

# Istraživanje sekundarne strukture ubikvitina infracrvenom spektroskopijom

---

Frey, Tea

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:217:422931>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-01**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

**PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET**

*Kemijski odsjek*

Tea Frey

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

**ISTRAŽIVANJE SEKUNDARNE  
STRUKTURE UBIKVITINA  
INFRACRVENOM SPEKTROSKOPIJOM**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: Prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Zagreb, 2020.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

17. lipnja 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

25. rujna 2020.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Potpis:



## Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. IR spektroskopija.....</b>	<b>2</b>
2.1.1. <i>FT-IR spektrometar.....</i>	<i>4</i>
<b>2.2. Proteini.....</b>	<b>5</b>
2.2.1. <i>Sekundarna struktura proteina .....</i>	<i>6</i>
2.2.2. <i>Ubikvitin.....</i>	<i>7</i>
<b>2.3. IR spektroskopija proteina .....</b>	<b>9</b>
2.3.1. <i>IR vrpce amidne skupine.....</i>	<i>9</i>
2.3.2. <i>Utjecaj sekundarne strukture na amid I vrpcu.....</i>	<i>10</i>
2.3.1. <i>Utjecaj vode i vodikovih veza na IR spektre proteina.....</i>	<i>12</i>
<b>2.4. Transmisijski i refleksijski FT-IR spektar ubikvitina .....</b>	<b>13</b>
<b>2.5. Istraživanje temperaturom i tlakom potaknutog odmatanja ubikvitina primjenom FT-IR spektroskopije.....</b>	<b>14</b>
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>18</b>



## § Sažetak

Infracrvena (engl. *infrared*, IR) spektroskopija je analitička metoda koja se primjenjuje za strukturnu analizu i praćenje fizikalno-kemijskih procesa molekula. Ubikvitin je regulatorni protein životinja i biljaka koji služi kao glasnik razgradnje nepotrebnih ili oštećenih proteina u proteolitičkom putu. Ovaj rad proučava primjenu IR spektroskopije za analizu sekundarnih struktura ubikvitina i praćenje procesa njegove denaturacije. Objasnjena je osnovna teorija IR spektroskopije, postojeće sekundarne strukture te funkcija i struktura ubikvitina. Analizirane su spektralne vrpce karakteristične za proteine, od kojih je najvažnija amid I vrpca, te povezanost svojstava amid I vrpce sa sekundarnim strukturama proteina. Analizirana je amid I vrpca ubikvitina te je dan primjer korištenja IR spektroskopije u analizi proteina prilikom praćenja procesa odmatanja ubikvitina uzrokovanih porastom temperature i tlaka.





## § 1. UVOD

Infracrveno zračenje obuhvaća elektromagnetsko zračenje u području valnih brojeva između  $14000\text{ cm}^{-1}$  i  $20\text{ cm}^{-1}$ . Apsorpcijom IR zračenja molekula prelazi u viša vibracijska stanja, pri čemu je uvjet za apsorpciju zračenja promjena dipolnog momenta. Načini i broj vibracija molekule ovise o njejoj strukturi. Kao posljedica apsorpcije IR zračenja nastaju IR spektri, čijom se asignacijom dobivaju informacije o strukturi molekule. Grupe atoma u molekuli koje vibriraju uslijed apsorpcije IR zračenja nazivaju se funkcionalne skupine. One u IR spektru daju vrpce karakteristične po intenzitetu i položaju.

IR spektroskopija se može primijeniti u proučavanju proteina. Zbog veličine i složene strukture proteina na temelju asignacije IR spektra nije moguće detaljno odrediti strukturu tj. sekvenciranje proteina, no vrpce amidnih skupina mogu ukazivati na sekundarne strukture proteina, trodimenzionalne oblike dijelova proteina nastale povezivanjem vodikovim vezama određenih skupina. Osnovna vrpca je amid I vrpca, koja većinom potječe od istezanja C=O veze amidne skupine, a čiji je položaj direktno koreliran sa sekundarnim strukturama. U ovom radu proučavana je sekundarna struktura proteina ubikvitina na temelju amid I vrpce u IR spektru proteina.

Ubikvitin je mali protein čija je funkcija obilježavanje oštećenih i nepotrebnih proteina za razgradnju u proteasomu. Kovalentno se veže na ciljani protein u procesu koji se zove ubikvitinacija. Ubikvitinirani protein dolazi do proteasoma gdje se razgrađuje na manje jedinice koje se mogu koristiti za razne metaboličke procese. Ubikvitin sadrži sve osnovne sekundarne strukture:  $\alpha$ -zavojnica,  $\beta$ -ploču te okrete i omče, čineći ga savršenim primjerom za proučavanje sekundarnih struktura proteina primjenom IR spektroskopije.

Osim određivanja sekundarnih struktura proteina, IR spektroskopijom se mogu pratiti njihove promjene. U ovom radu su dani primjeri praćenja promjena sekundarnih struktura ubikvitina IR spektroskopijom, uzrokovanih promjenom temperature i tlaka.

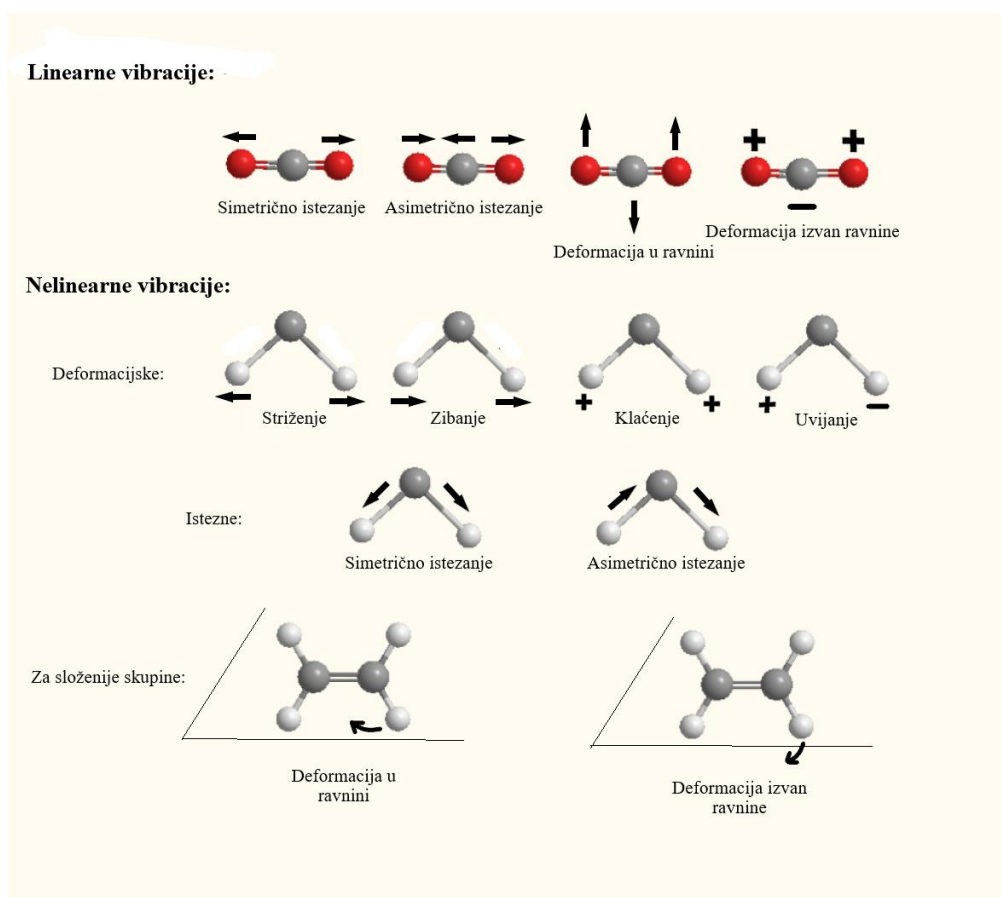
## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. IR spektroskopija

Spektroskopija proučava interakcije tvari i elektromagnetskog zračenja u svrhu strukturne analize i praćenja inter- i intramolekulskih sila. Odabir spektroskopske metode kojom će se neka molekula ili proces proučavati ovisi o željenim informacijama. Metoda koja se temelji na promjenama vibracijskih stanja molekula uzrokovanih apsorpcijom elektromagnetskog zračenja u području valnih brojeva između  $14000\text{ cm}^{-1}$  i  $20\text{ cm}^{-1}$  naziva se infracrvena spektroskopija. Molekula apsorpira elektromagnetsko zračenje i prelazi u više vibracijsko stanje onda kada frekvencija zračenja odgovara frekvenciji vibracije molekule.<sup>1</sup> Molekulske vibracije su pojava titranja atoma oko ravnotežnog položaja uzrokovanog pobudnim zračenjem. Uvjet koji se mora zadovoljiti da molekula apsorpira zračenje u IR području je promjena dipolnog momenta. Dipolni moment ovisi o razlici elektronegativnosti atoma sa svake strane veze. Što je razlika između elektronegativnosti veća, to je i promjena dipolnog momenta tijekom vibriranja atoma veća. Ako promjene dipolnog momenta u molekuli nema, nema niti interakcije molekule sa zračenjem. Područje infracrvenog zračenja se dijeli na blisko ( $14000\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ ), srednje ( $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ ) i daleko ( $400\text{--}20\text{ cm}^{-1}$ ). Najčešće se proučavaju IR spektri u srednjem infracrvenom području jer većina molekula upravo u tom području apsorpira.

Vibracije se dijele na osnovne, čija je pobuda međusobno neovisna, i degenerirane, one koje imaju istu frekvenciju. Broj osnovnih molekulskih vibracija ovisi o broju atoma u molekuli. Taj broj može se teorijski odrediti, pa tako linearne molekule imaju  $3N-5$ , a nelinearne  $3N-6$  osnovnih molekulskih vibracija.  $N$  predstavlja broj atoma u molekuli. Od broja  $3N$  oduzima se broj stupnjeva slobode koji je za nelinearne molekule jednak 6, s obzirom na 3 načina translacije i 3 načina rotacije u prostoru, a za linearne molekule 5, jer imaju jedan stupanj slobode rotacije manje (oko osi molekule).<sup>2</sup> Molekulske vibracije dijele se na vibracije istezanja ( $\nu$ ) i deformacije ( $\delta$ ) (slika 1). Vibracije istezanja su vibracije uzduž međunuklearne osi. One mogu biti simetrične (engl. *symmetrical stretching*,  $\nu_s$ ), kada se atomi sa svake strane veze istovremeno približavaju i udaljavaju centru masa, i asimetrične (engl. *asymmetrical stretching*,  $\nu_{as}$ ), kada se jedan atom približava, a drugi udaljava od centra masa. Vibracije deformacije su vibracije jezgara prilikom kojih se mijenja kut između atoma. Za nelinearne troatomne

funkcionalne skupine, koje se sastoje od dva atoma jedne vrste vezana na centralni atom druge vrste (npr.  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}_2$ ), deformacije se dijele na striženje, zibanje, klaćenje i uvijanje, ovisno o tome kreću li se atomi u istom ili suprotnom smjeru istovremeno ili naizmjenice u ravnini ili izvan ravnine. Za složenije funkcionalne skupine deformacije se dijele na svijanja u ravnini (engl. *in plane bending*,  $\delta_{\text{ip}}$ ) i izvan ravnine (engl. *out of plane bending*,  $\delta_{\text{oop}}$ ). Moguća su sprežanja vibracija koja nastaju kada skupine atoma vibriraju blizu jedne drugima pri sličnim frekvencijama.



Slika 1. Osnovne molekulske vibracije linearne molekule  $\text{CO}_2$  i nelinearnih molekula  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ .

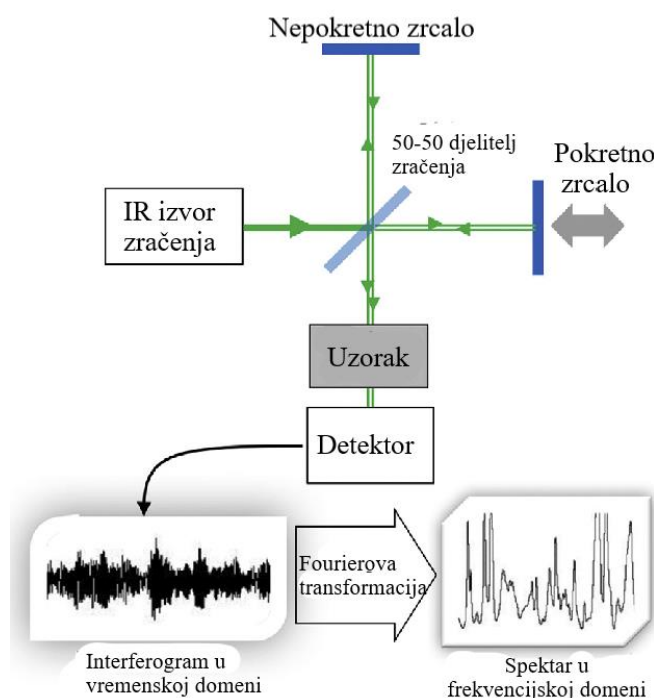
Vibracije istih funkcionalnih skupina u različitim molekulama daju IR vrpce u uskom području frekvencija neovisno o strukturi ostatka molekule. To se područje u IR spektru naziva područje funkcionalnih skupina i obuhvaća valne brojeve između  $4000$  i  $1100\text{ cm}^{-1}$ . Područje u IR spektru ispod  $1100\text{ cm}^{-1}$  karakteristično je za vibracije okosnice molekula i naziva se područje otiska prsta. U IR spektru vode dominiraju 3 vibracijske vrpce koje odgovaraju: asimetričnom

istezanju O–H veza pri  $3490\text{ cm}^{-1}$ , simetričnom istežanju O–H veza pri  $3277\text{ cm}^{-1}$  te deformaciji molekule vode pri  $1645\text{ cm}^{-1}$ .<sup>3</sup> Osim vrpce osnovnih vibracija postoje i druge vrpce. Primjerice, kombinacijske vrpce nastaju istovremenom apsorpcijom zračenja tijekom dviju ili više vibracija. Valni broj kombinacijske vrpce jednak je sumi valnih brojeva vrpce pojedinih vibracija. U ovom radu proučavane su vrpce amidne skupine.

Vibracija je IR aktivna ako se prilikom vibracije mijenja dipolni moment. Hoće li do promjene dipolnog momenta doći i koliki će biti intenzitet vrpce u IR spektru ovisi o strukturi molekule. Dvoatomne homonuklearne molekule (poput  $\text{H}_2$  i  $\text{O}_2$ ) nemaju IR spektre jer te molekule nemaju dipolni moment. Vrpce simetričnih vibracija heteronuklearnih molekula ili su IR neaktivne za simetrične molekule ili slabijeg intenziteta zbog manjih promjena dipolnog momenta.

### 2.1.1. FT-IR spektrometar

Snimanje IR spektara uključuje Fourierove transformacije detektiranog signala kojima se signal iz vremenske domene prevodi u frekvencijsku domenu. Spektrometri koji koriste spomenute matematičke operacije zovu se infracrveni spektrometri s Fourierovim transformacijama (FT-IR spektrometri) te ih karakterizira velika osjetljivost, brzina snimanja i točnost.<sup>2</sup> Dijelovi FT-IR spektrometra prikazani su na slici 2.



Slika 2. Osnovna konfiguracija FT-IR spektrometra (preuzeto i prilagođeno prema ref. 4).

Izvor zračenja u FT-IR spektrometru najčešće je Nernstov štapić ili štapić od silicijeva karbida (Globar). Najbitniji dio FT-IR spektrometra je Michelsonov interferometar, koji se sastoji od nepokretnog i pokretnog zrcala te djelitelja zračenja. Djelitelj zračenja propušta 50 % zračenja prema pokretnom zrcalu i usmjerava 50 % zračenja prema nepokretnom zrcalu. Zračenje se s oba zrcala reflektira i vraća na djelitelj, gdje konstruktivno ili destruktivno interferira ovisno o položaju pomičnog zrcala. Zračenje iz Michelsonovog interferometra prolazi kroz uzorak, djelomično se apsorbira i pada na detektor. Detektor bilježi intenzitet zračenja u ovisnosti o položaju pokretnog zrcala tj. kao interferogram u vremenskoj domeni. Interferogram se Fourierovim transformacijama prevodi u frekvencijsku domenu, odnosno IR spektar.<sup>2,5</sup>

FT-IR spektre moguće je snimiti različitim tehnikama. Pri snimanju transmisijskog IR spektra uzorak se stavlja na put IR zračenja pri čemu se detektira propušteno zračenje. U tu svrhu kruti uzorci se najčešće pripremaju u obliku pastila miješanjem s materijalima koji ne apsorbiraju IR zračenje u srednjem IR području (KBr, NaCl). Za tekuće i plinske uzorke koriste se kivete odgovarajuće duljine puta zračenja, s prozorima od materijala koje propuštaju IR zračenje. Optički put plinskih kiveta je dulji zbog niske koncentracije plinovitih uzoraka.

Osim transmisijske tehnike za snimanje IR spektara sve se više primjenjuju refleksijske tehnike. Tehnika prigušene totalne refleksije (engl. *attenuated total reflectance*, ATR) temelji se na refleksiji zračenja koje prolazi kroz materijal visokog indeksa loma, primjerice ZnSe, na kojem se nalazi uzorak. Na granici faza refleksijskog elementa i uzorka zračenje se potpuno ne reflektira, već dijelom prolazi do uzorka te ga uzorak apsorbira. Zračenje energije koje uzorak apsorbira manjeg je intenziteta od upadnog zračenja pri izlasku iz refleksijskog elementa.

U ovom radu proučavane su transmisijski i refleksijski IR spektri proteina ubikvitina snimljeni pomoću FT-IR spektrometra.

## 2.2. Proteini

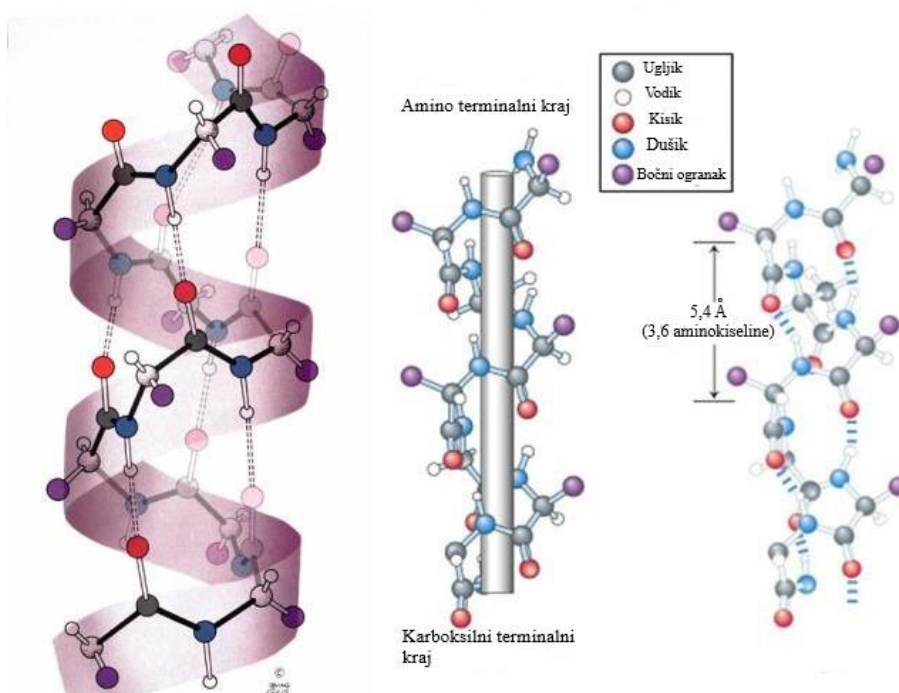
Proteini, linearni polimeri aminokiselina, jedni su od esencijalnih organskih spojeva živih bića. Sastoje se od slijeda dvadeset različitih aminokiselina uzajamno povezanih peptidnim (amidnim) vezama u polipeptidne lance. Odgovorni su za razne biološke procese poput katalize reakcija ili transporta tvari. Proteini sadrže kompleksnu trodimenzionalnu strukturu, pa je ona podijeljena u razine. Primarna struktura proteina predstavlja slijed aminokiselina i disulfidne veze nastale vezanjem bočnih ogranaka cisteina. Sva svojstva proteina, poput smatanja složenijih struktura i katalitičke aktivnosti, određena su slijedom aminokiselina. Sekundarne

strukture su uređene trodimenzionalne periodičke strukture nastale vezanjem aminokiselina vodikovim vezama. Tercijarna struktura proteina predstavlja ukupnu trodimenzionalnu konformaciju uslijed raznih neveznih interakcija slijeda aminokiselina te sadrži sekundarne strukture i nasumična klupka. Kvaterna struktura ne javlja se kod svih proteina, a obuhvaća združivanje polipeptidnih lanaca u cjelokupnu proteinsku strukturu. Proteini isto tako sadrže različite prostetičke skupine koje pomažu u izvršenju njihove funkcije.<sup>6</sup> Proučavajući strukturu proteina dobivamo informacije o njegovoj biološkoj ulozi koje se mogu dalje primjenjivati u različite svrhe.

Denaturacija proteina je proces tijekom kojeg nestaju složene proteinske strukture, uglavnom odmatanjem, prilikom čega protein gubi svoju funkciju. Okolina, tj. voda u kojoj se protein nalazi u organizmu, čini njegove vodikove veze stabilnima i tako održava strukturu i volumen potreban proteinu za obavljanje njegove funkcije. Promjenom uvjeta okoline, poput povećanja tlaka i temperature, ili promjenom otapala, pucaju i mijenjaju se vodikove veze te se smanjuje ukupni volumen proteina.

### 2.2.1. Sekundarna struktura proteina

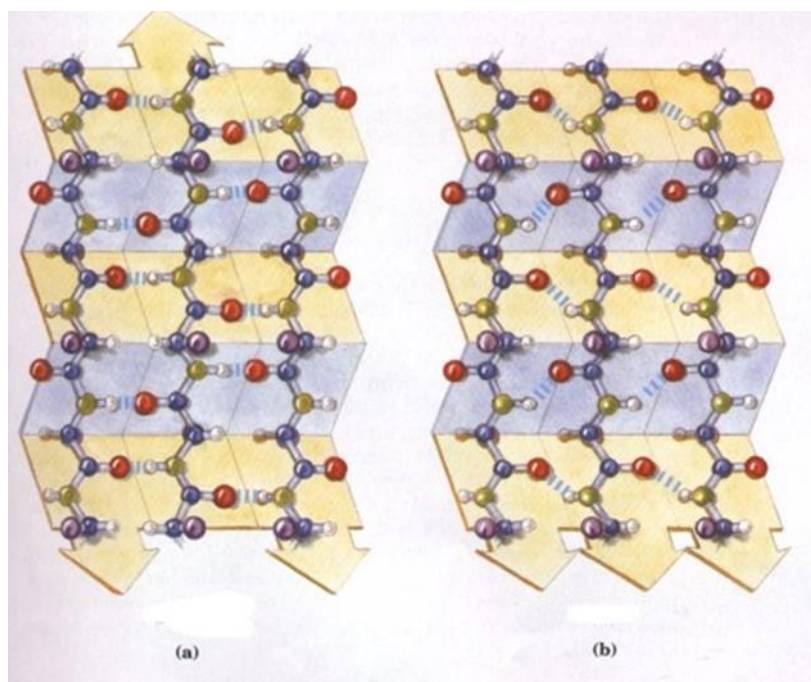
Polipeptidni lanci tvore sekundarne strukture koje se regularno pojavljuju kod proteina. Te strukture su:  $\alpha$ -zavojnice,  $\beta$ -ploče, okreti i omče. Struktura  $\alpha$ -zavojnice periodična je struktura sačinjena od zavoja visine 5,4 Å te u prosjeku sadrži 3,6 aminokiselina po zavoju (slika 3).



Slika 3. Prikaz  $\alpha$ -zavojnice (preuzeto i prilagođeno prema ref. 7).

Stabilizirana je vodikovim vezama između karbonilnog atoma kisika i amidnog dušika, tako da je  $n$  aminokiselina spojena s  $n+3$  ili  $n+4$  aminokiselinom u lancu ovisno o sekvenci proteina. Bočni ogranci aminokiselina strše prema van, a polarne skupine se nalaze unutar zavojnice.

Postoje dvije vrste  $\beta$ -ploča; paralelne i antiparalelne, kao što je prikazano na slici 4. Kod antiparalelnih ploča lanci imaju suprotan smjer, stabilne su i češće u proteinima, a kod paralelnih ploča lanci imaju isti smjer te su manje stabilne jer vodikove veze između lanaca nisu u ravnini. Okreti i omče nalaze se uglavnom na površini proteina i ne sadrže uređenu periodičnu strukturu.<sup>6</sup>



Slika 4. Prikaz antiparalelne  $\beta$ -ploče (a) i paralelne  $\beta$ -ploče (b) (preuzeto i prilagođeno prema ref. 8).

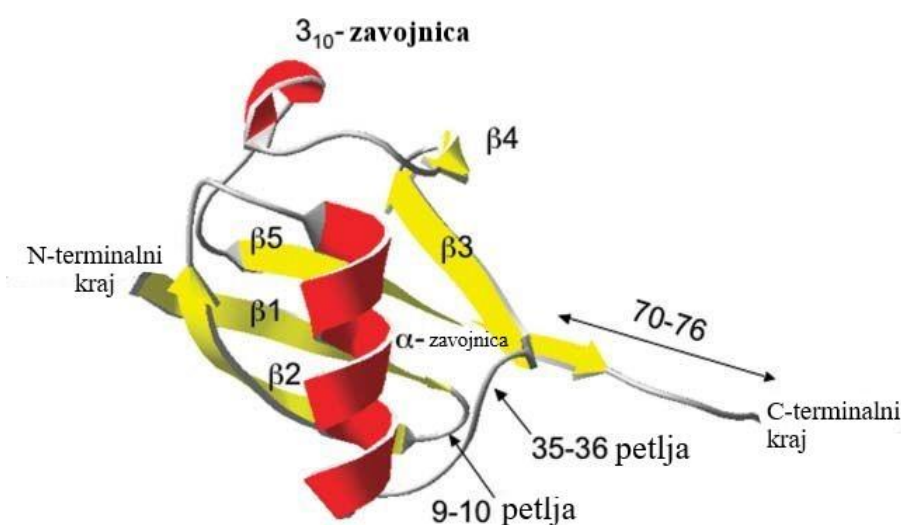
### 2.2.2. Ubikvitin

Otkriven 1975. godine, ubikvitin je poznat kao mali regulatorni protein koji se nalazi u svim eukariotskim stanicama. Primarna funkcija mu je konjugacija proteina kao signalizacija za razgradnju u proteolitičkom putu posredovanom ubikvitinom. U procesu ubikvitinacije C-terminalni glicin ubikvitina veže se na stanici nepotrebni, pogrešno smotani ili oštećeni protein izopeptidnom vezom s amino skupinom lizina ciljanog proteina. Moguće je kovalentno vezanje jednog ili više ubikvitinskog lanca na ciljani protein. Ubikvitinom povezani protein zatim putuje do proteasoma koji veže ubikvitin za svoju regulatornu jedinicu. Ciljani protein



razgrađuje se na peptidne fragmente u katalitičkoj srži proteasoma. Izopeptidaza koja se nalazi u regulatornoj jedinici kida ubikvitin (koji je ostao netaknut u procesu razgradnje ciljanog proteina) da bi se mogao ponovno upotrebljavati. Ubikvitinacija se javlja pri transkripciji gena, formaciji organa, degeneraciji živaca i mišića, u ribosomskoj i peroksisomskoj biogenezi te općenito u kontroli staničnih ciklusa.<sup>6</sup> Zbog široke primjene u stanici i većeg broja enzima potrebnih za konjugaciju proteina i ubikvitina, struktura ubikvitina vrlo je kompaktna.

Ubikvitin se sastoji od 76 aminokiselina (8,5 kDa) koje se malo razlikuju između pojedinih eukariotskih organizama. U primarnoj strukturi važno je istaknuti C-terminalni glicin na koji se konjugiraju proteini te lizin 48 na kojeg se vežu dodatne ubikvitinske molekule po potrebi. Sveukupna struktura proteina je čvrsto povezana vodikovim vezama te 87 % polipeptidnog lanca čine sekundarne strukture povezane vodikovim vezama (slika 5). Kristalna struktura proteina sadrži 16 %  $\alpha$ -zavojnica, 37 %  $\beta$ -ploče i 37 % ostalih struktura.<sup>9</sup> Tercijarne strukture ubikvitina su: 5 niti miješane paralelne/anti-paralelne  $\beta$ -ploče, 3,5 zavoja  $\alpha$ -zavojnica i 7 petlji.<sup>10</sup> U sekundarnim strukturama ne sudjeluju četiri aminokiseline na C-terminalnom kraju koje se nalaze izvan glavne globularne domene radi lakše konjugacije između ciljanog proteina i ubikvitina.



Slika 5. Sekundarna i tercijarna struktura ubikvitina prema analizi kristalne strukture. Žuto obojeno su  $\beta$ -ploče, a crveno  $\alpha$ -zavojnica (preuzeto i prilagođeno prema ref. 11).

## 2.3. IR spektroskopija proteina

Infracrvena spektroskopija se može primijeniti za analizu bioloških molekula na svim razinama složenosti, od pojedinačnih aminokiselina, izoliranih proteina, kompleksa proteina i peptida pa čak do cijelih membrana, stanica i tkiva. Osjetljiva je na molekularne mehanizme proteinskih reakcija te na sklapanje, odmatanje i greške u sklapanju proteina uzrokovane promjenom uvjeta u kojima se protein nalazi. Promjene u strukturi moguće je pratiti snimanjem spektara koristeći vremenski razlučene IR tehnike. Važno je napomenuti da se osjetljivost IR spektroskopije smanjuje s povećanjem veličine proteina, no moguće je prikupiti informacije o proteinima mase čak 150–200 kDa. IR spektri različitih proteina vrlo su slični, a opažaju se u spektralnom području između  $5000\text{ cm}^{-1}$  i  $1500\text{ cm}^{-1}$ . Jednostavni su, s malim brojem vibracijskih vrpca, zbog čega IR spektroskopijom nije moguće identificirati i provesti sekvenciranje proteina. Međutim, IR spektroskopija vrlo je korisna za prepoznavanje sekundarnih struktura proteina i praćenje raznih proteinskih procesa analizom karakterističnih amidnih vrpca.

### 2.3.1. IR vrpce amidne skupine

Detaljna analiza IR spektara amida, polipeptida i proteina ukazala je na ponavljanje karakterističnih vrpca amidne skupine za različite molekule. Analizom spektara proteina dokazalo se da postoji korelacija između položaja vrpca koje potječu od vibracija amidnih skupina i sekundarnih struktura poput  $\alpha$ -zavojnice i  $\beta$ -ploča. Vibracijske vrpce amidne skupine navedene su u tablici 1. Za proučavanje sekundarnih struktura proteina najznačajnija je amid I vrpca. Amid I vrpca javlja se u području oko  $1650\text{ cm}^{-1}$  i pripisuje većinom istezanju C=O skupine sa slabim doprinosom istezanja C–N veze, deformacije CCN skupine i svijanja u ravnini NH skupine.<sup>5</sup> Dok na nju slabo utječu bočni lanci, njezin položaj značajno ovisi o sekundarnoj strukturi proteina.

Tablica 1. Vibracijske vrpce amidne skupine polipeptida i proteina (preuzeto i prilagođeno prema ref. 12).

	$\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$	Vibracija	Vrpca
Osnovne vrpce	3300–3280	istezanje N–H veze	amid A
	3100–3060	2 x amid II (prvi viši ton)	amid B
	1660–1640	istezanje C=O skupine	amid I
	1570–1530	svijanje u ravnini NH skupine i istezanje C–N veze	amid II
	1300–1240	istezanje C–N veze i svijanje u ravnini NH skupine	amid III
	~630	svijanje u ravnini NCO skupine	amid IV
	700–650	svijanje izvan ravnine NH skupine	amid V
	~600	svijanje izvan ravnine C=O skupine	amid VI
Kombinacijske vrpce	4600	istezanje N–H veze i amid III	
	4860	istezanje N–H veze i amid II	
	4970	istezanje N–H veze i amid I	

### 2.3.2. Utjecaj sekundarne strukture na amid I vrpce

Ekperimentalna istraživanja ukazala su na ovisnost položaja amid I vrpce o sekundarnoj strukturi proteina. Spektralna područja amid I vrpce karakteristična za pojedine sekundarne strukture proteina u običnoj vodi ( $\text{H}_2\text{O}$ ) i teškoj vodi ( $\text{D}_2\text{O}$ ) prikazana su u tablici 2.

Tablica 2. Položaj amid I vrpce u IR spektrima različitih sekundarnih struktura proteina u H<sub>2</sub>O i D<sub>2</sub>O (preuzeto i prilagođeno prema ref. 5).

Sekundarna struktura	Prosječni valni broj / cm <sup>-1</sup> (H <sub>2</sub> O)	Područje valnih brojeva / cm <sup>-1</sup> (H <sub>2</sub> O)	Prosječni valni broj / cm <sup>-1</sup> (D <sub>2</sub> O)	Područje valnih brojeva / cm <sup>-1</sup> (D <sub>2</sub> O)
$\alpha$ -zavojnica	1654	1648–1657	1652	1642–1660
$\beta$ -ploče	1633	1623–1641	1630	1615–1638
	1684	1674–1695	1679	1672–1694
Okreti	1672	1662–1686	1671	1653–1691

U IR spektru proteina sa sekundarnom strukturom  $\alpha$ -zavojnice amid I vrpca opaža se pri 1655 cm<sup>-1</sup> s ramenom pri nižim valnim brojevima.<sup>5</sup> Položaj vrpce u spektru ovisi o duljini  $\alpha$ -zavojnice: dulje zavojnice karakteriziraju amid I vrpce pri nižim valnim brojevima. U IR spektrima kratkih  $\alpha$ -zavojnica ponekad izostaje glavna vibracijska vrpca te se opaža više slabijih vrpca u spektralnom području amid I vrpce. Antiparalelne  $\beta$ -ploče karakterizira jaka vrpca pri 1630 cm<sup>-1</sup> i slaba vrpca pri 1685 cm<sup>-1</sup>. Prepoznatljive amid I vrpce za paralelne  $\beta$ -ploče javljaju se pri višim valnim brojevima od odgovarajućih vrpca antiparalelnih ploča, nalaze se bliže jedna drugoj te je vrpca pri višem valnom broju slabijeg intenziteta i ponekad se niti ne opaža u spektru. Povećanjem broja niti osnovna vrpca za obje vrste ploča pomiče se prema nižim valnim brojevima. Uvijanje uzrokuje pomak prema višim valnim brojevima i manji razmak između dvije vrpce u spektrima antiparalelnih ploča, što je manje izraženo u slučaju paralelnih  $\beta$ -ploča. Razlike između IR spektara paralelnih i antiparalelnih ploča su manje kada se uspoređuju paralelne ploče s većim brojem niti i uvinute antiparalelne ploče ili antiparalelne ploče s manjim brojem niti.

Za određivanje sekundarne strukture proteina na temelju amid I vrpce koriste se dva pristupa. U jednom pristupu se amid I vrpca prilagođava vrpcama komponenata, čiji su položaji određeni tehnikama sužavanja vrpca (dekonvolucija), dok se u drugom pristupu amid I vrpca razlaže na osnovne vrpce koje su izračunate na temelju kalibracijskog seta spektara proteina poznate strukture.<sup>5</sup> Pažljivom obradom i analizom spektara moguće je odrediti sekundarnu strukturu proteina s pogreškom manjom od 7 %.

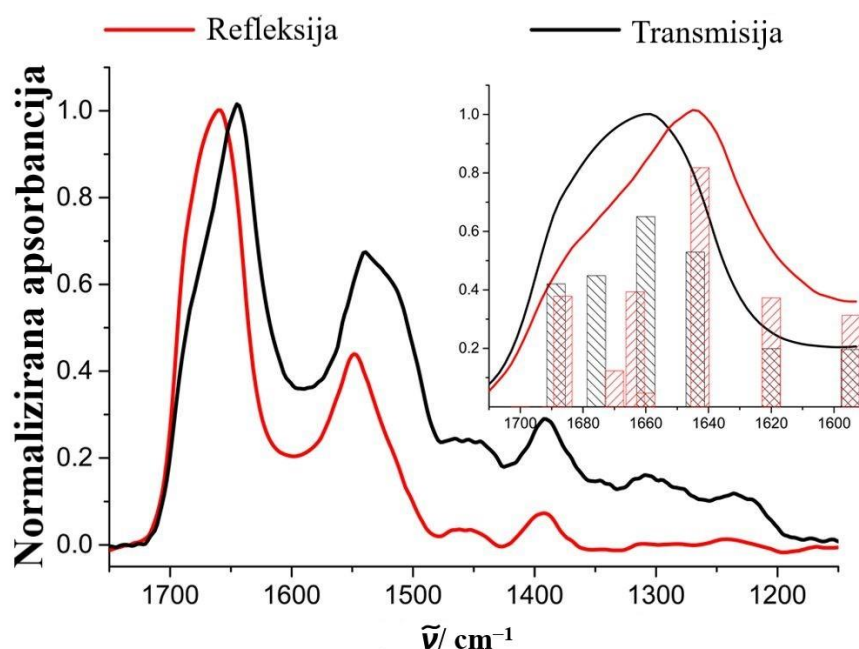
### 2.3.1. Utjecaj vode i vodikovih veza na IR spektre proteina

Glavna poteškoću u IR spektroskopiji proteina uzrokuje prisutnost vode u uzorku, koja intenzivno apsorbira zračenje u područjima oko  $3300\text{ cm}^{-1}$  i  $1650\text{ cm}^{-1}$  te prekriva važne vrpce proteina. Vrpca proteina najviše interferira vrpca strižne deformacije molekule vode pri  $1640\text{ cm}^{-1}$ . Kako bi se umanjio doprinos vode u IR spektru, razvijeni su razni načini pripreme uzoraka koji sadrže dovoljno vode za očuvanje biološke strukturne forme proteina, a produciraju odgovarajuće IR spektre.<sup>13</sup> Uklanjanje doprinosa otapala iz spektra može se provesti digitalnim putem, zasebnim snimanjem IR apsorpcije otapala pri istim uvjetima pri kojima se snima proučavani uzorak proteina te oduzimanjem spektra otapala od IR spektra proteina. Osim uklanjanja doprinosa vode obradom spektara, mogu se snimati spektri uzoraka proteina pripravljenih u „teškoj vodi“ (deuterijev oksid,  $\text{D}_2\text{O}$ ), koja slabo apsorbira u području između  $1800\text{ cm}^{-1}$  i  $1400\text{ cm}^{-1}$  i prikladno je otapalo za analizu amid I vrpce. U deuterijevu oksidu dolazi do zamjene deuterija i vodika vezanih na sumpor, dušik i kisik, ovisno o pristupačnosti navedenih atoma i koncentraciji deuterijevih iona. Iako se pri tome značajno mijenjaju amid II, amid A i amid B vrpce, amid I vrpca koja je najvažnija za proučavanje sekundarnih struktura, ostaje očuvana. Sekundarne strukture poput  $\alpha$ -zavojnice i  $\beta$ -ploče većinom su stabilne u deuterijevom oksidu te ih je moguće odrediti, dok se okreti i neuređene strukture djelomično denaturiraju. Kombinacija deuteriranih i protoniranih dijelova proteina može uzrokovati promjene u IR spektrima proteina, zbog čega se proteini na dulje vrijeme ostavljaju u deuterijevom oksidu kako bi se postigla potpuna izmjena protona deuterijem.<sup>5</sup>

Vodikove veze stabiliziraju ne samo sekundarne strukture, već i cijeloukupnu strukturu proteina. One imaju značajan utjecaj na spektre snimljene IR spektroskopijom, uobičajeno smanjujući frekvenciju vibracija istezanja i povećavajući frekvenciju vibracija uvijanja. Procesu tijekom kojih se mijenja konformacija ili broj vodikovih veza u molekuli, poput procesa odmatanja proteina, lako se mogu pratiti IR spektroskopijom. Amidne skupine, čije se vrpce analiziraju u IR spektroskopiji proteina, jako su osjetljive na promjene vodikovih veza te se lako iščitavaju iz spektara. Nastajanje vodikovih veza između amidnih skupina u jednostavnim molekulama uzrokuje promjenu položaja, širine i intenziteta vibracijske vrpce u usporedbi sa strukturama u kojima te veze nisu prisutne. Te promjene, proučavane u spektrima polipeptidnih vrsta pomogle su pri određivanju sekundarnih struktura poput  $\alpha$ -zavojnice.<sup>12</sup> Vodikove veze smanjuju frekvenciju amid I vrpce, primjerice solvatirana  $\alpha$ -zavojnica u prosjeku apsorbira zračenje pri valnom broju za  $20\text{ cm}^{-1}$  manjem nego desolvatirana  $\alpha$ -zavojnica.<sup>5</sup>

## 2.4. Transmisijski i refleksijski FT-IR spektar ubikvitina

Snimljen je transmisijski FT-IR spektar vodene otopine ubikvitina na prozoru od cinkova selenida i refleksijski FT-IR spektar vodene otopine ubikvitina na površini zlata, održavajući prirodnu konformaciju proteina (slika 6). Umetak na slici 6 pokazuje spektralno područje amid I vrpce. Amid I vrpca je analizirana prilagođavanjem sume Gaussovih krivulja eksperimentalnim podacima. Za određivanje broja i položaja vrpce koje se nalazi unutar amid I vrpce primijenjena je dekonvolucija. Dekonvolucija se u spektroskopiji koristi za izdvajanje signala jednog analita iz preklopljenih odziva matematičkim operacijama.<sup>14</sup> Postupkom prilagođavanja krivulja određen je položaj i intenzitet vrpce komponenata, koje ukazuju na sekundarnu strukturu istraživanog proteina.<sup>15</sup>



Slika 6. Refleksijski i transmisijski FT-IR spektar vodene otopine ubikvitina na površini Au, odnosno na prozoru ZnSe (preuzeto i prilagođeno prema ref. 15).

Snimljeni refleksijski i transmisijski IR spektri relativno su slični, iako su u refleksijskom spektru vrpce opažene pri većim valnim brojevima, što se pripisuje pobudi vibracija dipolnog momenta okomitog na površinu i česta je pojava pri refleksiji tankih filmova. Asignacija refleksijskog i transmisijskog spektra na temelju prilagođavanja krivulja prikazana je u tablici 3.

Tablica 3. Asignacija amid I vrpce u refleksijskom i transmisijskom FT-IR spektru ubikvitina (preuzeto i prilagođeno prema ref. 15).

Asignacija	Valni broj / $\text{cm}^{-1}$ (refleksijska vrpca)	Valni broj / $\text{cm}^{-1}$ (transmisijaska vrpca)
Okret	1595	1595
Okret	1620	1620
$\beta$ -ploča (vrpca I)	1644	1643
$\alpha$ -zavojnica	1660	1663
$\beta$ -ploča (vrpca II)	1676	1670
Okret	1689	1686

Vrpca pri  $1660 \text{ cm}^{-1}$  ( $1663 \text{ cm}^{-1}$ ) pripisana je  $\alpha$ -zavojnici, čija se vrpca uobičajeno nalazi u području  $1648\text{--}1657 \text{ cm}^{-1}$ . Vrpce u području  $1590\text{--}1620 \text{ cm}^{-1}$  te vrpca pri  $1689 \text{ cm}^{-1}$  ( $1686 \text{ cm}^{-1}$ ) pripisane su slučajnim okretima. Na  $\beta$ -ploču upućuju dvije apsorpcijske vrpce: vrpca pri  $1676 \text{ cm}^{-1}$  ( $1670 \text{ cm}^{-1}$ ) u području viših valnih brojeva (referentno područje:  $1674\text{--}1695 \text{ cm}^{-1}$ ) i vrpca pri  $1644 \text{ cm}^{-1}$  ( $1643 \text{ cm}^{-1}$ ) u području nižih valnih brojeva (referentno područje:  $1623\text{--}1641 \text{ cm}^{-1}$ ).

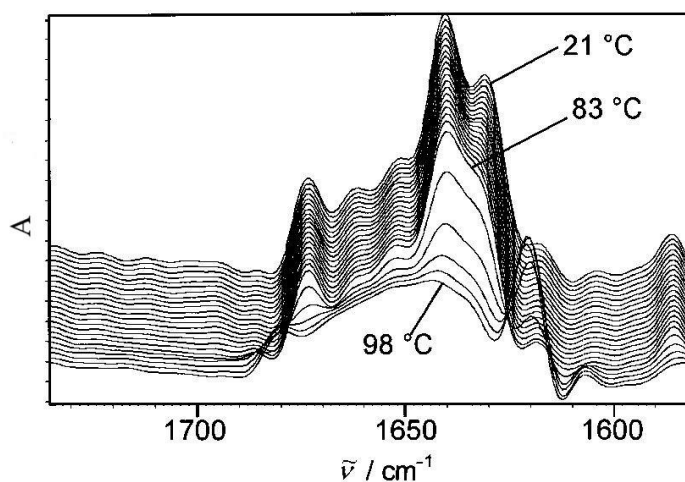
## 2.5. Istraživanje temperaturom i tlakom potaknutog odmatanja ubikvitina primjenom FT-IR spektroskopije

Temperatura i tlak važni su parametri za održavanje strukture proteina. Povećanjem vrijednosti tih veličina protein gubi postojeću sekundarnu strukturu, mijenja svoj volumen i odmata se. Osjetljivost amid I vrpce na sekundarnu strukturu omogućuje praćenje utjecaja tlaka i temperature na protein, pružajući informacije o strukturi i svojstvima proteina koje doprinose istraživanju dinamike smatanja proteina. Utjecaj povišenog tlaka i temperature na ubikvitin istražen je FT-IR spektroskopijom, u uzorcima proteina pripremljenim u deuterijevom oksidu.<sup>9</sup> Asignacija amid I vrpce ubikvitina prikazana je u tablici 4.

Tablica 4. Asignacija amid I vrpce ubikvitina u D<sub>2</sub>O (preuzeto i prilagođeno prema ref. 9).

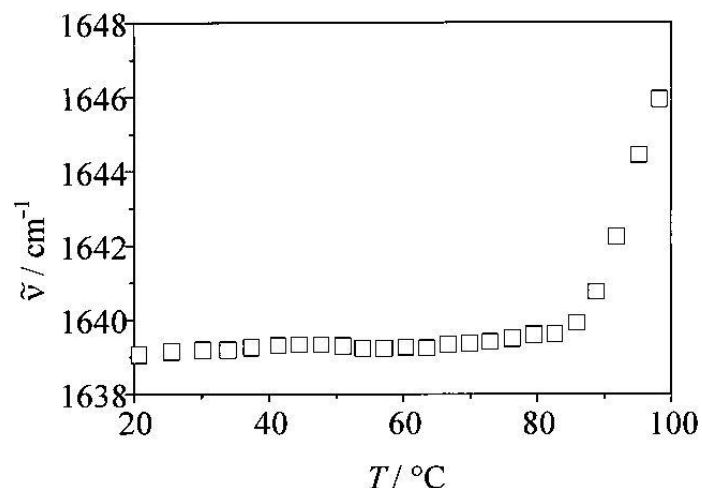
Asignacija	Valni broj / cm <sup>-1</sup>
Intermolekulska β-ploča	~1620
	~1685
Intramolekulska β-ploča	~1630
	~1674
Neuređene strukture	~1641
α-zavojnica	~1652
Okreti	~1663

FT-IR spektri ukazuju da ubikvitin mijenja svoju sekundarnu strukturu i počinje se odmatati iznad 83 °C (slika 7). Pri 20 °C maksimum amid I vrpce nalazi se pri 1639 cm<sup>-1</sup>, a potječe od neuređenih struktura. Porastom temperature iznad 83 °C vrpca se pomiče prema višim valnim brojevima te se pojavljuju dvije nove vrpce pri ~1620 cm<sup>-1</sup> i ~1685 cm<sup>-1</sup> (slika 8). Nove vrpce pripisane su intermolekulskim β-pločama koje nastaju smanjenjem volumena ubikvitina, na što ukazuje i smanjenje intenziteta vrpce neuređenih struktura. Intenziteti vrpce asigniranih struktura intramolekulskih β-ploča (~36 %), α-zavojnica (~12 %) i okreta (~15 %) konstantni su tijekom procesa.



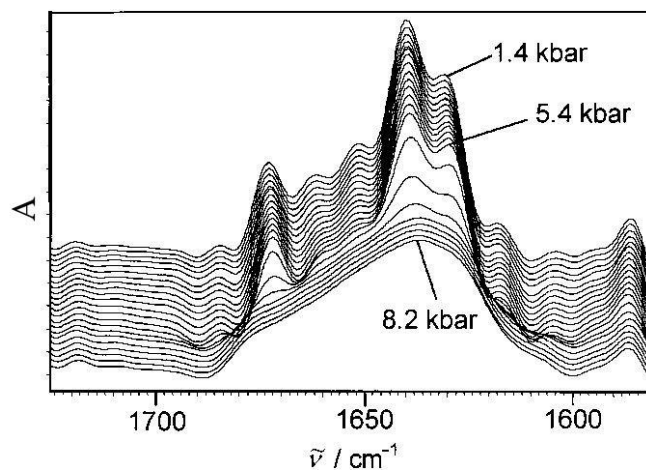
Slika 7. Dekonvoluirana amid I vrpca ubikvitina u FT-IR spektrima snimljenim u ovisnosti o temperaturi u području između 20 °C i 100 °C pri atmosferskom tlaku, otapalo je D<sub>2</sub>O (preuzeto i prilagođeno prema ref. 9).



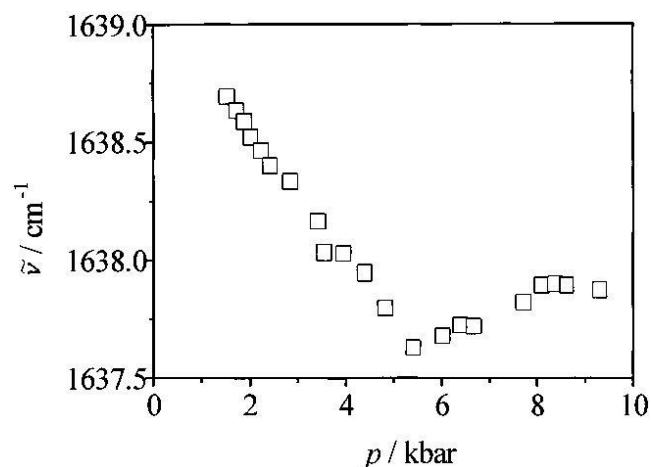


Slika 8. Temperaturna ovisnost položaja amid I vrpce ubikvitina pri atmosferskom tlaku, otapalo je  $\text{D}_2\text{O}$  (preuzeto i prilagođeno prema ref. 9).

U IR spektrima ubikvitina u ovisnosti o tlaku uočene su značajne promjene amid I vrpce iznad  $\sim 5,4$  kbar (slika 9). Povećanjem tlaka do 5,4 kbar amid I vrpca pomiče se prema nižim valnim brojevima, dok se iznad  $\sim 5,4$  kbar pomiče prema višim valnim brojevima, uslijed pucanja vodikovih veza u kojima sudjeluju  $\text{C}=\text{O}$  skupine i posljedične denaturacije proteina (slika 10).



Slika 9. Dekonvoluirana amid I vrpca ubikvitina u FT-IR spektrima snimljenim u ovisnosti o tlaku u području između 1 kbar i 9 kbar pri temperaturi od 21  $^\circ\text{C}$ , otapalo je  $\text{D}_2\text{O}$  (preuzeto i prilagođeno prema ref. 9).



Slika 10. Ovisnost položaja amid I vrpce ubikvitina o tlaku pri temperaturi od 21 °C, otapalo je D<sub>2</sub>O (preuzeto i prilagođeno prema ref.9).

Intenzitet amid I vrpce se smanjuje s porastom tlaka do 6,4 kbar, nakon čega se povećava intenzitet vrpce pripisanih  $\alpha$ -zavojnica i okretima, a smanjuje intenzitet vrpce koje potječu od neuređenih struktura. Promjena tlaka ne utječe na intenzitet vrpce intramolekulskih  $\beta$ -ploča. Opisane spektralne promjene ukazuju na proces odmatanja proteina u dva koraka.

Koristeći podatke mjerenja ovisnosti IR spektara proteina o tlaku i temperaturi moguće je konstruirati  $p/T$  graf ovisnosti stabilnosti strukture proteina. Opisani primjeri ukazali su na raznovrsne mogućnosti primjene IR spektroskopije u praćenju proteinskih procesa.

### § 3. LITERATURNI IZVORI

1. Z. Popović, *Infracrvena spektroskopija*, Zagreb, 1999, str. 2–12.
2. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA, Varaždin, 2013, str. 51–55.
3. [http://www1.lsbu.ac.uk/water/water\\_vibrational\\_spectrum.html#:~:text=Water%20absorbs%20over%20a%20wide,%C2%B5%2D%2010%20%C2%B5\)%20and%20electronic](http://www1.lsbu.ac.uk/water/water_vibrational_spectrum.html#:~:text=Water%20absorbs%20over%20a%20wide,%C2%B5%2D%2010%20%C2%B5)%20and%20electronic) (datum pristupa 17. lipnja 2020.)
4. [https://www.researchgate.net/figure/The-basic-configuration-of-the-FTIR-spectrometer\\_fig1\\_319452819](https://www.researchgate.net/figure/The-basic-configuration-of-the-FTIR-spectrometer_fig1_319452819) (datum pristupa 24. travnja 2020.)
5. A. Barth, *Biochim. Biophys. Acta* **1767** (2007) 1073–1101.
6. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto Jr., L. Stryer, *Biochemistry (5th ed.)*, W. H. Freeman and Company, New York, 2015 str. 27–49, 683–686.
7. <http://xray.bmc.uu.se/Courses/bioinformatik2003/Intro/a-helix.jpg> (datum pristupa 10. travnja 2020.)
8. <http://www.bioinfo.org.cn/book/biochemistry/chapt07/sim1.htm> (datum pristupa 10. travnja 2020.)
9. H. Herberhold, R. Winter, *Biochemistry* **41** (2002) 2396–2401.
10. D. Finley, V. Chau, *Annu. Rev. Cell Biol.* **7** (1991) 25–69.
11. S. E. Jackson, *Org. Biomol. Chem.* **4** (2006) 1845–1853.
12. C. N. R. Rao, *Chemical applications of infrared spectroscopy*, Academic Press Inc., New York i London, 1963 str. 485–495, 522–529.
13. F. Heinz, M. Werner, *Infrared Spectroscopy of Proteins*, John Wiley & Sons Ltd., 2002.
14. Š. Ukić, M. Kaštelan Macan (ur.), *Kem. Ind.* **65** (2016) 181–182.
15. Q. Hu, J. Laskin, *J. Phys. Chem. B* **120** (2016) 4927–4936.