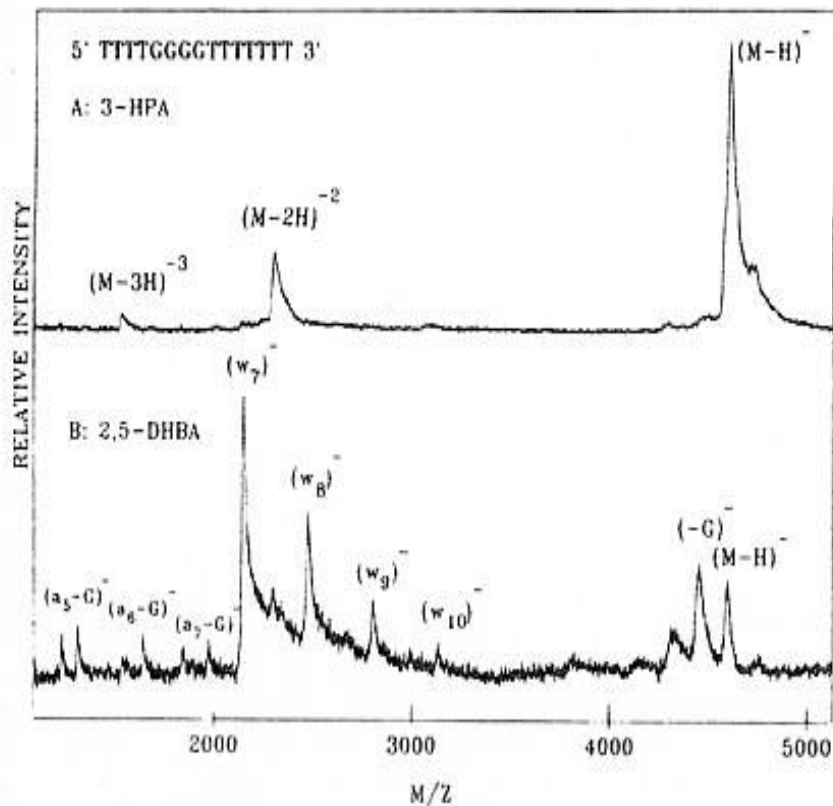
ESI analiza mioglobina konja.



<http://www.fbs.leeds.ac.uk/facilities/ms/analyses.php>

<https://www.sepscience.com/Information/Archive/MS-Solutions/247-/MS-Solutions-16-Determination-of-Intact-Protein-Molecular-Mass--from-Multiple-Charge-Electrospray-Mass-Spectra>

Ispitivanje bioloških uzoraka - nukleinske kiseline -

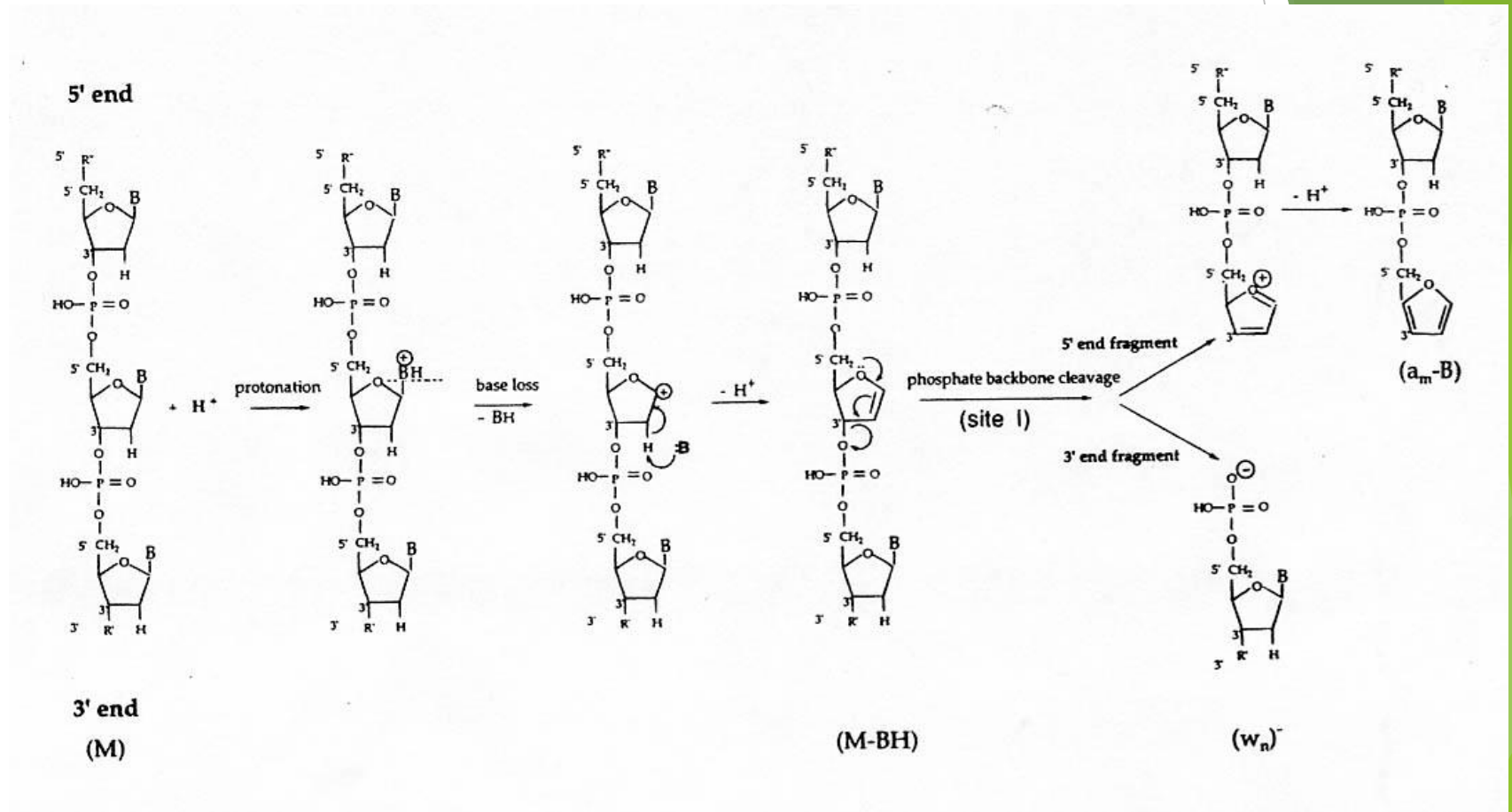


- ▶ Najčešće MALDI (matriksi 3-hidropikolna kiselina (3-HPA), 2,4,6-trihidroacetofenon i 6-aza-2-tiotimin za UV, i glicerol za IC oblast).
- ▶ Zavisno od matrice - veća ili manja fragmentacija.
- ▶ Najčešće analize - ispitivanje lekova, mesto modifikacije, ispitivanje infektivnih agenata i detaljna dijagnostika bolesti.

Petnaestomer ispitivan u dva matriksa - 3-HPA i 2,5-DHB (dosta fragmenata)

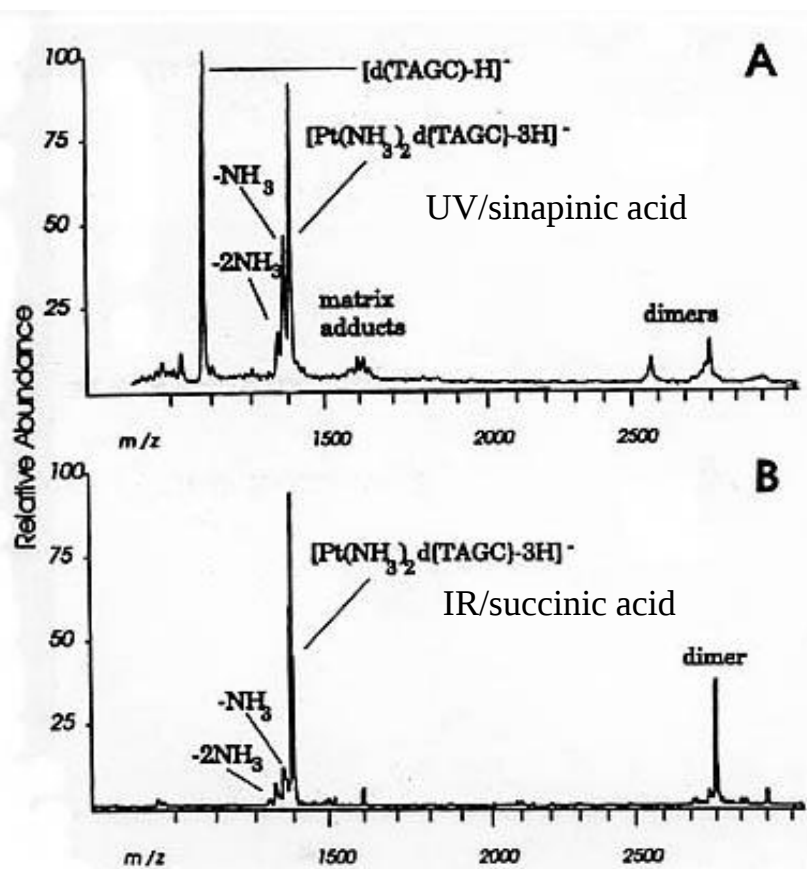
Ispitivanje bioloških uzoraka

- nukleinske kiseline -



Proces raskidanja veza u nukleinskim kiselinama

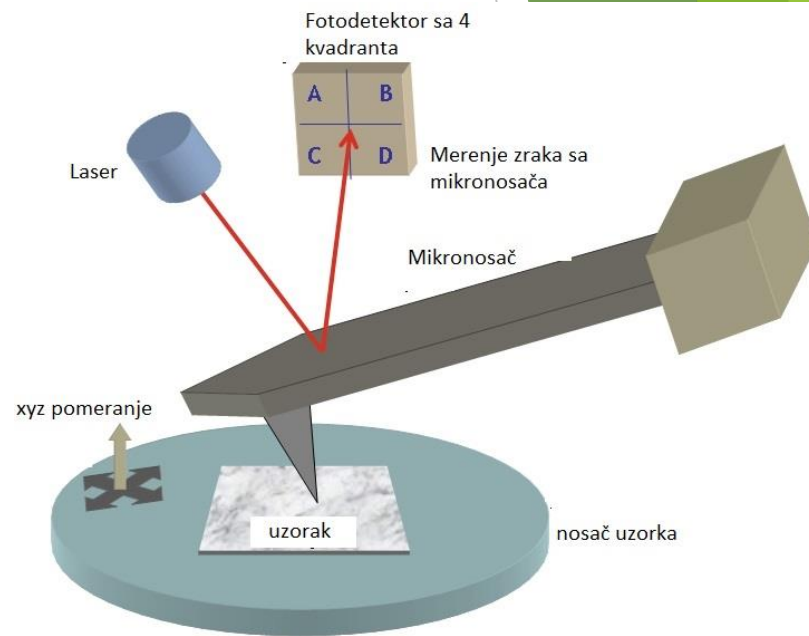
Primer - ispitivanje kompleksa metala sa DNA



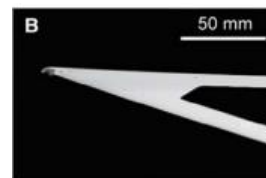
- ▶ Joni cis-platina-DNK kompleksa dobijeni su MALDI tehnikom.
- ▶ Stabilnost kompleksa zavisi od talasne dužine i korišćenog matriksa.
- ▶ Kompleksi daju informaciju o mestu vezivanja ukoliko se koristi enzimaska digestija.

Mikroskopija atomskih sila (AFM) - osnove metode

- Posebno dizajnirana sonda - šiljak i mikronosač. Skeniranje se zasniva na prevlačenju sonde po površini, a slika nastaje promenom položaja nosača usled postojanja sila između površine i šiljka. Položaj se određuje laserski i dobijaju se slike u 2D.
- Može da radi u dva moda - kontaktnom i bezkontaktnom. Poslednji razvijen je polukontakti u kome šiljak rezonantno osciluje iznad uzorka i dodiruje površinu frekvencijom koja zavisi od jačine sila.
- Promena faze i amplitude ukazuje i na magnetne sile (mikroskopija magnetnih sila).



Prikaz AFM mikroskopa



Izgled šiljka.

Mikroskopija atomskih sila (AFM) - osnove metode

AFM je bolje od SEM jer:

Realni 3D prikaz površine uzorka

Dielektrični uzorci

Uzorci koji ne mogu u vakuum

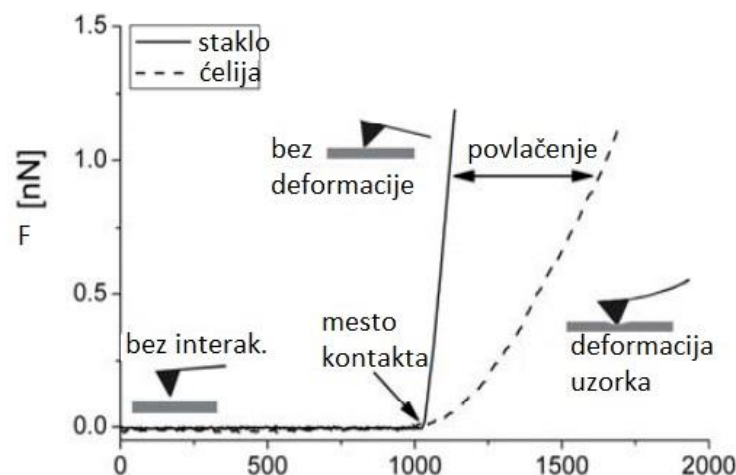
Ali ne daje hemijski sastav

Primena AFM u ispitivanju ćelija tumora

- ▶ Ovo metodom mogu da se ispituju strukture koje nisu vidljive optičkim mikroskopom. Dobra 3D struktura uzorka, ispitivanje na vazduhu i u tečnosti (uslovi slični prirodnim, za ćelije na pr.), mogućnost rada u imidžing modu, različiti tipovi uzoraka su samo neke od prednosti ove metode.
- ▶ AFM se smatra komplementarnom metodom ostalim biohemijskim.
- ▶ Metodom se dobijaju informacije o mehaničkim osobinama ćelija (nastanak citoskeleta, na pr.) i silama među molekulskim kompleksima (specifične informacije). Obe vrste istraživanja mogu da se koriste u ispitivanju tumora na nivou jedne ćelije.
- ▶ Tumor dovodi do promena u strukturi, ponašanju, mehaničkim osobinama, rastu, morfologiji, interakcija na nivou ćelija, ćelijskoj membrani i citoskeletu. Zbog smanjene količine aktinskih filamenata i mikrotubula, smanjuje se čvrstoća citoskeleta. Sa druge strane, ukoliko se razvija tumor, neki od proteina su glikozilovani (imaju dodatne oligosahardne grupe) što menja funkcije.

Primena AFM u ispitivanju ćelija tumora

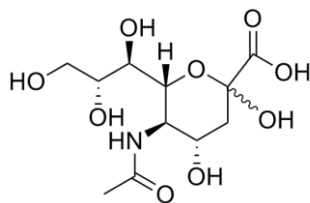
- ▶ Krutost ćelija se prikazuje kao kriva sile što predstavlja zavisnost otklona mikronosača (preveden u silu) od udaljenosti uzorka. Ukoliko je materijal stavljen tako da se ne deformiše lako, otklon predstavlja samo udaljenost materijala (prava linija), za realne uzorke postoji nelinearni karakter krive. Oduzimanjem ove dve krive dobija se zavisnost koja je karakteristika samog materijala. Odatle se može izračunati Jungov moduo.
- ▶ Metodom se retko određuje apsolutna vrednost modua, zbog ograničenja povezanih sa izvođenjem formule i realnim uzorcima, ali su i relativne vrednosti dobre zbog upoređivanja ćelija tumora i zdravih ćelija. Moduo je kod ćelija raka za red veličine manji od referentnih ćelija, zbog promena u citoskeletu.



Merenje krutosti

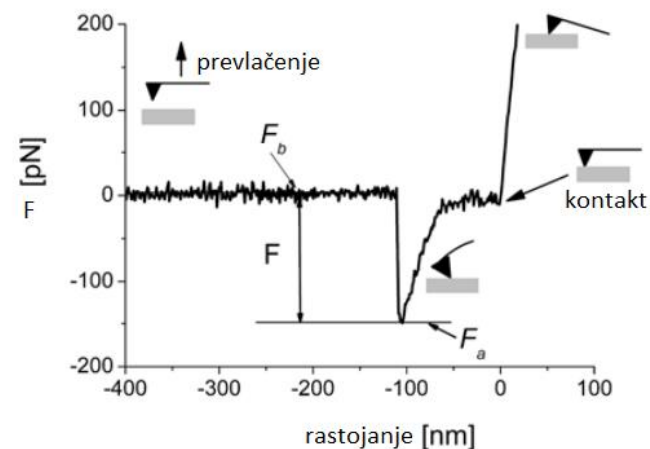
Primena AFM u ispitivanju ćelija tumora

- ▶ Merenje interakcija između para molekula zahteva da jedan od molekula bude zakačen na vrh igle, i nakon toga doveden u kontakt sa površinom ili molekulom od interesa (prevlačenjem preko površine uzorka). Meri se rastojanje u kome se raskidaju veze između molekula (i prikazuje kao sila raskidanja veza). Prednost je praćenje sila kratkog i dugog dometa.
- ▶ Koriste se dva parametra sila potrebna da se veza raskine (veća - stabilniji kompleksi) i verovatnoća raskidanja veza (gustina receptora na površini).
- ▶ Pojava oligosaharida sijalinskog na površini živih ćelija beške sa lektinom kao probom na površini šiljka. Pokazana je razlika oba parametra za referentne ćelije i ćelije tumora. Veze su lakše raskidane kod ćelija tumora, ali je broj oligosaharida bio veći.

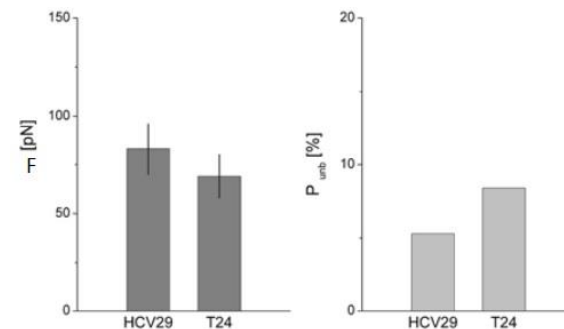


Sijalinska kiselina

<https://home.cc.umanitoba.ca/~hultin/chem2220/Support/CoolStuff/Influenza/Neuraminidase.htm>



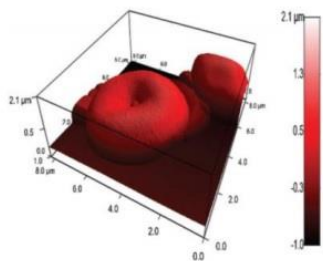
Merenje sile raskidanja veza



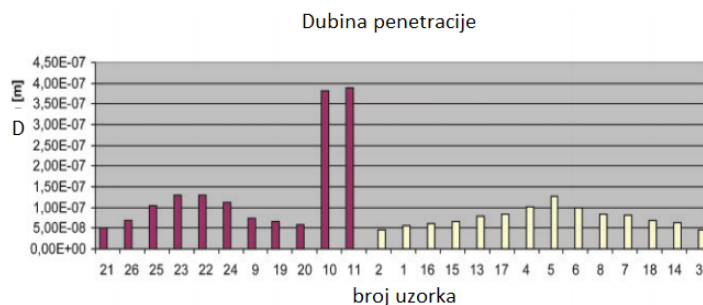
T24-ćelije tumora,
HCV29 - referentne
ćelije

Primena AMF u ispitivanju crvenih krvnih zrnaca

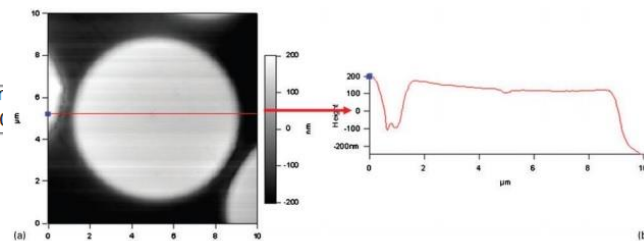
- ▶ Ispitivana su crvena krvna zrnca (topografija, elastičnost i tvrdoća) i upoređivana kod zdravih osoba i osoba koje uzimaju lek eritroprotein (EPO) na 26 uzoraka. Elastičnost i tvrdoća su izražena kao visinska razlika između prvog kontakta vrha mikronosača i dubine na kojoj je sila $3 \mu\text{N}$. Ali, rezultati nisu pokazali nikakvu razliku.
- ▶ Interesantno je da je kod jedne osobe primećeno veliko odstupanje velike penetracije. Normalno zrnce ima bikonkavni oblik, a kod ove osobe je primećeno da više liči na pljosnati cilindar. Detaljnom analizom je primećenno da boluje od retke vrste dijabetesa.



3D AFM slika crvenog krvnog zrnca



Rezultati merenja dubine penetracije mikronosača



Izgled eritrocita koji boluje od retke vrste dijabetesa

<https://www.youtube.com/watch?v=MZb8C0f7Kdg>