

The background of the slide features several molecular models. On the left, a large blue ball-and-stick model of a molecular structure is visible. On the right, a colorful DNA double helix is shown. In the bottom right corner, there is a 3D ribbon diagram of a protein structure with various colored helices and sheets. In the bottom center, there is a small, colorful, circular molecular structure.

# Методе и методологија у биофизичкој хемији

Др Александра Павићевић

## Шта је биофизичка хемија?

Тешко је наћи прецизну дефиницију, пошто ова област науке обједињује биологију, физику, хемију, па чак и медицину у једну научну дисциплину.

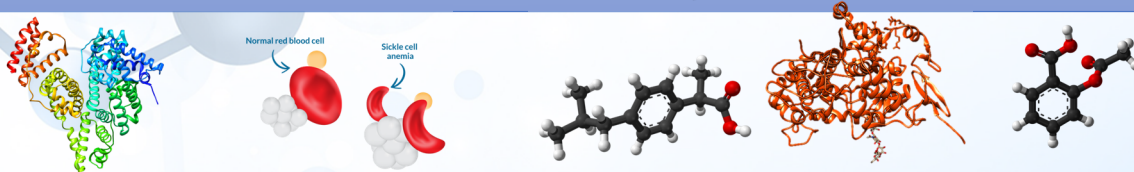
Могућа дефиниција: „Биофизичка хемија представља примену принципа познатих из физичке хемије, да би се нашли одговори на биохемијска и биомолекуларна питања.“ (P. J. Walla, *Modern Biophysical Chemistry*, 2014)

## Садржај:

- ❖ Методологија истраживања у биофизичкој хемији
- ❖ Масена спектрометрија
- ❖ УВ-Вис спектрофотометрија
- ❖ Флуоресцентна спектроскопија и микроскопија
- ❖ Циркуларни дихроизам
- ❖ Вибрациона спектроскопија - инфрацрвена и раманска
- ❖ Дифракција X-зрачења
- ❖ Магнетно резонантне методе - НМР и ЕПР
- ❖ Микроскопија атомских сила
- ❖ Калориметријске методе

## Шта је све предмет испитивања биофизичке хемије?

- ❖ Испитивање структуре макромолекула - важност због функције.
- ❖ Праћење међумолекулских интеракција и структурних промена (нпр. протеина са разним другим супстанцијама, испитивање конформационих промена).
- ❖ Идентификовање нефункционалног протеина - испитивање механизма болести.
- ❖ Проналажење лекова којима се специфично циља одређени протеин/ензим ради инхибиције или активације, а некада су сами протеини терапија - моноклонална антитела, ензимска супституциона терапија.
- ❖ Пример: аспирин - иреверзибилна инхибиција циклооксигеназе, ензима који производи простагландине.
- ❖ Други пример: ибупрофен - реверзибилна инхибиција истог ензима.



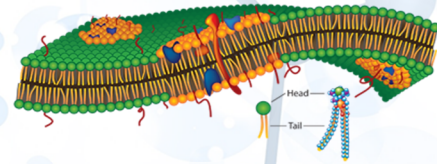
## Шта је све предмет испитивања биофизичке хемије?

❖ Испитивање структуре и физичкохемијских својстава мембрана - важност због функције (флуидност утиче на функционалност), промета материје кроз мембрану и комуникације са другим ћелијама (сигнализације).

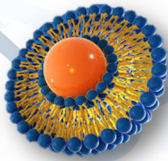
❖ Развијени су разни модели који oponaшају мембрану и служе између осталог за проучавање мембранских протеина.

❖ Протеин - липид интеракције

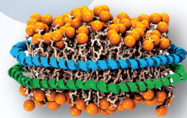
❖ Носачи за испоруку лекова - наночестице (липидне, протеинске), наногелови и хидрогелови.



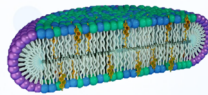
Липозоми



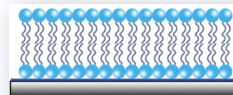
Нанодискови



Бицеле



Двослој



Монослој



# Истраживање у биофизичкој хемији

Формулисање  
питања на које  
треба дати  
одговор



Одабир:  
• Модел система  
• Методе/технике

Извођење  
експеримента

## Неопходно познавање:

- Релевантних биолошких/биохемијских/физичкохемијских процеса,
- узорка
- принципа рада метода/техника које ће бити коришћене

## Узорци могу да буду:

- Биолошки молекули
- Ћ. органеле или ћелија
- Ткива, органи
- Организми



## Одабир модел система

### ❖ Кључни појмови:



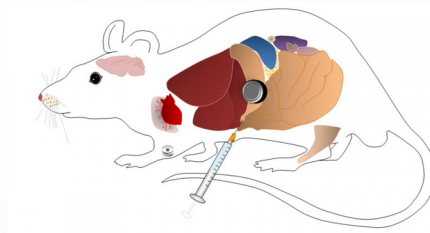
*In vitro* - експерименти са ћелијама које су изоловане, раздвојене и пречишћене од свог нормалног биолошког окружења.



*In silico* - експеримент урађен компјутерском симулацијом

*Ex vivo* - жива ткива која се испитују се не праве вештачки (*in vitro*), него се директно узимају из живог организма.

*In vivo* - у живом организму.





## In vivo - етички принципи

У Великој Британији је настала 1875. прва организација за заштиту животиња: “The Victoria Street Society”.

Први Закон о заштити експерименталних животиња донет 1876. - “Cruelty to animals act”

(<https://www.irishstatutebook.ie/eli/1876/act/77/enacted/en/print.html>)

Принцип троструког „R”:

**R**eplacement - замена - замена коришћења животиња неком другом техником када год је то могуће.

**R**eduction - смањење - употреба што мањег броја животиња.

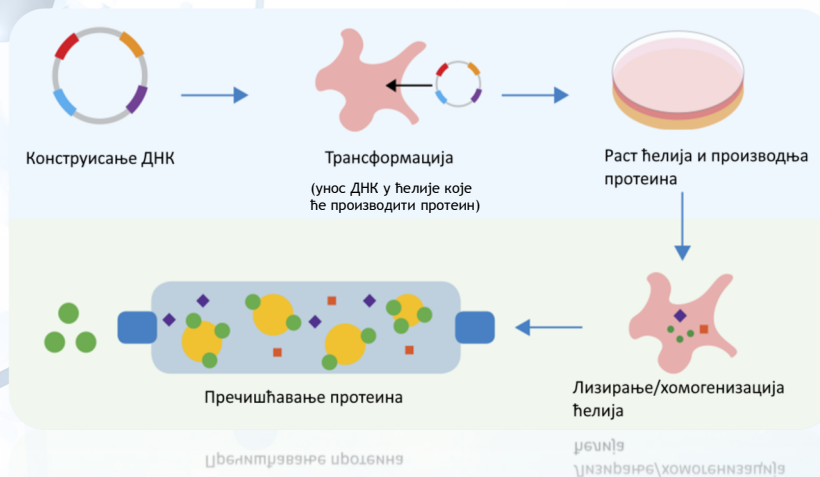
**R**efinement - побољшање - побољшање и усавршавање процедура (избегавање/редуковање стреса и бола)



Новосибирск, Институт  
за цитологију и генетику,  
Руска академија наука

## Пример истраживања у БФХ

### ❖ Експресија и изолација протеина



# Пример истраживања у БФХ

- ❖ Експресија и изолација протеина - пречишћавање и идентификација

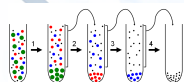
Лизат бактерија (ћелија)

Растворљиве компоненте:

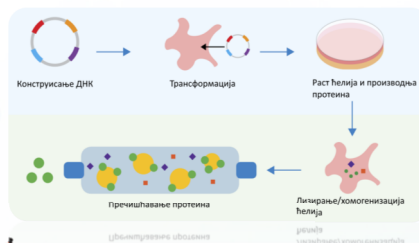
Цитосолни протеини  
Нуклеинске киселине  
Рибозоми

Нерастворљиве компоненте:

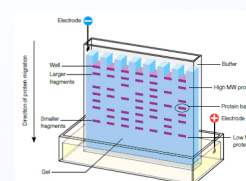
Неразбијене ћелије  
Једра  
Ћелијски зидови  
Ћелијске мембране



Центрифугирање



Хроматографија



Електрофореза



# Методе/технике у биофизичкој хемији

## Масена спектрометрија

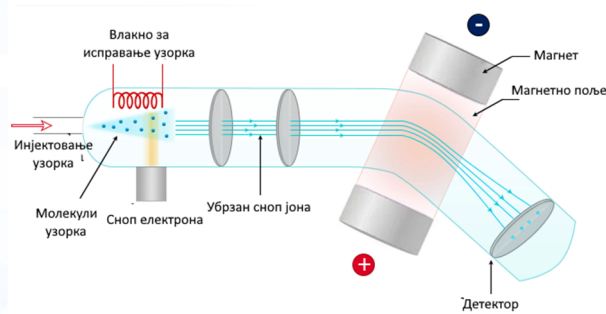
❖ Почива на различитом скретању и брзини наелектрисаних честица у магнетном/електричном пољу, што зависи од односа масе и наелектрисања -  $m/z$ .

❖ Кључни кораци у експерименту:

- 1) испаравање и јонизација узорка;
- 2) раздвајање на основу  $m/z$  у анализатору;
- 3) детекција јонским детекторима.

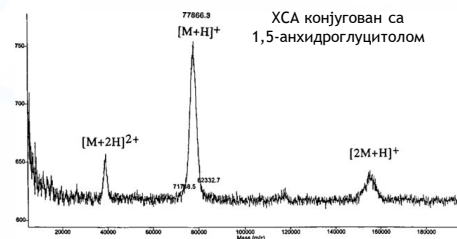
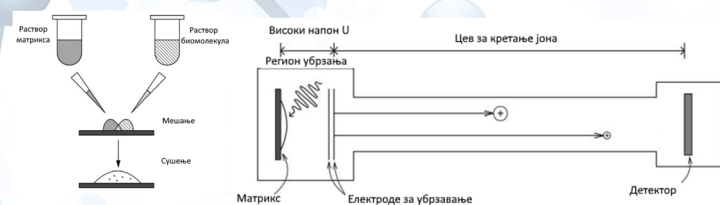
❖ Проблем испарљивости биолошких макромолекула, као и њихове деградације јонизацијом која се користи за мање органске молекуле (FAB-Fast Atom Bombardment).

❖ За јонизацију и испаравање биомacroмолекула се користе најчешће MALDI и ESI.



## Масена спектрометрија - MALDI-TOF

- ❖ MALDI - Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
- ❖ TOF - Time of Flight



- ❖ Матрикс (мањи ароматични молекули) се бира тако да апсорбује јако у области таласне дужине ласера (обично УВ област).
- ❖ Јонизација се догађа услед преноса протона између матрикса и биомолекула.
- ❖ Настају молекули са једним или неколико позитивних наелектрисања, мада је могућа и селекција негативних јона (олигонуклеотиди и олигосахариди).

MALDI predstavlja nedestruktivnu metodu za jonizaciju i isparavanje biomolekula. Najpre se matriks i biomolekuli rastvore i naprave dva posebna rastvora, pri čemu se kao rastvarači koristi voda pomešana sa nekim lako ispraljivim rastvaračem, kao što je metanol ili acetonitril. Koncentracija molekula matriksa se bira da bude 1000 do 10000 puta veća od koncentracije biomolekula. Mikrolitarske zapremine rastvora matriksa i proteina se mešaju na metalnom nosaču, a zatim se rastvarač isparava. Kao rezultat, dobija se uzorak biomolekula koji su raspoređeni u matriksu. Metalna pločica nakon sušenja može da se smesti u evakuisanu komoru masenog spektrometra. Matriks se bira tako da njegovi molekuli značajno apsorbuju svetlost pri talasnim dužinama lasera (obično u UV oblasti – npr. pulsni azotni laser čija je talasna dužina 337 nm). Kratak nanosekundi puls lasera u tako maloj zapremini uzorka koji jako apsorbuje na talasnoj dužini lasera, čini da matriks zajedno sa biomolekulima gotovo trenutno ispari, a zbog veliko viška energije dolazi i do delimične jonizacije celog matriksa i biomolekula. Jonizacija se događa usled prenosa protona između biomolekula i matriksa. Biomolekuli obično dobiju ili izgube jedan proton, mada se može desiti i da promene masu za dva protona i li više protona. U spektrima proteina mogu da se jave i pikovi koji potiču od protonovanih dimera proteinskih molekula.

U toku ekscitacije, metalna pločica služi i kao elektroda koja se u donosu na drugu elektrodu za ubrzavanje nalazi na visokom naponu od nekoliko kV. Ta, druga elektroda za ubrzavanje je metalna mrežica ka kojoj će da se ubrzaju joni i kroz koju će da prođu ka analizatoru. Obično se polaritet elektroda bira tako da se ubrzavaju pozitivni joni ka

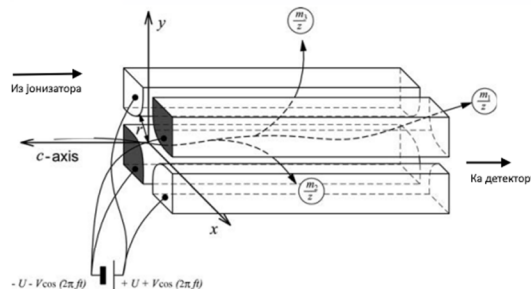
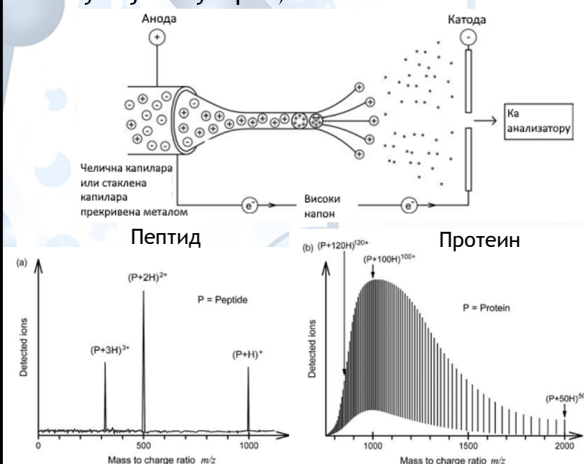
analizatoru.

U slučaju MALDI-a, kao analizator se obično koristi TOF analizator, koji vrši razdvajanje čestica različitih odnosa  $m/z$  prema različitim vremenima stizanja do detektora, pri čemu će manji joni stići brže. Ovaj analizator se sastoji iz cevi za kretanje (drift tube), pri čemu se razdvajanje vrši na osnovu toga što nakon ubrzavanja sve čestice imaju jednaku kinetičku energiju, ali različitu brzinu zbog različite mase.

Kao detektor se obično koristi elektromultiplikator.

## Масена спектрометрија - ESI

- ❖ ESI - ElectroSpray Ionization
- ❖ Обично се користи у спрези са квадруполним анализатором (не може TOF, због континуалног увођења узорка).



Потребна компјутерска анализа ради добијања тачне масе.

Због тога не може да се ради са смешом протеина - мана. Није потребна припрема узорка као за MALDI, могућ рад са протеином раствореним у води - предност.

ESI – elektrosprej jonizacija se koristi za direktnu jonizaciju biomolekula u rastvoru. Rastvor biomolekula se isparava sa vrha čelične kapilare (koja je široka oko 100 mikrona) u vakuum. Mogu se koristiti i staklene kapilare prevučene slojem metala, koje su prečnika svega nekoliko mikrona. Metal u kapilari služi kao jedna od elektroda potrebnih za generisanja visokonaponskog električnog polja (3-4 kV). Druga elektroda se nalazi u smeru ka analizatoru. Prolazom uzroka kroz kapilaru se generišu naelektrisane kapljice koje se ubrzavaju ka analizatoru. Pri ubrzavanju kapljica ka analizatoru, rastvarač isparava, čime nastaju sve sitnije kapljice, koje imaju sve veću površinsku gustinu naelektrisanja. Kada kapljice postanu tako sitne da odbojne Kulonove sile postanju jače od površinskog napona, kapljice potpuno ispare i zbog transfera protona, biomolekuli dobiju veliku količinu naelektrisanja. Biomolekuli su na ovaj način jonizovani u gasovitu fazu i ubrzavaju se ka analizatoru.

Kao i kod MALDI-a, može se vršiti ili pozitivna ili negativna jonizacija. Negativna jonizacija se i u slučaju ESI uglavnom koristi za saharide i oligonukleotide.

S obzirom na to da se uzorak kontinualno dovodi u maseni spektrometar, kao analizator se ne može koristiti TOF. Obično se koristi kvadrupolni analizator, koji se sastoji iz četiri elektrode u obliku šipki. Sve šipke su priključene na konstantan napon  $U$  i oscilujući napon koji se menja po zakonu  $V \cos(2\pi ft)$ , gde je  $f$  frekvencija oscilovanja, a  $t$  vreme. Joni koji

imaju određenu kinetičku energiju se usmjavaju od izvora jonizacije ka središnjem delu masenog analizatora. Za određenu vrednost  $m/z$  samo određene kombinacije parametra  $U$ ,  $V$  i  $f$  će omogućiti prolazak jona stabilnom putanjom kroz analizator sve do detektora, dok će se ostali joni, sa drugačijim  $m/z$  sudarati sa šipkama ili napustiti analizator u pravcu  $x$  ili  $y$  ose. Tako se u stvari, izborom  $U$ ,  $V$  i  $f$  vrši selekcija određenih jona. Menjanjem ovih parametara do detektora će sukcesivno stići joni sa različitim  $m/z$ .

Spektri su veoma složeni zbog toga što biomolekuli mogu da prime ili topuste veliki broj protona. Proteini mogu da dobiju između 50 i 150 protona. Peptidi, zbog manje molekulske mase primaju manji broj protona i daju jednostavniji spektar.

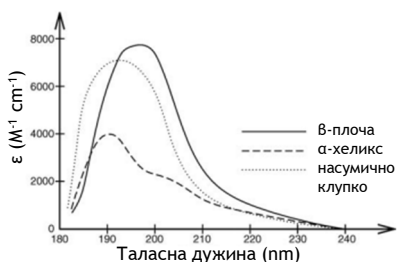
## Масена спектрометрија - секвенцирање протеина

- ❖ Секвенцирање протеина - помоћу више квадруполних анализатора који се налазе један за другим (обично три), од којих се у једном (средњем) намерно врши фрагментација, помоћу инертних гасова (He, Ar, N<sub>2</sub>).
- ❖ Често је потребно радити хемијску дигестију протеина (нпр. помоћу трипсина), па онда раздвојити фрагменте хроматографски и снимити МС-спектар за све фрагменте.
- ❖ MS-fingerprinting - поређење са базама пептида, ДНК секвенцијом.

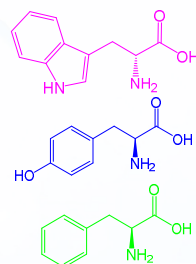
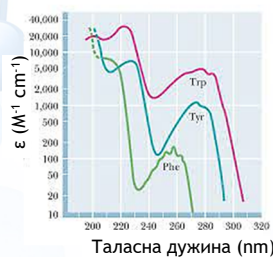
Kada se koristi više kvadrupolnih analizatora, to se zove tandem MS-MS (MS se ponavlja onoliko puta koliko ima analizatora). U slučaju tri analizatora navedenom na slajdu, prvi analizator služi za selekciju jona određenog odnosa  $m/z$ , koji ulaze u drugi analizator, gde u struji inetrnih gasova, u sudarima sa tim molekulima gasa mogu biti fragmentisani. Nakon toga ulaze u treći analizator gde se analiziraju  $m/z$  svih fragmenata.

## УВ-Вис спектрофотометрија

- ❖ Широко коришћена техника за одређивање концентрације разних молекула (нпр. протеина), праћење везивања лиганда за протеин и ензимске кинетике...разни есеји, дијагностичка примена...



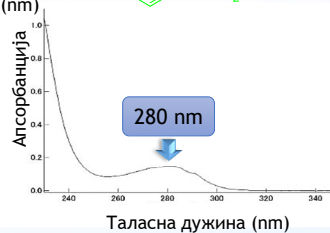
- ❖ Протеини - испод 240 nm прелази у пептидној вези; може доћи до дисоцијације везе; пикови зависе од секундарних структурних елемената (деталније касније).



Триптофан

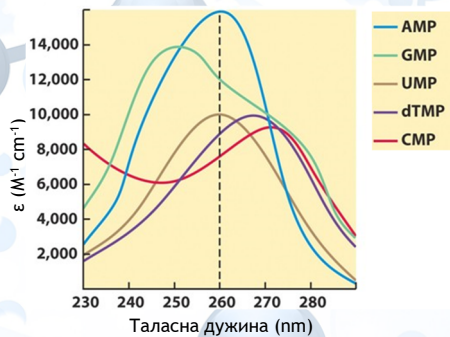
Тирозин

Фенилаланин

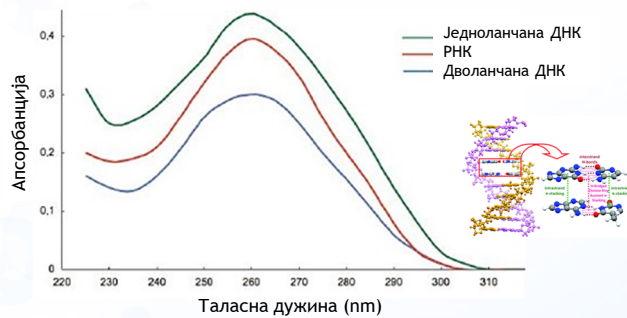


$\pi \rightarrow \pi^*$  прелази у конјугованим ароматичним системима електрона на око 280 nm, који потичу од три наведене аминокиселине.

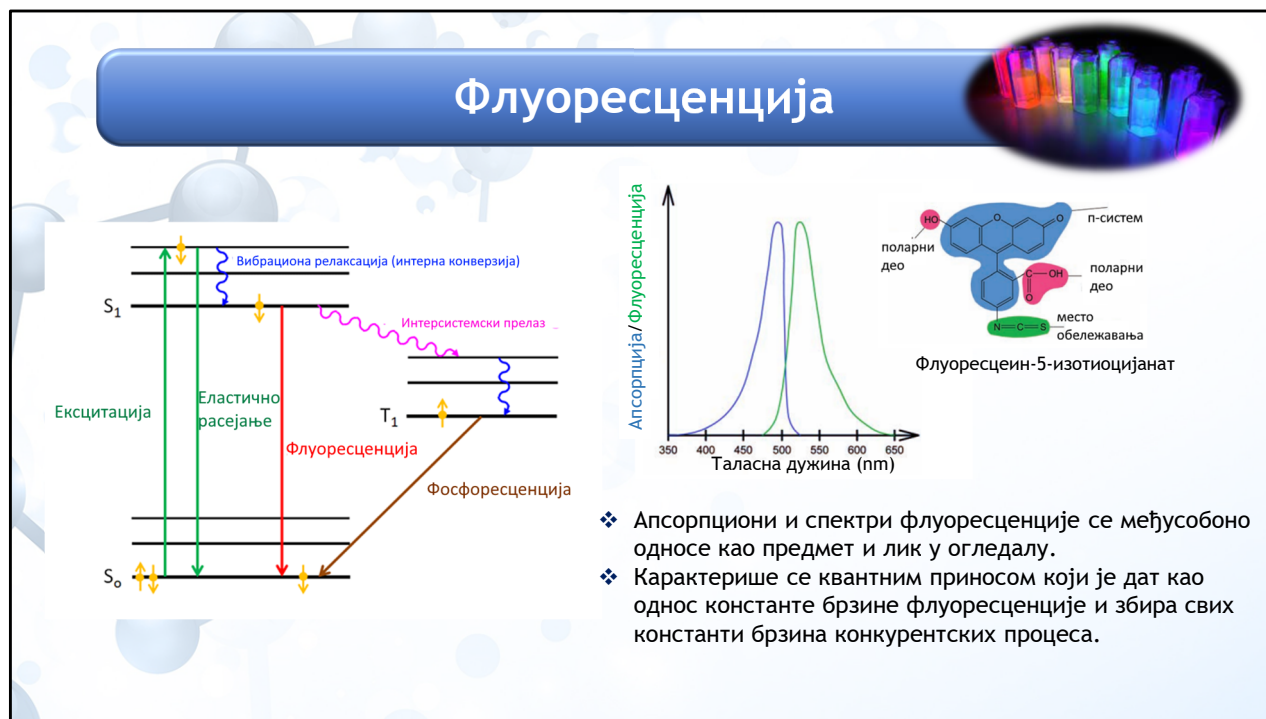
## УВ-Вис спектрофотометрија



- ❖ Нуклеинске киселине - апсорпција на око 260 nm.
- ❖ Екстинкциони коефицијент опада у низу: појединачне базе > РНК > ДНК.
- ❖ Хипохромни ефекат у ДНК потиче од наслојавања базних парова - тзв. stacking



- ❖ Денатурација ДНК - у спектру се јавља као хиперхромни ефекат.
- ❖ Однос апсорбанција на 260 и 280 nm се користи за процену чистоће ДНК: када је >1,8 ДНК се сматра да је чист.



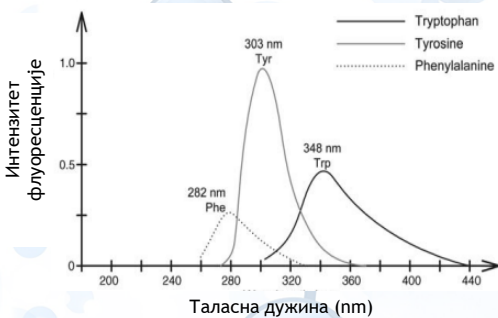
Kada molekul apsorbuje foton, i pobudi se sa osnovnog elektronskog stanja na više elektronsko stanje (pobuđivanje sa singletnog stanja  $S_0$  na npr. singletno stanje  $S_1$ ), višak energije može da se oslobodi na više različitih načina. U većini slučajeva se prvo događa vibraciona relaksacija, pri čemu se molekul veoma brzo (na nivou piko- do femtosekunde) oslobađa viška vibracione energije, predajući je okružujućim molekulima rastvarača. Tako se molekul relaksira do osnovnog vibracionog stanja višeg elektronskog stanja. Ovaj proces je neradijativan, tj. ne emituje se zračenje. Vibraciona relaksacija se drugačije zove i interna konverzija. Sa osnovnog vibracionog stanja višeg elektronskog stanja molekul se relaksira emisijom fotona, pri čemu se vraća na osnovno elektronsko stanje. Ovaj proces je radijativan i naziva se fluorescencija. Fluorescencija se uvek događa između singletnih stanja.

Singletno stanje je stanje sparenih spinova, čija je multipletnost 1, a tripletna stanja su stanja pri kojima su spinovi nesparesni, tj. molekuli usled ekscitacije postaju privremeno paramagnetici i imaju ukupan elektronski spin 1, a multipletnost prema formuli  $2S+1$  je jednaka 3. Prelazi između stanja iste multipletnosti su dozvoljeni, a različite multipletnosti zabranjeni (tj. događaju se sa vrlo malom verovatnoćom, ukoliko dolazi do značajnog preklapanja talasnih funkcija vibracionih nivoa singletnog i tripletnog stanja).

Fosforescencija se događa kada neradijativnom relaksacijom, koja se naziva intersistemski

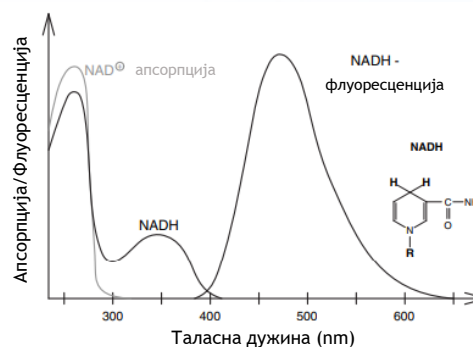
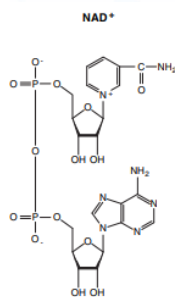
prelaz, molekul pređe sa singletnog stanja u tripletno ( $T_1$ ). Zatim dolazi do vibracione relaksacije do osnovnog vibracionog nivoa tripletnog stanja, nakon čega se ponovo događa prelaz sa tripletnog stanja ( $T_1$ ) na singletno stanje  $S_0$ , praćen emisijom fotona što se naziva fosforescencija.

## Флуоресценција - протеини и нуклеинске киселине



- ❖ Никотинамид аденин динуклеотид (NADH) показује апсорпцију на 260 nm и у оксидованом и редукованом облику. Редуковани облик има пик и на 340 nm.
- ❖ Међутим, флуоресценцију показује само редуковани облик при чему је максимум емисије на 460 nm.

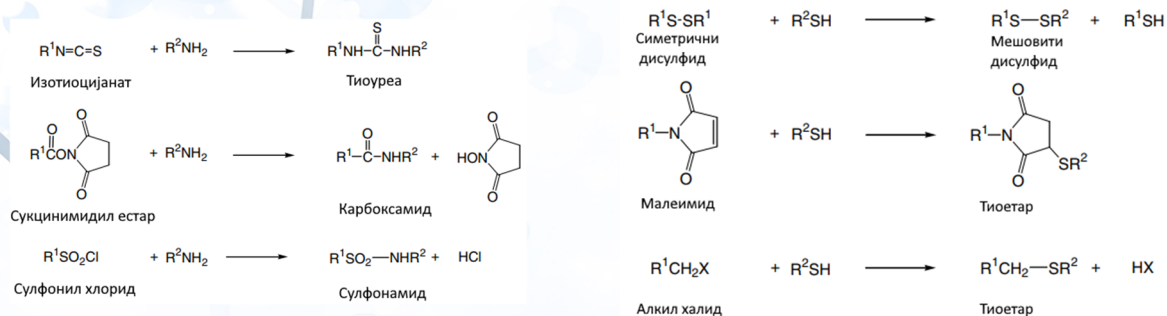
- ❖ Све три ароматичне аминокиселине које апсорбују на око 280 nm показују флуоресценцију при овој ексцитационој таласној дужини, док се триптофан може селективно побудити (без побуђивања друге две АК) ексцитацијом на 295 nm.



NADH, kao i odnos redukovanog i oksidovanog oblika je važan za praćenje redoks statusa, zbog čega je značajno što se ova dva oblika spektralno razlikuju.

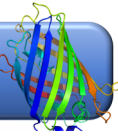
## Флуоресцентно обележавање

- ❖ У протеинима се обично ковалентно за примарне amino- или сулхидрилне групе везују флуоресцентни обележивачи.
- ❖ Ако се ДНК модификује тако да има примарне amino-групе, могу се користити исти обележивачи као за протеине.
- ❖ Мора да се води рачуна о рН средине при обележавању.
- ❖ Мутагенезом специфичном за одређено место могу да се експримују протеини који имају цистеин било где (докле год не нарушава структуру испитиваног протеина и активно место ензима од интереса, који се могу флуоресцентно обележити).

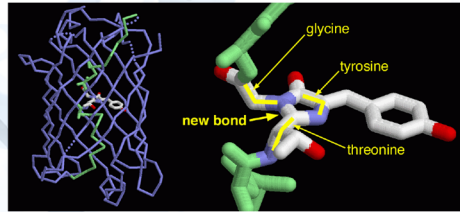


Fluorescentno obeležavanje je važno i za fluorescentnu mikroskopiju i spektroluorimetrijska istraživanja, a primenjuje se zato što mnogi biomolekuli od interesa nemaju fluorofore.

## Флуоресцентно обележавање - GFP



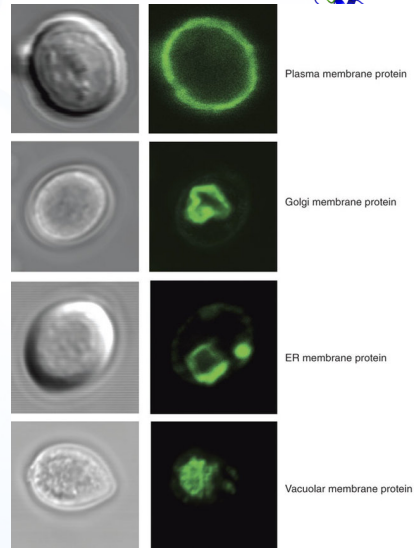
Aequorea victoria



GFP - green fluorescent protein

Хромофору чине серин, тирозин и глицин - три суседа у примарној структури - заштићени у средишту  $\beta$ -бурета. Циклизација ове три АК се дешава аутокаталитички, па нису потребни кофактори.

Фузионише се са протеинима чије праћење је од интереса за истраживања, пошто је нетоксичан и не ремети структуру циљаног протеина, лако се експримује, јер сам ген садржи све информације за посттранслационе модификације, а такође је хромофора отпорна на фото-избељивање.



GFP је скраћеница од Green Fluorescent Protein.

Често се користи за fluorescentно obeležavanje других proteina. Prirodno се sintetise kod nekih vrsta meduza (videti sliku na slajdu). Pokazuje maksimum apsorpcije na oko 400 nm, a fluorescencija na oko 510 nm. Ima strukturu beta-bureta u čijem centru se nalazi hromo-/fluorofora.

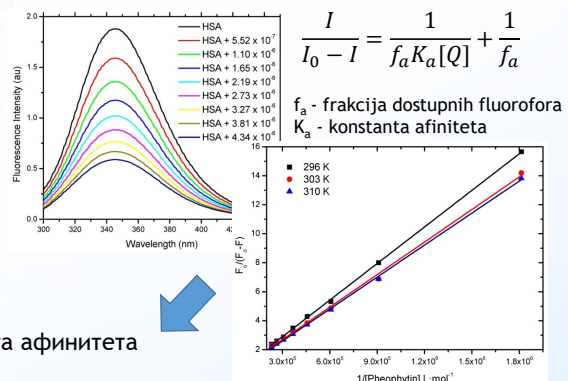
## Флуоресцентна спектроскопија

- ❖ Код протеина који имају бар један триптофан, могу да се ексцитацијом на 295 nm прате конформационе промене протеина услед везивања лиганда, денатурације...
- ❖ Дешава се плави померај ако се повећава хидрофобност средине.
- ❖ Може доћи до гашења флуоресценције (квенчовања) у присуству неких супстанција које изазивају нерадијативне прелазе, услед тога што индолни прстен лако предаје електрон у побуђеном стању.
- ❖ Штерн-Фолмер:  $\frac{I}{I_0} = 1 + k \cdot \tau \cdot [Q]$

$I$  - интензитет флуоресценције у присуству квенчера  
 $I_0$  - интензитет флуоресценције у одсуству квенчера  
 $\tau$  - време живота флуорофора без квенчера  
 $k$  - константа брзине квенчовања биомолекула  
 $[Q]$  - концентрација квенчера

- ❖ Гашење флуоресценције услед близине молекула воде.

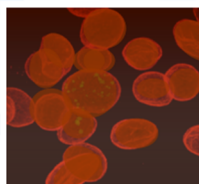
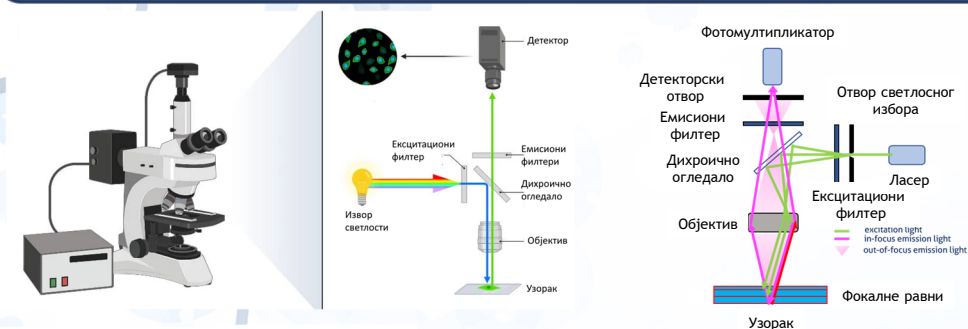
Рачуна се константа афинитета



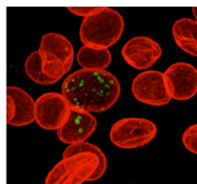
Квенчовање флуоресценције може бити статичког или динамичког типа. Статичко квенчовање потиче од везивања квенчера за протеин (настајања протеин лиганд комплекса), док динамичко потиче од судара између молекула квенчера и флуорофора. Разликују се према константи брзине квенчовања.

Уколико је квенчовање статичког типа, повећањем концентрације квенчера и очитаванjem интензитета флуоресценције триптофана, може се на основу представљања зависности  $I/(I_0 - I)$  у функцији  $1/[Q]$ , из нагиба одредити константа афинитета везивања квенчера за протеин.

# Флуоресцентна микроскопија

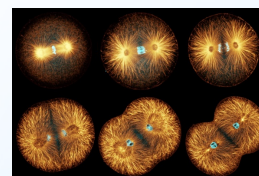


Флуоресцентна микроскопија



Конфокална микроскопија

❖ Конфокална микроскопија - употреба ласера; фокусирање зрака тако да слика може да се добије из различитих слојева узорка - много боља резолуција.

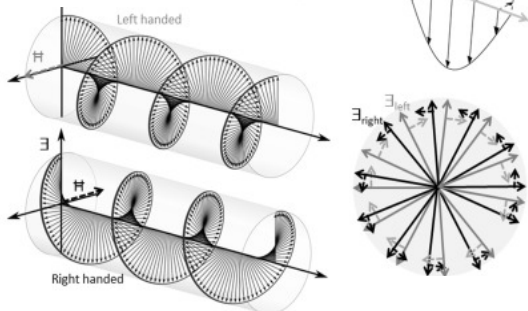


Узорак који показује флуоресценцију се може посматрати под флуоресцентним микроскопом. Узорак се озрачује светлошћу која пролази кроз филтер, којим се бира одређена, екситациона таласна дужина. Овом таласном дужином ће бити изазвана флуоресценција у узорку. Након филтера, зрак светлости долази до дихроичног огледала (делилац зрака – селективно рефлектује и пропушта зрачење одређених таласних дужина) које рефлектује зрак ка узорку. Зрак пролази прво кроз објектив, па долази до узорка где изазива флуоресценцију. Емитовани флуоресцентни фотони поново пролазе кроз кондизаторско сочиво објектива и пролазе кроз дихроично огледало и емисиони филтер, који дозвољава пролаз светлости веће таласне дужине (овaj филтер служи да се деo светлости који је рефлектован од узорка елиминише и да дод детктора дођу само флуоресцентни фотони. Такође, емисиони филтер служи за селекцију само одређеног опсега таласних дужина у случају да узорак садржи више флуорофора са различитим емисионим пиковима).

## Циркуларни дихроизам

Линеарно поларизован  
талас

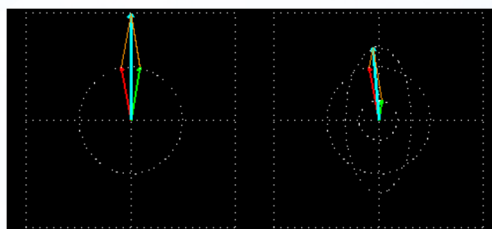
Циркуларно поларизован  
талас



- ❖ Структурно асиметрични молекули (хирални) у различитој мери апсорбују лево и десно поларизовану светлост.

$$\Delta A = A_l - A_r \quad A = (\epsilon_l - \epsilon_r)cl \quad \Delta\epsilon = \epsilon_l - \epsilon_r$$

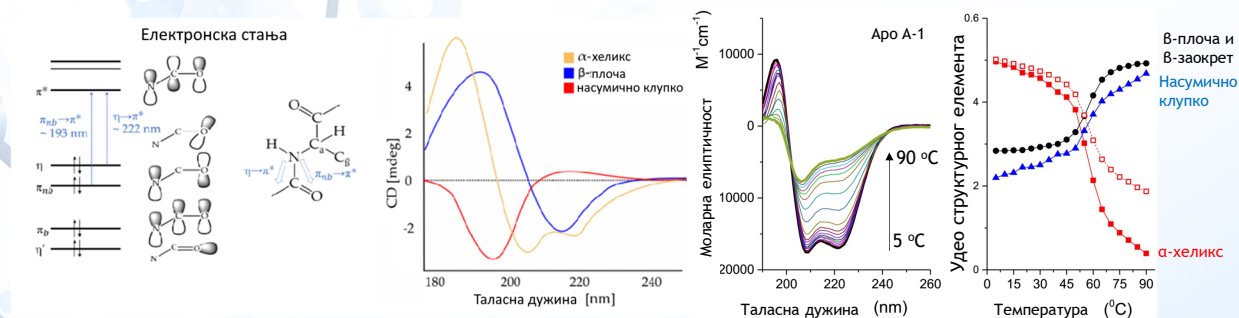
- ❖ Елиптичност ( $\Delta\epsilon$ ) зависи од таласне дужине, конформације молекула, концентрације, температуре и хемијског окружења.



Линеарно поларизован електромагнетни талас је талас код којег вектор електричног (односно магнетног) полја осцилује по синусном закону у једној равни. Циркуларно поларизован талас је талас код којег вектор електричног (односно магнетног) полја не мења интензитет, али мења правец и смер, односно описује спиралу око правца простирања. Када се саберу лево и десно поларизован талас истог правца простирања, ако су у одговарајућој фази могу да дају линеарно поларизован талас. Код циркуларног дихроизма, неполаризовано светло се линеарно поларизује, а затим претвара у циркуларно поларизовано светло којим се озрачује узорак. Када се хирални молекули озраче линеарно поларизованим светлошћу, лево и десно поларизована светлост неће бити у истој мери апсорбована. Елиптичност је величина која је једнака разлици екстинкционих коефицијената апсорпције лево и десно поларизоване светлости.

## Циркуларни дихроизам - протеини

- ❖ Пептидне везе апсорбују у области 190-230 nm.
- ❖ Јака трака на 190 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) и слаба на око 210-220 nm ( $n \rightarrow \pi^*$ )
- ❖ ЦД у далекој УВ области (190-250 nm) даје информације о пептидној вези и последично секундарној структури.
- ❖ ЦД у блиској УВ области (250-300 nm) потиче од ароматичних аминокиселина и цистеина у дисулфидним везама - терцијарна структура.



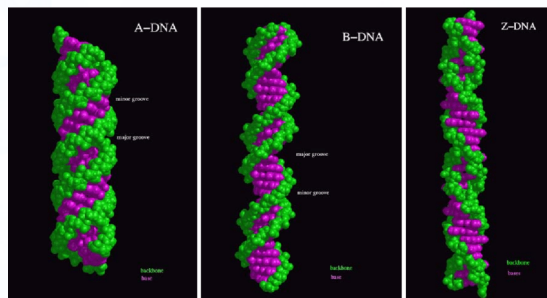
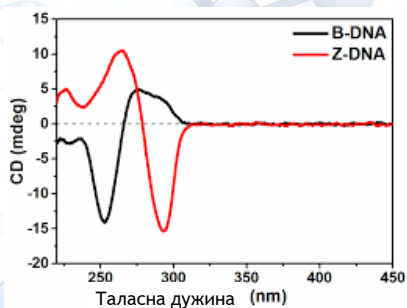
Različiti tipovi sekundarnih struktura i strukturnih motiva daju različite CD spektre. Obično se udeo određenog tipa sekundarne strukture određuje poređenjem sa bazama, koje sadrže spektre peptida i proteina koji imaju predominantno jedan tip strukture. Na osnovu ovih podataka iz baza dobijeni eksperimentalni spektar ispitivanog uzroka se računski razlaže (vrši se dekonvolucija) na spektre sastavnih strukturnih elemenata i računa se doprinos određenog tipa strukture u ukupnom spektru.

Cd se može koristiti za ispitivanje svega što izaziva promene u sekundarnoj ili tericjarnoj strukturi – konformacione promene pri različitim uslovima, vezivanje liganada itd.

Na poslednje dve slike je prikazano kako se menjaju CD spektri proteina Apo A-1 (Apolipoprotein A-1) sa povećanjem temperature, a nakon dekonvolucije spektara je prikazano kako se menjaju udeli raznih struktura sa temperaturom, na osnovu čega se može odrediti i temperatura faznog prelaza (npr. ireverzibilnog) – u konkretnom primeru dobijaju se neke informacije slične i komplementarne sa kalorimetrijskim metodama.

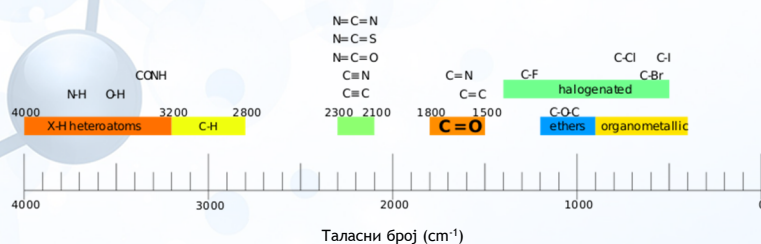
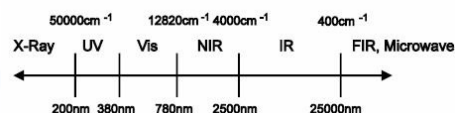
## Циркуларни дихроизам - нуклеинске киселине

- ❖ Теоријска основа ЦД-а ДНК је веома комплексна, па не може да пружи структурне информације на атомском нивоу.
- ❖ Углавном се користи емпиријски.
- ❖ Потребна мала концентрација ДНК - 25  $\mu\text{g/ml}$



## Вибрациона спектроскопија - инфрацрвена

- ❖ Блиска ИЦ област - овертонови, комбинационе траке слабог интензитета; траке су широке и преклапају се. Користи се за квантификацију алкохола, амина и свих једињења који садрже C-H, N-H или O-H групе.
- ❖ Средња ИЦ област - основни модови вибрација, најчешће коришћена област за биофизичка испитивања.
- ❖ Далека ИЦ област - није од значаја за испитивање биолошких узорака.

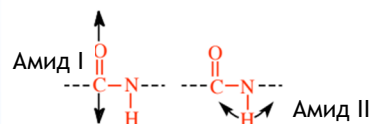


## Инфрацрвена спектроскопија (ФТ-ИЦ)

- ❖ За проучавање протеина најважније маркиране три траке које потичу од пептидне везе.
- ❖ У интервалу  $1500\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$  вибрације бочних група.

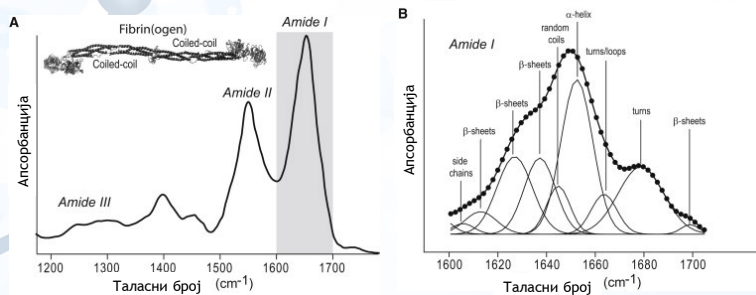
Вибрација	Таласни број ( $\text{cm}^{-1}$ )	Опис
Амид А	3270-3310	N-H истезање (80%), C-N истезање
Амид Б	3030-3100	N-H истезање
Амид I	1600-1700	C=O истезање
Амид II	1510-1580	C-N истезање, N-H савијање
Амид III	1200-1400	C-N истезање, N-H савијање
Амид IV	625-767	O=C-N савијање
Амид V	640-800	N-H савијање ван равни
Амид VI	537-606	C=O савијање ван равни
Амид VII	200	Торзија протеинског скелета

- ❖ Амид А - осетљива на промене у јачини водоничних веза.
- ❖ Због учешћа пептидне везе у формирању секундарне структуре, Амид I и II траке су осетљиве на промене у секундарној структури.
- ❖ Тачан положај зависи од структурног елемента.



## Инфрацрвена спектроскопија (ФТ-ИЦ)

Структурни елемент	Амид I	Амид II
$\alpha$ -хеликс	1650-1660 $\text{cm}^{-1}$	1550 $\text{cm}^{-1}$
$\beta$ -плоча	1615-1637 $\text{cm}^{-1}$ и око 1700 $\text{cm}^{-1}$	1520 $\text{cm}^{-1}$



Na ovom slajdu je ilustrovano kako pozicija amidnih traka zavisi od toga u okviru kog strukturnog elementa se nalazi peptidna veza. Kao i slučaju CD-a, poznavanjem talasnih brojeva na kojima se pojavljuju pikovi amidnih traka u pojedinim strukturnim elementima, moguće je izvršiti dekonvoluciju ukupnog spektra na pikove pojedinačnih strukturnih elementa i pratiti promene u svakom od strukturnih elementa pojedinačno.

## Инфрацрвена спектроскопија (ФТ-ИЦ)

- ❖ Проблем снимања биолошких узорака због присуства воде која даје јаке траке које се могу видети на спектру десно ->
- ❖ Мора да се одузима спектар воде или да се користи тешка вода, или велика концентрација протеина.
- ❖ АТР (Attenuated Total Reflectance) - алтернатива за водене узорке
- ❖ Лака припрема, нема оштећења узорка, пошто зрак продире у узорак само неколико микрона.



Тешка вода се користи због тога што се њене траке у ИЦ сектру јављају на другачијим позицијама у односу на  $\text{H}_2\text{O}$ . Time се разликују траке -OH истежучих вибрација испитиваних биомолекула од трака -OD из тешке воде. (Видети слику доле десно)

АТР - од енглеског Attenuated Total Reflectance (пригушена totalна рефлексија)

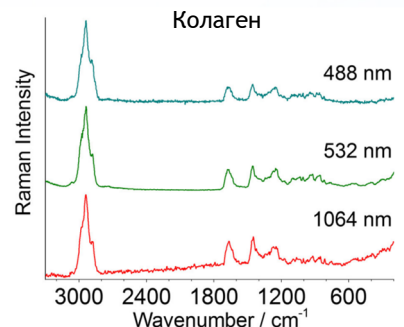
То је метода ИЦ спектроскопије која се може користити како за чврсте и праškасте узорке, тако и за течне. Код ове методе, ИЦ зрачење пролази под углом кроз кристал (обично дијамант) на којем се налази узорак и на додриној површини између кристала и узорка се потпуно рефлектује. Рефлектовани зрак путује ка детектору. При рефлексији, део ИЦ зрачења продире неколико микрона у узорка у којем се апсорбује и тај део зрачења се назива еванесцентно (пролазно зрачење). Дубина продирања ИЦ зрачења у узорка зависи од индекса преламанја коришћеног кристала и узорка. ИЦ спектар узорка се добија у суштини као разлика између инцидентног ИЦ зрачења и оног које је рефлектовано ка детектору.

Код биолошких узорака, допринос трака воде укупном ИЦ спектру може да се уманји коришћењем АТР-а, управо на основу тога што ИЦ зрачење продире само неколико микрона у узорак.

## Раманска спектроскопија

- ❖ ИЦ - потребно је да се у току вибрације мења електрични диполни момент
  - ❖ Раман - потребно је да се у току вибрације мења поларизабилност
  - ❖ Последица је да су углавном везе са већим диполним моментом активне у ИЦ, а са мањим у Раманској спектроскопији.
  - ❖ Пептидна група исто има 9 трака као у ИЦ.
  - ❖ Најважније за одређивања конформације:
    - Амид I (C=O истезање,  $1600-1690\text{ cm}^{-1}$ ),
    - Амид II (C-N истезање, N-H савијање,  $1480-1580\text{ cm}^{-1}$ )
    - Амид III (C-N истезање, N-H савијање,  $1230-1300\text{ cm}^{-1}$ )
- Рађена су истраживања у којима је тражена корелација између положаја Амид I и Амид III и удела  $\alpha$ -хеликса и  $\beta$ -плоча добијених кристалографски.

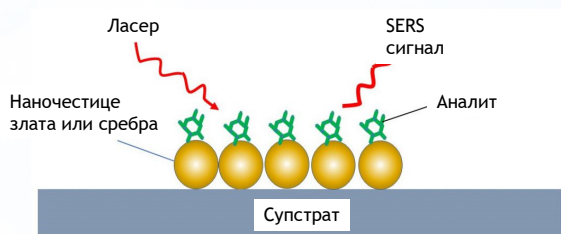
Структурни елемент	Амид I	Амид III
$\alpha$ -хеликс	$1662-1655\text{ cm}^{-1}$	$1272-1264\text{ cm}^{-1}$
$\beta$ -плоча	$1674-1672\text{ cm}^{-1}$	$1242-1227\text{ cm}^{-1}$



Kao i kod IC spektroskopije, kod proteina položaj Amid I i III trake zavisi od strukturnog elementa u okviru kojeg se nalaze peptidne veze od kojih potiče signal.

## Раманска спектроскопија

- ❖ Предност у односу на ИЦ - лакши је рад са воденим растворима, није потребна посебна припрема узорка.
- ❖ Треба водити рачуна о таласној дужини ласера и примењеној снази.
- ❖ Превелико  $\lambda$  - слабија осетљивост пошто је интензитет Раманског расејања пропорционалан са  $1/\lambda^4$
- ❖ Мање  $\lambda$  - могућа појава флуоресценције и деградација узорка.
- ❖ За биолошке узорке је често оптималан избор ласера из блиске ИЦ области.
- ❖ Осетљивост се може повећати коришћењем SERS-a (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy)
- ❖ Појачање Раманског расејања између  $10^6$  и  $10^{12}$  пута



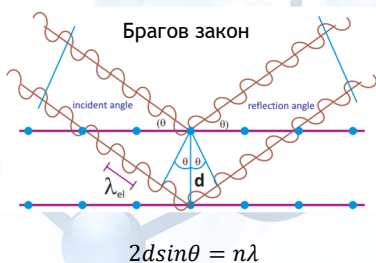
SERS - površinski pojačana Ramanska spektroskopija

SERS efekat se postiže kada se analit adsorbuje na pripremljenu metalnu površinu.

Ramanski ekscitacioni laser proizvodi površinske plazmone (kolektivne koherentne oscilacije elektrona) na površini metala. Kada se primeni određena talasna dužina svetlosti, takva da odgovara frekvenciji oscilacija elektrona, dolazi do lokalne površinekerezonancije plazmona, pri čemu natsaju tzv. "vruće tačke". U ovim tačkama se pojačava loklano električno polje blizu površine metala, značajno pojačavajući Ramansko rasejanje molekula analita koji se nalaze na metalu. Najčešće korišćeni metali su nanočestice zlata ili srebra. Nanočestice ovih metala se koriste zbog toga što je neophodan određen nivo hrapavosti metalne površine. Optimalna veličina čestica je 20-100 nm, pri korišćenju talasnih dužina lasera od 532 do 780 nm.

## Кристалографија Х-зрацима

- ❖ Проучавање атомске, тј. тродимензионалне структуре
- ❖ Почива на дифракцији рендгенских зрака на електронском облаку, пошто је њихова таласна дужина реда величине међуатомских растојања.
- ❖ Добија се 3Д слика електронске густине на основу положаја и угла дифрактованих зрака.



$$F(h, k, l) = \sum_{j=1}^N f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)}$$

$$I(h, k, l) \sim |F(h, k, l)|^2$$

Структурни фактор представља збир свих расејаних зрака на свим атомима.

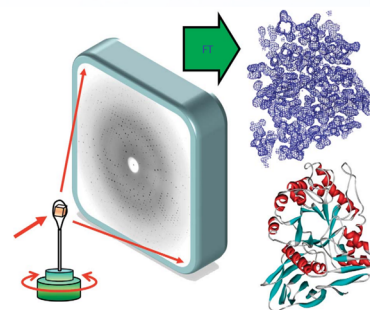
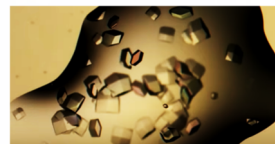
$$\rho(h, k, l) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} F(h, k, l) e^{2\pi i(hX + kY + lZ)} - \text{електронска густина}$$



Rosalind Franklin

## Кристалологија Х-зрацима

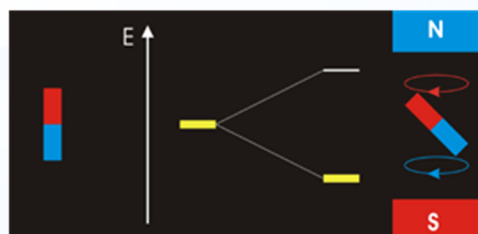
- ❖ Експресија протеина, пречишћавање, кристализација.
- ❖ Неки протеини не могу да кристалишу!!!
- ❖ Проблем мембранских протеина
- ❖ Протеини нису у нативној средини, па је стога упитна и њихова конформација.
- ❖ Добијање дифрактограма, па анализа Фуријеовом трансформацијом, међутим недостаје информација о фази дифрактованог зрачења - фазни проблем.
- ❖ Експериментално тражење фаза - изоморфне замене везивањем металних јона за протеине.
- ❖ У случају постојања атома који апсорбују Х-зраке, мењањем таласне дужине Х-зрака могу се добити информације о фази.
- ❖ Ако су познате структуре других сличних молекула, рачунају се структурни фактори за сваку оријентацију познатог молекула. Поређењем се добија оријентација познатог молекула, која најбоље осликава испитивани. Затим се посматра слагање при translацији у јединичној ћелији.



## Магнетно-резонантне технике

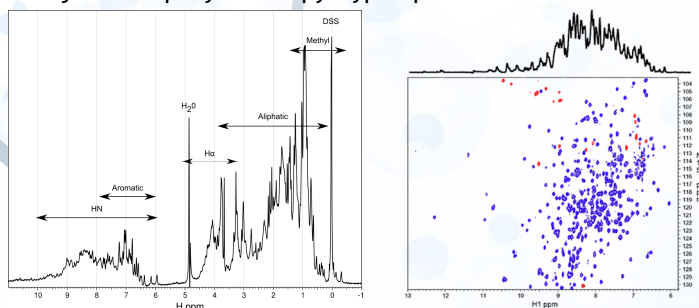


Потребно да постоји укупни спин (електронски или нуклеарни) различит од нуле.



## Нуклеарна магнетна резонанција

- ❖ Налажење атомске структуре испитиваних молекула.
- ❖ При проучавању протеина, служи за испитивање терцијарне структуре.
- ❖ Хемијски помераји говоре о структури молекула.
- ❖ Мултиплетност даје информације о томе на који начин су атоми повезани.
- ❖ Нуклеарни Оверхаузеров ефекат (НОЕ) - процењивање раздаљине између спинова кроз простор (не кроз везе), ако су оне 1-5 Å.
- ❖ Коришћењем посебних пулсних секвенција добијају се 2Д, 3Д, 4Д спектри на основу којих се израчунава структура протеина.



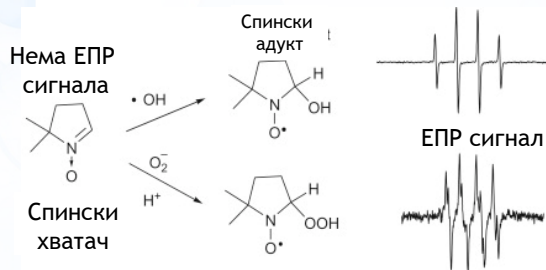
- ❖ Предност у односу на кристалографију је испитивање протеина у раствору у нативном облику, значајно лакша припрема узорка.
- ❖ Мана - мањи протеини, до 35000 Da

## Електронска парамагнетна резонанција

- ❖ Детекција хемијских врста са бар једним неспареним електроном - слободни радикали и прелазни метали у различитим оксидационим стањима - нека оксидациона стања нису ЕПР активна. За ЕПР активна оксидациона стања метала могуће одређивање координације метала у комплексу.
- ❖ Физиолошки присутни радикали нису стабилни ( $10^{-9}$  s), па морају да се посредно детектују:
  - ❖ супероксидни анјонски радикал -  $O_2^{\cdot-}$
  - ❖ хидроксил радикал -  $OH^{\cdot}$
  - ❖ азот-моноксид - NO

Спински хватачи (Spin-trap) - једињења која реагују са слободним радикалима дајући као производ релативно стабилан радикал (спински адукт)

Не могу да се користе *in vivo* (због токсичности и високе цене), али могу за ћелијске културе, хомогенате ткива...



## Електронска парамагнетна резонанција

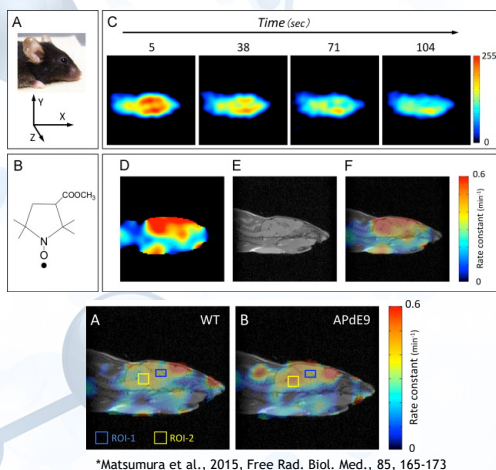
- ❖ Детекција радикала, или боље редокс статуса, спинским пробама
- ❖ Редокс статус говори о односу концентрација реактивних кисеоничних врста (слободних радикала) са једне стране и антиоксидативних врста са друге.



Spinske probe su paramagnetni molekuli koji mogu imati različite strukture i primene. Na ovom slajdu je prikazano kako nitroksidne spinske probe, koje imaju N-O grupu, u kojoj se nalazi nespareni elektron (taj elektron je zaštićen susednim metil, etil ili nekim drugim grupama) mogu da se koriste za ispitivanje redoks statusa.

Redoks status govori o odnosu oksidujućih i redukujućih vrsta u ćelijama, tkivima, organizmu. Pri izloženosti raznim tretmanima ili pri mnogim patološkim stanjima redoks balans je narušen što se može detektovati primenom nitroksidnih spinskih proba. One mogu da se oksiduju, gubeći nesparen elektron do oksoamonijum katjona ili da se redukuju, dobijajući elektron do hidroksilamina. Pri tome ova dva oblika nisu EPR aktivna jer više nema nesparenog elektrona. Injektovanjem spinskih proba životinjama, ili dodavanjem spinskih proba ćelijskim kulturama, homogenatima, različitim tkivima, i posmatranjem kinetike nestajanja EPR signala usled oksidacije i redukcije nitroksidnih proba, može se zaključiti da li pri nekom tretmanu ili zbog neke patologije dolazi do promene u redoks statusu. Razumevanje redoks statusa pomaže u razumevanju patogeneze i mehanizma raznih bolesti, a time i razvoj odgovarajućih medikamenata.

## ЕПР - Алцхајмерова болест



\*Matsumura et al., 2015, Free Rad. Biol. Med., 85, 165-173

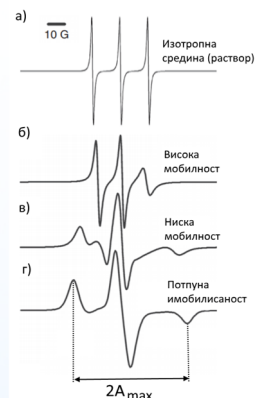
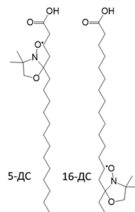
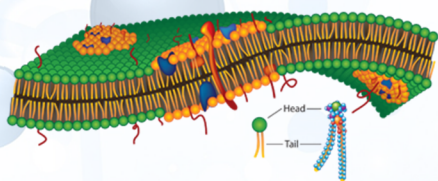
### Закључци:

- Постојање оксидативног стреса у хипокампусу испитиваних мишева
- Драстичном порасту количине Аβ-плакова претходи промена у редокс статусу.

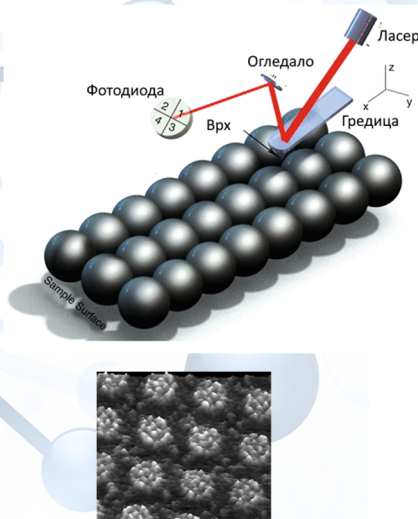
Korišćenjem linernog gradijenta magnetnog polja, moguće je pomoću EPR-a raditi i imidžing, koji daje prostornu distribuciju injektovanih spinskih proba. Ukoliko je moguće da se dobijena slika preklopi sa anatomskim snimkom, moguće je utvrditi u kojim regionima se spinska proba najviše nakuplja ili gde se brže troši.

## ЕПР/спинско обележавање - протеини и мембране

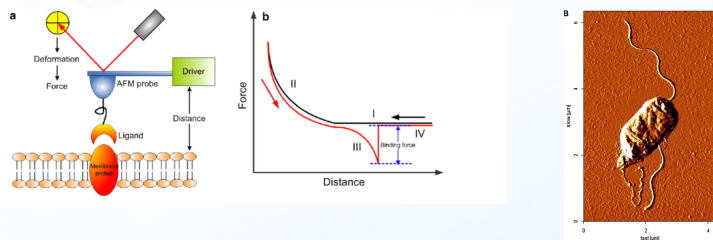
- ❖ Метода којом се стабилни радикал (нитроксид), спински обележивач, везује за протеине или уграђује у мембране одакле обликом свог ЕПР спектра даје информацију о својој околини.
- ❖ Спински обележивачи су својеврсни „шпијуни“ - у зависности од свог окружења дају различите сигнале.
- ❖ Неке информације које се могу добити спинским обележавањем:
  - ❖ изложеност обележивача води
  - ❖ „чврстина“ или флексибилност места где се налази обележивач
  - ❖ растојања између појединих делова протеина, чиме се разоткрива структура протеина....



# Микроскопија атомске силе



- ❖ Доступне информације на нанометарској скали
- ❖ Могућ рад са чврстим и течним узорцима
- ❖ Снимање живих ћелија, вируса, бактерија - бесконтактни мод
- ❖ Визуелизација мембрана
- ❖ Јачина везе између протеина и лиганда
- ❖ Одређивање крутости/еластичности ћелија



AFM (Atomic Force Microscopy) je tehnika koja nam omogućava da posmatramo i merimo površinske strukture sa jedinstvenom rezolucijom i tačnošću. Mikroskop atomske sile nam dozvoljava, na primer, da dobijemo slike koje prikazuju raspored individualnih atoma u uzorku ili strukture svakog molekula ponaosob. Za AFM nisu potrebni ekstremni uslovi (ultravisoki vakuum i kriogene temperature), već može da se izvodi u fiziološkim puferima na 37°C da bi se kontrolisale biološke reakcije, i čak posmatrao njihov tok u realnom vremenu. Veoma male slike veličine 5 nm, koje pokazuju samo 40-50 individualnih atoma, mogu da se prikupe da bi se izmerila kristalografska struktura materijala, ili mogu da se dobiju slike od 100  $\mu\text{m}$  i više koje istovremeno pokazuju oblike desetina živih ćelija. Osim što se koristi kao mikroskop, odnosno kao instrument za snimanje slika, AFM poseduje i različite "spektroskopske" modove, koji mere druge osobine uzoraka na nanometarskoj skali.

AFM mikroskopi rade na principu ispitivanja površine pomoću izuzetno oštrog vrha na silicijumskoj sondi. Ovaj vrh se koristi za imidžing uzorka skeniranjem po površini liniju po liniju, iako se metoda dramatično razlikuje između različitih režima rada. Dve osnovne grupe režima rada široko su definisane kao kontakti način i dinamički, ili tapping način.

Osnovni princip AFM-a je da je ovaj nanometarski vrh pričvršćen na malu elastičnu gredicu. Kada vrh dođe u kontakt sa površinom, gredica se savija, a savijanje i veličina

savijanja se detektuje pomoću lasera i podeljenog fotodetektora (lasersko zračenje se odbija o ogledalo sa zadnje strane gredice i pada na fotodiodu). Ovo savijanje ukazuje na silu interakcije između vrha i uzorka. U kontaktnom režimu, vrh se pritisne uz površinu, a preko električne povratne sprege prati se sila interakcije između vrha i uzorka, kako bi se rastojanje između površine i vrha držalo konstantnim tokom skeniranja.

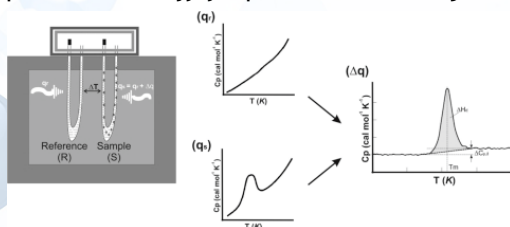
U donjem redu date su slike kojima su prikazane neke primene AFM-a u biofizičkoj hemiji - Slika levo - snimljeni akvaporini na površini ćelija

Slika u sredini - Ispituje se interakcija između liganda i membranskog proteina, pri čemu je ligand vezan za vrh gredice. Merenjem promene sile pri prevlačenju gredice po površini ka i od membranskog proteina može da se utvrdi da li do interakcije dolazi. Ta interakcija se na grafiku zavisnost sile interakcije od rastojanja beleži kao nagle, oštre promene.

Slika desno - snimak mikroorganizma.

## Диференцијална скенирајућа калориметрија

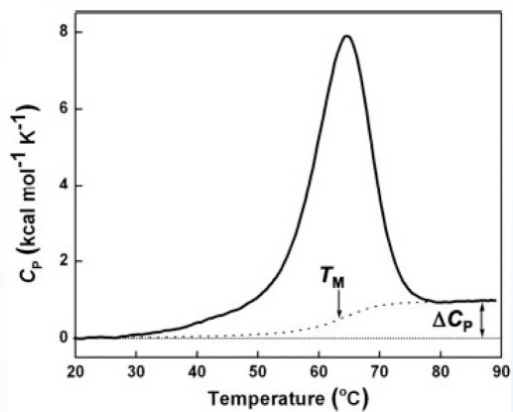
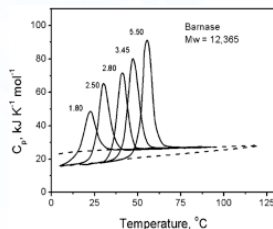
- ❖ Мерење термалних својстава материјала, како би се установила веза између температуре и специфичних физичких својстава супстанције.
- ❖ Директно мерење енталпије које су последица процеса од интереса.
- ❖ Две врсте: базиране на топлотном флуксу и на компензацији снаге.
- ❖ Код прве - узорак и еталон (нпр. растварач без анализата, пуфер) се греју истовремено једнаком линеарном брзином загревања, али због топлотног капацитета ( $C_p$ ) узорка, постоји температурска разлика између узорка и еталона која се мери и прерачунава у топлоту.



- ❖ Код друге врсте - узорак и еталон се држе на истој температури, а мери се разлика у топлоти потребна да температура буде једнака у узорку и еталону.

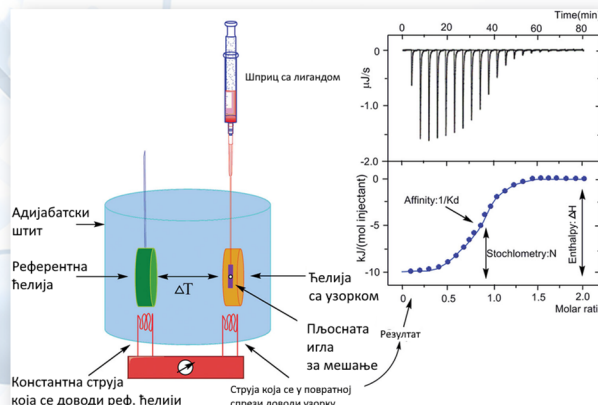
## Диференцијална скенирајућа калориметрија

- ❖ Рачунање термодинамичких параметара - температура прелаза  $T_M$  (нпр. денатурације)
- ❖ Интеграљењем површине испод криве (уз претходно одузимање базне линије) -  $\Delta H_{cal}$
- ❖ Интеграљењем  $C_p/T=f(T)$   $\Delta S$ , па из тога Гибсова енергија  $\Delta G$  и константа равнотеже  $K$
- ❖ Проучавају се:
  - ❖ Конформационе промене протеина и нуклеинских киселина
  - ❖ Фазни прелази у мембранама, липозомима...
  - ❖ Интеракције лиганд/протеин



## Изотермална титрациона калориметрија

❖ Користи се за рачунање термодинамичких параметара и константе везивања лиганда за протеин



Kada se lek ili ligand veže za protein, dolazi do oslobađanja ili apsorpcije toplote. Iako su ove promene male, promene u toploti se mogu precizno izmeriti korišćenjem kalorimetrije. Postoji nekoliko metoda za merenje toplote u biohemijskim sistemima, pri čemu mikrokolorimetri mogu da mere termodinamičke parametre koristeći zapremine od oko 0.1 mL. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija se obično koristi u biohemiji za praćenje savijanja i odvijanja (razmotavanja) proteina. Merenja interakcija između molekula i proteina se obično izvode korišćenjem tehnike nazvane izotermalna titraciona kalorimetrija (ITC), koja se sprovodi na konstantnoj temperaturi i podrazumeva sistematsku titraciju proteina sa lekom. Savremeni instrumenti su sposobni da odrede energetiku vezivanja lekova sa visokom pouzdanošću i tačnošću. ITC meri toplotu koja se apsorbuje ili oslobađa kada se lek uvodi u uzorak koji sadrži protein. U tipičnom testiranju vezivanja leka za protein, špric sadrži koncentrovani rastvor leka i male jednake zapremine leka se injektuju postepeno u ćeliju koja sadrži protein.

Nakon svake injekcije, meri se toplota koja se apsorbuje ili oslobađa u uzorku u poređenju sa referentnom ćelijom. Povratna petlja kontinuirano obezbeđuje toplotnu energiju kako bi održala konstantnu temperaturu u uzorku i referentnim ćelijama, pri čemu se svako oslobađanje ili apsorpcija toplote u uzorku kompenzuje promenom toplotne energije. Kako se više leka injektuje, broj molekula proteina dostupnih za

vezivanje sistematski opada, a oslobađanje toplote se kasnije smanjuje sve dok mesta za vezivanje ne budu zasićena, tj. molekuli leka se više ne mogu vezivati za protein.

Na desnom delu slike prikazan je karakterističan eksperiment titracije (gore desno) sa njegovom obradom (dole desno). Na slici (gore desno), termogram titracije prikazan je kao toplota po jedinici vremena oslobođena nakon svake injekcije liganda u protein. Pri dodatku liganda u protein, toplotni efekti ne potiču samo od interakcije liganda sa proteinom, već i od toplotnih efekata razblaženja liganda u rastvoru. Stoga kao kontrolni eksperiment, treba da se samo pufer bez proteina titruje ligandom i prate toplotni efekti. Na slici (dole desno), predstavljena je zavisnost oslobođene toplote u svakoj injekciji u odnosu na odnos između ukupne koncentracije liganda i ukupne koncentracije proteina. Krugovi predstavljaju eksperimentalne podatke, a linija odgovara najboljem fitu koji uzima u obzir  $n$  identičnih i nezavisnih mesta. Brojni parametri, kao što su entalpija vezivanja ( $\Delta H$ ), entropija vezivanja ( $\Delta S$ ), konstantna asocijacije ( $K_a$ ), stehiometrija vezivanja ( $n$ ), slobodna energija vezivanja ( $\Delta G$ ) i potencijalne interakcije između mesta vezivanja (kooperativnost), mogu se dobiti iz jedne kalorimetrijske titracije, pružajući potpun termodinamičak opis interagujućeg sistema protein/ligand.

## Литература

P. J. Walla, Modern Biophysical Chemistry, 2014