

Istraživanje inzulina FT-IR spektroskopijom

Rukavina, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:680982>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Matea Rukavina

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Istraživanje inzulina FT-IR spektroskopijom

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Zagreb, 2021.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

9. srpnja 2021.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

10. rujna 2021.

Mentor rada: prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME.....	II
2.1. Infracrvena spektroskopija	ii
2.1.1. Uvod u infracrvenu spektroskopiju.....	ii
2.1.2. Molekulske vibracije	iii
2.1.3. Priprava uzorka.....	vi
2.1.4. FT-IR spektrometar.....	vii
2.1.5. Interpretacija spektra.....	viii
2.2. Proteini.....	ix
2.2.1. Općenito o proteinima.....	ix
2.3. Inzulin	xi
2.3.1. Uloga i sinteza inzulina.....	xi
2.3.2. Struktura inzulina.....	xii
2.3.2. Poremećaj metabolizma ugljikohidrata	xiii
2.4. FT-IR spektroskopija proteina.....	xiii
2.5. Određivanje sekundarne strukture inzulinskih fibrila FT-IR spektroskopijom	xvii
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XX

§ Sažetak

Infracrvena spektroskopija (engl. *infrared spectroscopy*, IR) je instrumentalna metoda strukturne analize koja se temelji na vibracijama molekule. Istraživana molekula u ovom radu je inzulin, hormon β -stanica Langerhansovih otočića gušterače, koji regulira koncentraciju glukoze u krvi, a također djeluje i na metabolizam bjelančevina i masti. U radu je iznesena osnovna teorija IR spektroskopije, navedene poznate sekundarne strukture proteina, opisana struktura inzulina te prikazano istraživanje strukture inzulinskih fibrila FT-IR spektroskopijom. Detaljno je analiziran spektar inzulinskih fibrila pri različitim uvjetima (temperaturi i vrijednosti pH otopine), pri kojima inzulin mijenja svoju sekundarnu strukturu. Raspoznavanje konformacija proteina i razumijevanje njihovog nastanka od velikog je značaja u medicinske i farmaceutske svrhe.

§ 1. UVOD

Infracrveno zračenje obuhvaća dio elektromagnetskog spektra između mikrovalnog i vidljivog područja. Njegovom apsorpcijom pobuđuje se gibanje atoma u molekuli, tj. vibracije. Vibracija je IR aktivna ukoliko se tijekom vibracije mijenja dipolni moment molekule. Ukupan broj vibracija ovisi o broju atoma u molekuli i simetriji molekule, odnosno o tome je li molekula linearna ili nelinearna. IR spektroskopijom moguće je snimati spektre uzoraka u sva tri agregatna stanja. U snimljenim spektrima javljaju se vrpce karakteristične za određene funkcionalne skupine, a cijeli spektar jedinstven je za svaku molekulu.

Za proučavanje strukture proteina moguće je koristiti IR spektroskopiju, no strukturu nije moguće detaljno odrediti zbog veličine i složenosti proteina. Amidne vrpce u spektru ukazuju na sekundarnu strukturu proteina te na prisutnost vodikovih veza. U ovom je radu na temelju amid I vrpce, koja potječe od istezanja C=O veze amidne skupine, proučavana sekundarna struktura inzulina.

Inzulin je peptidni hormon koji se izlučuje iz β -stanica gušterače u krvotok, kada je koncentracija glukoze u krvi visoka. Inzulin stvara interakcije s protein-kinaznim receptorom s vanjske strane stanične membrane te potiče ulazak glukoze u stanicu i njezino korištenje u metaboličke svrhe. Ako je količina raspoložive glukoze veća od potreba stanice, glukoza se djelovanjem inzulina pohranjuje u obliku glikogena ili masti. Inzulin se sastoji od α -uzvojnice, β -ploča i β -zavoja kao gradivnih sekundarnih struktura. Ovaj rad opisuje primjenu FT-IR spektroskopije u istraživanju sekundarne strukture inzulina u različitim uvjetima.

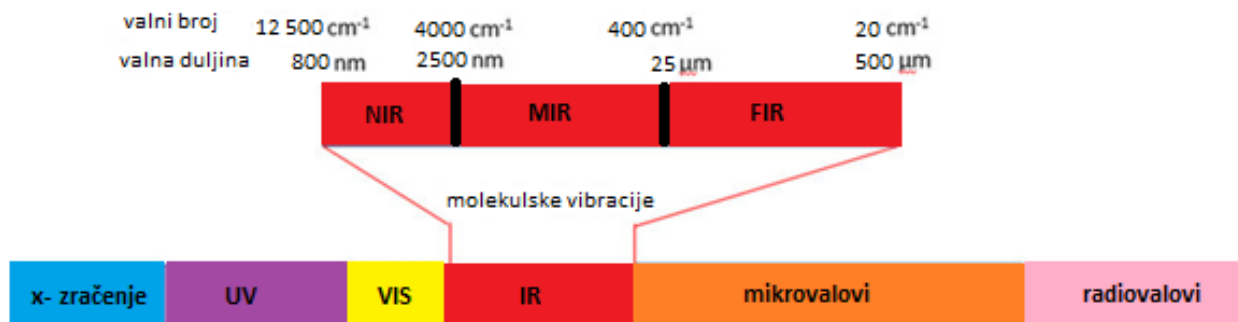
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Infracrvena spektroskopija

2.1.1. Uvod u infracrvenu spektroskopiju

Spektroskopske metode temelje se na interakciji tvari i elektromagnetskog zračenja. Elektromagnetsko zračenje je val definiran amplitudom (A), valnom duljinom (λ) i frekvencijom (ν). Prijelazi između energijskih stanja u molekuli ovise o energiji upadnog zračenja. Prema Einsteinu, elektromagnetsko zračenje putuje u diskretnim paketićima energije $h\nu$ (kvantima svjetlosti). Njihova energija proporcionalna je frekvenciji i valnom broju ($\tilde{\nu}$), a obrnuto proporcionalna valnoj duljini. Područje valnih duljina elektromagnetskog zračenja obuhvaća široku skalu, od γ -zraka ($< 10^{-8}$ cm) do radiovalova ($> 10^4$ cm).¹ Interakcijom molekula s infracrvenim zračenjem pobuđuju se vibracije molekula, zbog čega se infracrveni spektar ubraja u vibracijske spektre.

Apsorpcijske spektroskopske metode, poput IR spektroskopije, temelje se na mjerenju smanjenog intenziteta upadnog zračenja nakon prolaska kroz uzorak, uslijed apsorpcije. Infracrveno zračenje odgovara području valnih brojeva između 12500 cm^{-1} i 20 cm^{-1} , pri čemu se dijeli na blisko (engl. *near infrared*, NIR), srednje (engl. *mid infrared*, MIR) i daleko (engl. *far infrared*, FIR) područje (slika 1). Interakcijom sa zračenjem u NIR području pobuđuju se prijelazi između elektronskih stanja nižih energija te vibracijsko-rotacijski prijelazi, što uzrokuje kombinirane vrpce i više tonove. Viši tonovi su cjelobrojni višekratnici frekvencija osnovnih vibracija, dok kombinirane vrpce nastaju kombinacijom frekvencija osnovnih vibracija. Većina organskih molekula apsorbira zračenje u srednjem području, koje se dijeli na područje funkcionalnih skupina ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) i područje otiska prsta ($1400\text{--}400\text{ cm}^{-1}$).¹ U spektrima molekula nakon interakcije s FIR zračenjem prevladavaju vrpce spregnutih vibracija i torzija molekula te se uočavaju vrpce vibracija skupina koje sadrže teške atome.

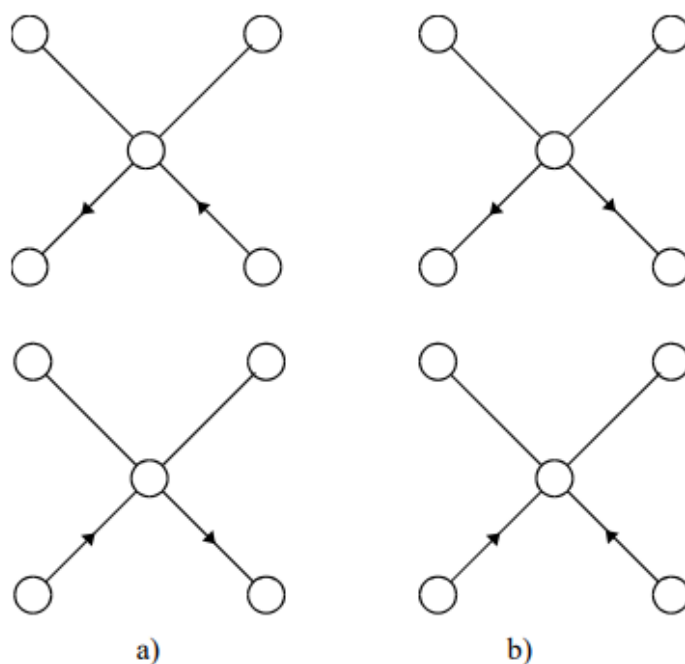


Slika 1. Elektromagnetski spektar s istaknutim područjem infracrvenog zračenja:
 12500–4000 cm^{-1} NIR, 4000–400 cm^{-1} MIR, 400–20 cm^{-1} FIR (preuzeto i prilagođeno
 prema ref. 3)

Apsorpcijom infracrvenog zračenja pobuđuju se vibracije molekule. U infracrvenom spektru opažaju se samo one vibracije tijekom kojih se mijenja električni dipolni moment. Ovisno o apsorbiranoj energiji elektromagnetskog zračenja, pobuđuju se vibracije pojedinih funkcionalnih skupina neke molekule. Zbog slabe sprege s ostalim vibracijama, one se mogu promatrati odvojeno, što omogućava primjenu infracrvene spektroskopije kao analitičke tehnike.

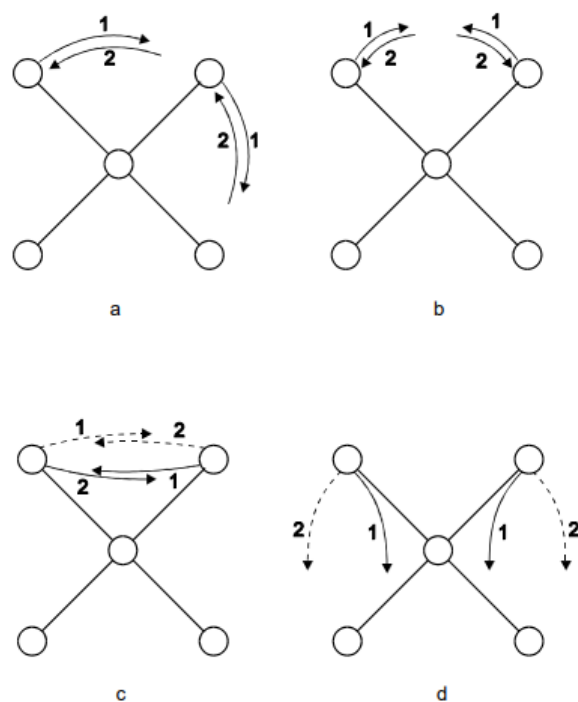
2.1.2. Molekulske vibracije

Vibracije se dijele na osnovne, čije su energije pobuda međusobno neovisne, i degenerirane, čije su energije pobuda jednake. Višeatomne molekule mogu imati više osnovnih vibracija, ovisno o geometriji molekule. Za nelinearne molekule broj vibracijskih stupnjeva slobode iznosi $3N-6$, dok za linearne molekule iznosi $3N-5$, pri čemu N označava broj atoma u molekuli. Za nelinearne molekule broj stupnjeva slobode rotacije i translacije iznosi ukupno 6 (3 rotacije i 3 translacije), dok za linearne iznosi 5 (2 rotacije i 3 translacije). Linearne molekule imaju jedan stupanj slobodne rotacije manje, jer se rotacija oko osi molekule ne smatra gibanjem. Molekulske vibracije, također se dijele na vibracije istezanja (ν) i vibracije deformacije (δ). Vibracije istezanja opisuju oscilacije molekule duž međuatomske osi te se dijele na simetrične i antisimetrične (slika 2). Prilikom simetričnog istezanja dva atoma se istovremeno približavaju ili udaljavaju istoj točki (slika 2.b). Antisimetrično istezanje opisuje se gibanjem dvaju atoma, pri čemu se jedan atom približava centru mase dok se drugi istovremeno udaljava (slika 2.a).



Slika 2. Vibracijsko istežanje višeatomne molekule: a) antisimetrično istežanje, b) simetrično istežanje (preuzeto prema ref. 4)

Molekule ili funkcionalne skupine s minimalno tri atoma osim vibracija istežanja, karakteriziraju i vibracije deformacije. Deformacijske vibracije opisuju se gibanjem atoma koji uzrokuju promjenu kuta između dvije veze. Vibracije deformacije skupina koje se sastoje od dva atoma jedne vrste vezane na središnji atom druge vrste, dijele se na svijanje kuteva u ravnini: zibanje (engl. *rocking*) (slika 3.a) i striženje (engl. *scissoring*) (slika 3.b), te svijanje kuteva izvan ravnine: uvijanje (engl. *twisting*) (slika 3.c) i klaćenje (engl. *wagging*) (slika 3.d).



Slika 3. Vibracijske deformacije višeatomne skupine. Pune strelice označavaju gibanje atoma iznad ravnine papira, a crtkane ispod ravnine papira u odnosu na središnji atom u molekuli: a) zibanje, b) striženje, c) uvijanje, d) klaćenje (preuzeto prema ref. 4)

Kako je već spomenuto, vibracija je IR aktivna ukoliko se prilikom vibracije mijenja dipolni moment skupine atoma koja vibrira. O promjeni dipolnog momenta ovisi intenzitet vrpce u IR spektru, što je posljedica strukture skupine atoma koji vibriraju. Vrpce simetričnih skupina ili molekula, koje sadrže atome iste vrste ili male razlike u elektronegativnosti, slabijeg su intenziteta ili su IR neaktivne, dok su vrpce asimetričnih skupina ili molekula koje sadrže atome velike razlike u elektronegativnosti, jake. Položaj vrpce u spektru određuju relativna molekulska masa atoma i jakost veze između atoma, a na njega utječu i polarnost molekule te intermolekulske interakcije u otopini. Veća koncentracija i interakcije s molekulama otapala mogu uzrokovati širenje i pomak vibracijskih vrpca.⁴ Zbog toga se za pripremu otopina koriste nepolarna i relativno inertna otapala (npr. CCl_4 i CS_2). Vibracijska sprežanja (engl. *coupling*) se javljaju kada skupine atoma vibriraju sličnim frekvencijama. Sprežanje se najčešće uočava za molekule u kojima se veza koja se rasteže ujedno i deformira, odnosno za skupine koje su u strukturi nalaze vrlo blizu.

2.1.3. Priprava uzorka

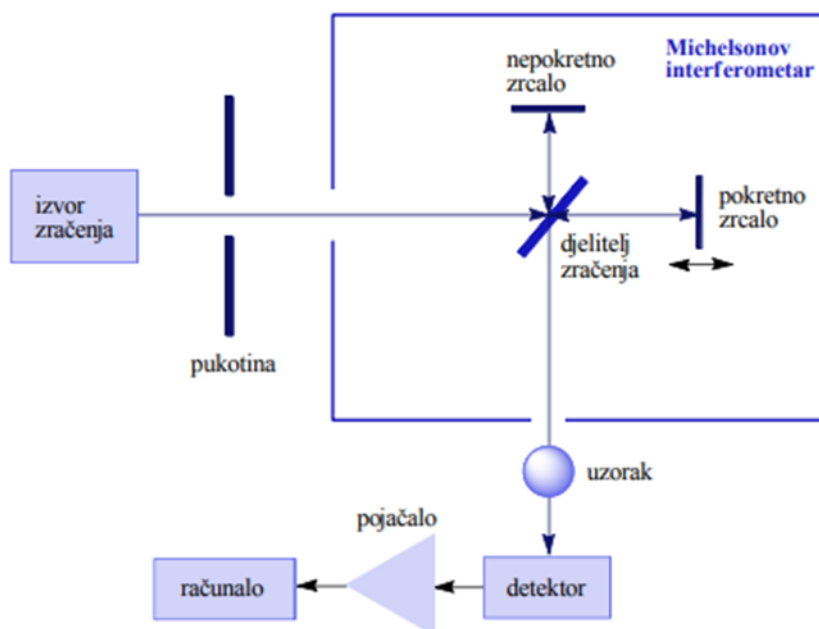
Infracrveni spekar može se snimiti za uzorke u sva tri agregatna stanja. Kruti uzorci pripremaju se za snimanje pripravom pastile u alkalijevom halogenidu (KBr, NaCl) ili suspenzije u ulju (tekući parafin). Najjednostavnija tehnika, priprema uzorka u obliku KBr pastile, zahtjeva usitnjavanje uzorka u tarioniku, miješanje s osušenim kalijevim bromidom te prešanje praškaste smjese hidrauličkom prešom u tanku pastilu. Važno je analizirani uzorak fino usitniti kako ne bi došlo do rasipanja zračenja na većim kristalim uzroka ili alkalijeva halogenida. Uslijed polimorfije ili reakcije kalijeva bromida s uzorkom prilikom prešanja, snimljeni spektar može odstupati od očekivanog. Prilikom pripreme suspenzije u ulju, fino usitnjeni kruti uzorak pomiješa se s parafinskim uljem. Kapljica dobivene paste nanese se između pločica od NaCl ili KBr, te se pločice smjeste u odgovarajući nosač. Snimljeni spektar sadrži vrpce analiziranog uzorka i parafinskog ulja. Vrpce parafinskog ulja javljaju se u području $2920\text{--}2710\text{ cm}^{-1}$ i $1470\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$.⁴ Parafinsko ulje može se zamijeniti kloriranim ili fluoriranim uljima, ukoliko se očekuju vrpce uzorka u području u kojem apsorbira parafinsko ulje. Za pripravu otopine uzorka, kao otapala se najčešće koriste kloroform, ugljikov tetraklorid i ugljikov disulfid. Radi lakše analize spektra, potrebno je odabrati otapalo koje ne apsorbira u području u kojem se očekuje apsorpcija analiziranog uzorka.

Tekući uzorci i viskozne nehlapljive tekućine snimaju se tako da se nekoliko kapi uzorka nanese na pločicu od materijala propusnog za IR zračenje. Prilikom pripreme uzorka treba paziti da u uzorku ne zaostanu mjehurići zraka.

Plinoviti uzorci se snimaju u posebnim kivetama za plinove dugog optičkog puta. Na taj način omogućeno je snimanje spektara plinovitih uzoraka, koji zbog niske koncentracije slabije apsorbiraju zračenje.¹ Plinoviti uzorci se mogu snimati čisti ili razrijeđeni s nekim plinom koji ne apsorbira u istom području kao i analizirani uzorak. Prije punjenja plinovitim uzorkom iz ćelije je potrebno ukloniti zrak vakuumskom pumpom.

2.1.4. FT-IR spektrometar

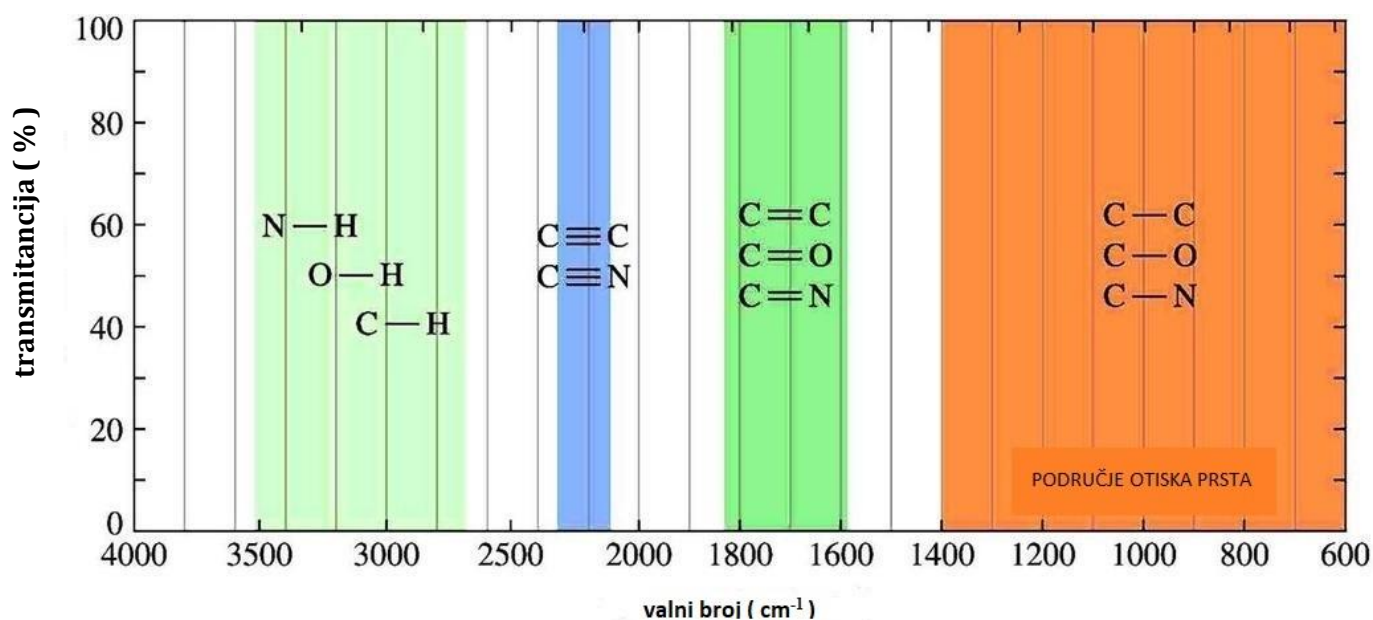
Infracrveni spektrometar uz Furierovu transformaciju bilježi spektar u vremenskoj domeni, a zatim ga Furierovim transformacijama prevodi u frekvencijsku domenu. Upravo zbog velike osjetljivosti, brzine snimanja i točnosti danas je najviše korišten oblik izvedbe infracrvenog spektrometra. Važni dijelovi FT-IR spektrometra su izvor zračenja, pukotina, Michaelsonov interferometar, prostor za uzorak te detektor koji je spojen preko pojačala s računalom za obradu podataka (slika 4). Štapić od silicijeva karbida (engl. *glowing bar*), Nernstov štapić i laseri najčešći su izvori zračenja u infracrvenoj spektroskopiji.¹ Zračenje iz izvora prolazi kroz pukotinu i ulazi u Michaelsonov interferometar, koji se sastoji od djelatelja zraka te pokretnog i nepokretnog zrcala. Zraka upada na djelatelj zračenja i dijeli se na dva snopa koja putuju prema pokretnom i nepokretnom zrcalu, reflektiraju se i na djelatelju zračenja interferiraju. Zbog razlike u optičkim putevima može doći do konstruktivne ili destruktivne interferencije. Nakon što zraka izađe iz Michelsonovog interferometra, zračenje prolazi kroz uzorak i pada na piroelektrični detektor, koji bilježi signal kao interferogram u vremenskoj domeni. Signal u vremenskoj domeni se pomoću Furierove transformacije prevodi u frekvencijsku domenu.



Slika 4. Shematski prikaz FT-IR spektrometra (preuzeto prema ref. 1)

2.1.5. Interpretacija spektra

Infracrvena spektroskopija danas se uglavnom koristi za analizu organskih i bioloških molekula. Za sve molekule infracrveni spektri se razlikuju, osim za enantiomere koji su isti spojevi osim što u različitu stranu zakreću polariziranu svjetlost za isti iznos. IR spektar dijeli se na područje funkcionalnih skupina i područje otiska prsta (engl. *fingerprint region*). Područje spektra od 4000 cm^{-1} do 1400 cm^{-1} naziva se područje funkcionalnih skupina, u kojem se javljaju vibracije većine funkcionalnih skupina u nekoj molekuli, neovisno o strukturi čitave molekule. Dio spektra ispod 1400 cm^{-1} naziva se područje otiska prsta, karakteristično za molekulu. Čitav spektar identičan je za molekulu te potpuna podudarnost spektara upućuje na identičnost dvaju spojeva.⁵



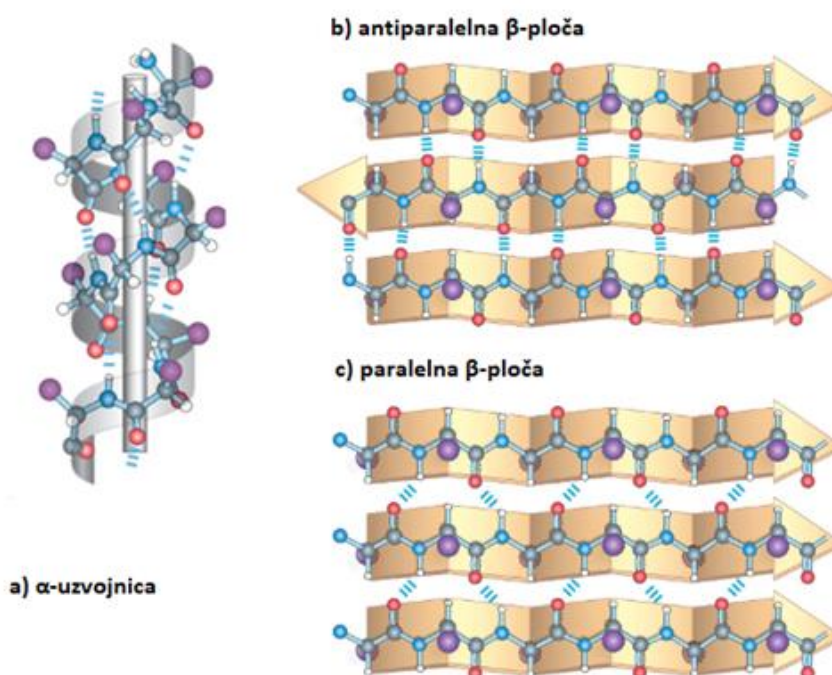
Slika 5. Područje karakterističnih vrpca u IR spektru (preuzeto i prilagođeno prema ref.6)

2.2. Proteini

2.2.1. Općenito o proteinima

Proteini su linearni polimeri građeni od dvadeset aminokiselina. Njihova uloga je prijenos i pohrana molekula, te kataliziranje određenih reakcija. Proteini posjeduju primarnu, sekundarnu, tercijarnu, te neki i kvaternu strukturu. Primarna struktura opisuje aminokiselinski slijed u polipeptidnom lancu, dok sekundarna struktura označava prostorni raspored u određenom području proteina. Najpoznatije periodične sekundarne strukture proteina su α -uzvojnica (engl. *α -helix*) i β -ploča (engl. *β -sheet*), te su poznate i neperiodične strukture β -okret i Ω -omča. Struktura α -uzvojnice je ponavljajuća struktura u kojoj je zavoj jedinica koja se ponavlja. Visina zavoja iznosi 5,4 Å, dok se po zavoju nalazi 3,6 aminokiselina,¹⁰ te je zavojnica desnoga navoja u većini proteina. Peptidne veze u strukturi α -uzvojnice su orjentirane prema unutrašnjosti, dok bočni ogranci aminokiselina strše prema van (slika 6.a). Struktura je stabilizirana vodikovim vezama koje su paralelne s osi uzvojnice te interakcijama između bočnih ogranaka s vanjske strane uzvojnice.

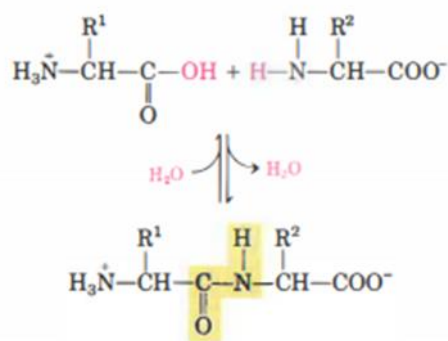
Postoje dvije vrste β -ploča, paralelne i antiparalelne (slika 6.b). U antiparalelnoj strukturi susjedni lanci su suprotnih smjerova, te se donor i akceptor vodikove veze koja povezuje lance nalaze na pravcu, što ju čini izrazito stabilnom. U paralelnoj strukturi lanci istoga smjera povezani su vodikovim vezama pod određenim kutom, što ju destabilizira.



Slika 6. Prikaz sekundarnih struktura proteina: a) α -uzvojnica, b) antiparalelna β -ploča, c) paralelna β -ploča (preuzeto i prilagođeno prema ref. 10)

Tercijarna struktura opisuje konformaciju koju zauzima jedan polipeptidni lanac. Kvaternu strukturu posjeduju oni proteini koji se sastoje od više polipeptidnih lanaca međusobno vezanih nekovalentnim interakcijama. U nekovalentne interakcije ubrajaju se vodikove veze, Van der Waalsove interakcije i hidrofobne interakcije.

Proteini se u vodenim otopinama nalaze u „zwitter“ ionskom obliku. Peptidna veza koja povezuje aminokiseline, nastaje reakcijom amino i karboksilne skupine uz izdvajanje molekule vode (slika 7). Peptidna veza je planarna, ima parcijalni karakter dvostruke veze zbog delokalizacije slobodnog elektronskog para atoma dušika te je dipol.



Slika 7. Shema reakcije karboksilne skupine i amino skupine kojom nastaje peptidna veza (preuzeto prema ref. 10)

2.3. Inzulin

2.3.1. Uloga i sinteza inzulina

Inzulin je peptidni hormon, kojeg luči žlijezda gušterača (lat. *pankreas*), a na čiju sekreciju također utječu gastro-intestinalni hormoni. Gušterača osim inzulina luči i hormon glukagon kojim također regulira razinu glukoze u krvotoku. Glukagon se luči kada je koncentracija glukoze niska, potičući glukoneogenezu. Nasuprot tome, inzulin djeluje kada je koncentracija glukoze u krvotoku visoka i omogućava ulazak glukoze u stanicu kako bi se smanjila njezina koncentracija u vanstaničnoj tekućini. Inzulin osim primarne uloge regulacije koncentracije glukoze, utječe na metabolizam ugljikohidrata i masti.

Inzulin se sintetizira u β -stanicama Langerhansovih otočića gušterače staničnim mehanizmom sinteze bjelančevina. Sama sinteza započinje translacijom inzulinske RNA na ribosomima endoplazmatskog retikuluma te nastankom proinzulina. Proinzulin ($M_r = 11500$) se razgrađuje na proinzulin manje relativne molekulske mase ($M_r = 9000$), koji se sastoji od tri peptidna lanca A, B i C.¹² Proinzulin se dalje u Golgijevu aparatu razgrađuje na inzulin i C-peptidni lanac (vezani peptidi). Inzulin i C-peptid se pohranjuju u granule β -stanica i u normalnim uvjetima se istodobno izlučuju egzocitozom u ekvimolarnim količinama. Proinzulin i C-peptid nemaju inzulinsku aktivnost, a sama uloga C-peptida još uvijek nije objašnjena.

Sekrecija inzulina regulirana je povratnom spregom između koncentracije glukoze u krvi i lučenja inzulina. Izlučivanje inzulina u bazalnim uvjetima je konstantno. Do porasta koncentracije glukoze u krvi uglavnom dolazi uslijed unošenja hrane. Kao odgovor na visoku

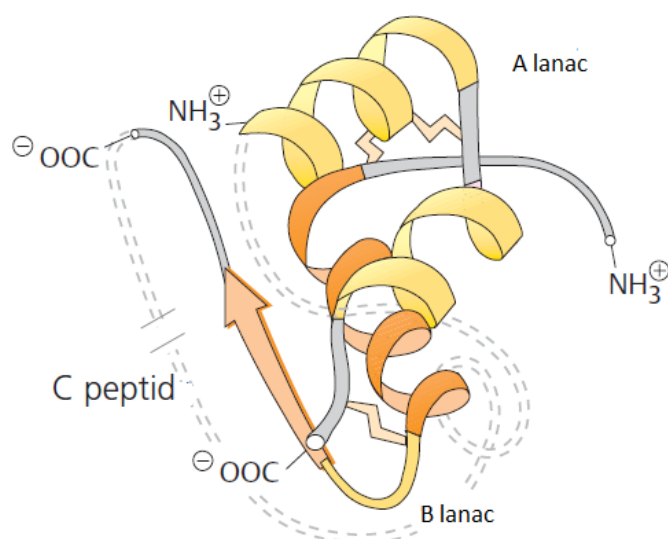
koncentraciju glukoze, inzulin se veže na transmembranski receptor s vanjske strane stanice uzrokujući konformacijsku promjenu receptora te povećanje koncentracije šećera u stanici.

2.3.2. Struktura inzulina

Inzulin je prvi protein čija je kristalna struktura riješena, 1953. godine riješio ju je Fredrick Sanger. Inzulin je mali peptid, molekulske mase oko 6000 Daltona, čiju primarnu strukturu čini slijed 51 aminokisline.^{7,8} Sastoji se od dva lanca povezana disulfidnim vezama, od kojih se jedna veza nalazi na površini molekule, dok su druge dvije smještene u hidrofobnoj unutrašnjosti (slika 8). Kod većine sisavaca struktura inzulina je vrlo očuvana te se lanac A sastoji od 21 aminokiseline, dok lanac B sadrži 30 aminokiselina.⁷ Sekundarnu strukturu lanca A čine dvije antiparalelne α -uzvojnice, a lanca B α -uzvojnica i β -ploča (slika 9).² Inzulin može vezati cink pri čemu nastaju dimeri ili se stvaraju još veći agregati.



Slika 8. Primarna struktura inzulina (preuzeto prema ref. 10)



Slika 9. Sekundarna struktura inzulina (preuzeto prema ref. 11)

2.3.2. Poremećaj metabolizma ugljikohidrata

Dijabetes (lat. *diabetes mellitus*, DM) je složeni poremećaj metabolizma ugljikohidrata. Postoje dva tipa, tip 1 (T1DM) je inzulin ovisan te je posljedica autoimunog poremećaja i uništavanja β -stanica Langerhansovih otočića, dok je tip 2 (T2DM) rezistentan na inzulin uslijed nepravilne prehrane, loših životnih navika i genetske predispozicije. Inzulinska terapija je neophodna u T1DM te u T2DM, ako se zadovoljavajuća regulacija glikemije ne može postići drugim oblicima liječenja.

Upravo očuvana trodimenzijska struktura inzulina upućuje da je inzulin neke vrste biološki aktivan u drugoj vrsti te da obavlja svoju funkciju. Svinjski inzulin najbliži je humanom. Životinjski inzulin nije bio najučinkovitiji u terapiji bolesnika, zbog primjesa ostalih struktura gušterače, koje su mogle uzrokovati jake i opasne alergijske reakcije. Danas se inzulin proizvodi pomoću genetski modificirane kvašćeve gljivice ili bakterije *E. Coli* tehnologijom rekombinantne DNA.¹²

2.4. FT-IR spektroskopija proteina

Infracrvena spektroskopija je nedestruktivna metoda koja se široko primjenjuje u analizi bioloških molekula. Na temelju analize vrpce vibracije amidne skupine polipeptida FT-IR spektroskopija se koristi za određivanje sekundarne i tercijarne strukture malih proteina. Ovom metodom nije moguće odrediti točnu strukturu proteina, kao primjerice X-kristalografijom, već samo identificirati prisutne sekundarne strukture. Prednost FT-IR metode pred ostalima, poput masene spektrometrije, spektroskopije NMR i cirkularnog dikroizma te X-kristalografije, je mogućnost analize uzoraka u sva tri agregatna stanja, pa čak i u vodenom mediju, važnom za istraživanje bioloških sustava. Osjetljivost IR spektroskopije za ovu vrste analize smanjuje se s povećanjem veličine proteina, iako je moguće prikupiti podatke o strukturi proteina do mase 200 kDa.

Spektri različitih proteina vrlo su slični te se sekundarna struktura proteina istražuje na temelju vibracijskih vrpca amidne skupine, koje obuhvaćaju vrpce amid A i B te vrpce amid I–VII (tablica 1). Ipak, od najvećeg su značaja vrpce amid I i II. Amid I vrpca javlja se oko 1650 cm^{-1} te potječe većinom od istezanja C=O veze amidne skupine, dok se amid II vrpca javlja pri 1540 cm^{-1} , a posljedica je svijanja NH skupine i istezanja C–N veze peptidne okosnice. Položaj amid I vrpce direktno ovisi o kosturu samog polipeptidnog lanca proteina, stoga daje više podataka o sekundarnoj strukturi od amid II vrpce. Ostale vrpce amidne

skupine vrlo su složene te ovise o prirodi bočnih lanaca proteina i povezanosti vodikovim vezama. Upravo zato se ne koriste za proučavanje sekundarne strukture proteina, već njihove konformacije.

Tablica 1. Karakteristične vibracijske vrpce amidne skupine peptida (preuzeto i prilagođeno prema ref . 17)

Vrpca	Valni broj / cm^{-1}	Vibracija
Amid A	~3300	Istezanje N–H veze
Amid B	~3110	
Amid I	1600–1690	Istezanje C=O veze
Amid II	1480–1575	Istezanje C–N veze Svijanje N–H skupine
Amid III	1229–1301	Istezanje C–N veze Svijanje N–H skupine
Amid IV	625–767	Svijanje O=C–N skupine
Amid V	640–800	Svijanje izvan ravnine N–H skupine
Amid VI	537–606	Svijanje izvan ravnine C=O skupine
Amid VII	200	Torzija ugljikovog skeleta

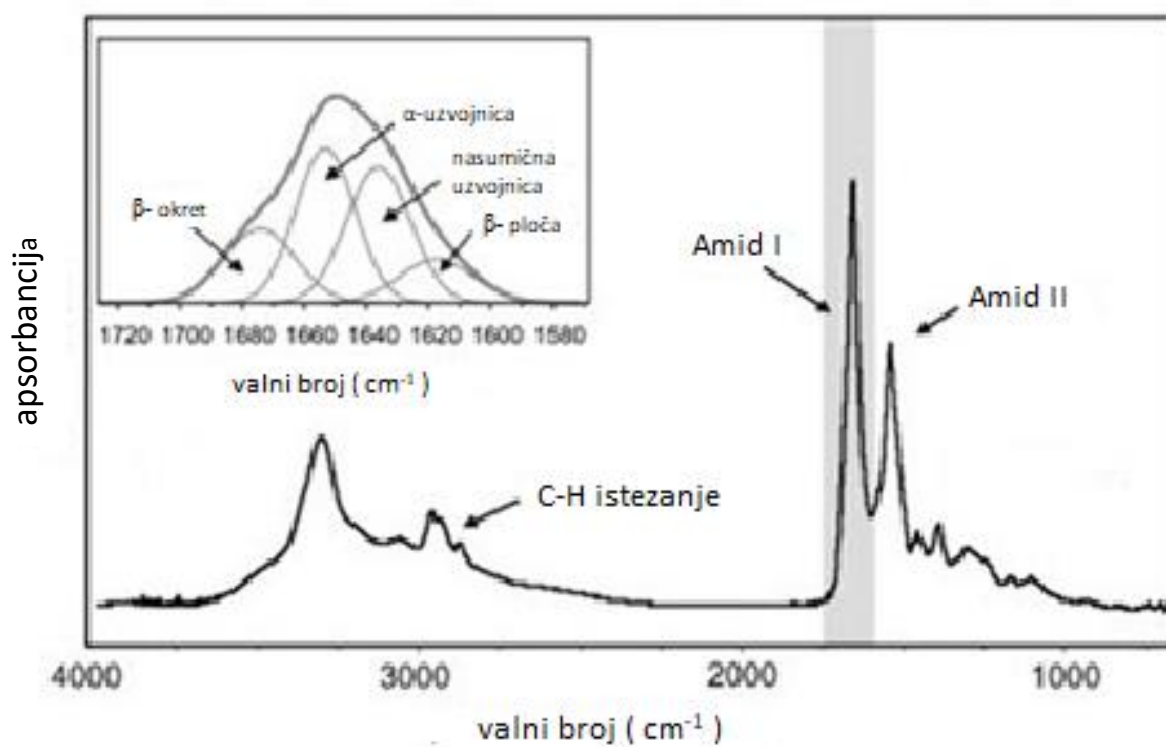
Utvrđena je korelacija između položaja vibracijske vrpce amid I i sekundarne strukture proteina. Različite sekundarne strukture opisane su malim promjenama geometrije molekula, uslijed čega se istezanje C=O skupine pobuđuje različitim frekvencijama (tablica 2). U spektru proteina sa sekundarnom strukturom α -uzvojnice, opaža se amid I vrpca u području oko 1656 cm^{-1} . Frekvencija apsorpcije karbonilne skupine proteina sa strukturom β -ploče ovisi o usmjerenju susjednih lanaca. Amid I vrpca paralelnih i antiparalelnih β -ploča javlja se oko 1630 cm^{-1} , pri čemu antiparalelne β -ploče karakterizira i dodatna vrpca pri višim valnim brojevima (oko 1695 cm^{-1}), koja je vrlo slabog intenziteta, zbog čega često nije niti opažena u spektru. Pri valnim brojevima 1688 , 1680 , 1672 i 1666 cm^{-1} opažene su vrpce koje upućuju na strukturu β -okreta, dok se pri 1648 cm^{-1} uočava amid I vrpca nasumične uzvojnice.

Tablica 2. Položaj amid I vrpce u IR spektru proteina različite sekundarne strukture u vodi kao otapalu (preuzeto i prilagođeno prema ref 17)

Sekundarna struktura	Valni broj / cm^{-1}
α -uzvojnica	1654–1658
β -ploča	1642–1624
β -okret	1688, 1680, 1672, 1666
nasumična uzvojnica	1648

Zbog preklapanja vrpce spektri se pri analizi obrađuju metodama druge derivacije ili dekonvolucije, koje se temelje na tehnikama sužavanja vrpce, kako bi se kvalitativno i kvantitativno procijenila sekundarna struktura proteina (slika 10).

Uz preklapanje vrpce karakterističnih za sekundarne strukture, često je prisutna i voda u uzorku. Voda intenzivno apsorbira zračenje u području oko 3400 cm^{-1} , uslijed istezanja O–H veza, te oko 1645 cm^{-1} uslijed svijanja H–O–H. Digitalnim putem moguće je ukloniti vrpce apsorpcije vode, snimanjem spektara otapala te oduzimanjem od spektra proteina. Drugi način uklanjanja interferencija vode je pripremljanje uzorka u deuteriranoj vodi. Vibracijske vrpce istezanja i svijanja molekule vode nalaze se pri nižim valnim brojevima zbog čega je teška voda prikladno otapalo za analizu sekundarne strukture proteina. Međutim, zamjenom vodika deuterijem narušavaju se nativni uvjeti, što može utjecati na sekundarnu strukturu istraživanih proteina.



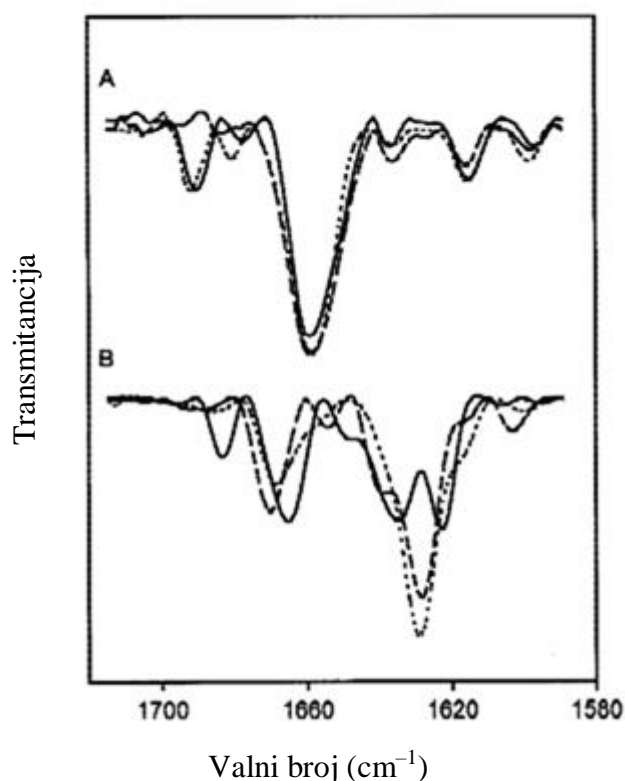
Slika 10. Karakteristične vrpce u IR spektru proteina (preuzeto i prilagođeno prema ref. 16)

2.5. Određivanje sekundarne strukture inzulinskih fibrila FT-IR spektroskopijom

Farmaceutska industrija svakodnevno se suočava s nestabilnošću proteinskih pripravaka tijekom proizvodnje, skladištenja i upotrebe. Proteini mogu agregirati zbog visoke temperature, potresanja ili niske vrijednosti pH. Agregacija je proces tijekom kojeg se nekovalentnim interakcijama udružuju molekule proteina, koje su djelomično odmotane u usporedbi s proteinima nativne strukture. Slično mnogim drugim globularnim proteinima, inzulin pri promjeni uvjeta nastoji zadržati svoju trodimenzijsku strukturu, no tijekom pročišćavanja, proizvodnje i skladištenja uočena je agregacija inzulina uz nastajanje fibrilarnih struktura. Stvaranje fibrila je složen i još uvijek nedovoljno razjašnjen proces čiji su najvažniji koraci nukleacija i elongacija. Formiranje fibrila uzrokuje konformacijske promjene koje utječu na sekundarnu strukturu proteina, stoga je proces nastajanja fibrila moguće pratiti FT-IR spektroskopijom.

U radu su proučavani FT-IR spektri goveđeg inzulina. Uzorci inzulina, masene koncentracije 20 mg/mL, pripremljeni su u vodenom mediju različite pH vrijednosti. Spektri uzoraka snimani su u kivetu od kalcijeva fluorida pri sobnoj temperaturi. Nastajanje inzulinskih fibrila potaknuto je potresanjem ili zagrijavanjem uzorka. Spektri su analizirani primjenom druge derivacije.

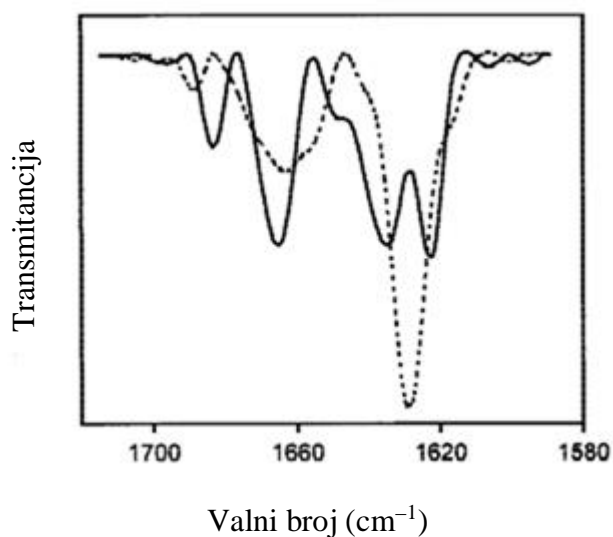
Intenzivna vrpca pri 1658 cm^{-1} u FT-IR spektru goveđeg inzulina u kiseljoj otopini pH 1,6 ukazuje na veliki udio α -uzvojnica u nativnoj strukturi proteina, dok slabe vrpce pri 1690 i 1637 cm^{-1} te 1681 i 1678 cm^{-1} upućuju na mali doprinos β -ploča i β -okreta sekundarnoj strukturi (slika 11).¹⁵ Sekundarna struktura nativnog inzulina vrlo je slična u klorovodičnoj kiselini i octenoj kiselini, uz iznimku uzorka u očetnoj kiselini u prisutnosti natrijeva klorida u čijem spektru nisu uočene vrpce pri 1690 cm^{-1} (β -ploče) i 1681 cm^{-1} (β -okret). U spektrima fibrila pripremljenim zagrijavanjem uzoraka pri $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ vrpca α -uzvojnica (1658 cm^{-1}) slabi te se javlja široka vrpca u području $1666\text{--}1663\text{ cm}^{-1}$.¹⁵ Osim toga, javljaju se intenzivne vrpce β -ploča pri 1635 i 1622 cm^{-1} u spektru uzorka u klorovodičnoj kiselini, za razliku od jedne široke vrpce β -ploča pri 1629 cm^{-1} u spektrima uzoraka u octenoj kiselini. Porast intenziteta vrpce β -struktura uz istodobni gubitak vrpce α -struktura ukazuje na nastajanje fibrila.



Slika 11. Područje amid I vrpce u FT-IR spektrima goveđeg inzulina: A) nativna struktura, B) fibrili. Goveđi inzulin otopljen: u 0,1 M HCl podešeno s NaOH do pH 1,6 (—); u 8,3 M CH₃COOH (---); u 8,3 M CH₃COOH, 0,1 M NaCl (---); γ (inzulin) = 20 mg/mL. Fibrili su pripremljeni zagrijavanjem pri 50°C redom tijekom 7 sati, 6 dana i 7 sati. (preuzeto prema ref. 15)

Na razliku u strukturi fibrila u klorovodičnoj kiselini pripremljenih zagrijavanjem i protresanjem uzorka inzulina, upućuje položaj vrpce β -ploče. Ovakva razlika nije uočena kod uzoraka pripremljenih u octenoj kiselini. U FT-IR spektru inzulinskih fibrila u klorovodičnoj kiselini pripremljenih pri povišenoj temperaturi od 50 °C opažaju se vrpce β -ploča pri 1635 i 1622 cm⁻¹, dok se u spektru fibrila pripremljenih potresanjem uzorka pri temperaturi od 37 °C uočava samo jedna vrpca pri 1629 cm⁻¹ (slika 12). Opisane razlike u spektrima pripisane su različitim međumolekulskim strukturama β -ploča ovisnim o načinu nastajanja. Snimljeni spektri uzoraka u klorovodičnoj kiselini pri istim prethodno navedenim uvjetima, razlikuju se i prema broju i položaju karakterističnih vrpca α -uzvojnice, što je pak posljedica promjene međumolekulskih vodikovih veza. Slabljenje vodikovih veza povećava učestalost β -ploča.

Spektri uzoraka snimljeni tijekom šest ciklusa zamrzavanja pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i odmrzavanja na sobnu temperaturu ukazali su na promjene sekundarne strukture fibrila u klorovodičnoj kiselini pripravljenih zagrijavanjem pri $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, dok za fibrile inzulina u octenoj kiselini nisu uočene promjene. Pri tome su uočene spektralne razlike karakteristične za nastajanje struktura β -ploča.



Slika 12. Područje amid I vrpce u FT-IR spektrima govedih inzulinskih fibrila pripravljenih: zagrijavanjem pri $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 7 sati (—), potresanjem pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 24 sata (---); γ (inzulin) = 20 mg/mL otopljen u $0,1\text{ M HCl}$ podešeno s NaOH do $\text{pH } 1,6$ (preuzeto prema ref. 15)

Opisani primjeri naglašavaju uspješnu i korisnu primjenu FT-IR spektroskopije u određivanju sekundarne strukture proteina i praćenju proteinskih procesa.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA, Varaždin, 2013, str. 1–2, 63–68.
2. A. Vlašić, *Inzulin - struktura i funkcija*, Završni rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016, str. 7.
3. G. Fox, *Appl. Sci.* **10** (2020) 616.
4. Z. Popović, *Infracrvena spektroskopija*, Interna skripta, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 1999, str. 2–12.
5. V. P. Peroković, D. Kidemet, R. Odžak, D. Parat, I. Primožić, V. Šimunić, *Praktikum iz organske kemije*, Interna skripta, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2004, str. 23–29.
6. *Infracrvena spektroskopija (IR)*, <https://docplayer.gr/73436515-Infracrvena-spektroskopija-ir.html> (datum pristupa 15. kolovoza 2021.)
7. *Insulin Synthesis and Secretion*, <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/pancreas/insulin.html#:~:text=Insulin%20is%20synthesized%20in%20significant,the%20endoplasmic%20reticulum%20generates%20proinsulin.> (datum pristupa 19. svibnja 2021.)
8. P. Karlson, *Biokemija za studente kemije i medicine*, Školska knjiga, Zagreb, 1989, str. 303.
9. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 34–46.
10. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, 2004, str. 118–120.
11. <https://www.quora.com/What-is-the-structure-of-insulin-primary-secondary-or-tertiary> (datum pristupa 20. kolovoza 2021.)
12. K. Režić, *Povijest i razvoj inzulinske terapije*, Specijalistički rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2018, str. 40.
13. H. Guenzler, H.-U. Gremlich, (preveli: Z. Meić, G. Baranović), *Uvod u infracrvenu spektroskopiju*, Školska knjiga, Zagreb, 2006.
14. <http://brussels-scientific.com/?p=5975> (datum pristupa 18. svibnja 2021.)

15. L. Nielsen, S. Frøkjaer, J. F. Carpenter, J. Brange, *J. Am. Pharm. Assoc.* **90** (2001) 29–37.
16. L. M. Miller, M. W. Bourassa, R. J. Smith, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1828** (2013) 2339–2346.
17. J. Kong, S. Yu, *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **39** (2007) 549–559.
18. H. Fabian, W. Mäntele, *Infrared Spectroscopy of Proteins*, u P. Griffiths, J. M. Chalmers (ur.), *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd, New Jersey, 2006.