

Metode i metodologija fizičkohemijskih istraživanja

Metode i metodologija u biofizičkoj hemiji

Ana Popović Bijelić

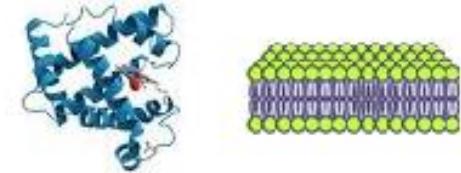


22.12.2022.

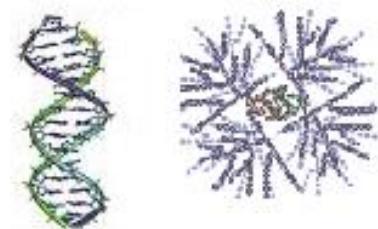
Neka pitanja na koja bi trebalo da možete da odgovorite nakon slušanja ovog predavanja

- Kojim metodama mogu da odredim primarnu, sekundarnu, i tercijarnu (3D) strukturu proteina?
- Kojom metodom mogu da odredim veličinu koloidne čestice?
- Koja spektroskopska tehnika nije idealna za snimanje vodenih uzoraka?
- Kojom metodom mogu da izmerim rastojanje na kojem se kidaju veze između dva molekula?
- Kojom tehnikom može da se ispituje funkcionisanje jonskih kanala?
- Kojom metodom mogu da potvrdim da se Fe nalazi unutar hema?
- Kojom metodom mogu da proučavam fluidnost membrane?
- Kojom tehnikom mogu da vidim ćelije i ćelijske organele?
- Kojim tehnikama mogu da pratim toplotne promene koje prate vezivanje supstrata za enzim?
- Da li su neke aminokiseline fluorofore?
- Da li DNK može da se koristi za enkapsulaciju lekova?
- Koje FH tehnike nisu destruktivne?

Šta proučava biofizička hemija?



Biosisteme



Fundamentalna istraživanja

- Struktura, konformacija, funkcija biomolekula
- Konformacione promene i dinamika tih promena
- Interakcije između biomolekula
- Biohemski procesi – reaktanti, intermedijeri, produkti, aktivatori, inhibitori
- Efekti toplote, zvuka, zračenja, reaktivnih hemijskih vrsta itd. na biosisteme

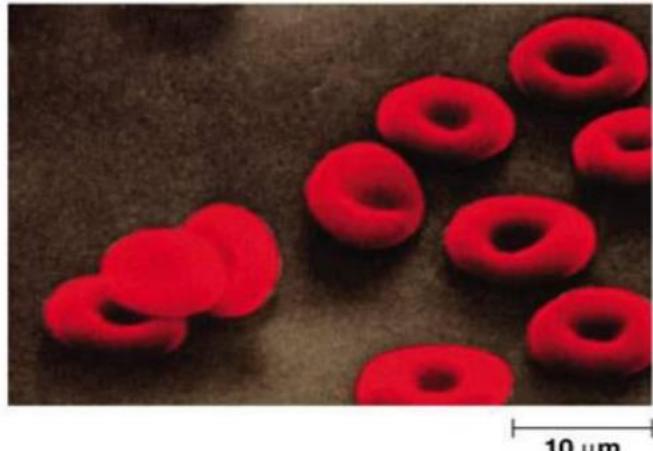
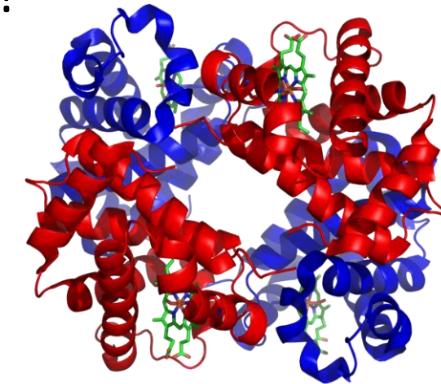
Primenjena istraživanja - farmakologija, medicina, ekologija itd.

- Kako rade **lekovi**, sa kojim biomolekulima interaguju
- Da li neki biomolekul ili biohemski reakcija mogu da budu **meta** za lek
- **Dizajn** novih lekova – **ciljana** isporuka lekova – nove **rute** za isporuku lekova
- Identifikacija pouzdanih **biomarkera** za bolesti
- Uticaj **ekoloških faktora** na biosisteme na molekularnom nivou

Pitanje: Zašto nas interesuje struktura biomolekula?

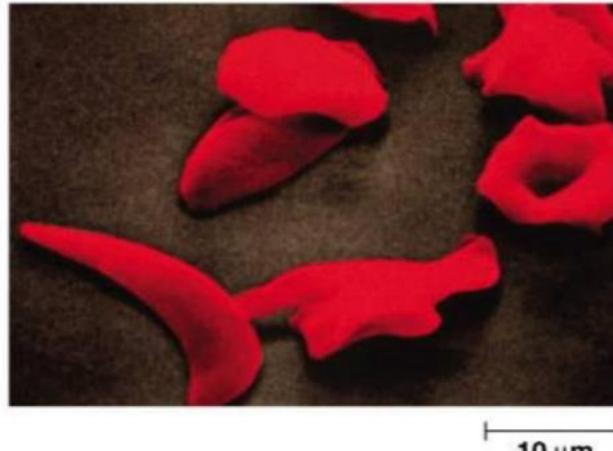
Primer: protein hemoglobin

Samo jedna AK u primarnoj strukturi je pogrešna → izmenjen oblik Hb → izmenjen oblik eritrocita → srpasta anemija



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

Normalni eritrociti i 1^o struktura Hb

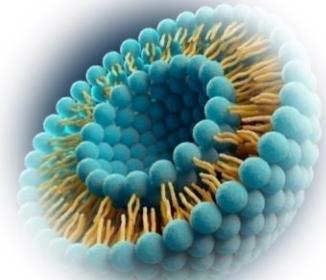


Val His Leu Thr Pro Val Glu ...
1 2 3 4 5 6 7

Eritrociti kod srpaste anemije
i 1^o struktura njihovog Hb

Odgovor: Struktura određuje osobine i funkciju biomolekula, možemo da objasnimo poreklo bolesti, možemo da pronađemo tretman ili lek

Ciljana isporuka lekova - lipozomi



- Zaštita od oksidacije i degradacije leka
- Bolja bioraspoloživost i bioiskoristljivost leka u odnosu na kapsule ili tablete.

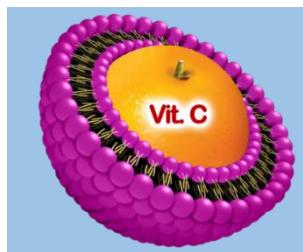
Neki primeri:



AmBisome®
(amphotericin B) liposome for injection



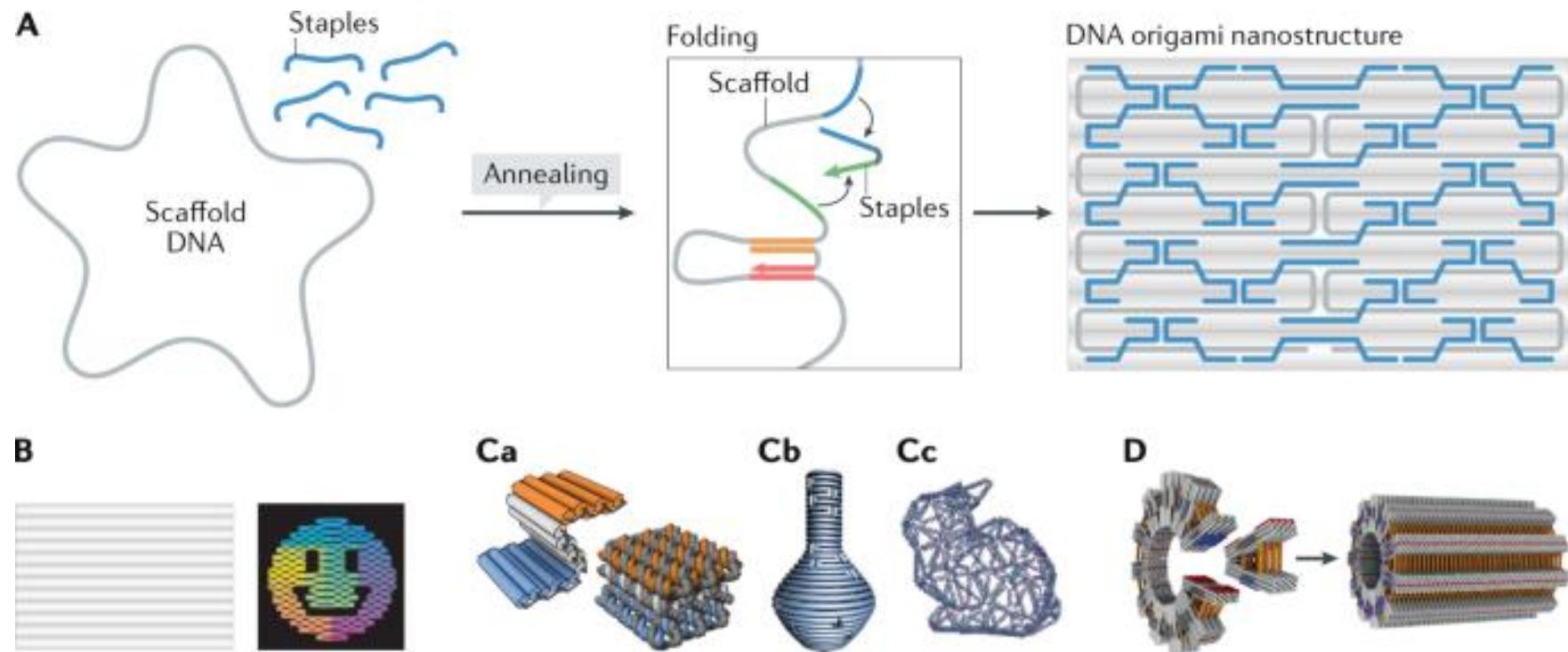
©2021 Astellas Pharma US, Inc.



- Prašak za suspenziju za infuziju.
- Primena kod sistemskih gljivičnih infekcija.

Ciljana isporuka lekova – DNK origami

Posebno važna primena za ciljanu dostavu **antikancerskih lekova** koji su slabo rastvorljivi, nestabilni, citotoksični.

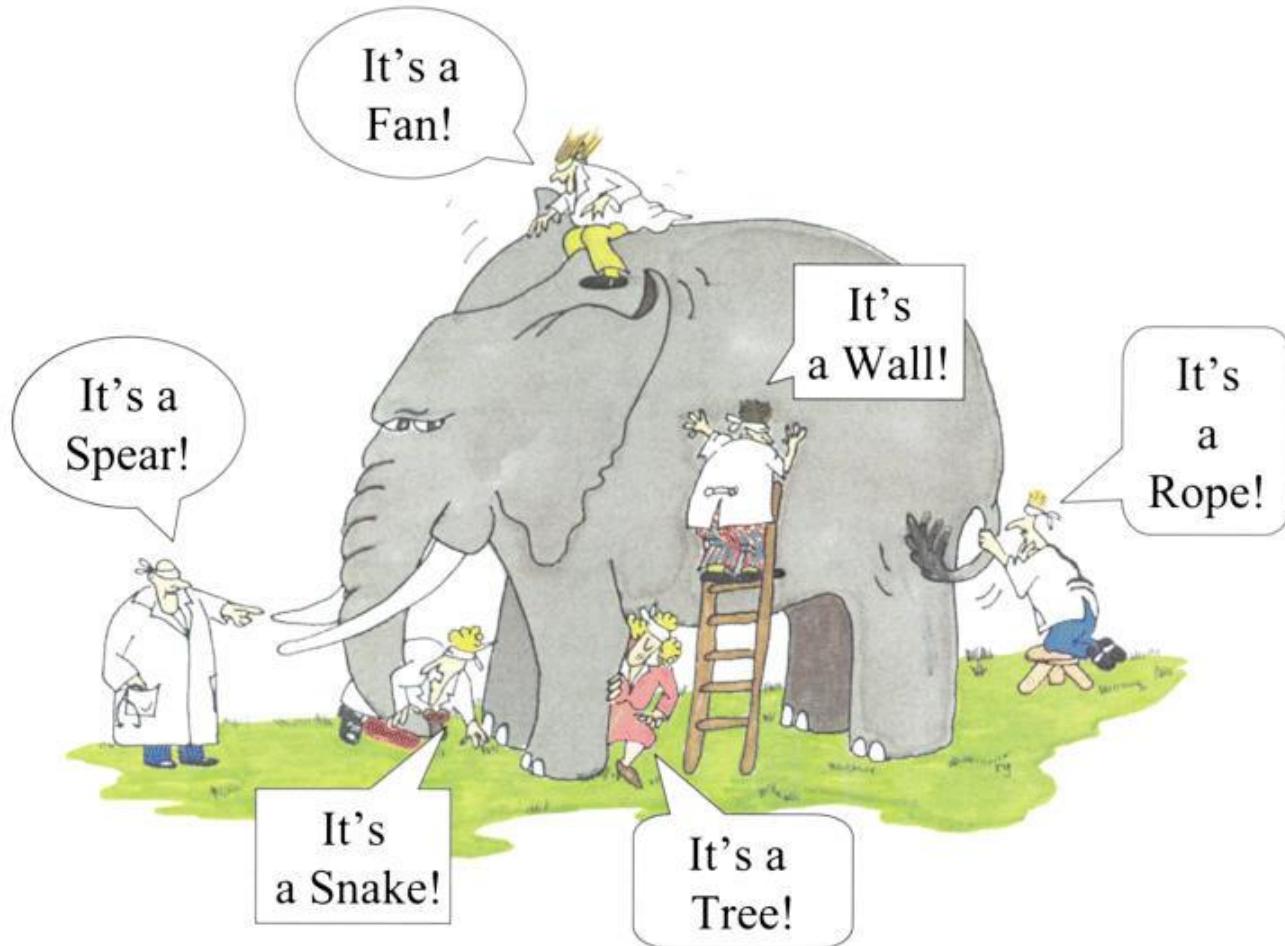


Šta je uzorak u biofizičkoj hemiji?

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

Biofizička hemija – timski rad

Interdisciplinarna naučna oblast – integriše znanja i metode iz različitih disciplina



Etička pitanja

Direktiva [02010L0063-20190626](#)

EU zakon o zaštiti životinja koje se koriste u naučno-istraživačke svrhe

„Dostupna su nova naučna saznanja u pogledu faktora koji utiču na dobrobit životinja kao i sposobnost životinja da osete i izraze bol, patnju, stres i trajno oštećenje. Stoga je potrebno unaprediti dobrobit životinja koje se koriste u naučno-istraživačkim postupcima podizanjem minimalnih standarda za njihovu zaštitu u skladu s najnovijim razvojem nauke.“

„Iako je poželjno zameniti korišćenje živih životinja u postupcima drugim metodama koje ne uključuju žive životinje, korišćenje živih životinja i dalje je potrebno radi zaštite zdravlja ljudi, životinja i okoline.“

Važna je procena:

1. Naučna opravdanost
2. Primena pravila 3R (*Replace, Reduce, Refine*)
3. Korist (šta, za koga, kako, kada?)
4. Šteta
5. Verovatnoća uspeha

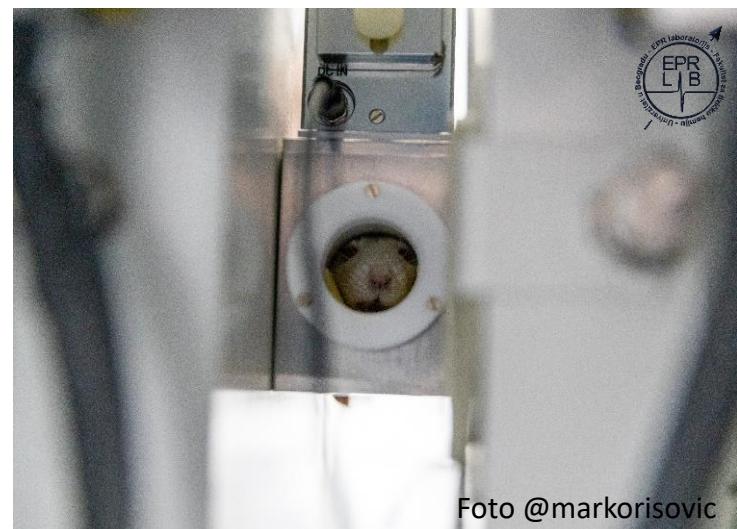


Foto @markorisovic

Statistika

Najvažnije pitanje u radu sa eksperimentalnim životnjama:
Kako odrediti optimalan broj životinja?

Šta je optimalan broj?

Minimalan broj ali relevantan za statistiku.

Premali broj dovodi do greške jer se ne uzima različitost biosistema.
Preveliki broj dovodi do nepotrebnog žrtvovanja životinja.

Guidelines for the Design and Statistical Analysis of Experiments
Using Laboratory Animals

Michael F. W. Festing and Douglas G. Altman

ILAR Journal, Volume 43, Issue 4, 2002, 244–258.

Metodologija (strategija istraživanja) u BFH

1. Odabrat odgovarajući model sistem
2. Odabrat odgovarajuće metode (tehnike)

A to znači, **stvarno** razumeti:

- Pitanje na koje treba dati odgovor
- Biologiju / biohemiju / fizičku hemiju procesa koji se proučava
- Princip rada fizičkohemijskih tehnika

Dizajn eksperimenta je od ključnog značaja posebno ako se radi sa eksperimentalnim životinjama:

- Početi od jednostavnog, dodavati jednu po jednu komponentu
- Voditi računa o T, pH, jonskoj jačini (fiziološki relevantno ili džaba ste merili)
- Uraditi sve moguće kontrolne eksperimente
- Ponoviti, ponoviti, ponoviti
- Potvrditi eksperimentalno dobijene rezultate sa teorijskim proračunima (predviđanjima)

Metode u BFH

Koriste se tehnike koje služe za proučavanje strukture, osobina i funkcije biomolekula na molekulskom nivou:

- Spektroskopije
- Mikroskopije
- Elektrofiziološke tehnike
-
- Molekulsko modeliranje (teorijski proračuni)

Tehnike za pripremu uzorka – tehnike za izolovanje, prečišćavanje i identifikaciju biomolekula:

- Centrifugiranje
- Hromatografija
- Elektroforeza

Centrifugiranje

Tehnika za razdvajanje (prečišćavanje) čestica iz rastvora prema njihovoj veličini, obliku, gustini, viskoznosti rastvora i brzini rotiranja.



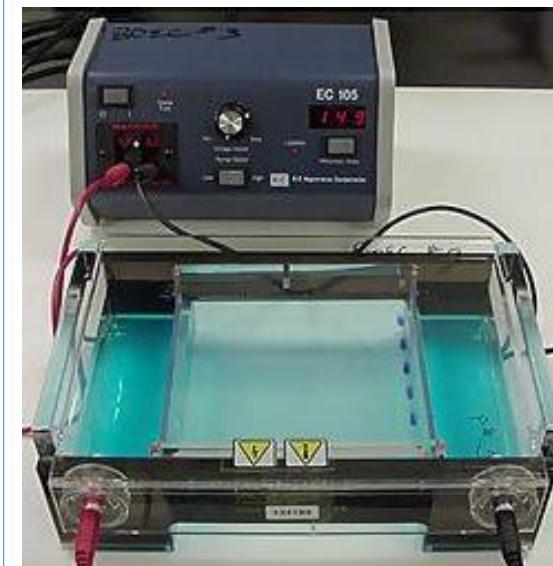
Hromatografija



Tehnika za razdvajanje komponenata iz smeše na osnovu različite interakcije sa stacionarnom i mobilnom fazom. **Gel hrom** – razdvajanje prema veličini (masi) makromolekula, **jonoizmenjivačka** – razdvajanje prema naelektrisanju.

Elektroforeza

Tehnika za razdvajanje i identifikaciju komponenata iz smeše, prema masi, naelektrisanju i obliku makromolekula. Može denaturisani i nativni biomakromolekuli.



Fizičkohemiske tehnike u BFH

- UV/vis spektroskopija
 - Infracrvena spektroskopija
 - Ramanska spektroskopija
 - Fluorescentna spektroskopija
 - Cirkularni dihroizam
 - Rendgeno-struktturna analiza
 - Masena spektrometrija
 - NMR/MRI
 - EPR/EPRI
 - SEM, TEM, AFM
 - Dinamičko rasejanje svetlosti (DLS)
 - Kalorimetrijske tehnike (DSC, ITC, termodinamička kalorimetrija)
 - Peč-klemp tehnika (metoda nametnute voltaže)
- itd.

Primer istraživanja u BFH

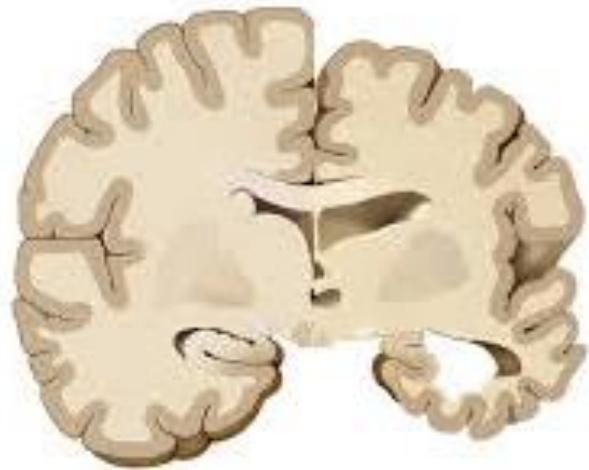


Mitohondrijalni Fe-S klasteri u neurodegenerativnim bolestima

Iz predavanja sa 4. međunarodnog kongresa Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalsku fiziologiju, 28.9.2018.

Neurodegenerativne bolesti

- Alzheimerova
 - Parkinsonova
 - Huntingtonova
 - Amiotrofična lateralna skleroza (ALS)
 - Prionska bolest
 - Spinocerebelarna ataxia
 - Spinalna muskularna atrofija
- ...



Šta smo znali o neurodegenerativnim bolestima pre nego što smo počeli sa našim istraživanjima?

- Akumulacija i intracelularna agregacija pogrešno savijenih proteina
ALI RAZLIČITI PROTEINI KOD RAZLIČITIH ND
- Metali
ALI NE SAMO REDOKS AKTIVNI
- ROS / RNS
- Mitochondrijalna disfunkcija, defekti u Fe-S biogenezi

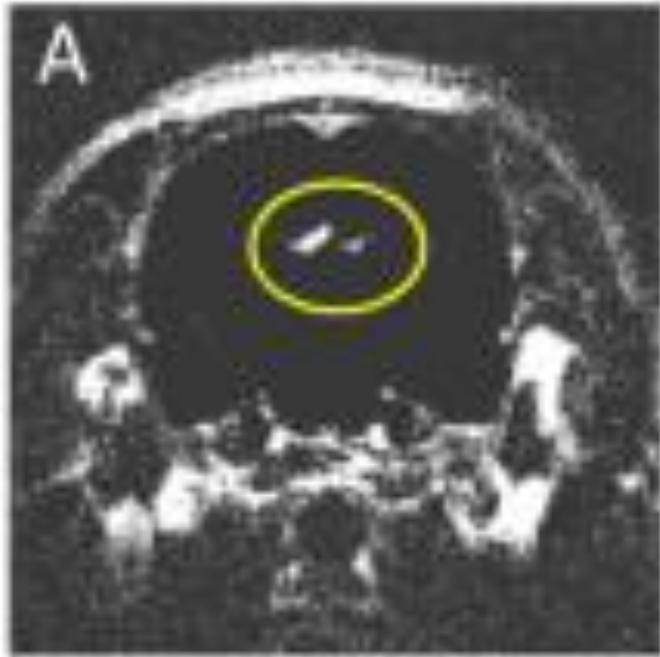
ND se veoma razlikuju klinički i patofiziološki, ali izgleda da postoji zajednički mehanizam nastanka/progresije bolesti koji ima veze sa **metabolizmom gvoždja**

Amiotrofična lateralna skleroza (ALS)



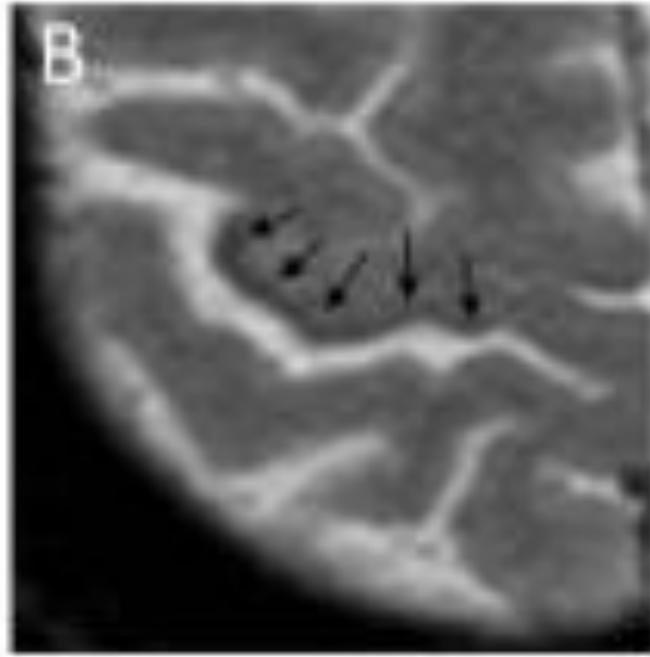
MRI studije: 2009, 2013. god

Povećana propustljivost
krvno-moždane barijere (KMB)



Andjus, P. et al. Anatomical Rec (2009) 292:1882.

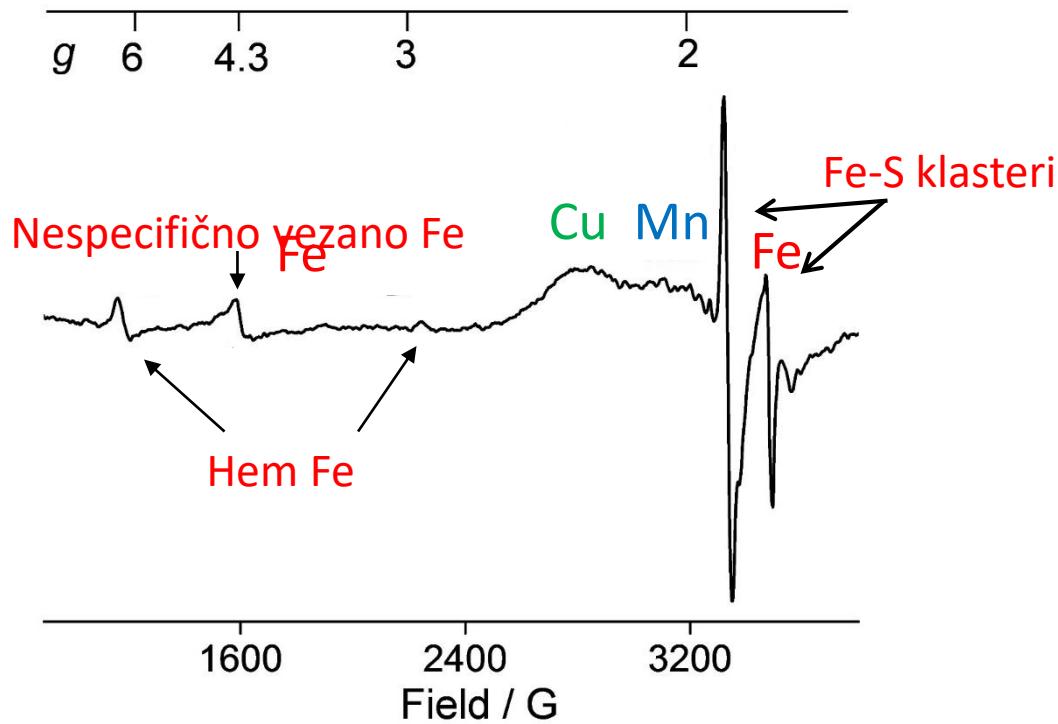
Akumulacija Fe

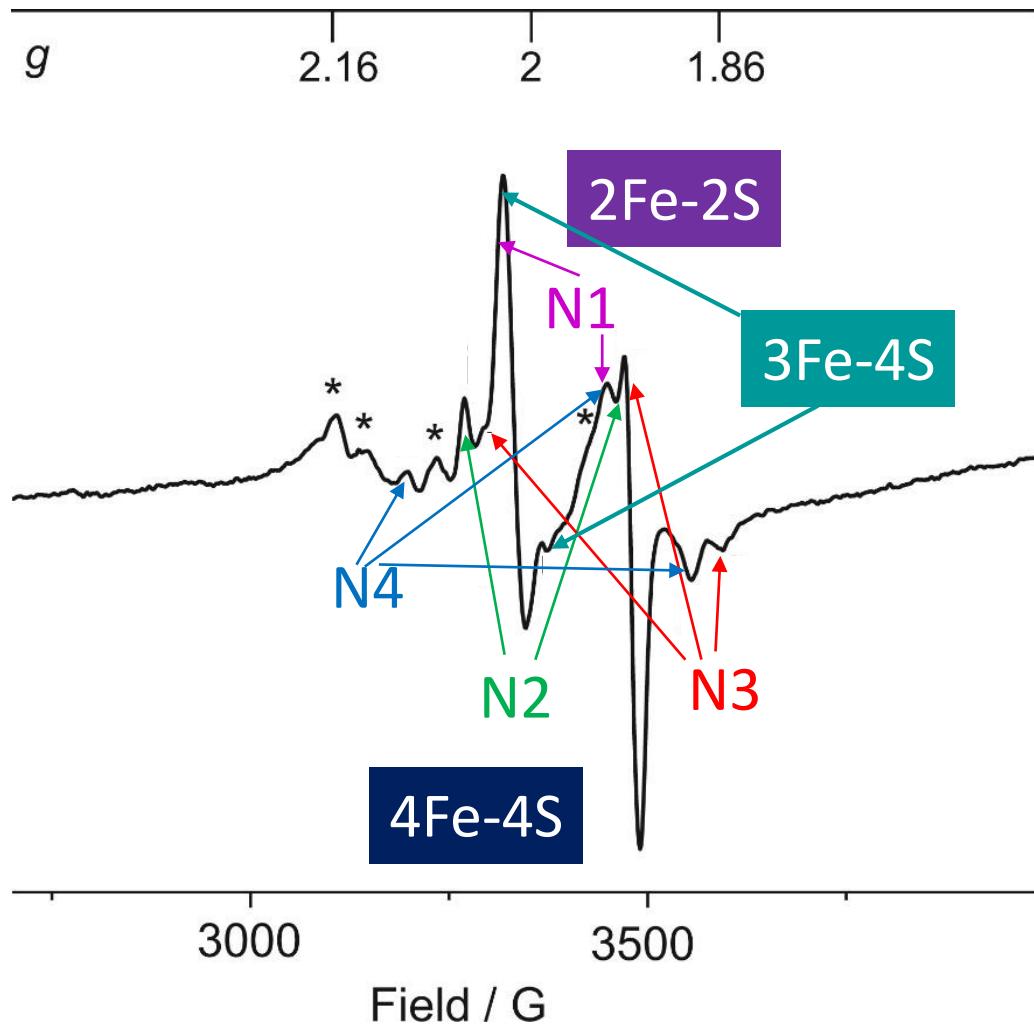


Ignjatović A. et al. J Magn Reson Imaging (2013) 38:1472.

Odakle Fe u mozgu?

Ex vivo EPR spektroskopija pacovskog mozga na 4 – 30 K
Istraživanja su trajala dve godine, 2014-2015.



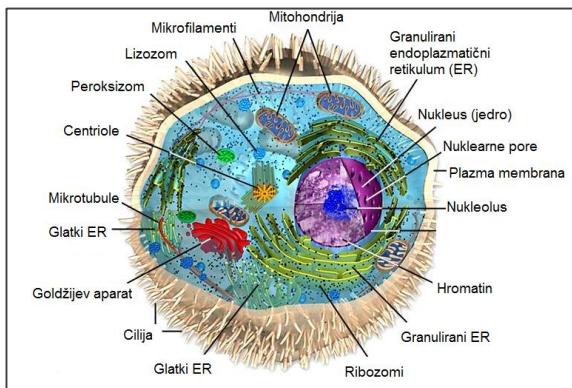




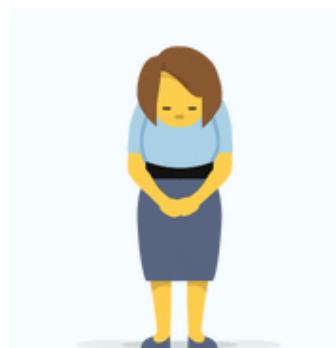
Uzorak: 150 µg mozga



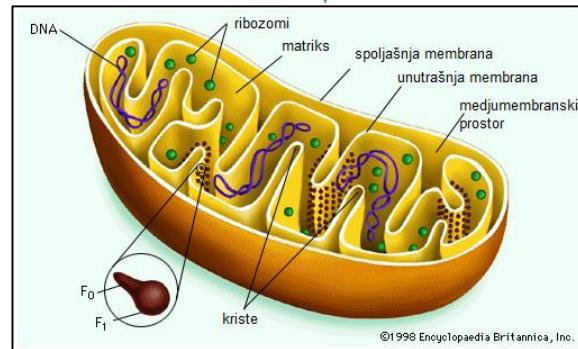
ćelija



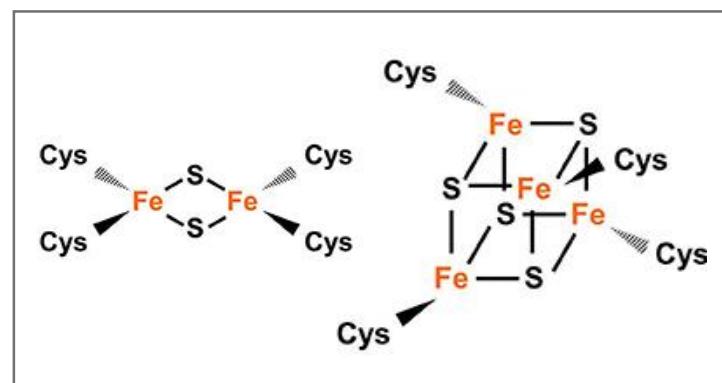
EPR@15K



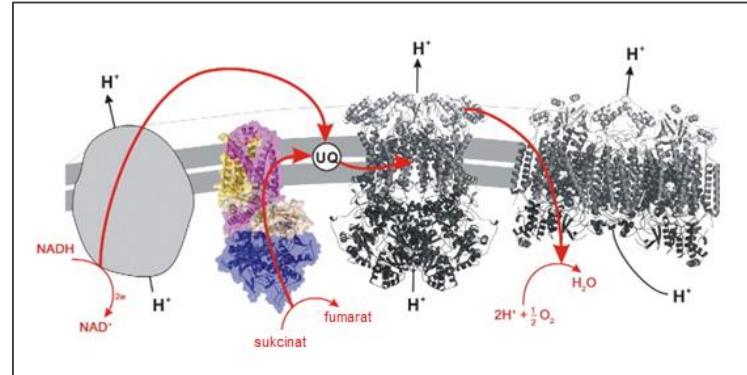
organela

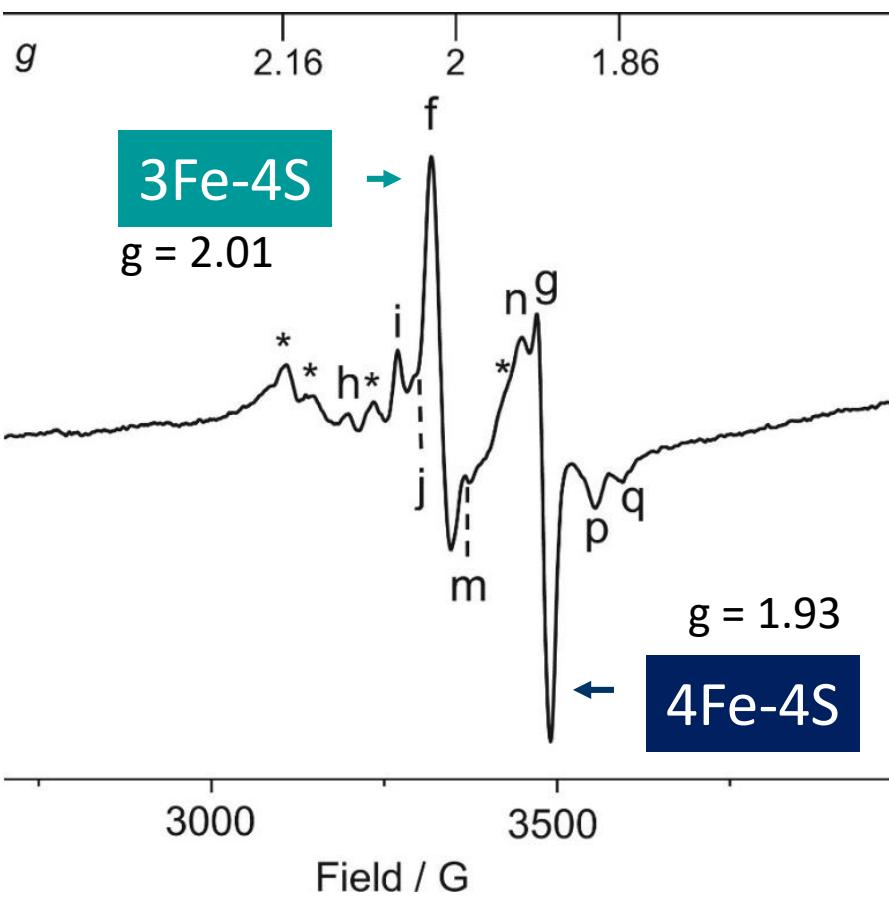


Informacije o **prostetičnim grupama** proteina koji se nalaze u unutrašnjoj membrani mitohondrija.



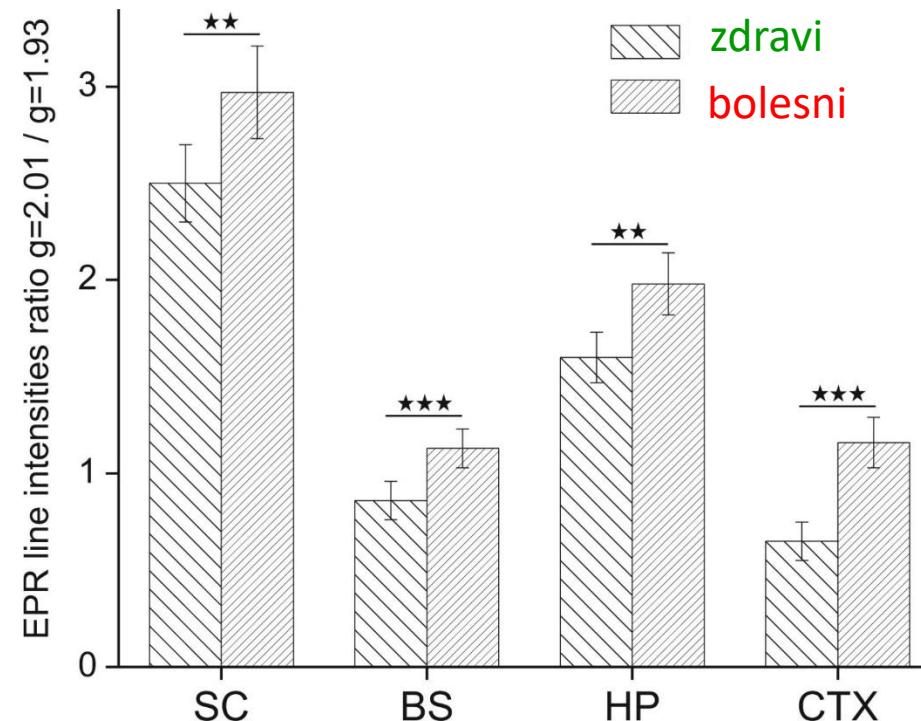
membranski proteini



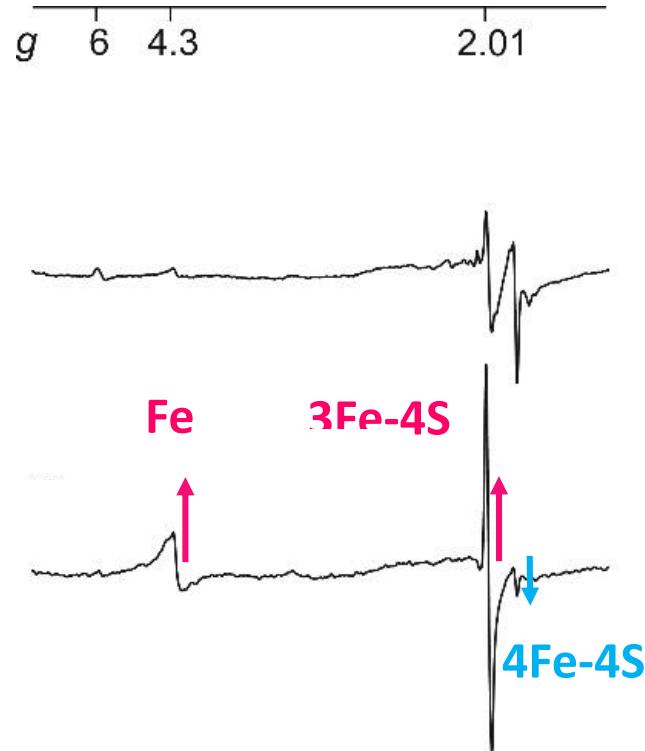


Različiti odnosi intenziteta pikova na $g=2.01$ i $g=1.93$

A to znači različite količine 3Fe-4S i 4Fe-4S



Zatim smo se pitali zašto je taj odnos povećan kod bolesnih pacova?



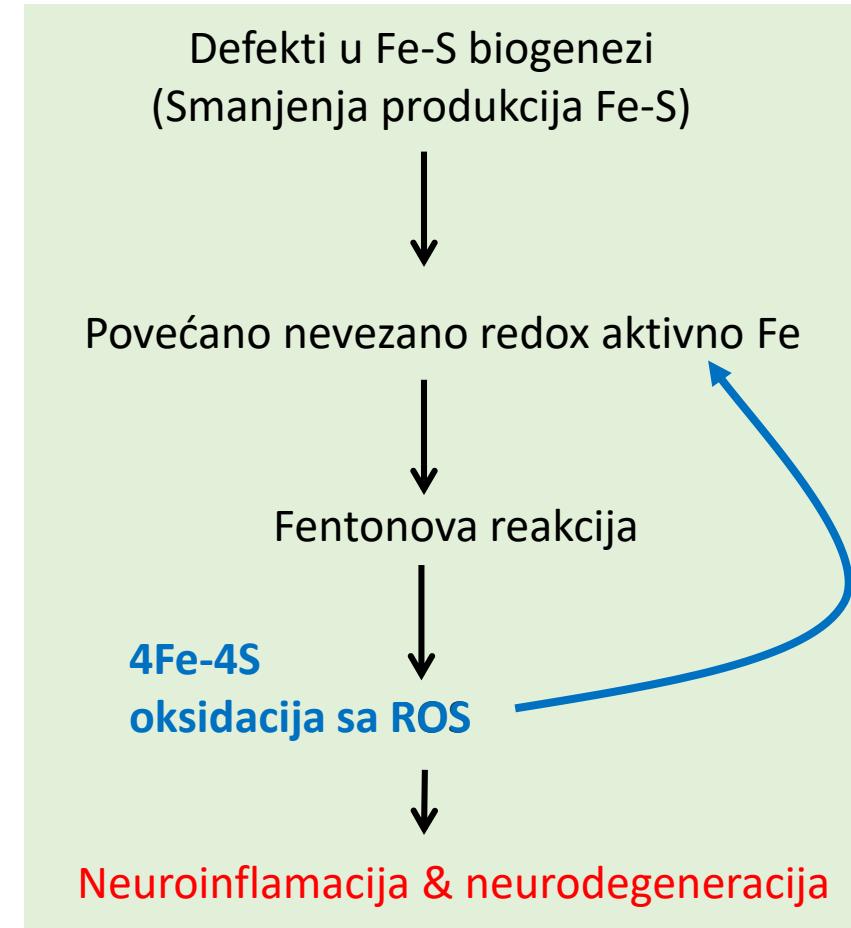
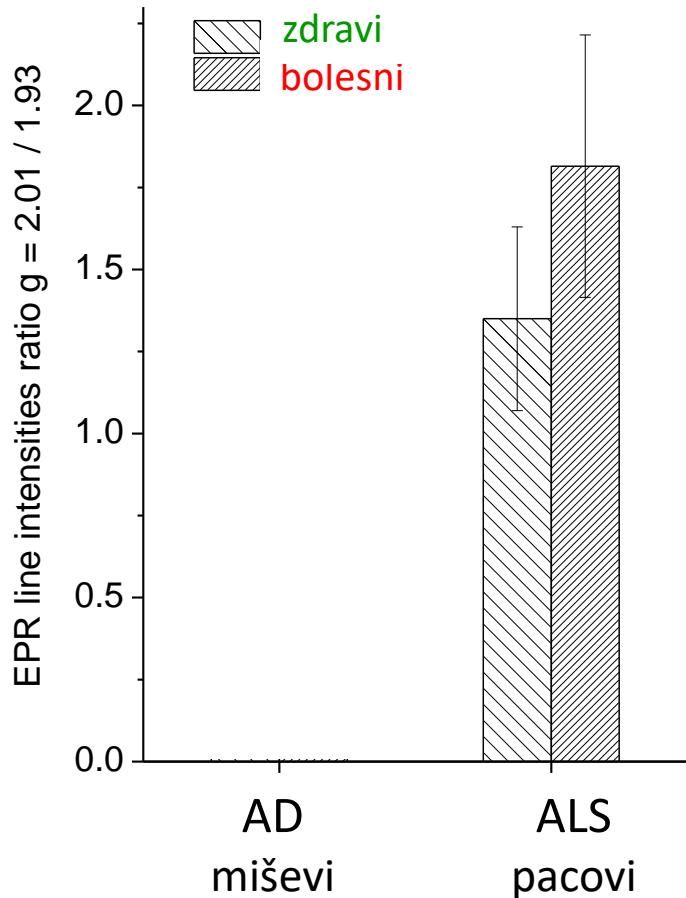
Zaključak:

- Detektovali smo veće oksidativno oštećenje kod bolesnih nego kod zdravih
- Pokazali smo
$$4\text{Fe}-4\text{S} + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow 3\text{Fe}-4\text{S} + \text{Fe}$$
- Predložili smo da je **4Fe-4S** izvor slobodnog **Fe**

Nama se činilo da ovo ima smisla pa smo zato pogledali i mozgove miševa koji imaju Alchajmera...



Mišji model Alchajmerove bolesti

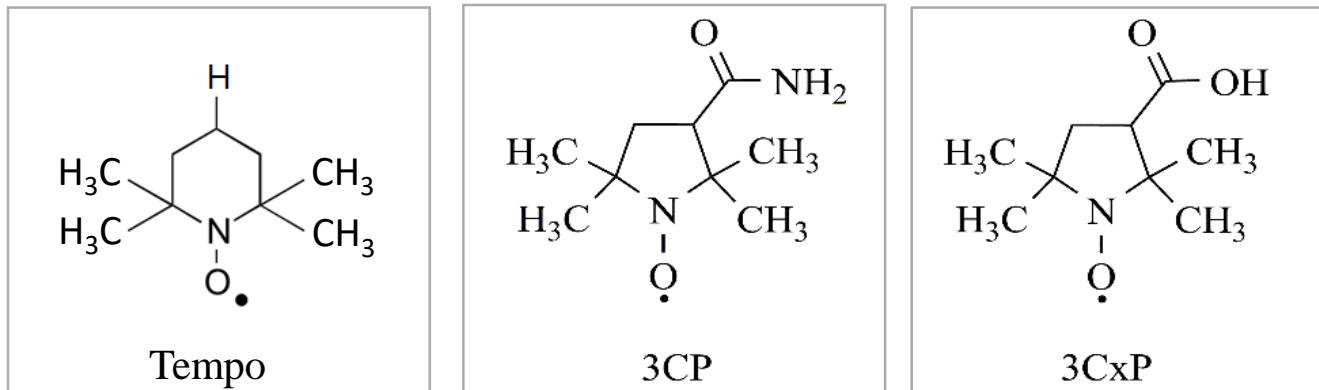


Propustljivost KMB kod AD miševa

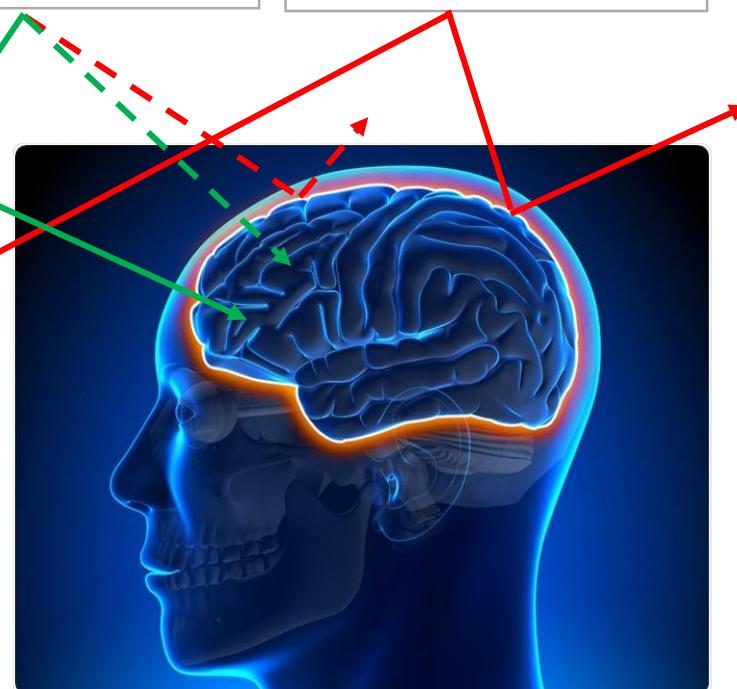
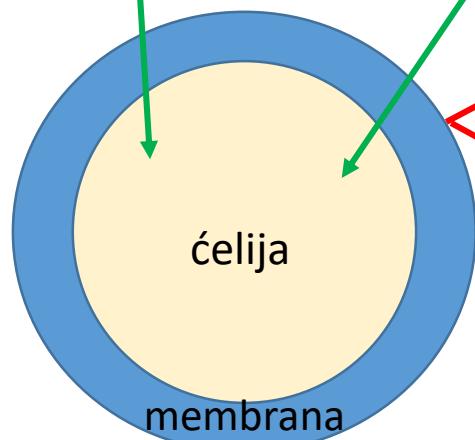


In vivo L bend EPR glave miša: kinetika redukcije spinskih proba

Ex vivo X bend EPR mozga miša: kvantifikacija spinske probe



Odabir probe?
3CP, 3CxP



Čemu služe ovi rezultati?

Free Radical Biology and Medicine 96 (2016) 313–322



Contents lists available at ScienceDirect

Free Radical Biology and Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/freeradbiomed

Original article

Iron-sulfur cluster damage by the superoxide radical in neural tissues of the SOD1^{G93A} ALS rat model

Ana Popović-Bijelić ^{a,*}, Miloš Mojović ^a, Stefan Stamenković ^b, Miloš Jovanović ^b, Vesna Selaković ^c, Pavle Andjus ^b, Goran Bačić ^a

[Home](#) / [Current Alzheimer Research](#), Volume 18, Number 1



In Vivo/Ex Vivo EPR Investigation of the Brain Redox Status and Blood-Brain Barrier Integrity in the 5xFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease

Buy Article:

\$68.00 + tax

(Refund Policy)

[ADD TO CART](#)

[BUY NOW](#)

Authors: Vesković, Ana; Nakarada, Đura; Pavićević, Aleksandra; Prokić, Bogomir; Perović, Milka; Kanazir, Selma; Popović-Bijelić, Ana; Mojović, Miloš

Source: Current Alzheimer Research, Volume 18, Number 1, 2021, pp. 25-34(10)

Čemu služe ovi rezultati, šta smo zaključili?

- Neophodno je
 - razumeti biomolekularne mehanizme za nastanak ili progresiju neke bolesti
 - pronaći pravu metu za lek
 - dizajnirati lekove koji su više selektivni
- Mitohondrije su definitivno mete u ranoj patogenezi ND bolesti
- Iako esencijalno različite, ND bolesti imaju isti „potpis“, mitohondrijalnu disfunkciju i oksidativno oštećenje
- Nevezano redoks aktivno **Fe i ROS** su možda idealne terapeutske mete
- Ipak, činjenica je da trenutno postoji veliki broj lekova i tretmana ali nijedan nije dovoljno efikasan

Istraživački tim



*Fakultet za fizičku hemiju
Biološki fakultet
Veterinarski fakultet
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“*

Fizičkohemiske tehnike u BFH

- UV/vis spektroskopija
- Infracrvena spektroskopija
- Ramanska spektroskopija
- Fluorescentna spektroskopija
- Cirkularni dihroizam
- Rendgeno-struktturna analiza
- Masena spektrometrija
- NMR/MRI
- EPR/EPRI
- SEM, TEM, AFM
- Dinamičko rasejanje svetlosti (DLS)
- Kalorimetrijske tehnike (DSC, ITC, termodinamička kalorimetrija)
- Peč-klemp tehnika (metoda nametnute voltaže)
itd.

NASTAVAK

Spektroskopija

Proučava interakciju zračenja sa materijom.

Za bilo koju spektroskopiju su nam potrebni:

Izvor zračenja

Disperzivni element

Uzorak

Detektor



Skeniramo po λ ili ν

Rezultat merenja je **spektar, A ili T ili I ili $\Delta\varepsilon = f(\lambda, \nu)$**

Za magnetnu spektroskopiju nam još treba:

Magnetno polje

Npr. EPR, NMR, MCD

UV/vis spektroskopija

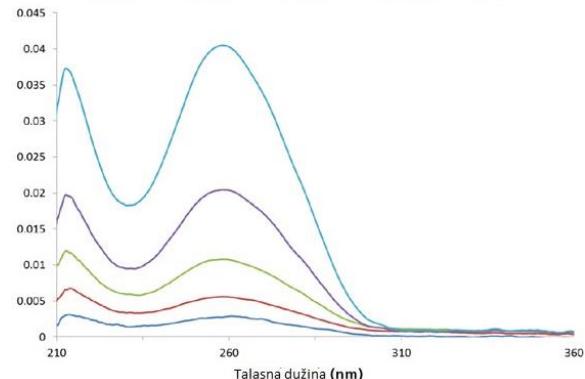
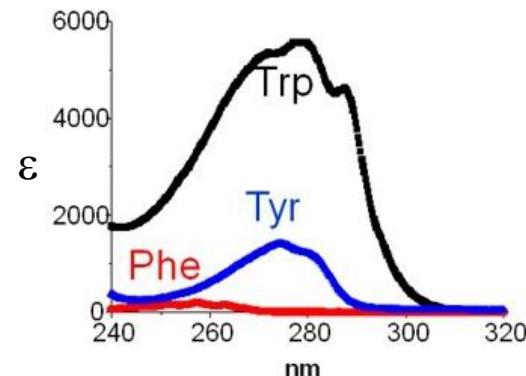
Spektrofotometar je neophodan u svim BFH eksperimentima.

Uglavnom za **kvantitativnu** analizu

Ali i za brzu identifikaciju (**kvalitativna** analiza)

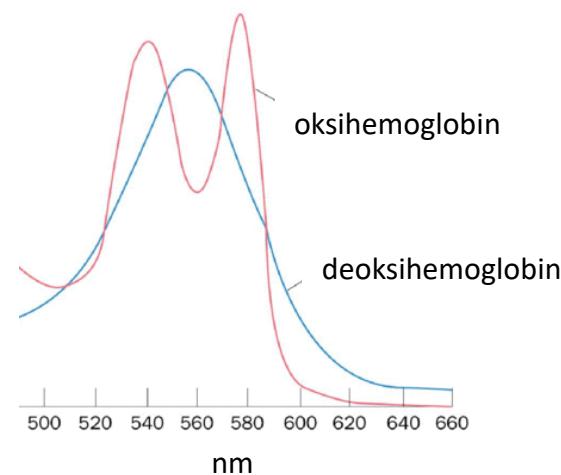
Detekcija proteina - **280 nm**

Detekcija nukleinskih kiselina - **260 nm**

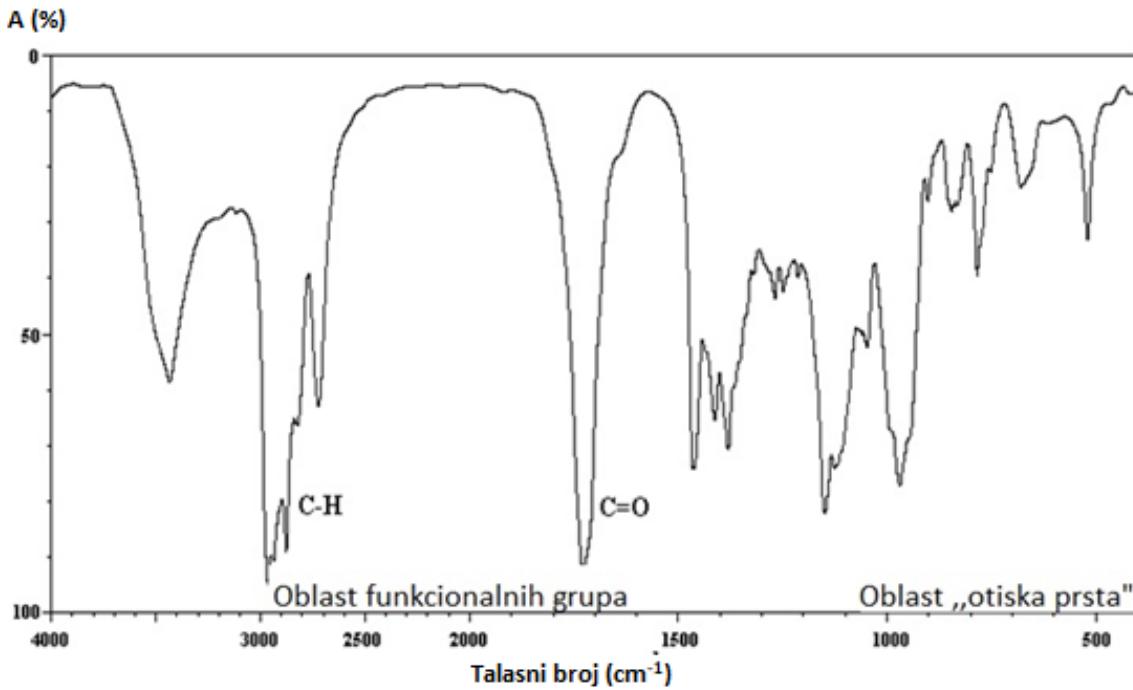


Biomolekuli koji sadrže metale (**vis oblast**)

Sistemi sa konjugovanim dvost. vezama (**UV oblast**)



IC, FTIC spektroskopija



- Može kvali i kvanti
- Voda je problem - apsorbuje IC, ima trake na 3600 do 3200 cm^{-1} , 1645 cm^{-1}

Bliska (12500-4000 cm^{-1}) – nije značajna, ali mogu koncentrovani uzorci jer je mali intenzitet apsorpcije

Srednja (4000-400 cm^{-1}) – najčešće korišćena oblast, osnovni modovi vibracija, veliki intenzitet

Daleka (400-10 cm^{-1}) – nije značajna, ali postoje rotacioni prelazi složenijih molekula, od male važnosti u analitici

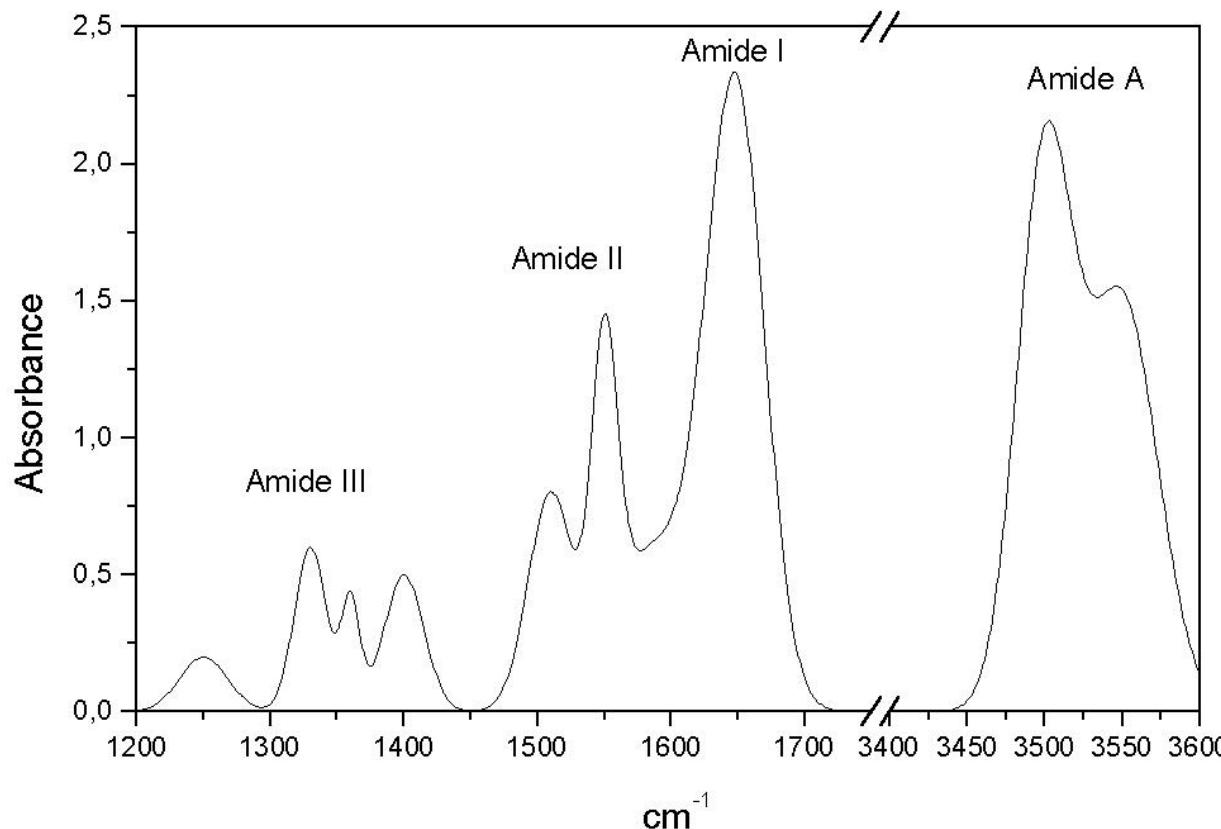
Srednja oblast

-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} (zavisi od supstituenata)
Arom.	3060 cm^{-1} (fenilalanin, tirozin, triptofan)
SH	2580 cm^{-1} (cistein)
-C=N-	1600 cm^{-1}

IC, FTIC – analiza proteina

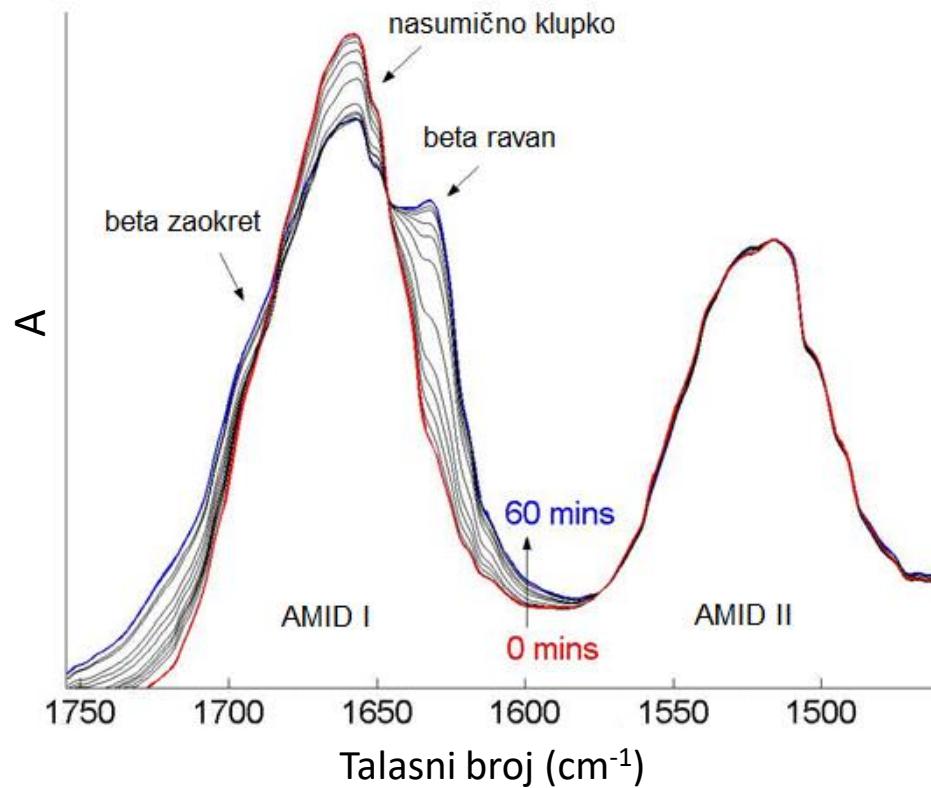
Najvažnije trake:
Sve 3 su apsorpcione
trake peptidne grupe

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



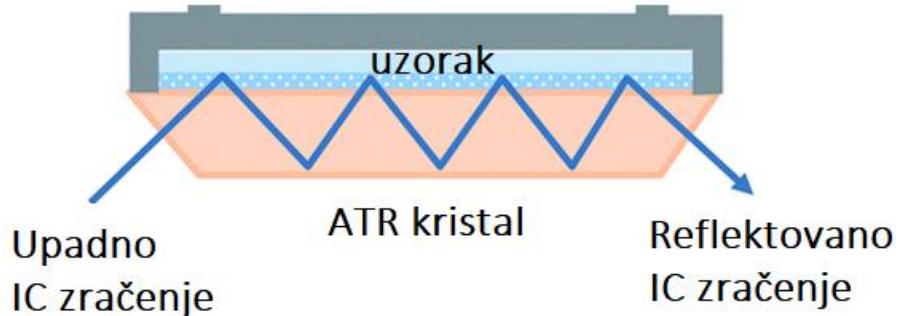
IC, FTIC – analiza proteina, primena

Primer: promena sekundarne strukture fibroina tokom kristalizacije

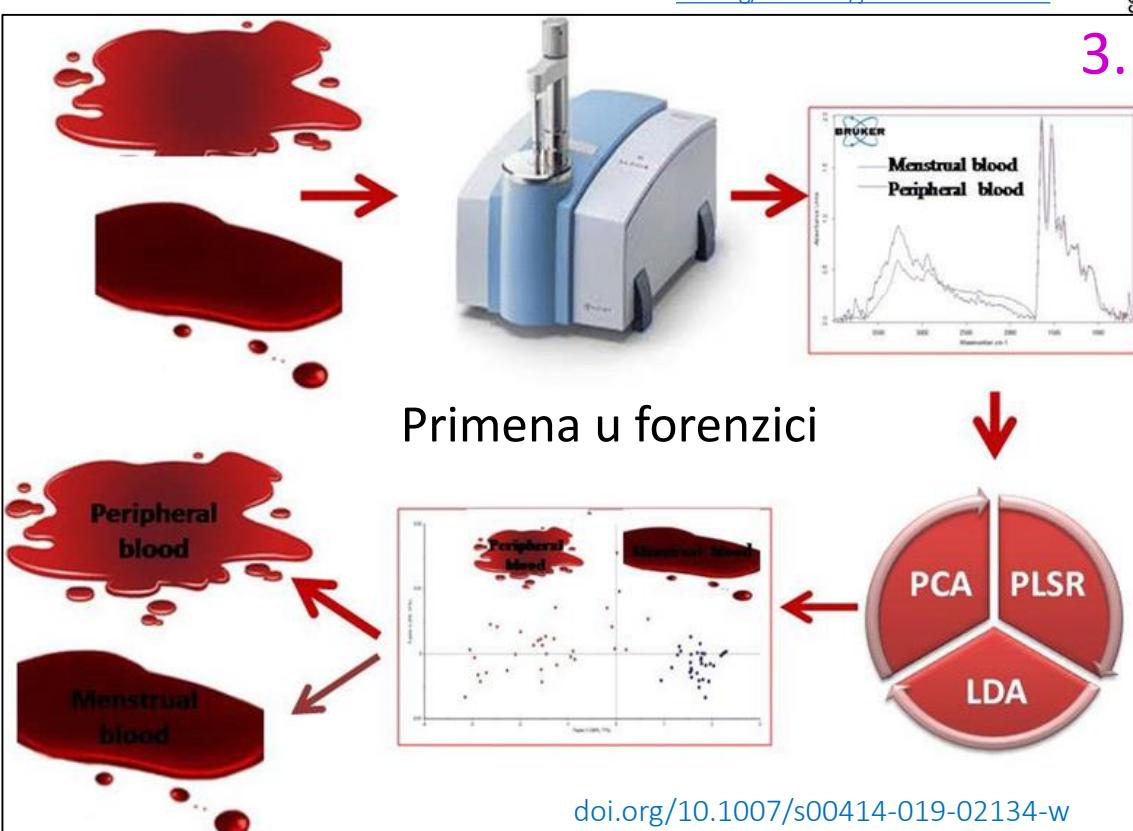
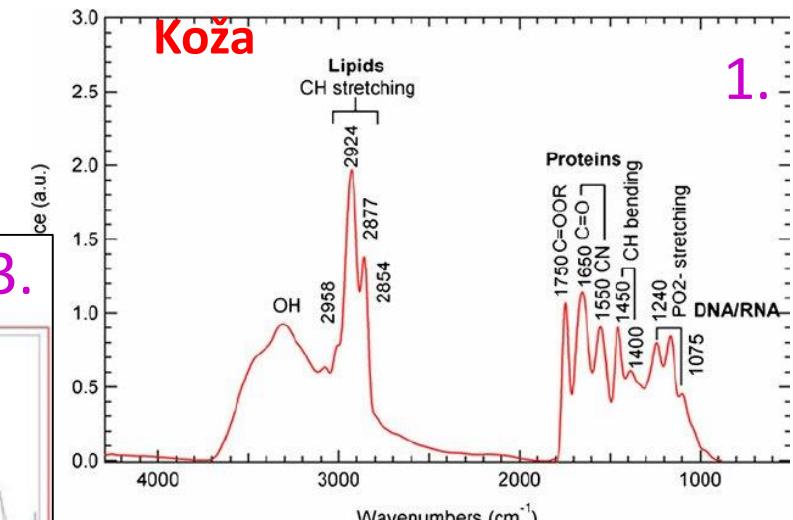
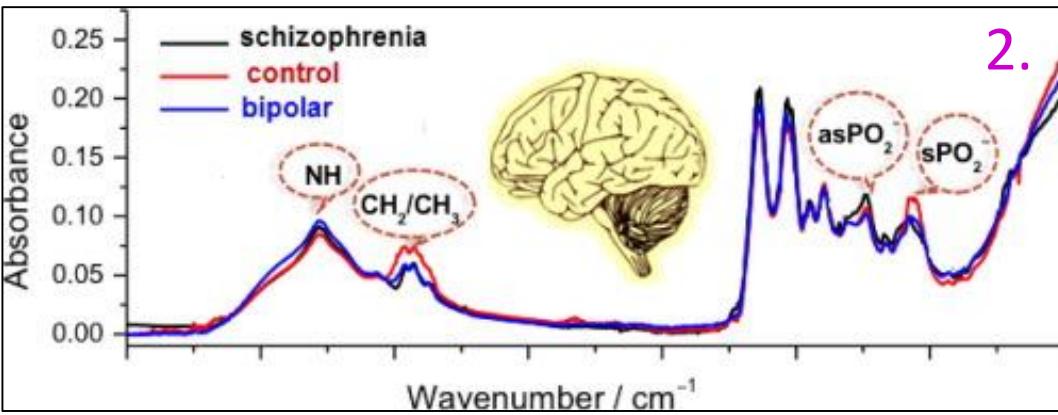


IC, FTIC – analiza bioloških uzoraka

- Krv, urin, znoj, pljuvačka, serum, amniotska tečnost, brisevi, uzorci tkiva
- IC spektroskopija zahteva pripremu uzorka – treba ukloniti vodu, ili eventualno oduzeti spektar vode
- Za prevazilaženje problema sa vodom u IC spektroskopiji se koristi kombinacija D_2O/H_2O , ali to nije zgodno za analizu bioloških uzoraka
- Najbolje je za biološke uzorke koristiti **ATR-FTIC tehniku** (ATR, *Attenuated Total Reflection*): nema pripreme i oštećenja uzorka



IC, FTIC - analiza bioloških uzoraka, tri primera



Statističke metode:
Principal component analysis (PCA)
Partial least squares regression (PLSR)
Latent Dirichlet Allocation (LDA)

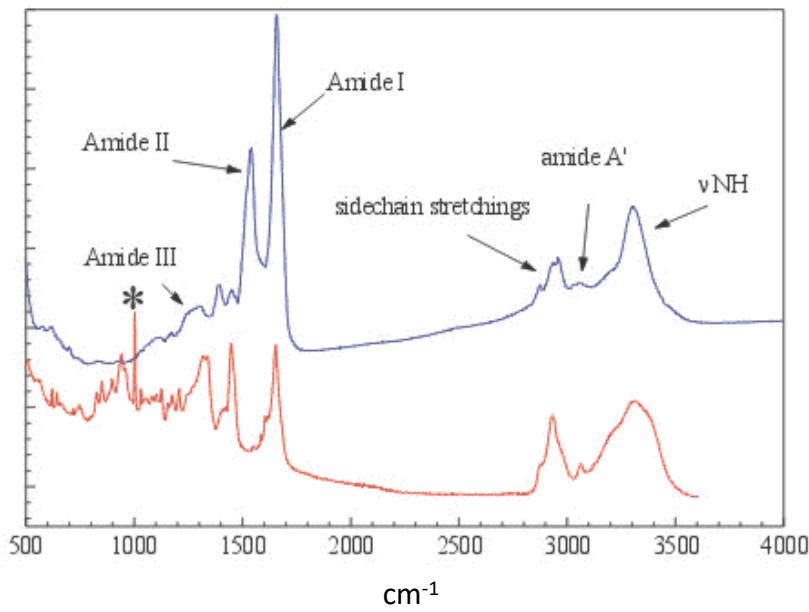
Ramanska spektroskopija

Komplementarna sa IC:

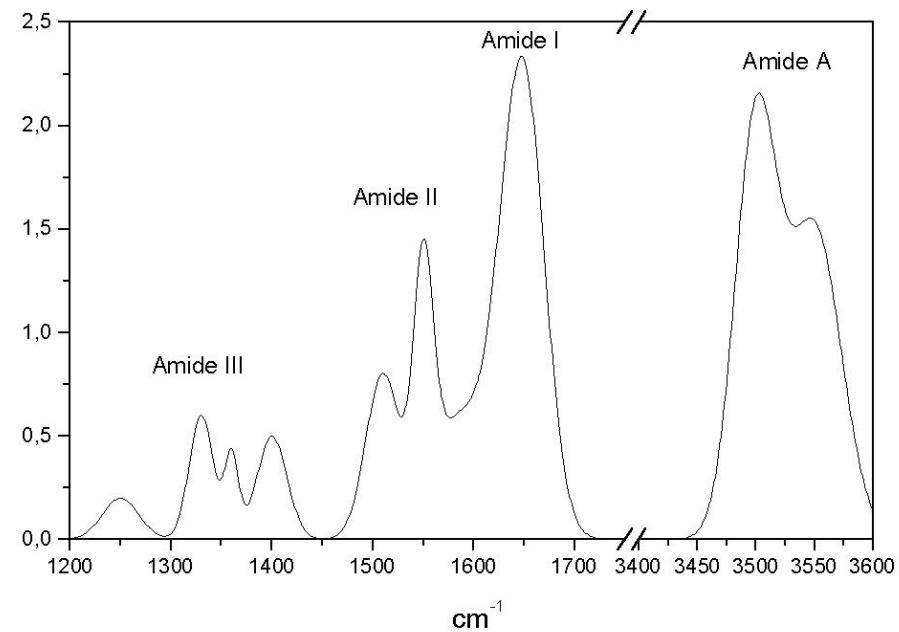
C-C , C-H , C=C (nepolarne) - intenzivne **Ramanske trake**

C-O , N-O , O-H (polarne) - intenzivne **IC** trake

Ramanski spektar proteina



IC spektar proteina



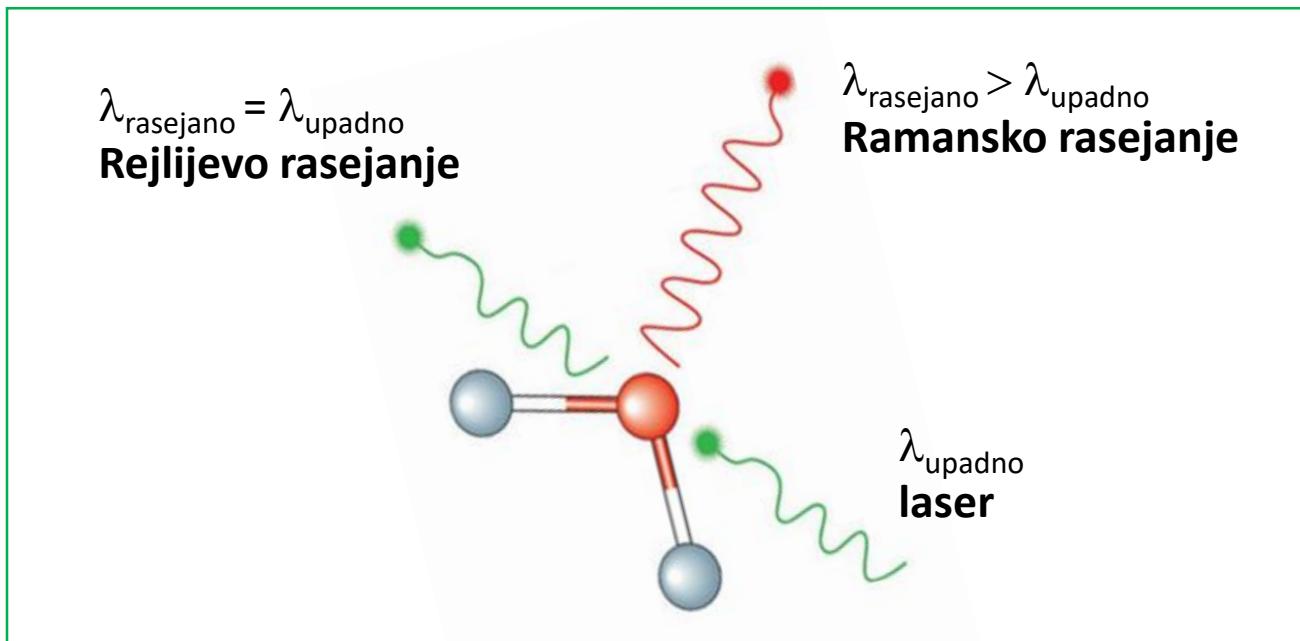
Poređenje IC i Raman

IC

Apsorpcija svetlosti
Promena dipolnog momenta
Ne može H_2O
Zahteva pripremu uzorka
Nije mnogo skupo

Raman

Rasejanje svetlosti
Promena polarizabilnosti
Može H_2O
Ne zahteva pripremu uzorka
Skupo je



Ramanska spektroskopija - laseri

UV: 244, 257, 325, 364 nm

proteini, nukleinske kiseline, rez. Ram

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

neorganski mat, rez. Ram, SERS

Bliska IC: 785, 830, 980, 1064 nm

biološki uzorci koji apsorbuju u UV/vis

Izbor lasera utiče na rezultat:

Osetljivost – intenzitet Ramanskog rasejanja $\sim \lambda^{-4}$

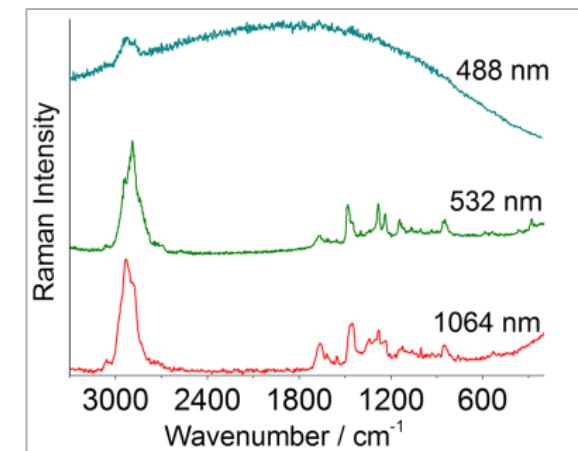
Prostorna rezolucija – prečnik spot-a $\sim \lambda$, i zavisi od mikroskopskog objektiva

Npr. za 0.90/100x objektiv: 532 nm laser - spot 0,72 μm , 785 nm laser spot 1,1 μm

Problem kod Ramana u analizi bioloških uzoraka:

Fluorescencija

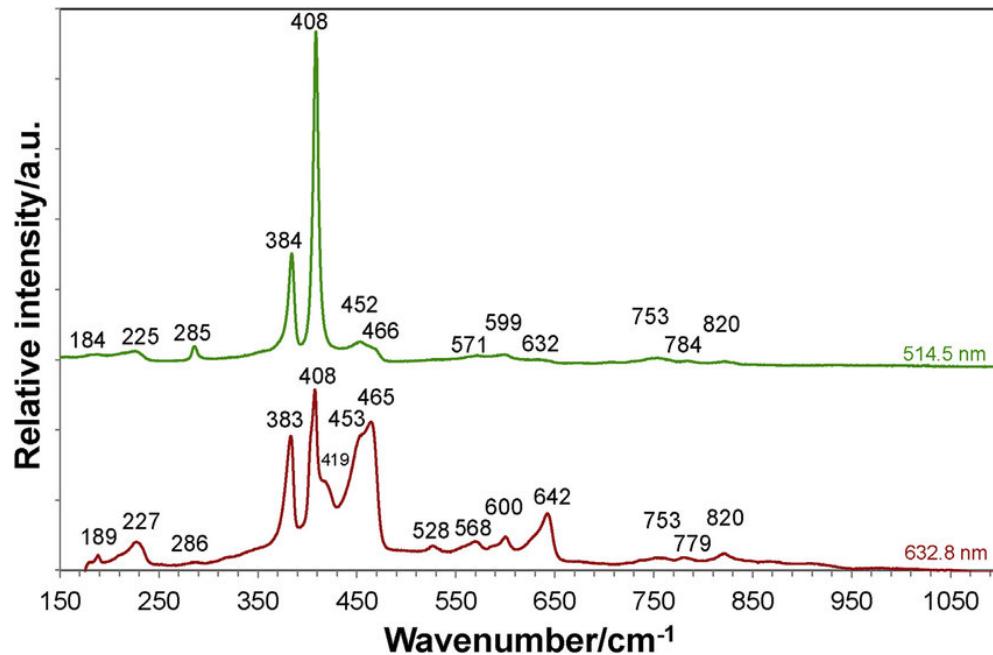
(pomaže ako se koriste laseri iz bliske IC ili UV, kao i fotoizbeljivanje)



Rezonantna ramanska spektroskopija

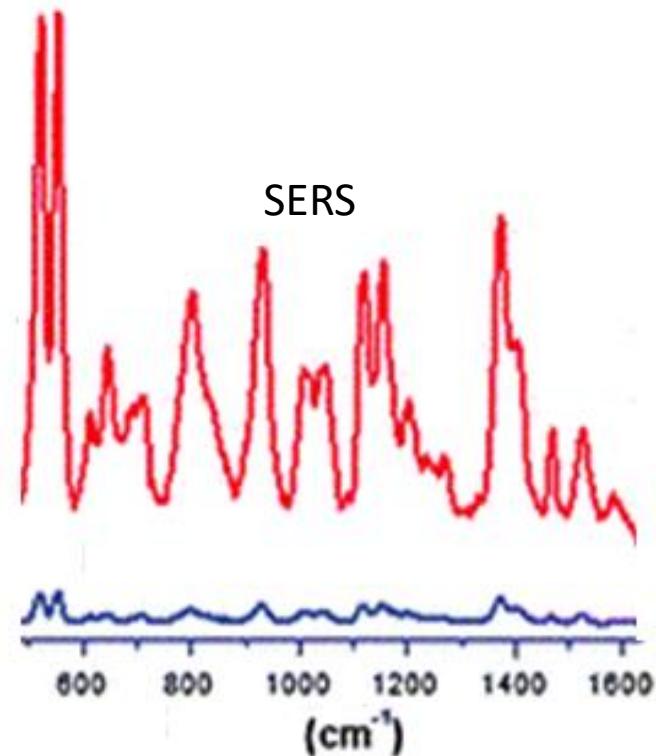
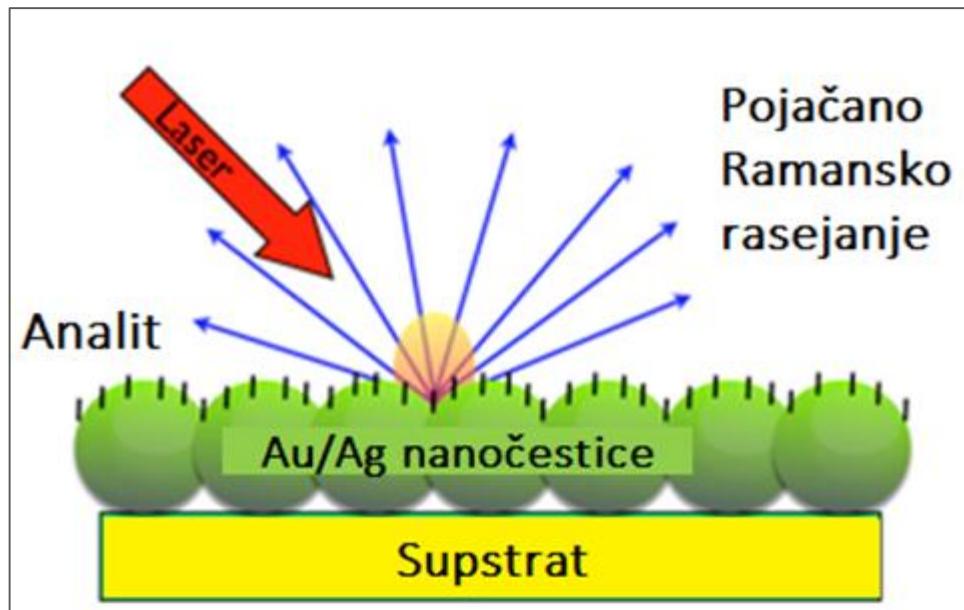
- Koristi se laser sa frekvencijom koja odgovara elektronskom prelazu odgovarajuće hromofore
- Trake simetričnih vibracija se intenziviraju i pojavljuju se trake koje se ne opažaju u običnoj ramanskoj spektroskopiji (rezonantno pojačane).
- Bolja granica detekcije, do 10^{-6} mol/dm³

- Primena u analizi proteina i nukleinskih kiselina
 - Ako se koriste impulsni laseri onda mogu da se ispituju ultrabrzi procesi i intermedijeri



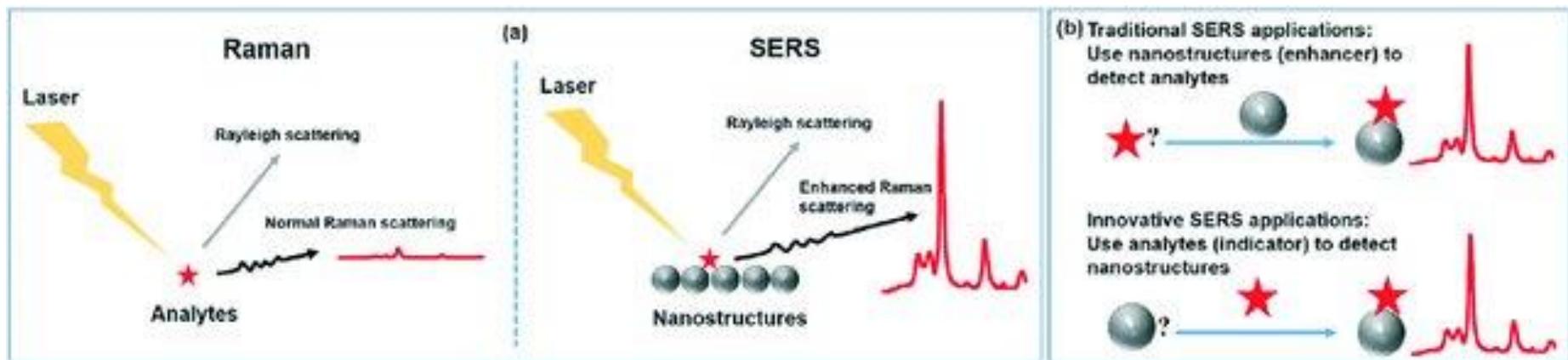
Površinski pojačana ramanska spektroskopija *Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)*

- Biomolekuli koji se ispituju se prvo adsorbuju na pogodan supstrat, obično Au ili Ag koloidne nanočestice
- Pojačavanje signala $10^6\text{-}10^{14}\times$ (posebno kod *Surface-enhanced resonant Raman scattering, SERRS*)
- Primena za analizu biomolekula u tragovima, često se koristi za detekciju bakterija u uzorku



Površinski pojačana ramanska spektroskopija *Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)*

Nije BFH, ali je zanimljivo: „obrnuta“ primena SERS, za detekciju nanočestica u životnoj okolini, rad iz 2017.



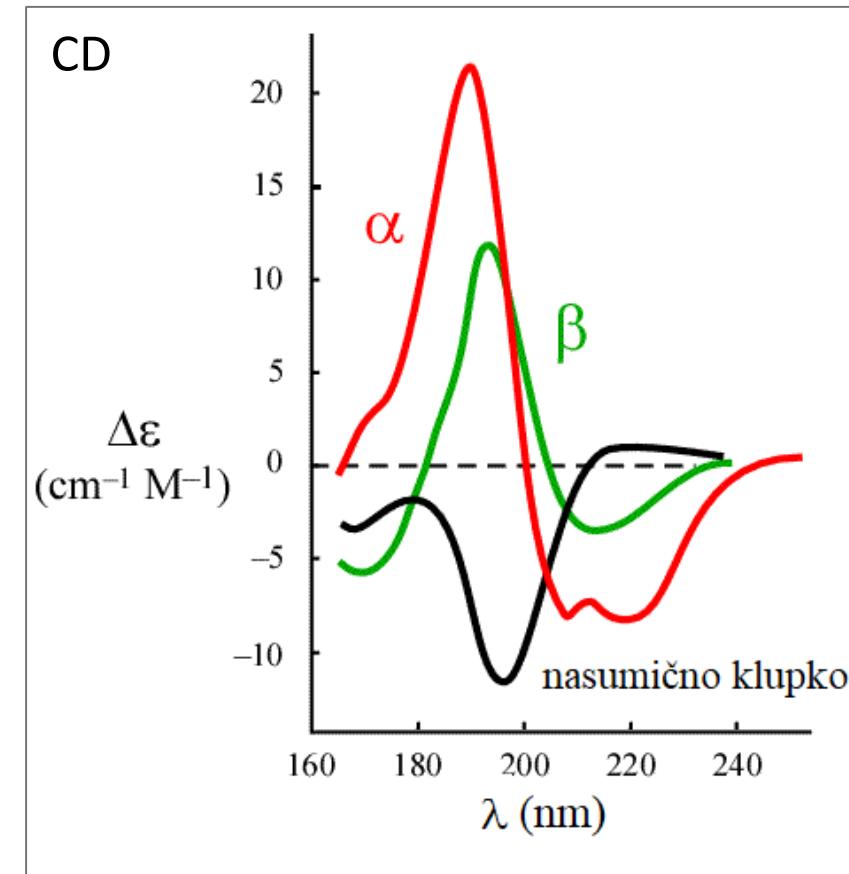
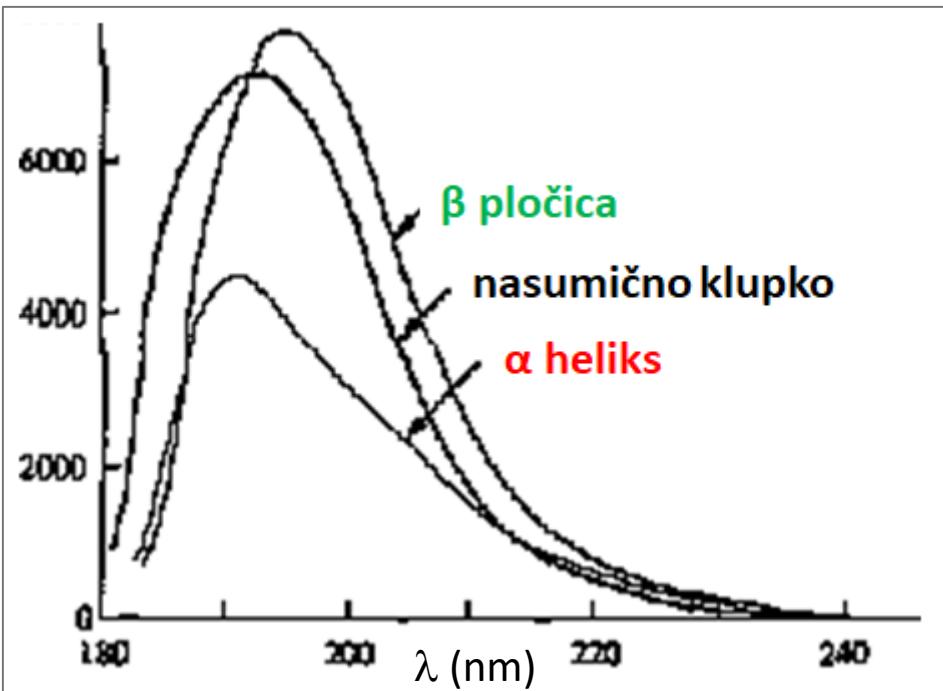
[doi:10.1039/C7EN00653E](https://doi.org/10.1039/C7EN00653E)

Cirkularni dihroizam (CD)

CD spektroskopija je vrsta apsorpcione spektroskopije.

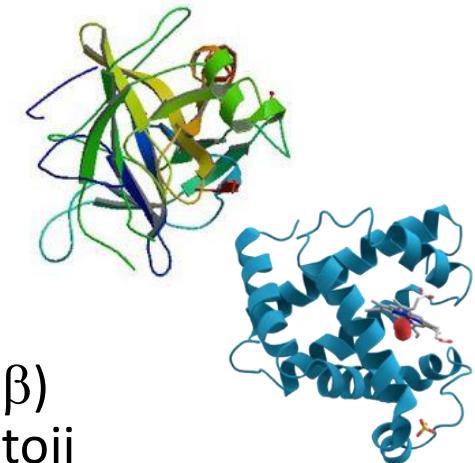
Apsorpcioni spektar proteina:

Peptidna veza je optički aktivna ($n \rightarrow \pi^*$ 210-220 nm, $\pi \rightarrow \pi^*$ 190 nm, $n \rightarrow \sigma^*$ 175 nm)



Razlike u aps. spektrima različitih sekundarnih struktura nisu očigledne u oblasti 180 – 240 nm.

Cirkularni dihroizam (CD) - proteini



CD spektroskopija u dalekoj UV oblasti (170-250 nm)

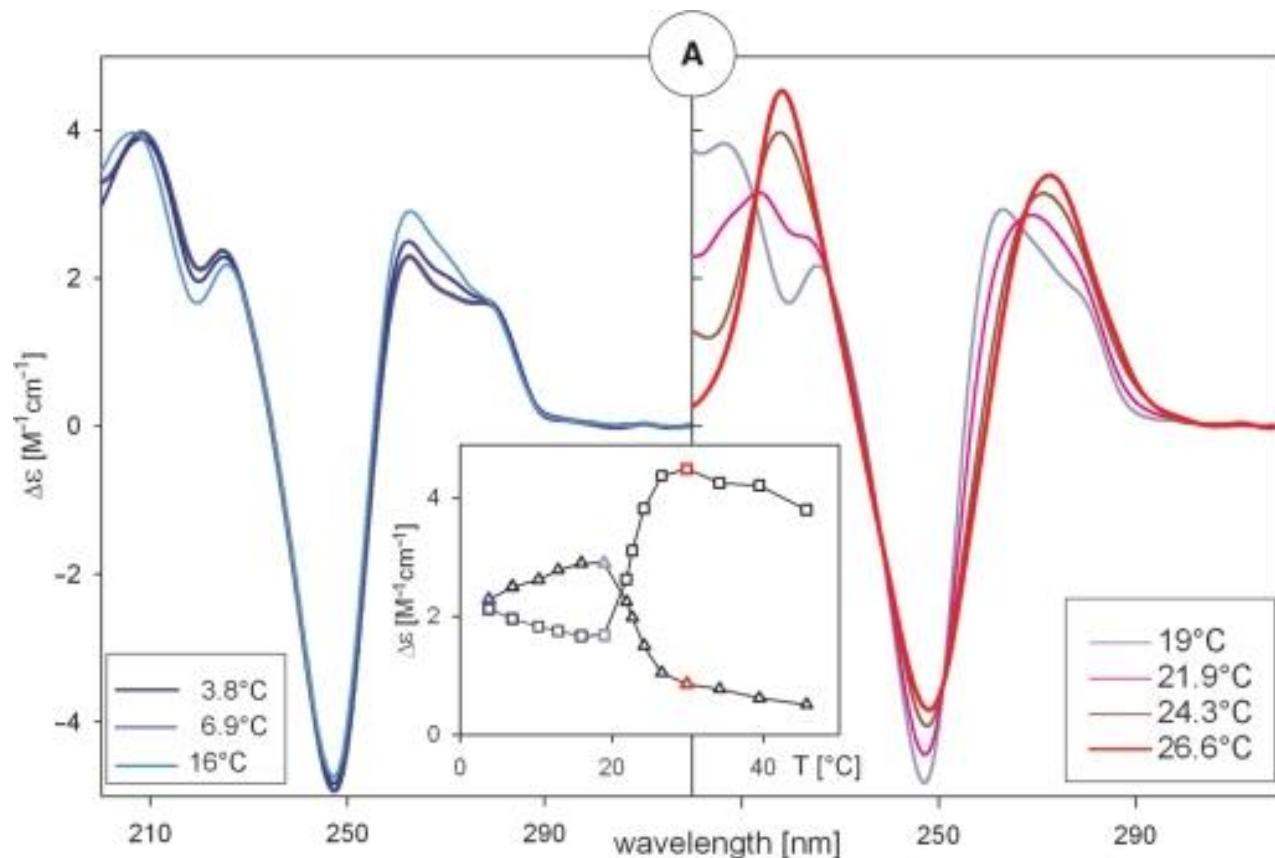
- Za određivanje tipa **sekundarne strukture** proteina (α , β)
- Signal potiče od peptidne veze (hromofora) ukoliko postoji uređena struktura
- Daje informacije o ukupnoj strukturi, ne zna se koja aminokiselina učestvuje u kom tipu strukture
- Osetljivost 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteina

CD spektroskopija u bliskoj UV oblasti (250-350 nm)

- Za određivanje **promena u tercijarnoj strukturi**
- U ovoj oblasti apsorbuju aromatične AK, S-S veza
- Ako nema signala u bliskoj UV oblasti – protein nije savijen u nativnu konformaciju
- Signal u bliskoj UV oblasti je slabiji od onog u dalekoj, osetljivost 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteina

Cirkularni dihroizam (CD) – nukleinske kiseline

- Oblast 200-320 nm
- Praćenje promena u strukturi (sekund) prilikom denaturacije, vezivanja liganada ili lekova



Cirkularni dihroizam (CD) – pozitivne i negativne trake u spektru?

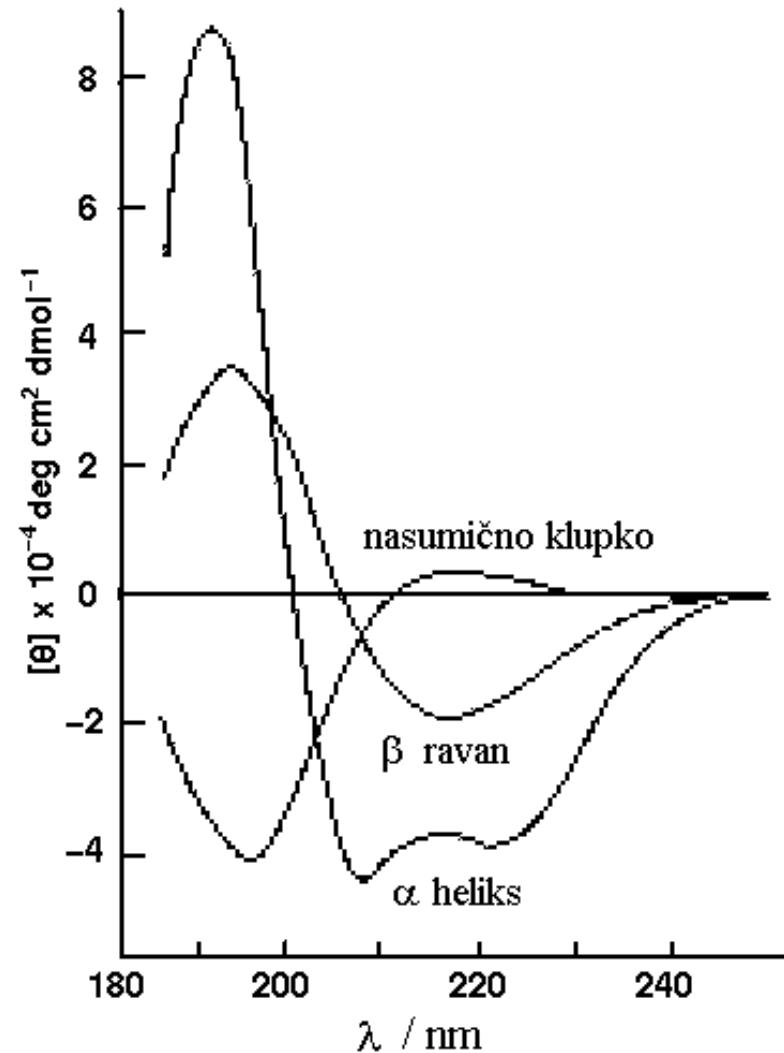
CD meri razliku u apsorpciji levo i desno cirkularno polarizovane svetlosti

$$[\theta] = \text{const} \times \Delta\epsilon$$

$$\Delta\epsilon = \epsilon_{\text{levo}} - \epsilon_{\text{desno}}$$

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

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

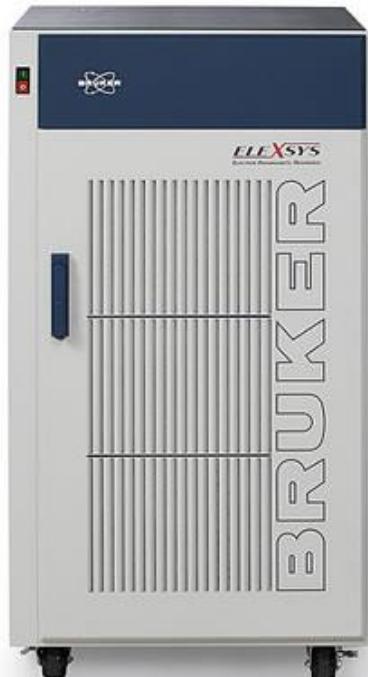


Elektronska paramagnethna rezonantna spektroskopija (EPR)

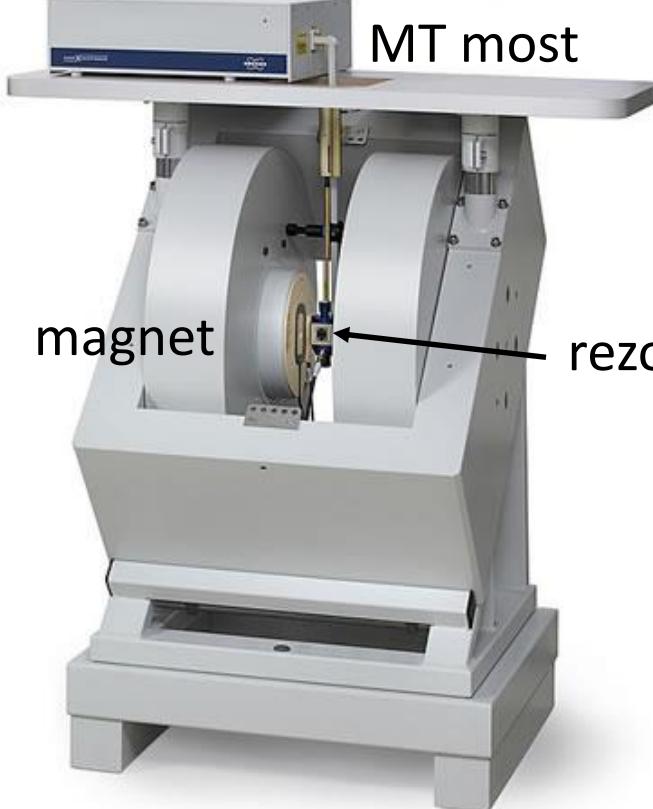
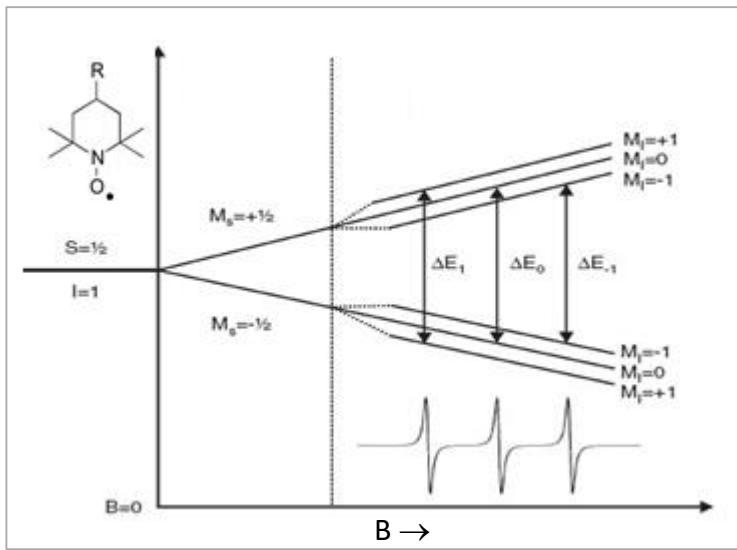


- Jedina tehnika za detekciju kratkoživećih radikala, **ROS i RNS**
- Određivanje **antioksidativnog kapaciteta** biomolekula
- Određivanje fluidnosti **membrane/lipozoma**
- Identifikacija oksidacionog stanja i geometrije kompleksa **paramagnethnih metalnih jona** (npr. Ru, Cu, Mn, V, Fe)
- Praćenje **konformacionih** promena proteina
- *In vivo* merenje **pO₂**
- *In vivo* određivanje **oksidativnog statusa** - razlikovanje zdravog od bolesnog tkiva

EPR



konzola



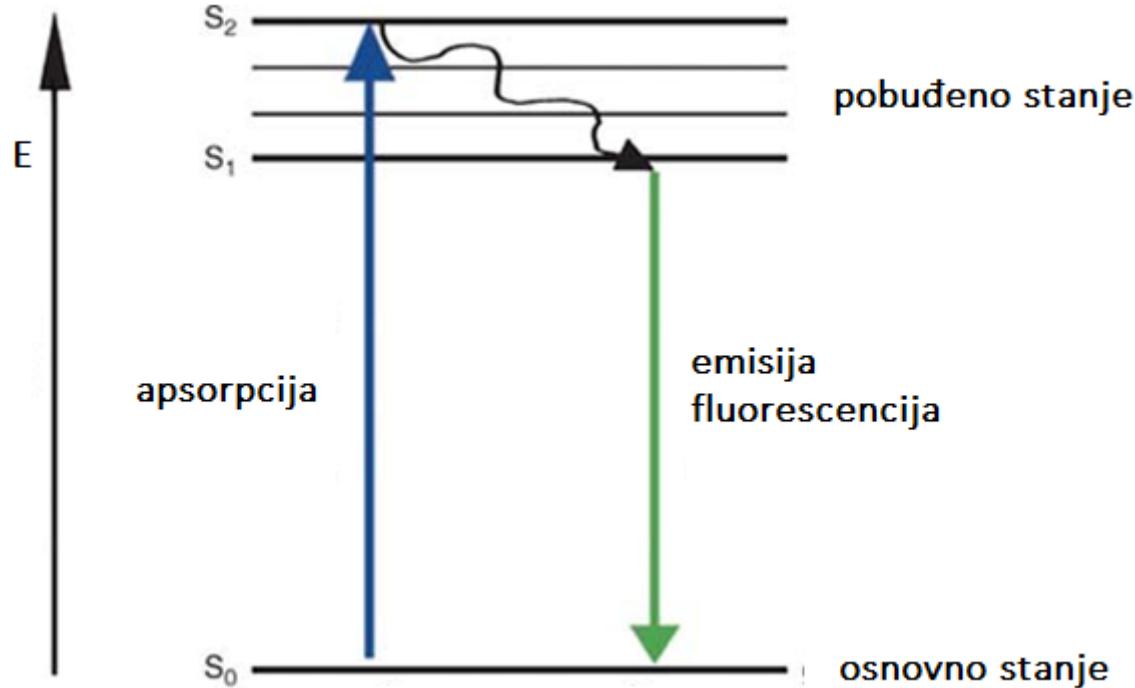
MT most



Spektrofluorimetrija – fluorescentna spektroskopija

Fluorofore u biomolekulima:

- Aminokiseline Trp, Tyr, Phe
- Nukleotidi imaju slabu fluorescenciju



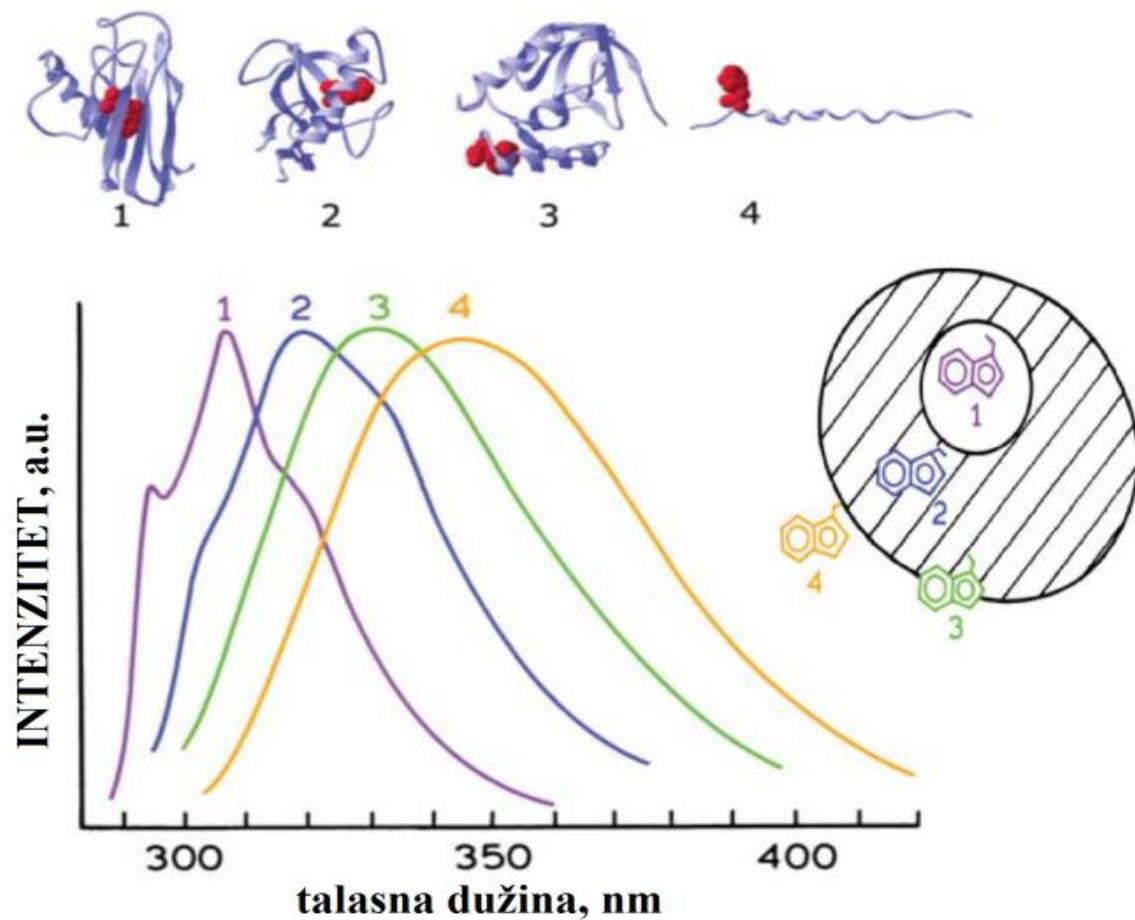
Dijagram Jablonskog

Spektrofluorimetrija proteina

Proučavanje strukture, funkcije, konformacionih promena,
ligand-protein interakcija

Uticaj okruženja
aminokiseline triptofan
na emisioni spektar →

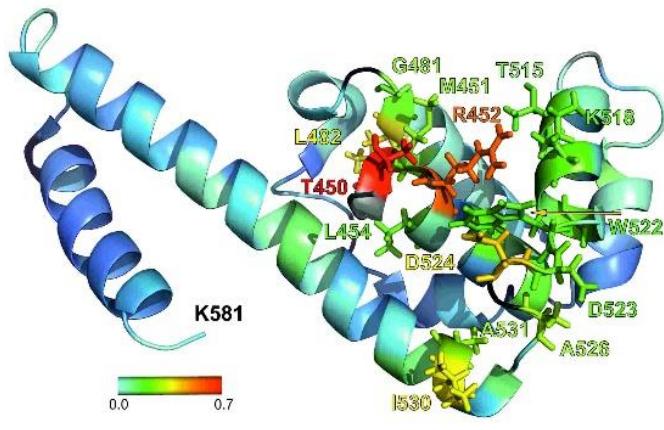
Methods Biochem. Anal., 1990,
35, 117–129.



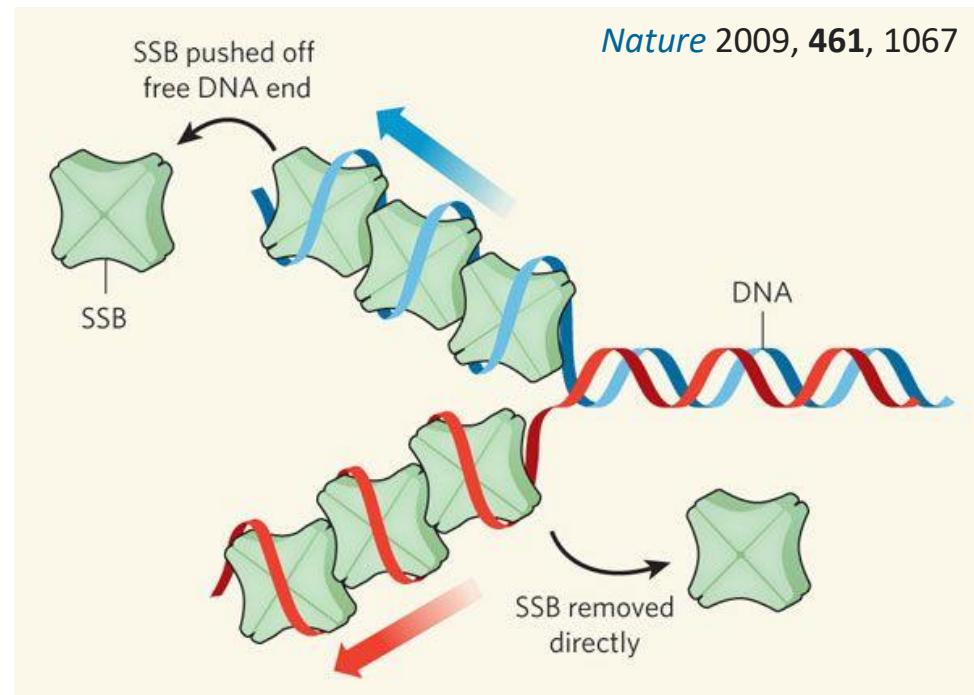
Spektrofluorimetrija - interakcije proteina i DNK

Primer: Single-stranded protein (SSB) se vezuje za jednolančanu DNK i sprečava da se lanci ponovo spoje (iza DNK helikaze) u toku transkripcije

- Kada se SSB veže za DNK gasi se fluorescencija triptofana
- Smanjenje fluorescencije je direktno proporcionalno količini odmotanog dela DNK

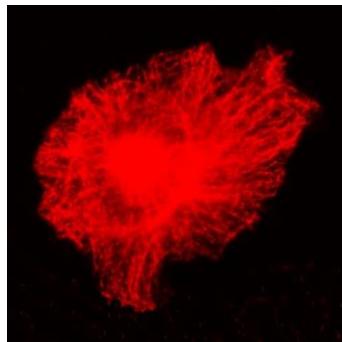


<http://schmieder.fmp-berlin.info/research/ssb.htm>

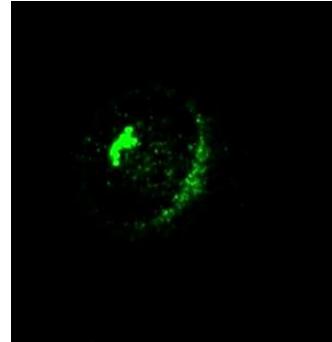


Fluorescentna mikroskopija

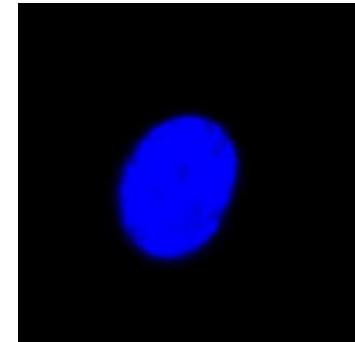
- Fluorescentno obeležavanje proteina, nukleinskih kiselina
- Npr. antitelo se obeleži (hemijska veza) fluorescentnom bojom, i tada postaje fluorescentna proba za detekciju antigena
- Postoje specifične probe za različite ćelijske organele
- Fluorescentno obeleženi biomolekuli ili organele se koriste za ćelijski imidžing, citometriju, *Western-blot* i *ELISA* testove



mikrotubule



centrozomi

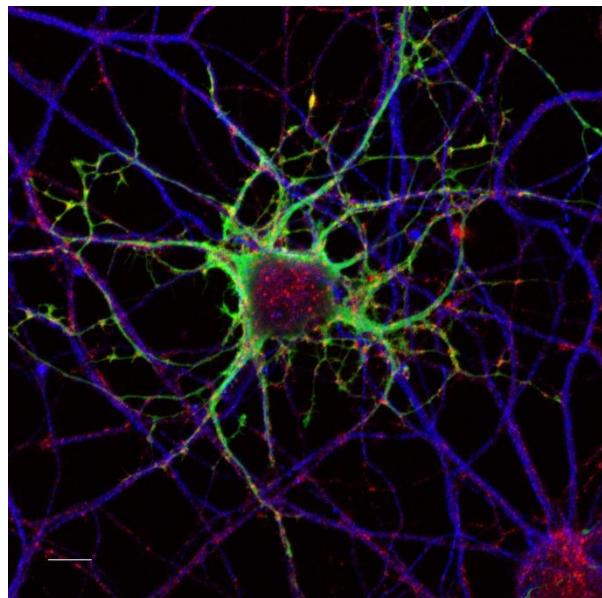


jedro

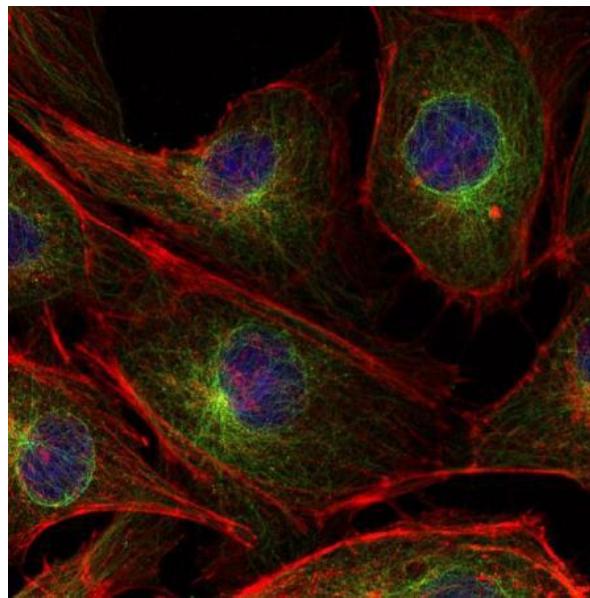


Konfokalna mikroskopija – optička imidžing tehnika

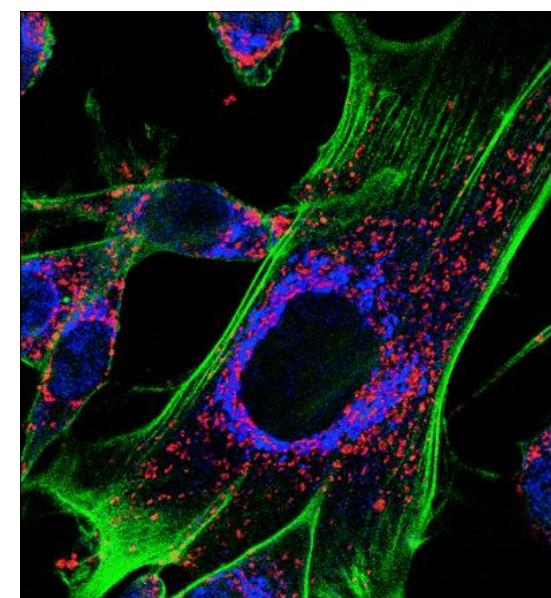
Dobija se slika visoke rezolucije, bolje od fluorescentne mikroskopije



Neuron



Epitelne ćelije



Mitohondrije (crveno) i
Goldžijev kompleks (plavo)

Single particle tracking fluorescentna mikroskopija

U realnom vremenu je moguće pratiti **jedan** (fluorescentno obeležen) molekul u fiziološkim uslovima, na primer:

- Kojom brzinom helikaza razmotava DNK
- Prolaz jona/molekula kroz membranu



Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Nov 25; 105(47): 18176–18181.

PMCID: PMC2587633

Published online 2008 Nov 14. doi: [10.1073/pnas.0809250105](https://doi.org/10.1073/pnas.0809250105)

PMID: [19011092](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19011092/)

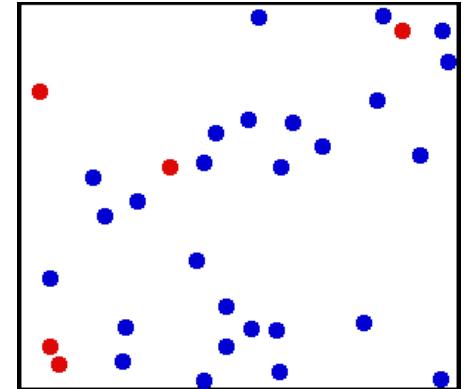
Applied Physical Sciences

Quantitative single-molecule imaging by confocal laser scanning microscopy

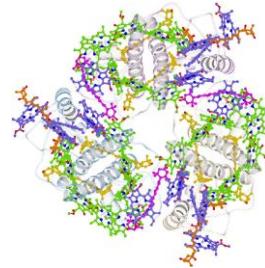
Vladana Vukojević,^{a,1} Marcus Heidkamp,^b Yu Ming,^a Björn Johansson,^a Lars Terenius,^a and Rudolf Rigler^{c,d,1}

Dinamičko rasejanje svetlosti

Dynamic Light Scattering (DLS)



- **Osnovna primena DLS-a je za određivanje veličine (1 nm - 10 μm) i zeta potencijala čestica u suspenzijama.**
- Takođe se koristi za određivanje elektroforetske mobilnosti, izoelektrične tačke i aproksimaciju mase makromolekula.
- Princip merenja se zasniva na fenomenu **Braunovog kretanja** čestica u suspenziji: **dispergovane čestice** se sudaraju sa molekulima **dispersanta** i kreću se stohastičnom (nasumičnom) putanjom i rasejavaju svetlost.
- Na brzinu Braunovog kretanja čestice utiču **masa (veličina) čestice i viskoznost dispersanta**

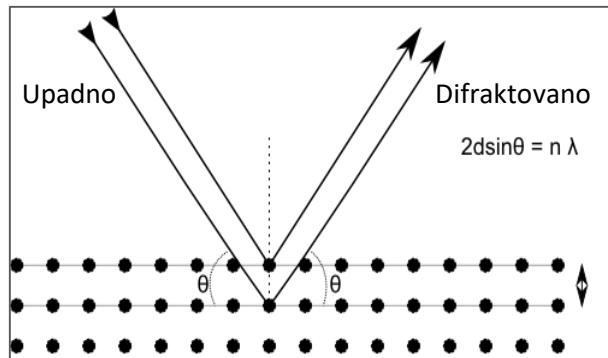


Rendgenostruktturna analiza

Kristalografija X-zracima

XRD (X-Ray Diffraction)

- Najvažnija i najkorisnija metoda za proučavanje trodimenzionalne, atomske strukture molekula
- Do danas određeno ~ 150.000 3D struktura proteina ovom tehnikom
- Neophodno je imati monokristal
- Uslov za difrakciju: red veličine međuatomskog rastojanja u kristalu odgovara redu veličine λ zračenja
- Elektronski oblaci su mesta difrakcije X zraka (difrakciona rešetka)



NMR vs. XRD za određivanje 3D strukture proteina

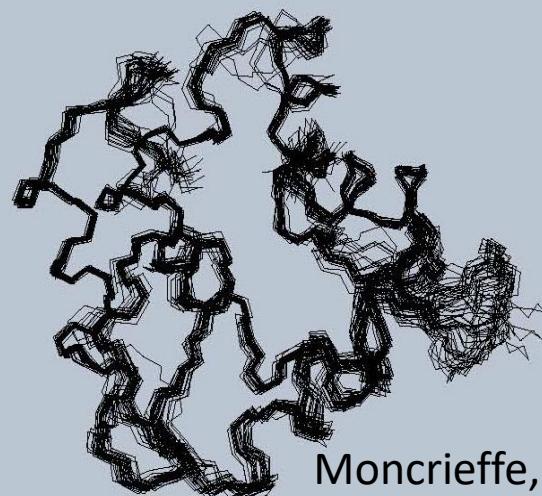
NMR



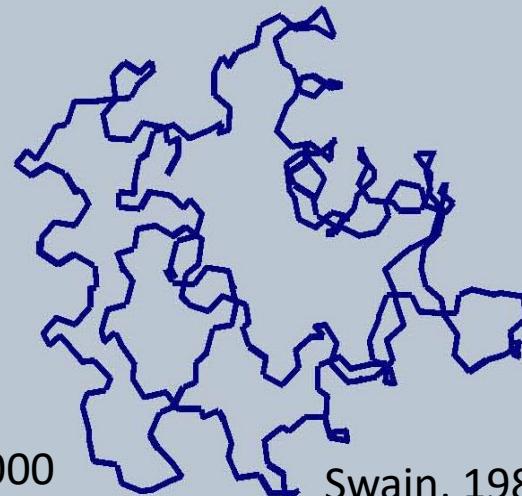
XRD



Protein
parvalbumin



Moncrieffe, 2000



Swain, 1989

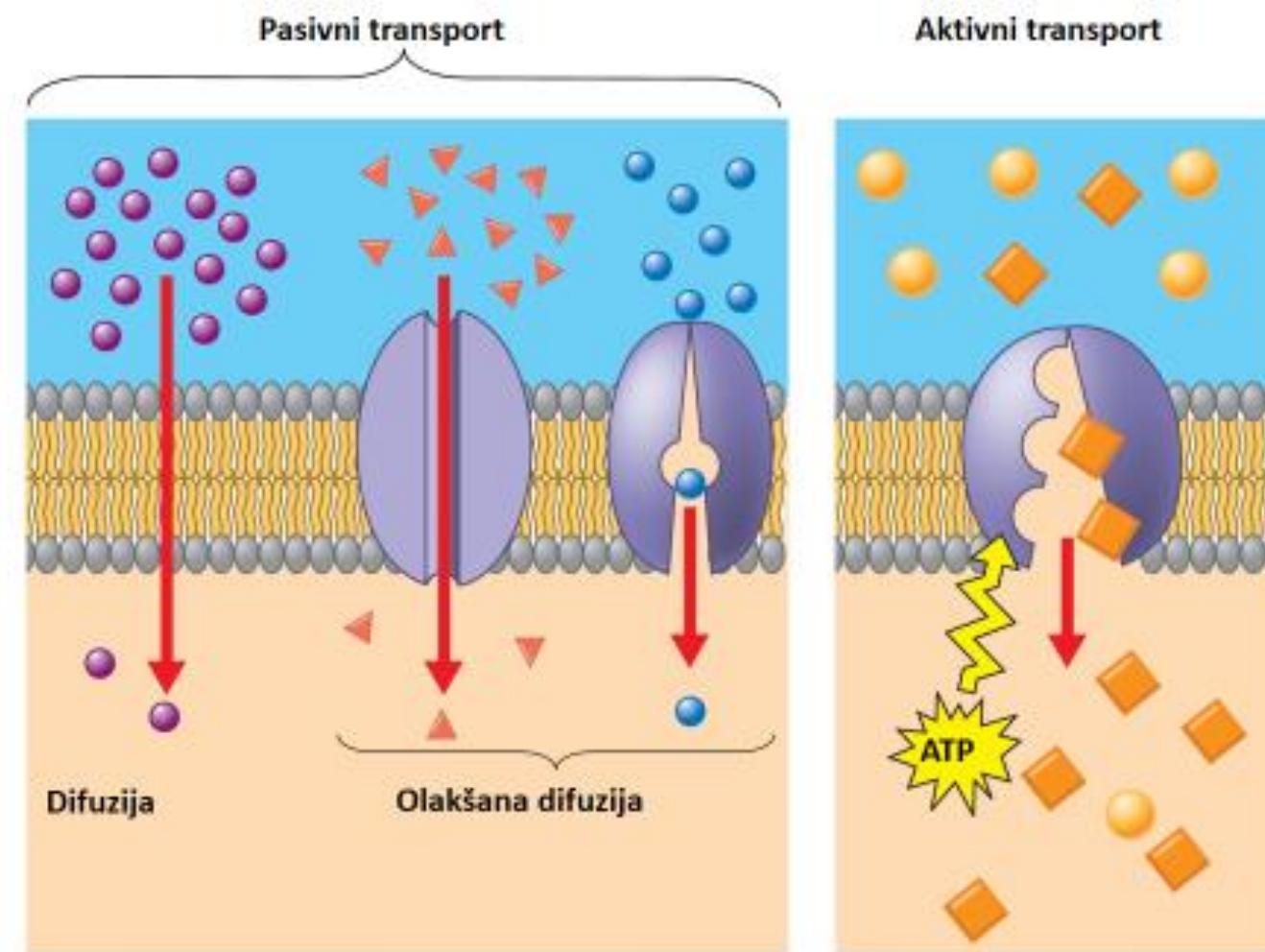
NMR vs. XRD za određivanje 3D strukture proteina

NMR

- Može protein u rastvoru, ali visoko prečišćen
- Nije potreban monokristal, što predstavlja ograničenje za XRD
- Pogodno i za membranske proteine
- Mnogo više informacija od XRD - uglovi, rastojanja, konstante sprezanja, dinamički parametri
- Ali postoji ograničenje u M_r proteina (tj. broju atoma), do 50 kDa, zbog ozbiljno zahtevne manipulacije podacima koja podrazumeva specijalne tehnike 2D i 3D NMR-a (COSY, NOESY, TROSY), specifično izotopsko obeležavanje, kao i superprovodne magnete (≥ 700 MHz)

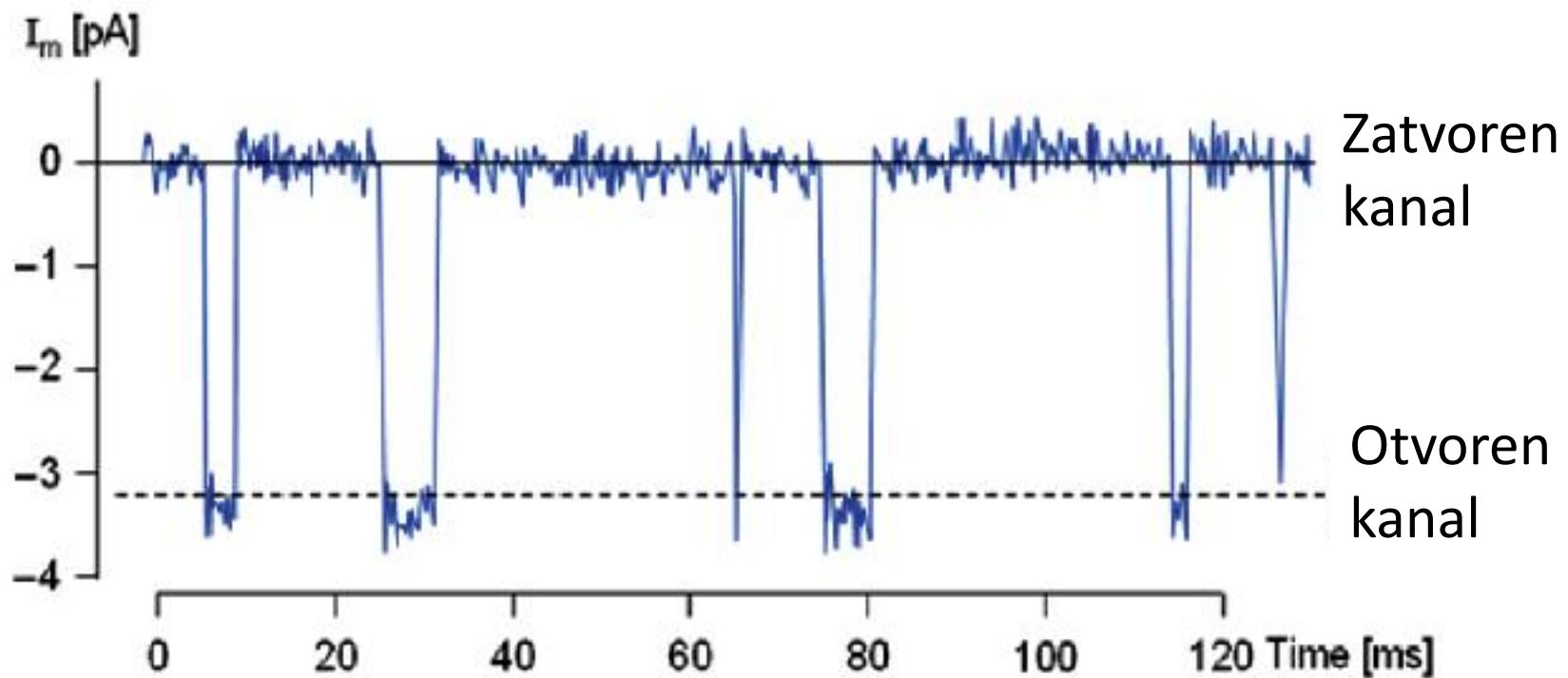
Patch-clamp tehnika

Elektrofiziološka metoda za ispitivanje jonskih kanala u ćelijskoj membrani

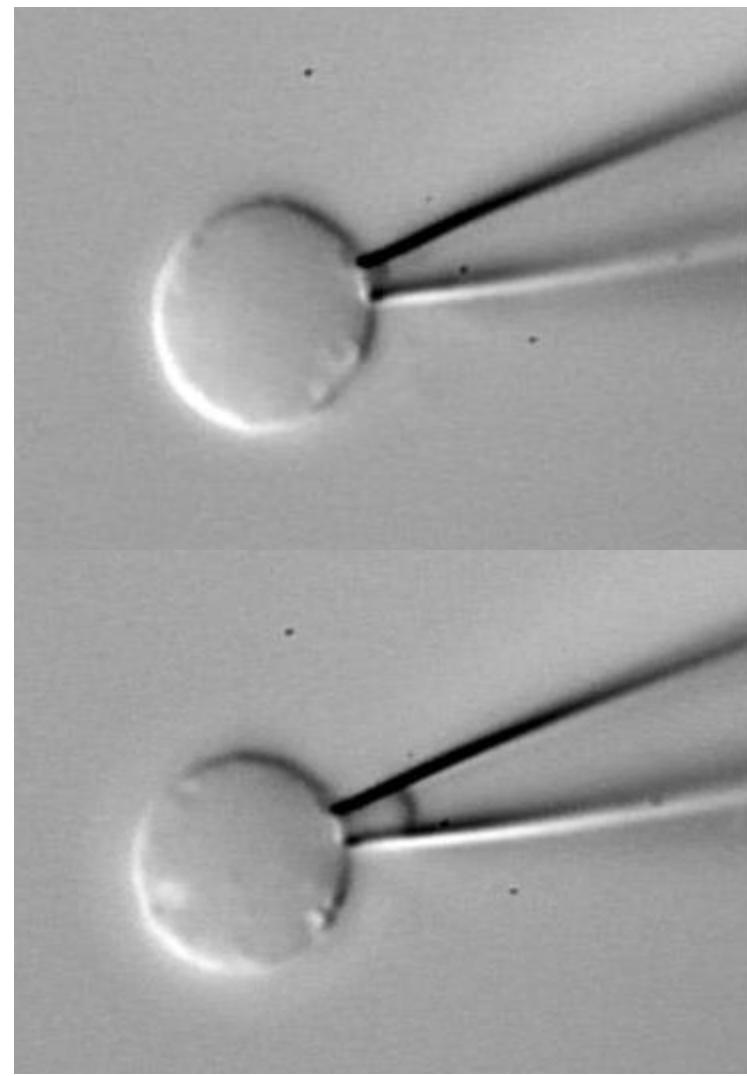
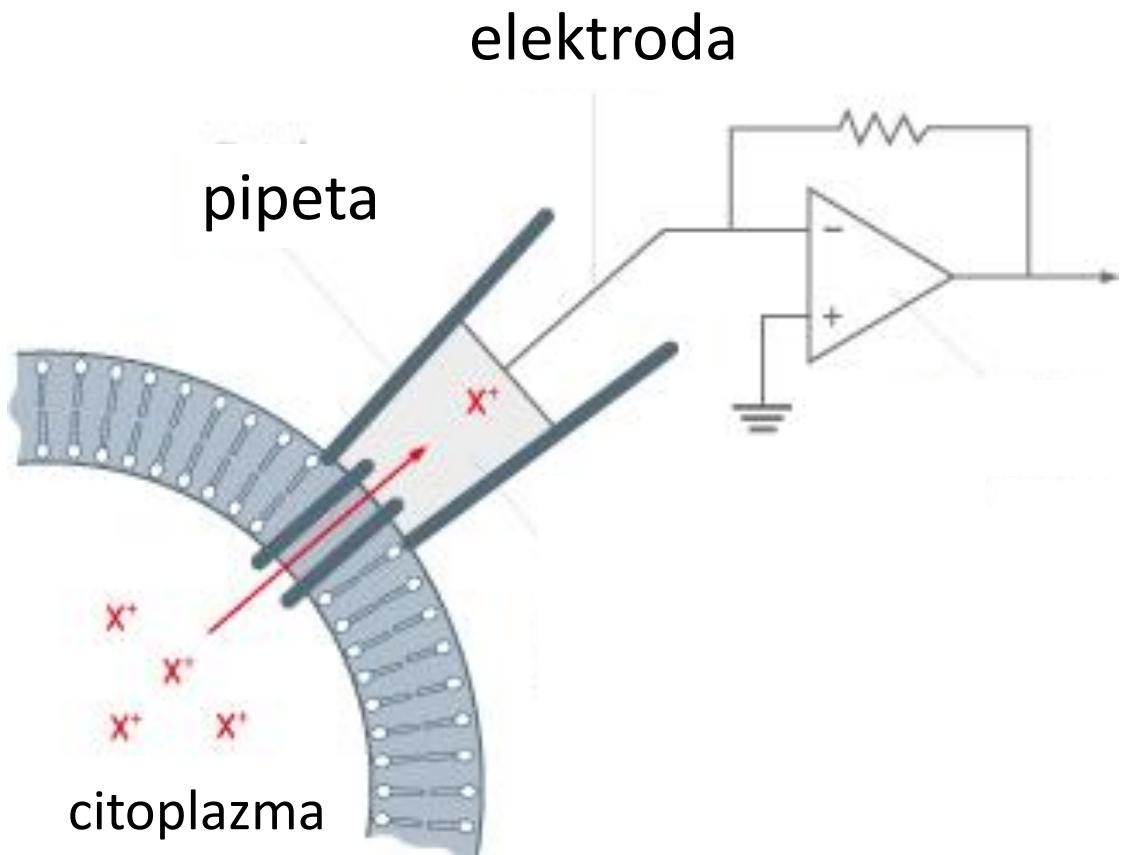


Patch-clamp tehnika

- Meri se struja stvorena prolaskom jona kroz kanale
- Prisustvo ili odsustvo struje govori o tome da li je kanal otvoren ili zatvoren



Patch-clamp tehnika



[YouTube klip](#)

Masena spektrometrija

Razdvajanje jona pri prolasku kroz magnetno ili električno polje, na osnovu njihovog odnosa mase i nanelektrisanja (m/z)

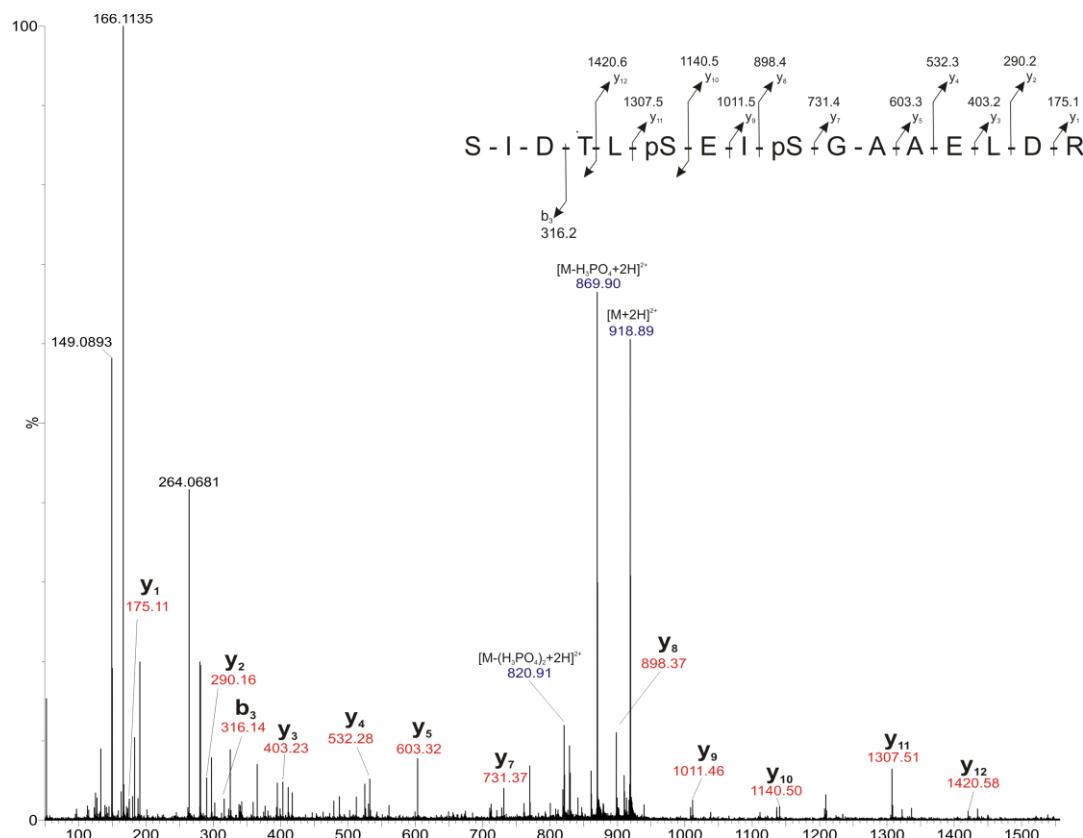
Jonizator → Analizator masa → Detektor

Jonizatori (za analizu bioloških uzoraka)

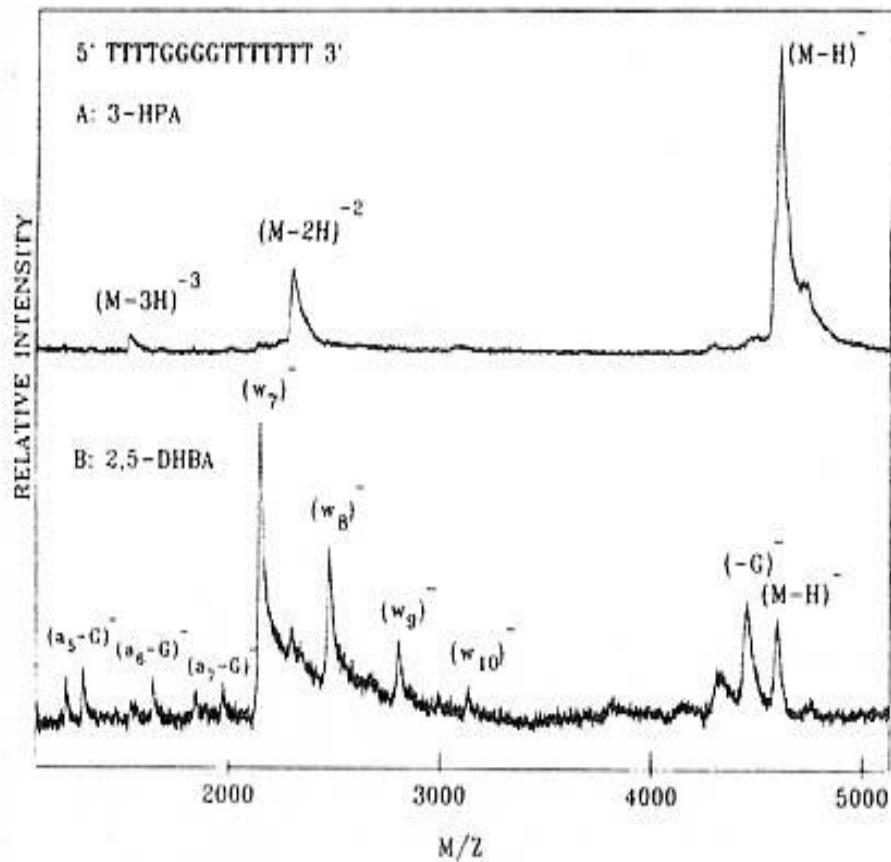
FAB fast atom bombardment	7-25 kDa	nmol	Naisparljiv rastvarač	Mogu mali biomolekuli, peptidi, ugljeni hidrati. Ne može za teško jonizujuće molekule.
ESI electrospray ionization	70-200 kDa	fmol	Voda	Ne može za smeše.
MALDI matrix assisted laser desorption ionization	300 kDa	fmol	Mikrokristal	Ne može za fotosenzitivne molekule.

Masena spektrometrija – proteini

- Rutinska tehnika za određivanje primarne strukture proteina i molekulske mase
 - Potrebne male zapremine uzorka



Masena spektrometrija – nukleinske kiseline



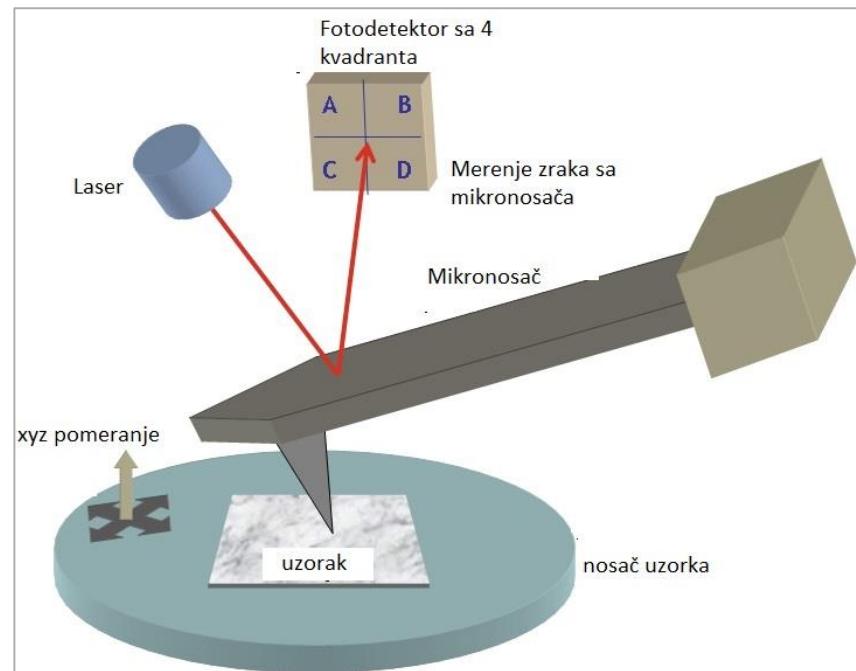
Najčešće analize:

- ispitivanje interakcije lekova sa DNK
- mesto modifikacije DNK
- stvaranje kompleksa
- dijagnostika bolesti

Mikroskopija atomskih sila

Atomic Force Microscopy (AFM)

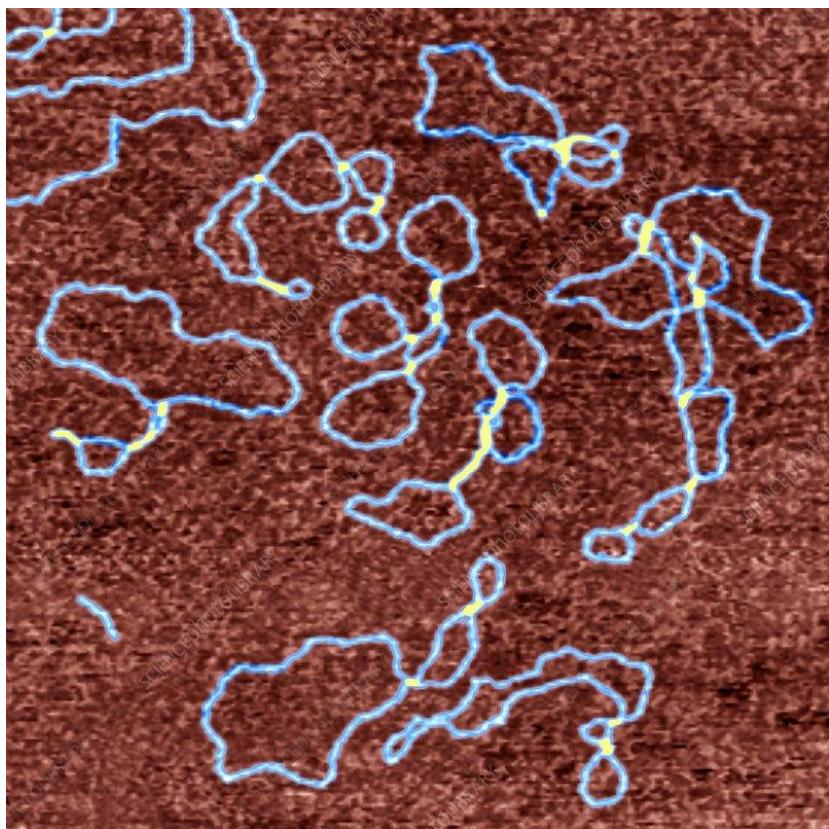
- 3D topografska tehnika visoke rezolucije
- Ispitivanje na vazduhu i u tečnosti
- Dobijaju se informacije o mehaničkim osobinama ćelija i silama između molekula
- AFM daje:
 - „Realni“ 3D prikaz površine uzorka
 - Mogu dielektrični uzorci
 - Mogu uzorci koji ne smeju u vakuum
 - Ali, ne daje hemijski sastav (SEM)



AFM – primena, primeri

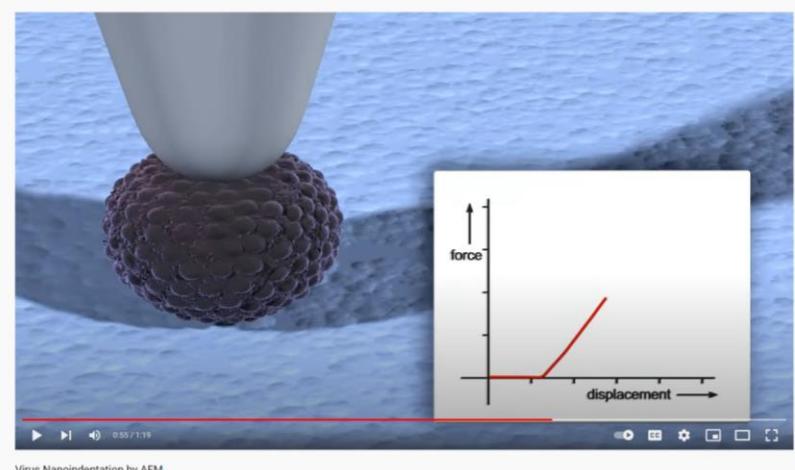
Kompleksi DNK – antikancer lek

©Torunn Berge



Ispitivanje elastičnosti virusa
(animacija)

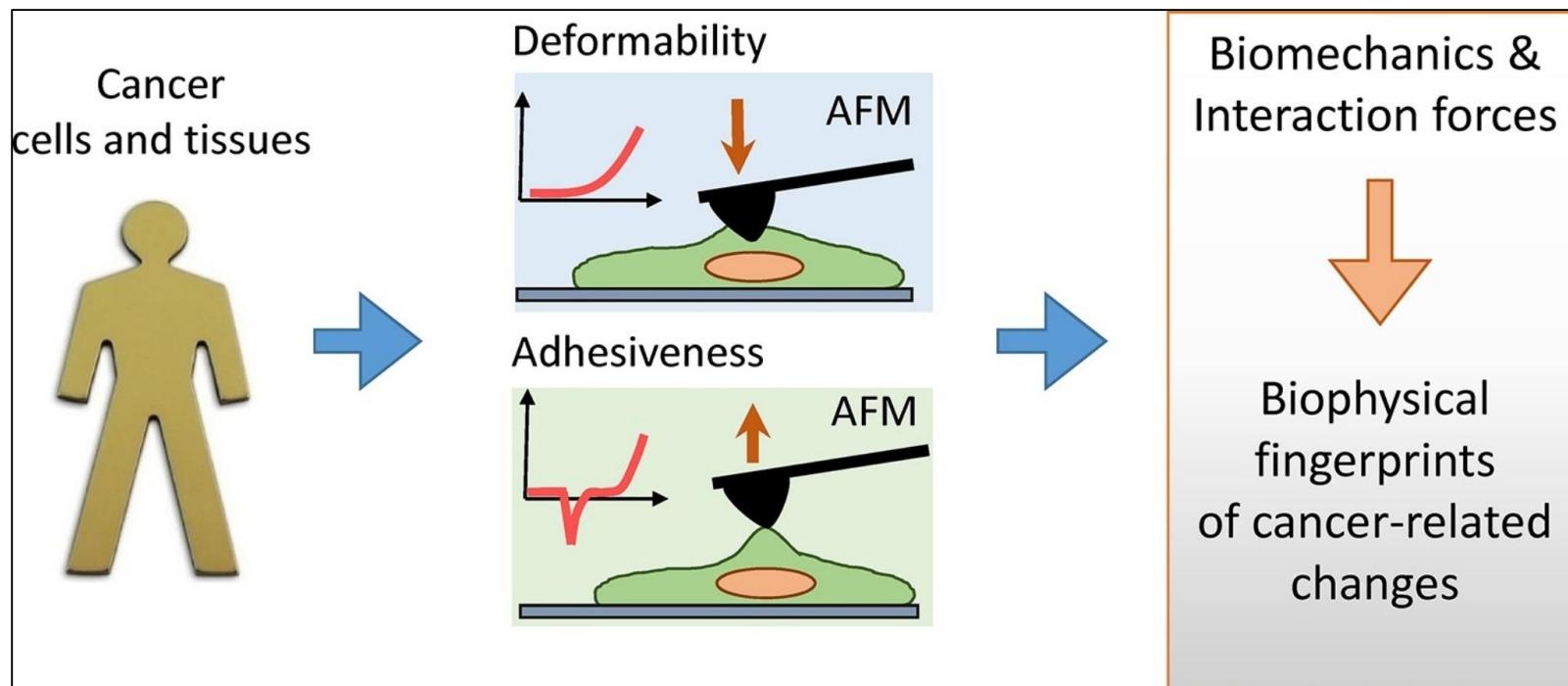
<https://www.youtube.com/watch?v=MZb8C0f7Kdg>



AFM – ispitivanje tumora na nivou jedne ćelije

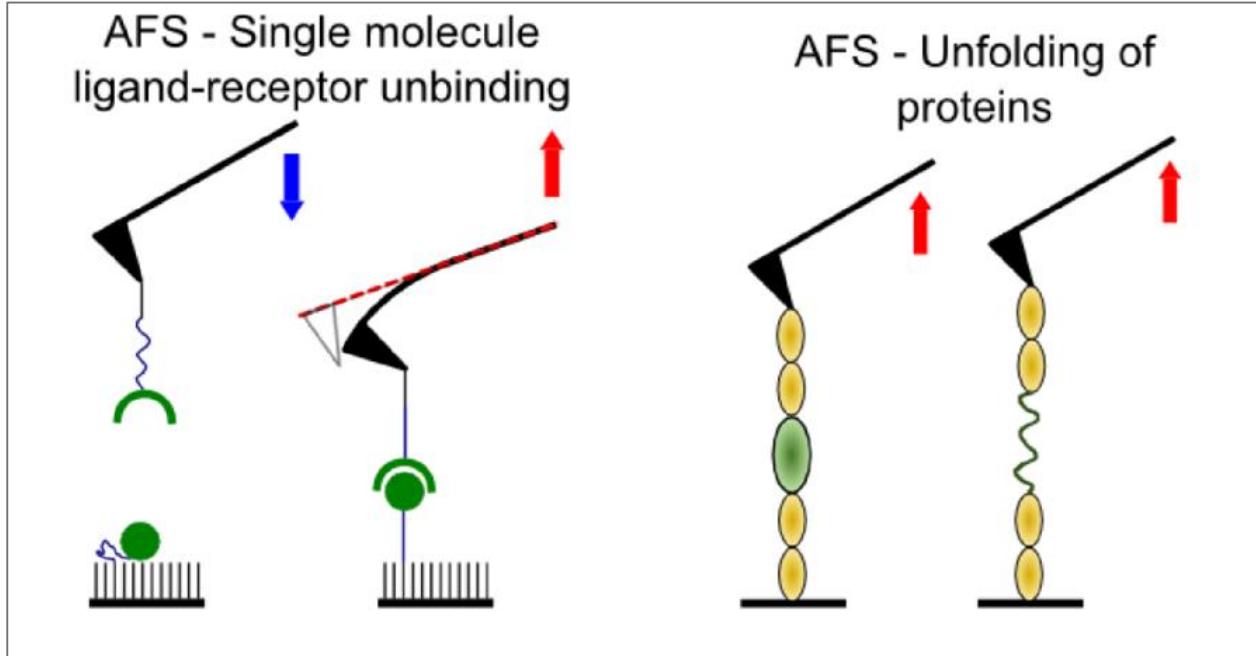
Tumor dovodi do promena u strukturi, mehaničkim osobinama, rastu, morfologiji, interakcija na nivou ćelija, ćelijskoj membrani i citoskeletu.

Zdrave i bolesne ćelije se razlikuju u elastičnim i athezivnim osobinama – **AFM ovo može da detektuje.**



AFM – interakcija između dva molekula, razvijanje proteina

- Jeden molekul je na površini, drugi molekul je zakačen na vrh AFM igle
- Meri se rastojanje na kome se raskidaju veze između molekula

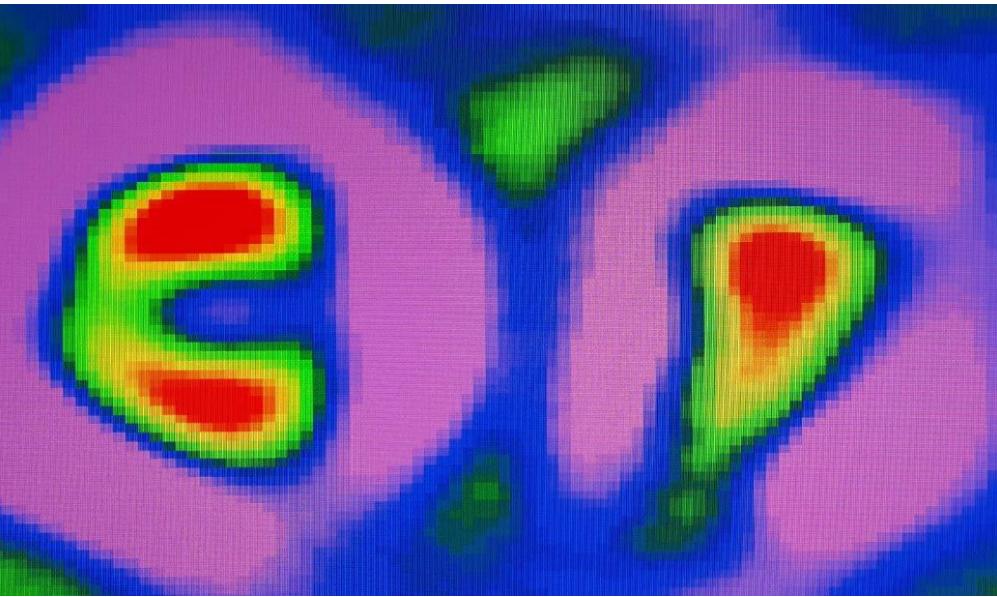
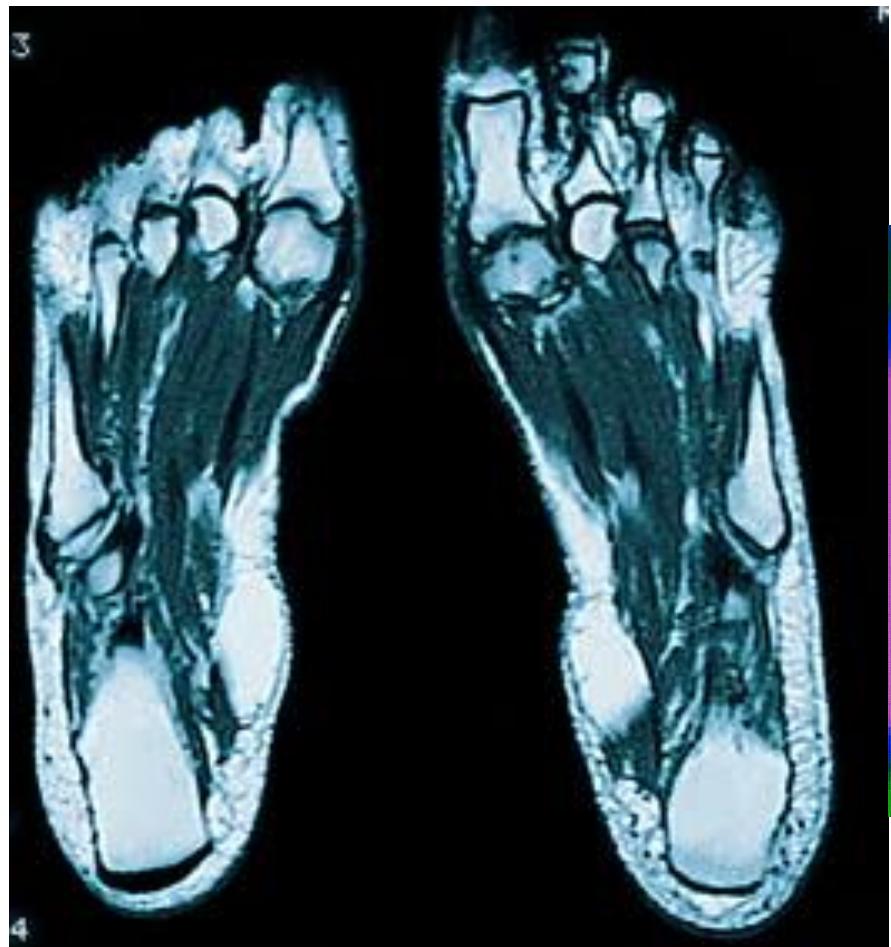


Kalorimetrijske tehnike

Merenje toplotnih promena koje prate:

- Stabilnost i konformacione promene proteina i nukleinskih kiselina
 - Interakcije između subjedinica u molekulu proteina
 - Vezivanje liganda/supstrata za protein
 - Fazne prelaze u membranama
-
1. **DSC** – diferencijalna skanirajuća kalorimetrija, meri ΔC_p uzorka u funkciji T
 2. **ITC** – izotermalna titraciona kalorimetrija, meri količinu toplote koja se otpušta/apsorbuje u toku titracije proteina ligandom ili u toku hemijske reakcije
 3. **Termodinamička kalorimetrija** – NEMA kalorimetra, meri temperatursku zavisnost konstante ravnoteže nekom FH metodom (CD, NMR, fluorescencija)

Imidžing tehnike magnetne rezonancije: MRI i EPRI



NIMEDIA, Stockvideo-ID:13787300

