

SPEKTROSKOPSKE METODE ZA ODREĐIVANJE STRUKTURE BIOLOŠKIH MAKROMOLEKULA

D. Krilov

30.01. 2006.



Interakcije u biološkim makromolekulama

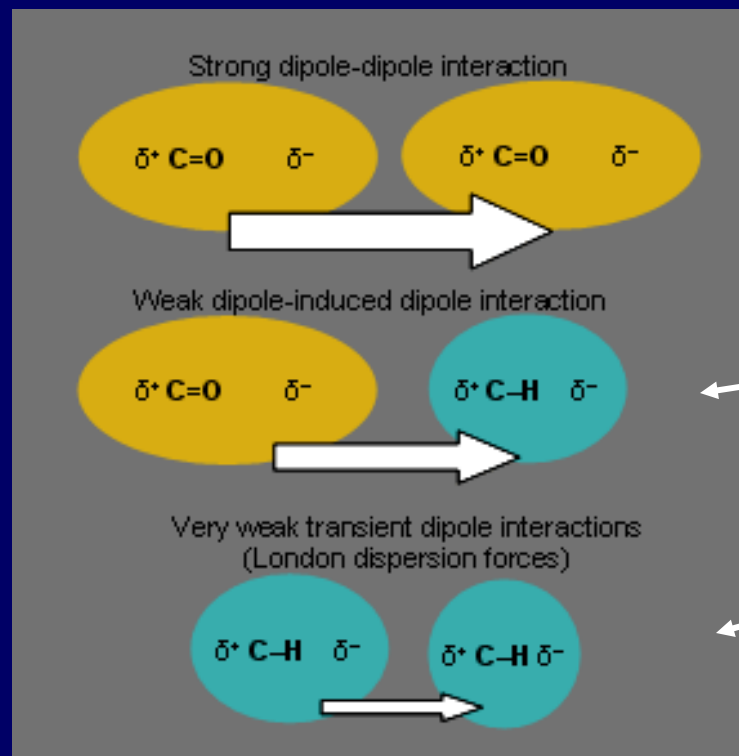
- Van der Waalsove sile; vodikova veza; hidrofobne interakcije; ionske veze
 - interakcije između atomskih skupina u makromolekuli, između makromolekule i manjih molekula ili makromolekule i vode
 - ove interakcije su elektrostatske prirode
 - oko 20 puta su slabije od kovalentne veze
 - omogućuju stvaranje sekundarne i tercijarne strukture makromolekula
-



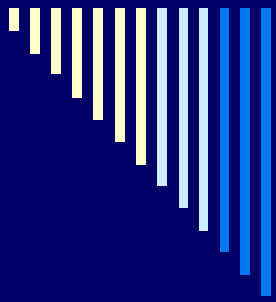
Van der Waalsove sile

- privlačne interakcije između molekula sa popunjenim ljuskama:
- a) nepolarne molekule - interakcije disperzije između nestabilnih dipola nastalih fluktuacijom elektrona
- b) polarne molekule - interakcije dipol-naboj, dipol-dipol, inducirani dipol-dipol, inducirani dipol-inducirani dipol
- potencijalna energija $U(r) = -\frac{B}{r^6}$
- veza nije usmjerena niti zasićena

Energije privlačnih interakcija



- na 25°C prosječna energija interakcije je - 0,07 kJ mol⁻¹ (kinetička energija je 3,7 kJ mol⁻¹)
- energija interakcije je - 0,8 kJ mol⁻¹; ne ovisi o temperaturi
- energija interakcije je oko - 5 kJ mol⁻¹; ovisi o polarizabilnosti molekula

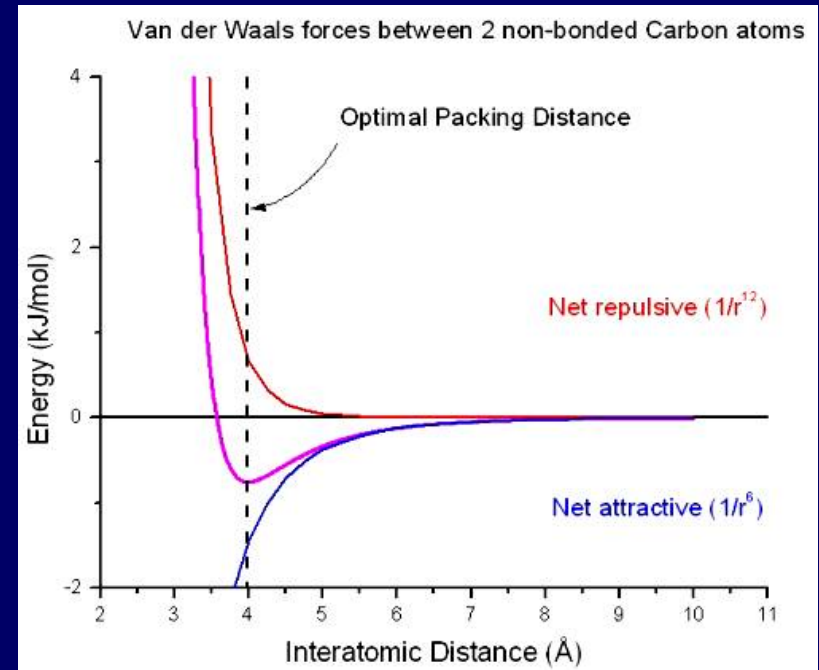


- odbojne interakcije: na vrlo malim udaljenostima postaju dominantne odbojne sile između atomskih jezgara i između elektronskih oblaka:

$$U(r) = A e^{-r/r_0}$$

- radi numeričkih metoda uzima se:

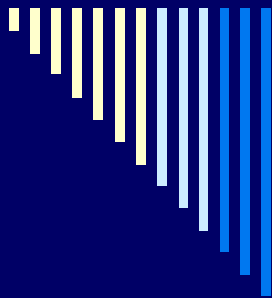
$$U(r) = \frac{A}{r^{12}}$$



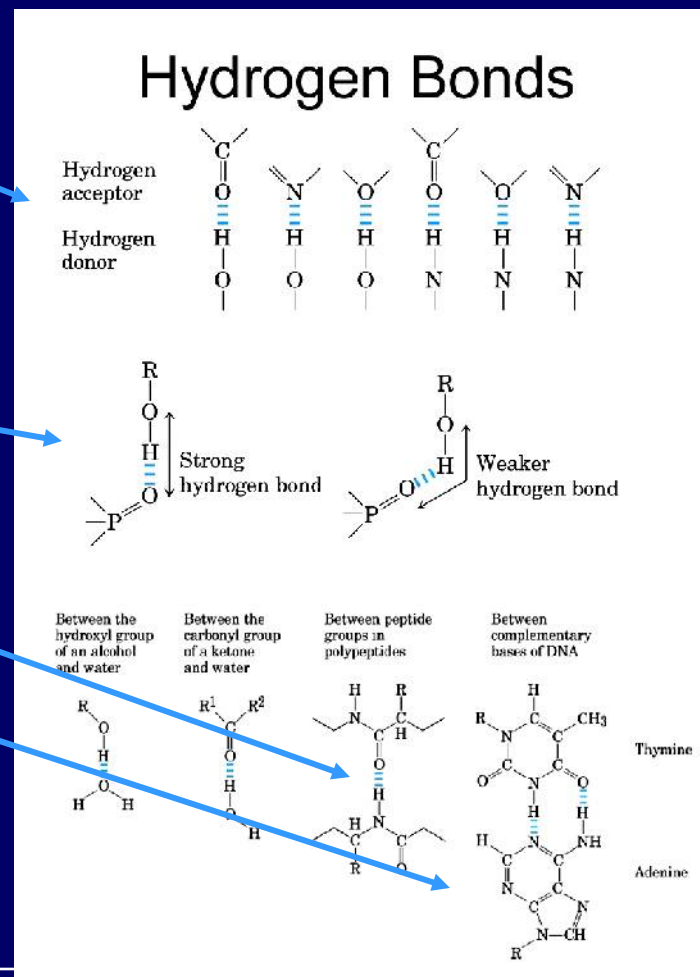


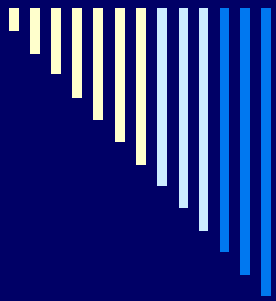
Vodikove veze

- privlačne interakcije koje postoje između molekula s popunjenim ljuskama, specifične strukture: $A - H \cdots B$
 - A i B su jako elektronegativni elementi
 - (najčešće N, O, F)
 - B ima slobodni elektronski par
 - zbog elektronegativnosti A, vodikov atom teži položaju između A i B \Rightarrow H postaje pozitivan a B negativan
 - veza je usmjerena i zasićena
 - energija je oko 20 kJ mol^{-1}
-

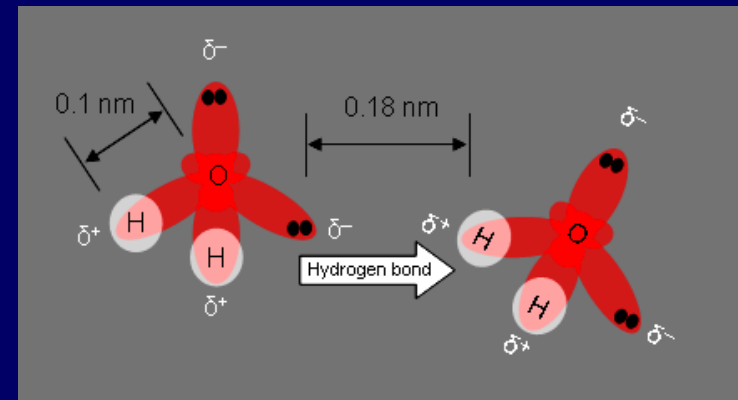


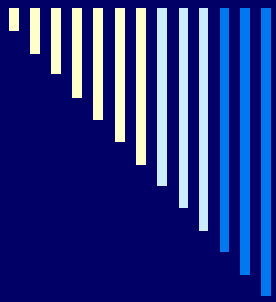
- a) između atoma u susjednim molekulama
- veza je jača kad su atomi na istom pravcu
- primjeri vodikove veze:
- između aminokiselina u polipeptidnom lancu,
- između baza u nukleinskim kiselinama



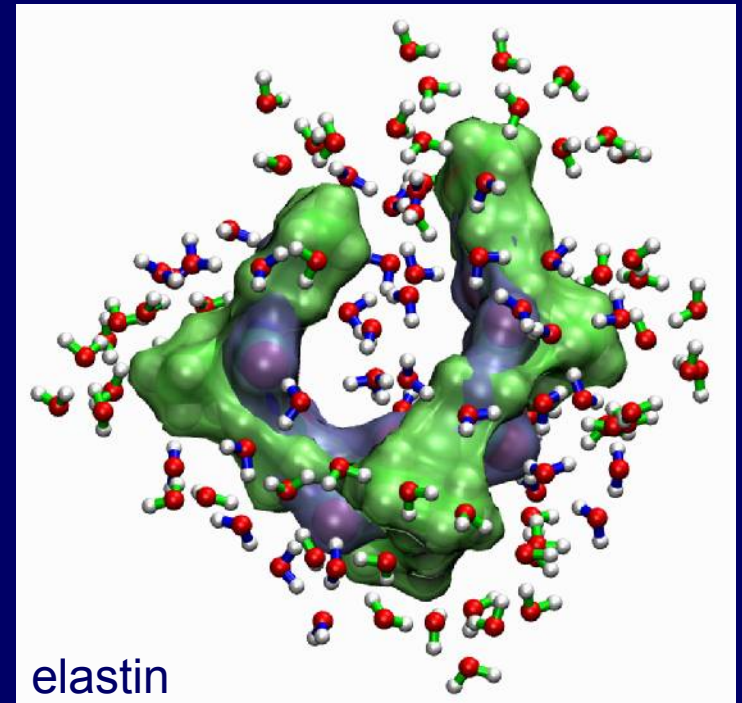


- b) u vodi
- svaka molekula koja stvara vodikove veze s drugom molekulom, stvara ih i s molekulama vode
- zato su veze između dvije molekule slabije kad se otope u vodi
- između molekula vode postoji mreža vodikovih veza



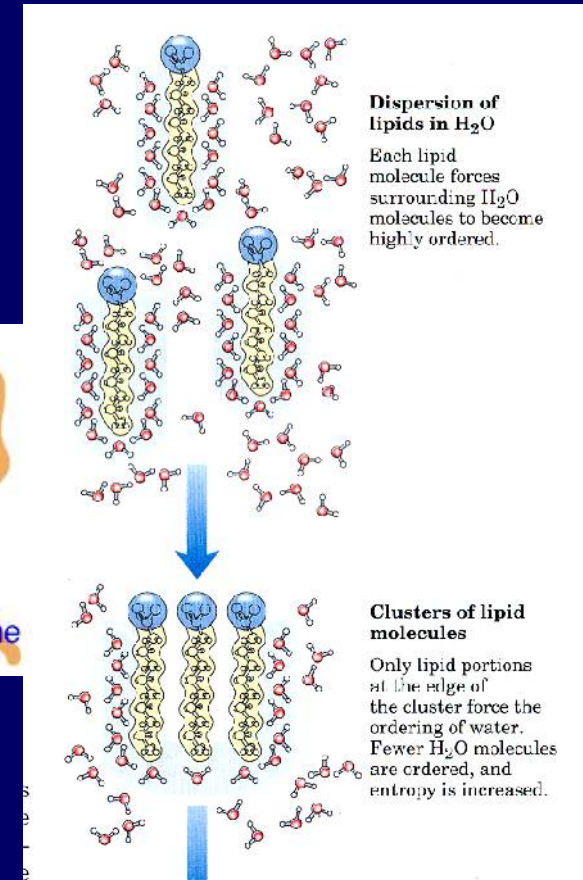
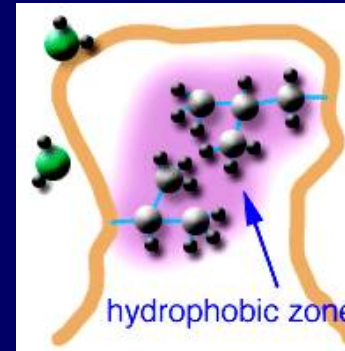


- između površine makromolekule i okolnih molekula vode stvaraju se vodikove veze
- sloj djelomično imobiliziranih molekula vode oko makromolekule čini hidratacijsku ovojnicu

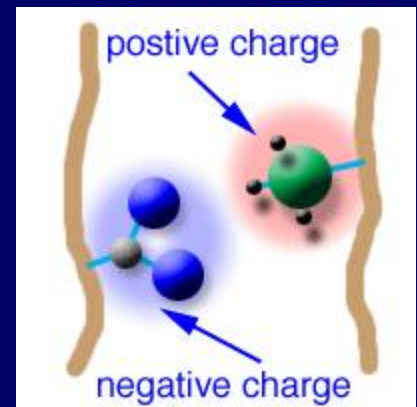
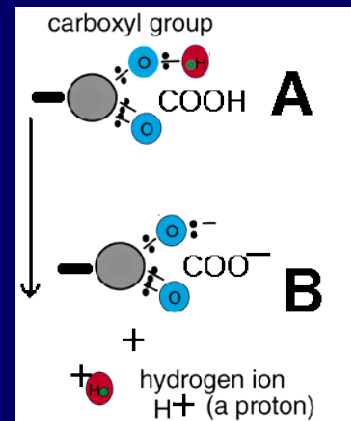


Hidrofobne interakcije

- voda prisiljava hidrofobne grupe da se okupljaju zajedno da bi njihovo djelovanje na mrežu vodikovih veza u vodi bilo minimalno
- to se okupljanje opisuje kao hidrofobna veza, iako je riječ od odbojnim interakcijama molekula vode i hidrofobnih grupa
- ovakva uređenost smanjuje ukupnu energiju i povećava entropiju



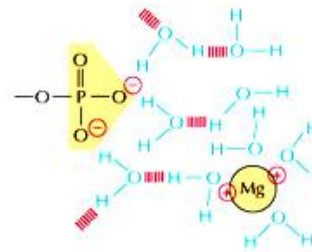
Ionske veze



- a) u molekulama
- ionske kulonske interakcije postoje između nabijenih grupa; jake su kad nema vode između njih
- b) u vodenim otopinama
- ionske interakcije su smanjene i ionske veze su slabe, pogotovo ako su u vodi otopljene soli
- enzim (-) veže se na supstrat (+)

IONIC BONDS IN AQUEOUS SOLUTIONS

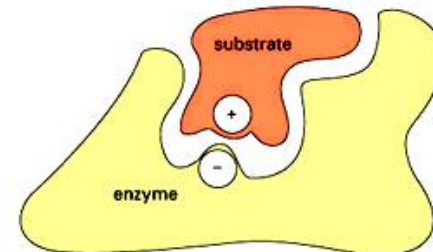
Charged groups are shielded by their interactions with water molecules. Ionic bonds are therefore quite weak in water.



Similarly, other ions in solution can cluster around charged groups and further weaken ionic bonds.



Despite being weakened by water and salt, ionic bonds are very important in biological systems; an enzyme that binds a positively charged substrate will often have a negatively charged amino acid side chain at the appropriate place.

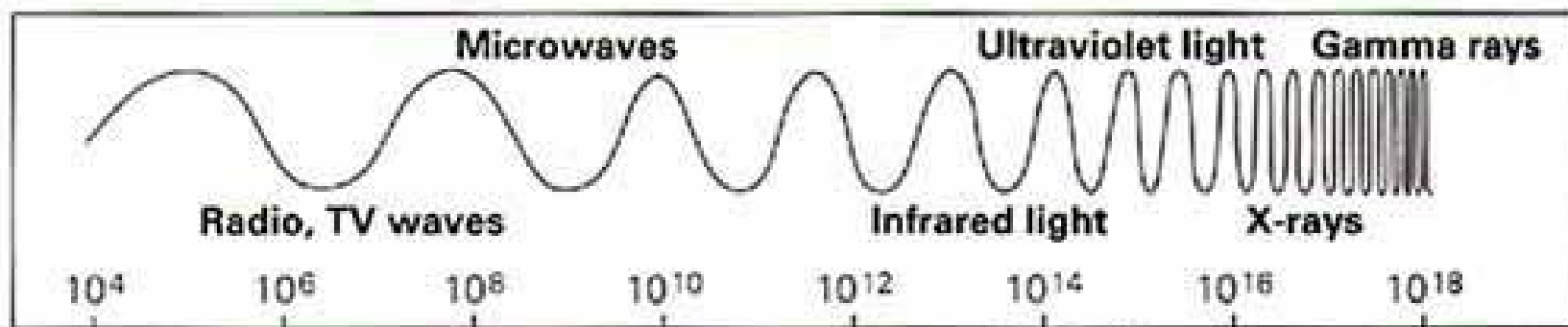




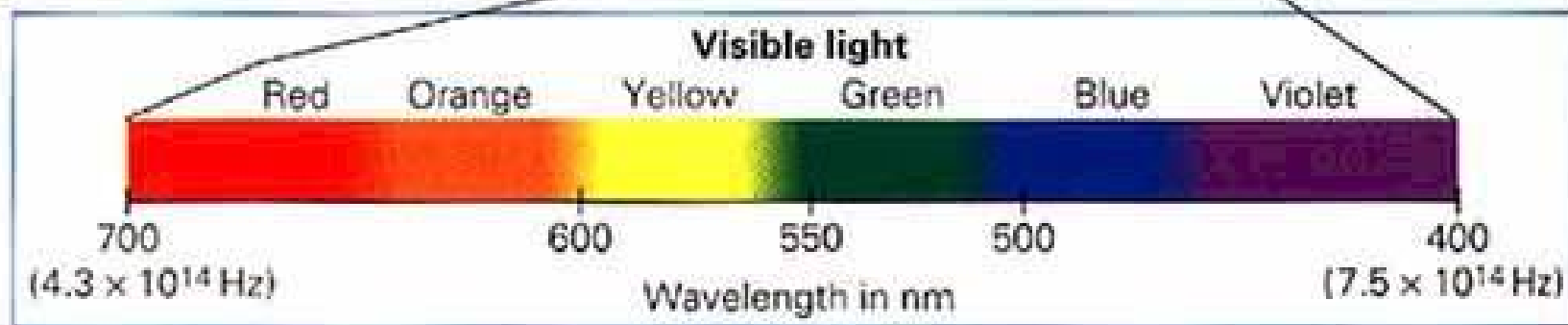
ELEKTROMAGNETSKO ZRAČENJE

- elektromagnetski valovi – komunikacija s okolinom: vid, osjet topline, komunikacijski uređaji (radio, TV, mobiteli ...)
 - interakcija s tvari: informacije o strukturi i dinamici molekula; konformacije makromolekula i interakcija s okolinom
 - izvori: prirodni (atomi, molekule, kozmičke zrake, zvijezde); umjetni (antene, svjetiljke, rtg cijev, kobaltna bomba ...)
-

Elektromagnetski spektar



Frequency in Hz



$(4.3 \times 10^{14} \text{ Hz})$

Wavelength in nm

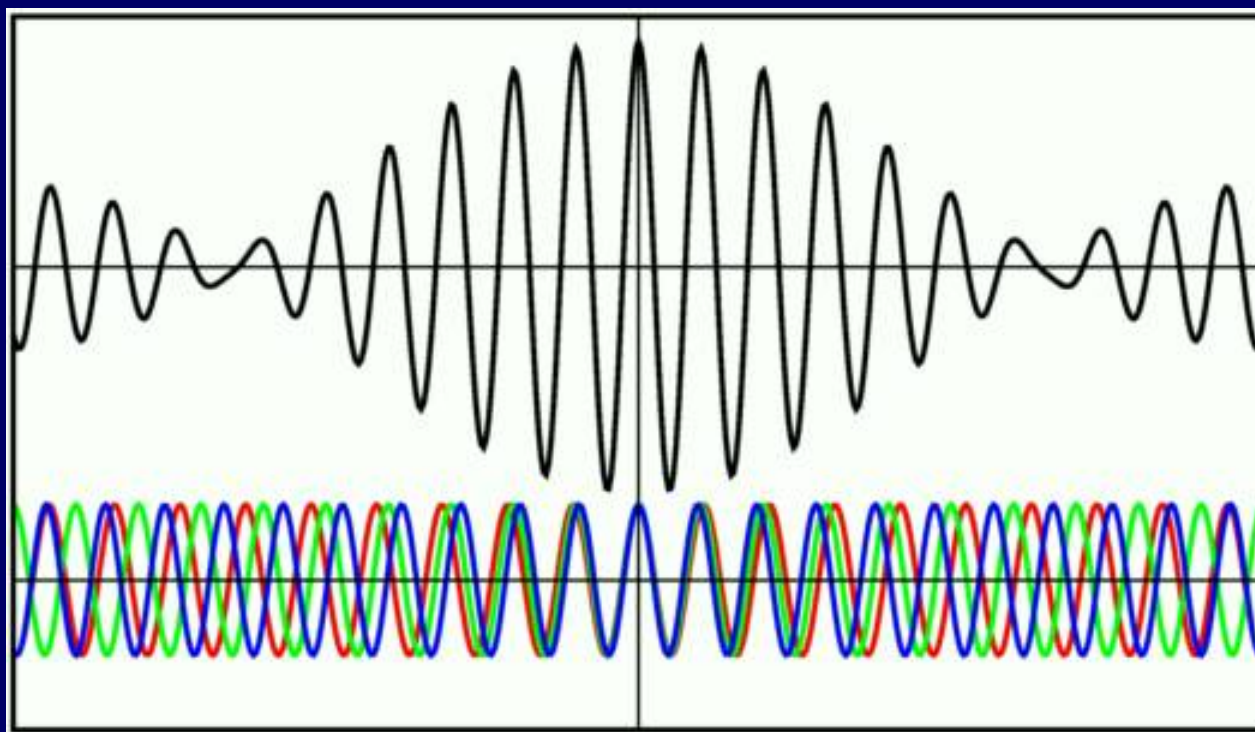
$(7.5 \times 10^{14} \text{ Hz})$



Interakcija elektromagnetskog zračenja i tvari

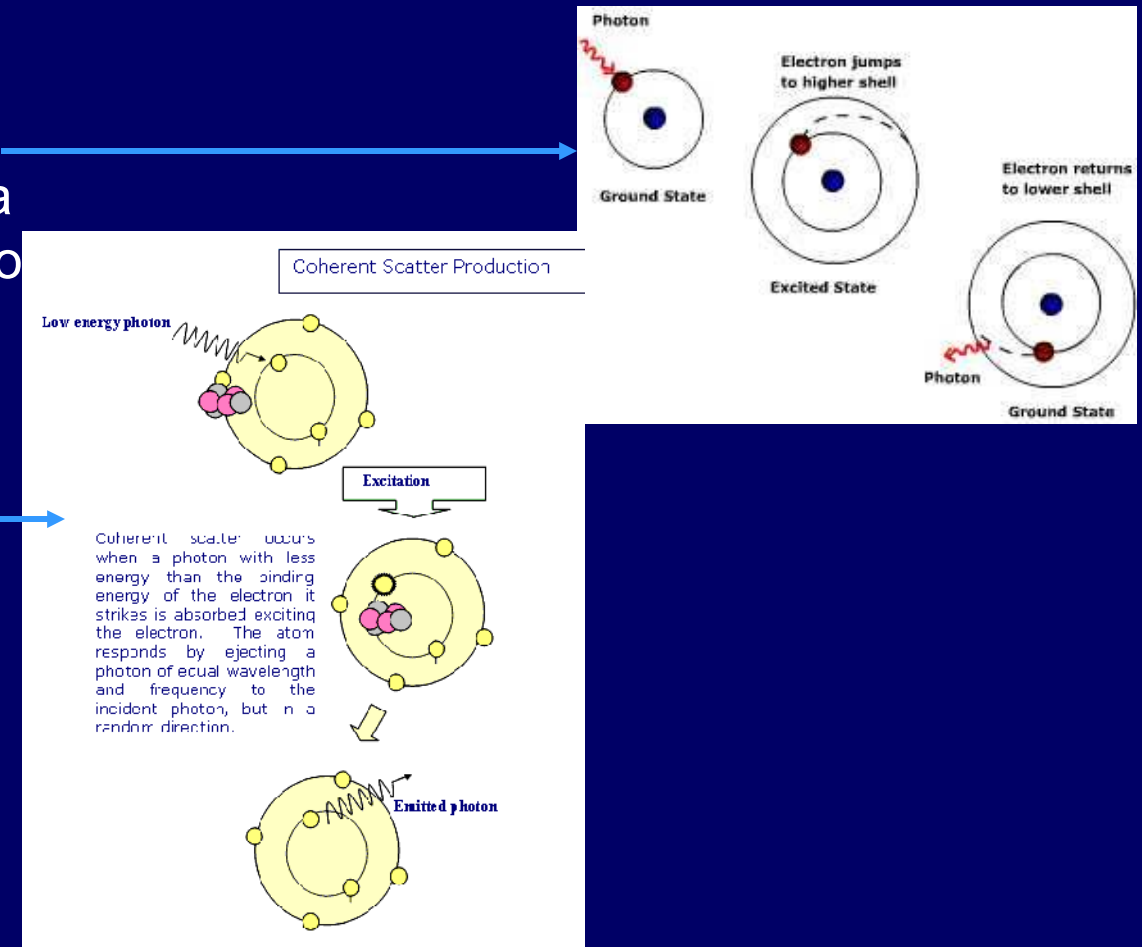
- objašnjava se čestičnom prirodom zračenja: valni paket – foton (Einstein 1905.)
- prirodni i umjetni izvori zračenja nisu čisti harmonijski oscilatori – emitiraju se valovi uskog raspona frekvencija:
 - $\omega = \omega_0 \pm \Delta\omega$, $\Delta\omega \ll \omega_0$
 - interferencija valova bliskih frekvencija – lokalizacija energije $E=h\nu$
 - energija se predaje tvari u kvantima

Valni paket



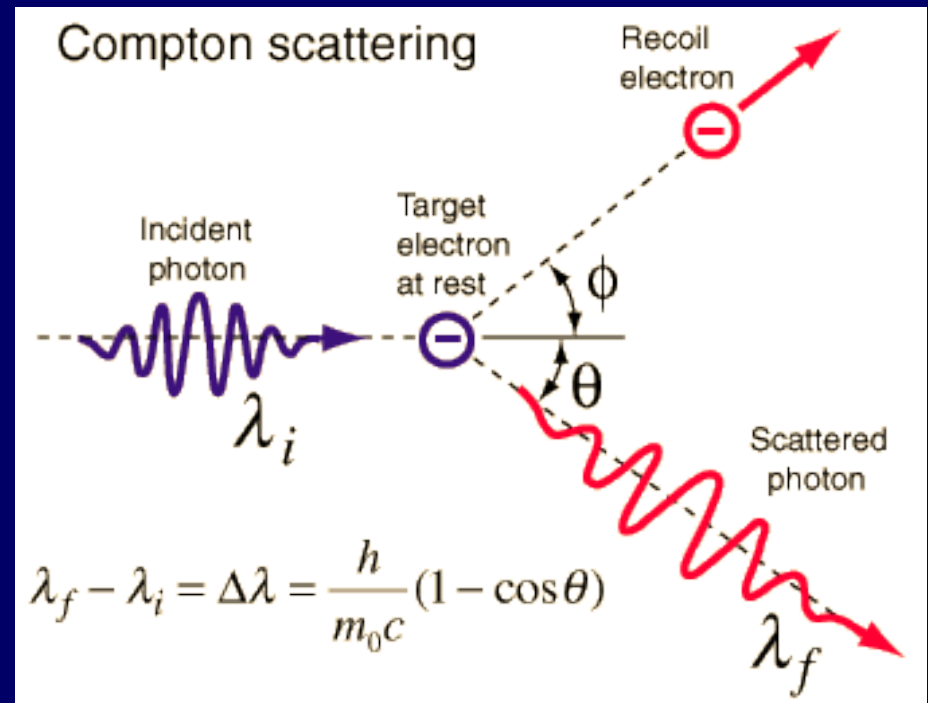
Neionizirajuće interakcije

- apsorpcijom upadnog fotona atom ili molekula prelazi u više energijsko stanje ili se pojačava translacijsko gibanje - zagrijavanje
- elastično raspršenje fotona na atomu



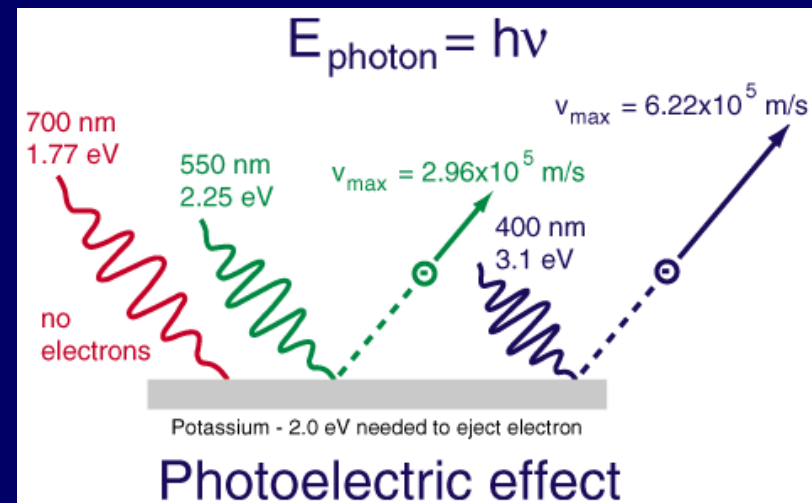
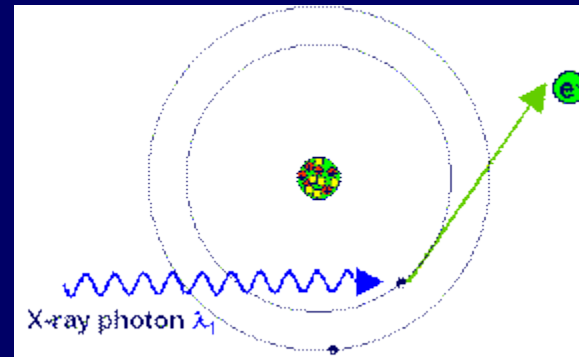
Elastično nekoherentno raspršenje fotona – Comptonov efekt

- sudarom s atomom upadni foton izbacuje elektron iz vanjske orbitale; izlazni foton ima manju energiju i giba se drugim smjerom
- izbačeni elektron može izazvati daljnje ionizacije
- kation se relaksira emisijom sekundarnog fotona
- vjerojatnost interakcije je veća za fotone čija je energija mnogo veća od energije veze elektrona u atomu



Apsorpcija fotona – fotoelektrični efekat

- sudarom s atomom upadni foton se apsorbira i izbacuje se elektron iz unutrašnje ljuske
- izbačeni elektron može izazvati daljnje ionizacije
- kation se relaksira emisijom sekundarnog fotona
- vjerojatnost interakcije je veća za fotone manje energije



$$h\nu = \Phi + \frac{mv_{\text{max}}^2}{2}$$

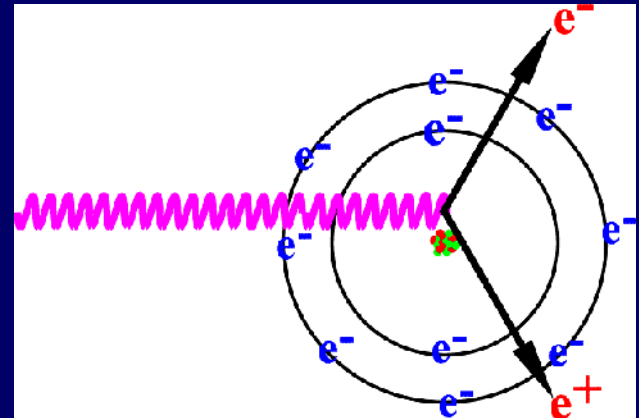
A. Einstein 1905.

Tvorba parova

- u blizini teške jezgre foton energije veće od 1 MeV može se transformirati u par čestica: elektron-pozitron

- $h\nu \geq 2m_e c^2$

- teška jezgra preuzima dio količine gibanja fotona

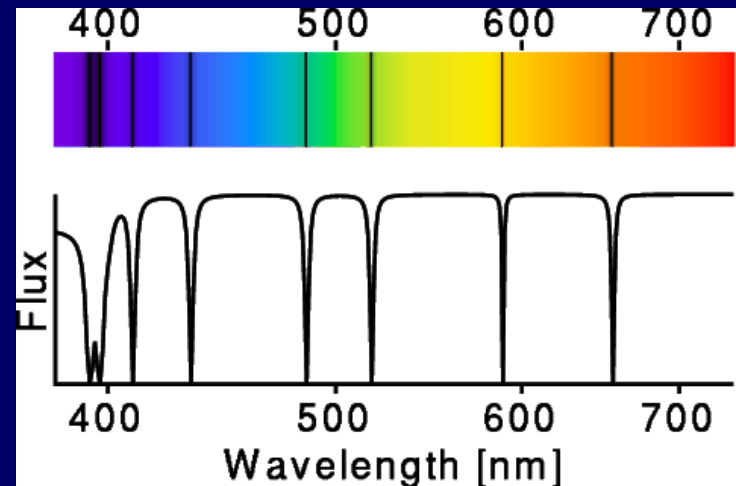


Spektroskopija

- osniva se na interakciji elektromagnetskog zračenja i tvari
- molekula će absorbirati foton ako je njegova energija jednaka razlici dva energijska stanja u molekuli:

$$h\nu = E_n - E_v$$

- tim događajem mijenja se stanje molekule: raspodjela elektrona, električni dipolni moment, magnetski moment jezgre ili elektrona ...

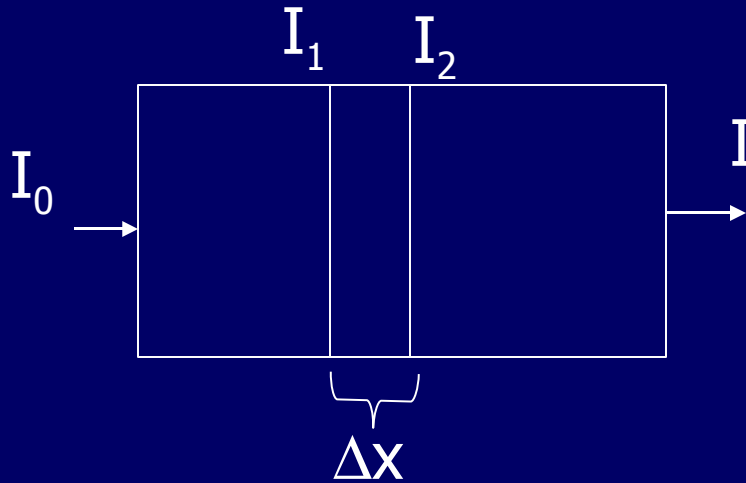


molekula će emitirati foton ako se nalazi u pobuđenom stanju, znači da ima višak energije

U svakoj metodi spektroskopije moguće su interakcije fotona onih energija koje su određene strukturom i svojstvima molekularnog sistema uzorka.

Atenuacija elektromagnetskog zračenja u tvari

Zbog interakcije fotona i molekula tvari smanjuje se intenzitet snopa duž puta

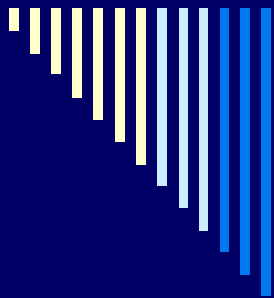


$$\square - \Delta I = I_2 - I_1 = k I_1 \Delta x$$

$$\square - dI = k I dx$$

$$\frac{dI}{I} = -k dx \Rightarrow \int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = -k \int_0^x dx$$

$$I(x) = I_0 e^{-kx}$$



- $k(\lambda)$ je koeficijent atenuacije (apsorpcije) koji ovisi o tvari i o valnoj duljini zračenja
- kada zračenje prolazi kroz otopinu:
- $k(\lambda, c) = \varepsilon(\lambda) c$

molarni
apsorpcijski
koeficijent

koncentracija

- **transmitancija** $T = I / I_0$
- **apsorbancija** $A = -\log I = \log I_0 / I$

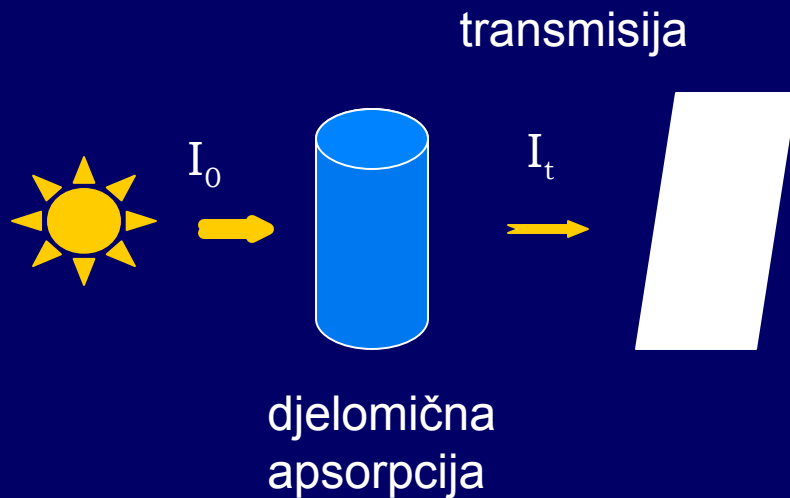


Karakteristični parametri spektra

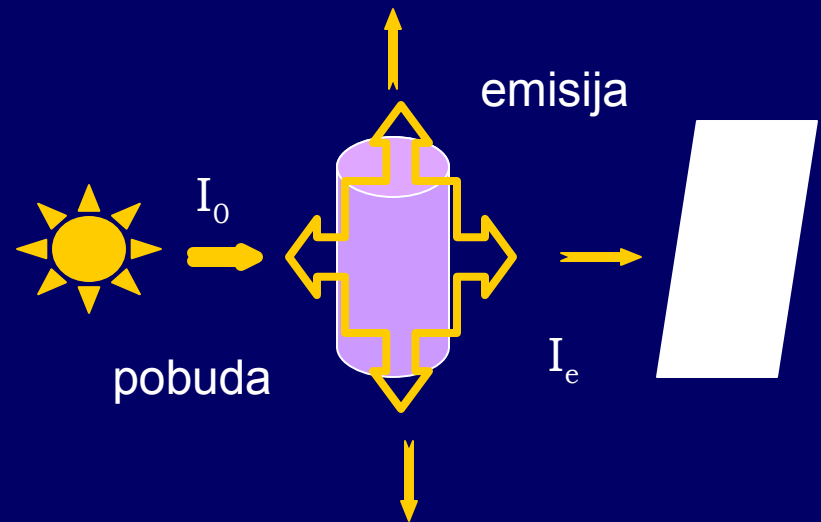
- Spektar je raspodjela intenziteta jedinične valne duljine (I_λ) (apsorbancije, molarnog apsorpcijskog koeficijenta...) o energiji (valnoj duljini, frekvenciji, valnom broju)
- Položaj linije označava energiju prijelaza između dva stanja
- Intenzitet linije govori o broju istovrsnih prijelaza između tih stanja
- Širina linije ovisi o dinamici okoline promatrane molekule; što je veći broj sudara s drugim molekulama, to je kraće vrijeme boravka molekule u određenom stanju; u spektru se to očituje kao linija veće širine
- Osnovno stanje molekule je stanje najmanje energije i u svakom području spektroskopije ono je najviše naseljeno što znači da se najveći broj molekula uzorka nalazi u takvom stanju. To znači da je apsorpcija odgovarajućeg fotona uvijek moguća.

Spektroskopske tehnike

□ Apsorpcijske



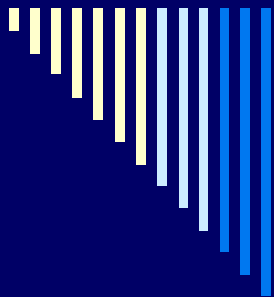
□ Emisijske





Osnovne spektroskopijske metode u biologiji i medicini

- **Apsorpcijske spektroskopije:**
 - 1. Optička ili elektronska spektroskopija – prijelazi elektrona između molekularnih orbitala; promjena strukture elektronskog omotača; spektri u vidljivom i ultraljubičastom području (100-700 nm)
 - 2. Infracrvena spektroskopija – prijelazi između vibracijskih stanja; promjena iznosa električnog dipolnog momenta; spektri u infracrvenom području (800-10000 nm)
 - 3. Elektronska spinska rezonancija – prijelazi između spinskih stanja elektrona u vanjskom magnetskom polju; promjena magnetskog spinskog momenta elektrona; spektri u području mikrovalova (1-10 cm)
 - 4. Nuklearna magnetska rezonancija - prijelazi između spinskih stanja jezgre u vanjskom magnetskom polju; promjena magnetskog spinskog momenta jezgre; spektri u području radiovalova (1 – 10 m)
-



- Emisijske spektroskopije:
- Fluorescencija – molekule se pobuđuju u stanje veće energije ultraljubičastim ili laserskim zračenjem; relaksacijom u osnovno stanje emitiraju zračenje u vidljivom području; molekule ili veće strukture koje nemaju fluorofore obilježavaju se kovalentnim vezivanjem fluorescentnih proba