

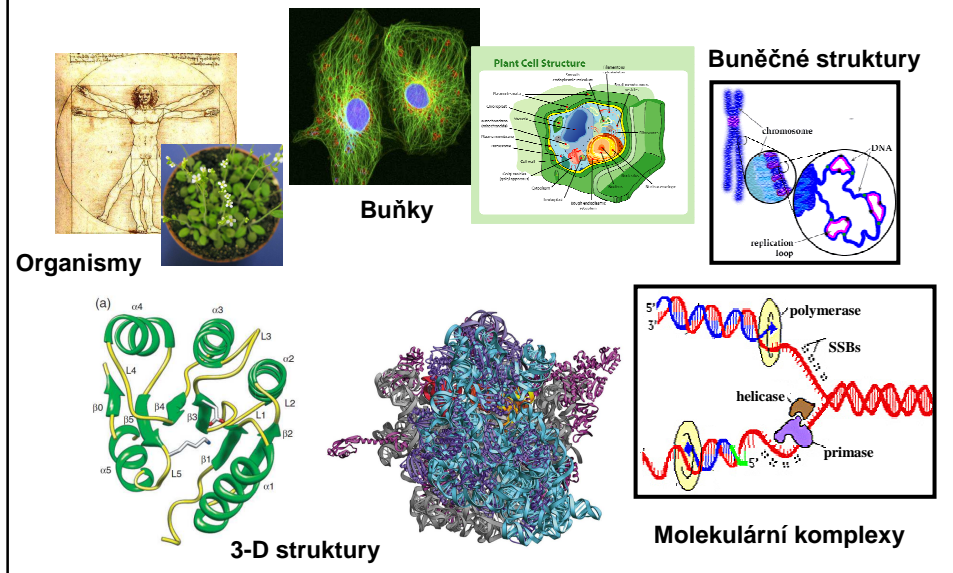
Metody makromolekulární strukturní analýzy

Jaromír MAREK,
Centrum strukturní biologie,
CEITEC MU

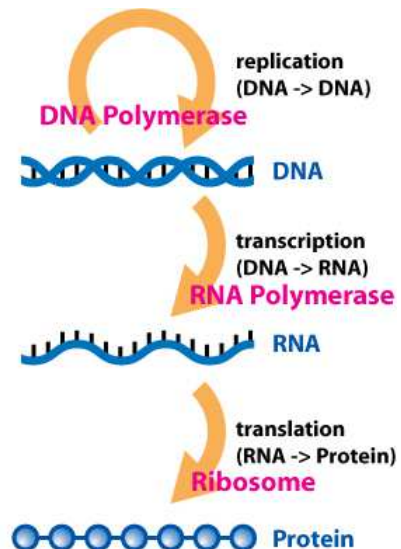
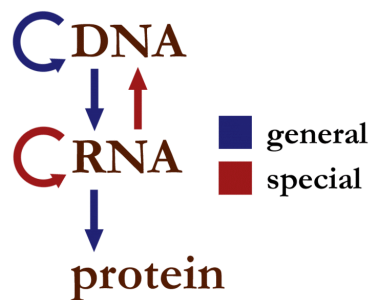
Obsah

- Předmět studia
- Sekundární struktura a CD
- Metody na určování terciární struktury
- RTG krystalografie
- NMR
- Kryoelektronová mikroskopie

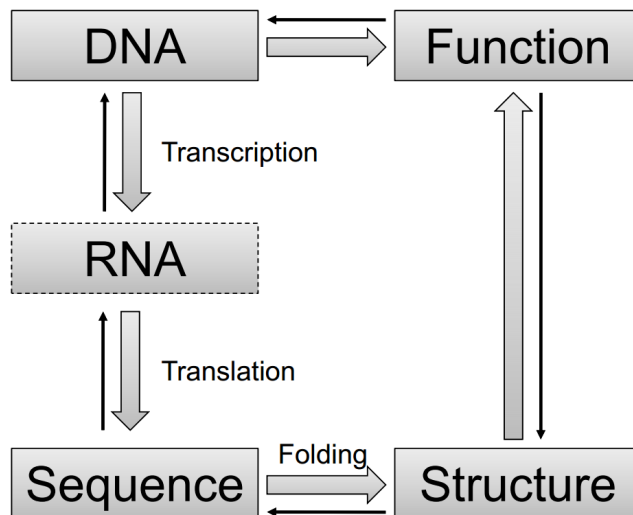
(Bio)makromolekulární strukturní analýza



Centrální dogma molekulární biologie



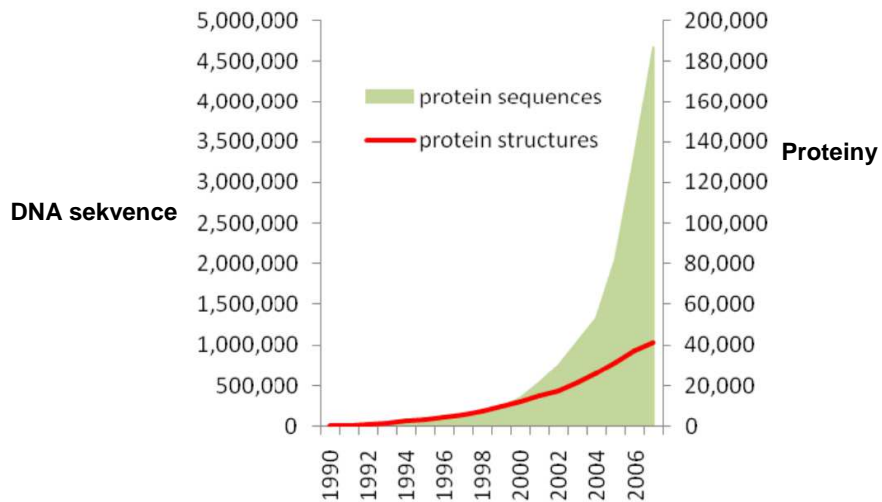
Centrální dogma strukturní biologie



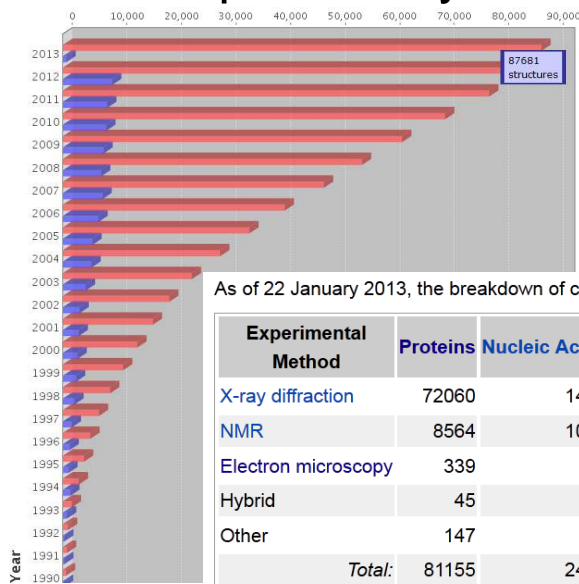
Počet struktur k určení

Počet	Rozpustné/ globulární proteiny	Membránové proteiny
Sekvence	10^7	10^6
Exp. určené struktury	10^5	10^3
Proteinové sklady	10^3	10^2

Strukturní biologie v „postgenomické“ éře biologie



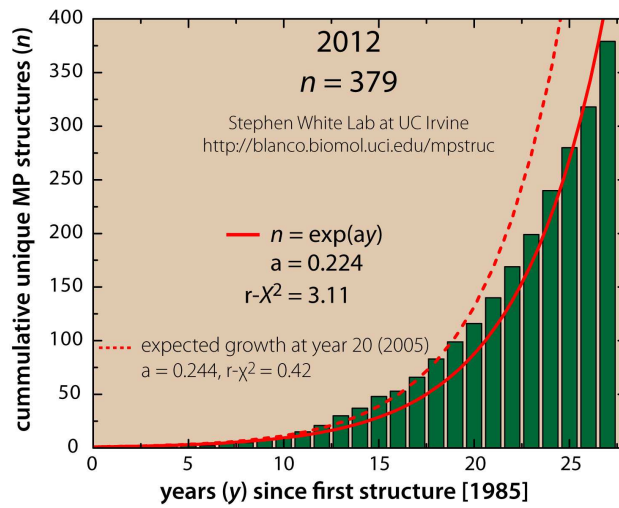
Počet proteinových struktur v PDB



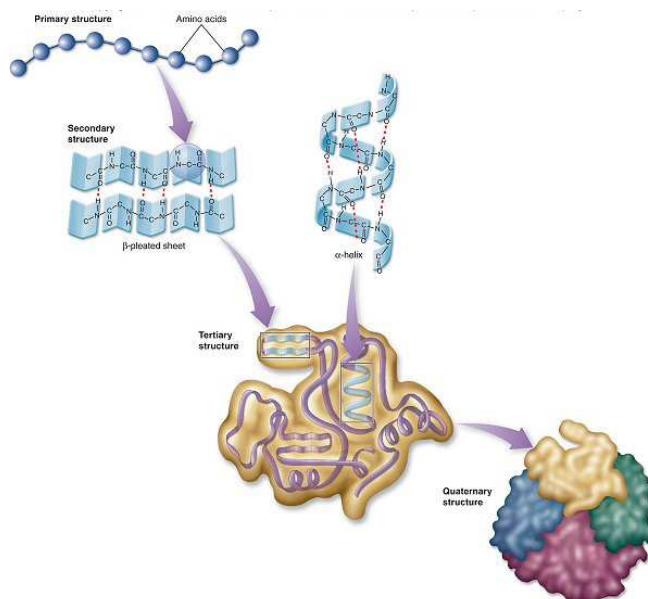
As of 22 January 2013, the breakdown of current holdings is as follows:

Experimental Method	Proteins	Nucleic Acids	Protein/Nucleic Acid complexes	Other	Total
X-ray diffraction	72060	1432	3686	3	77181
NMR	8564	1017	191	7	9779
Electron microscopy	339	39	123	0	501
Hybrid	45	3	2	1	51
Other	147	4	5	13	169
Total:	81155	2495	4007	24	87681

Membránové proteiny



Úrovně popisu (bio)struktur

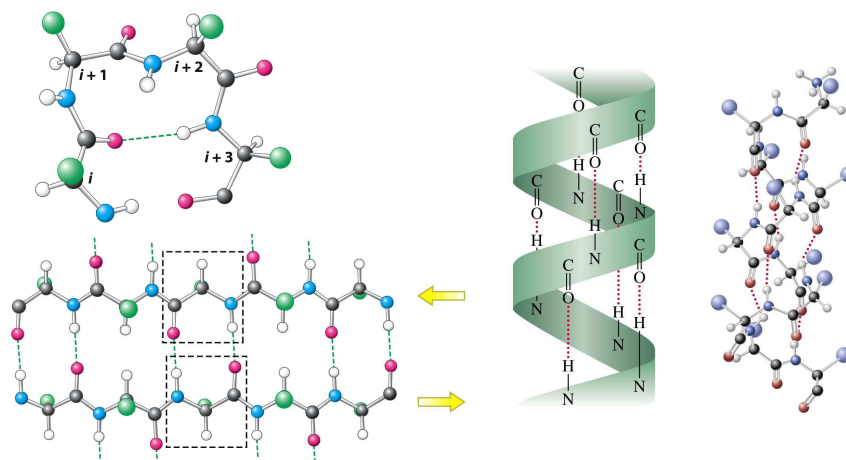


Primární struktura – přímé určení

- MS - hmotnostní spektroskopie (mass spectrometry)
- Techniky typu MALDI, Matrix-assisted laser desorption/ ionization
- Detaily - přednáška doc. Zdráhala

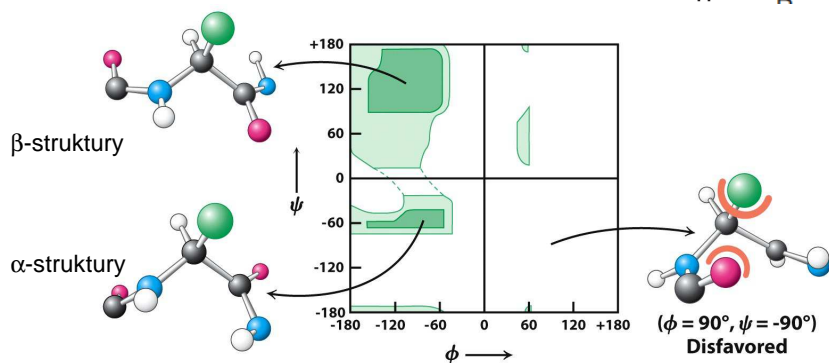
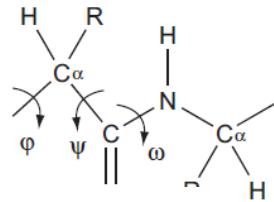
Sekundární struktura – definice

Určující interakce –strukturu stabilizující vodíkové můstky



Sekundární struktura – nepřímé určení

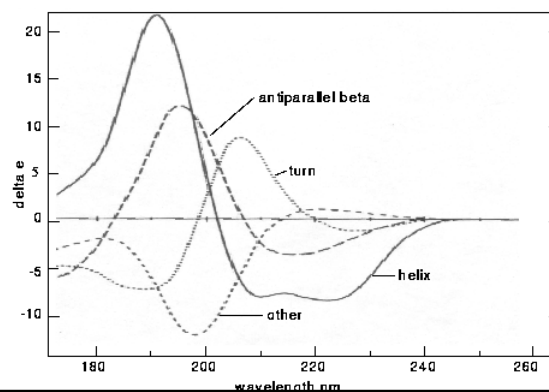
- Úhly ϕ a ψ
- Vazby zapojené v α a β strukturách



Sekundární struktura a CD spektra

- cirkulární dichroismus – různá absorpce levotočivého a pravotočivého kruhově polarizovaného světla
- spektrálně závislé změny - UV oblast - 170 - 260 nm
- Aditivní signál (množství, délka dráhy, složky)

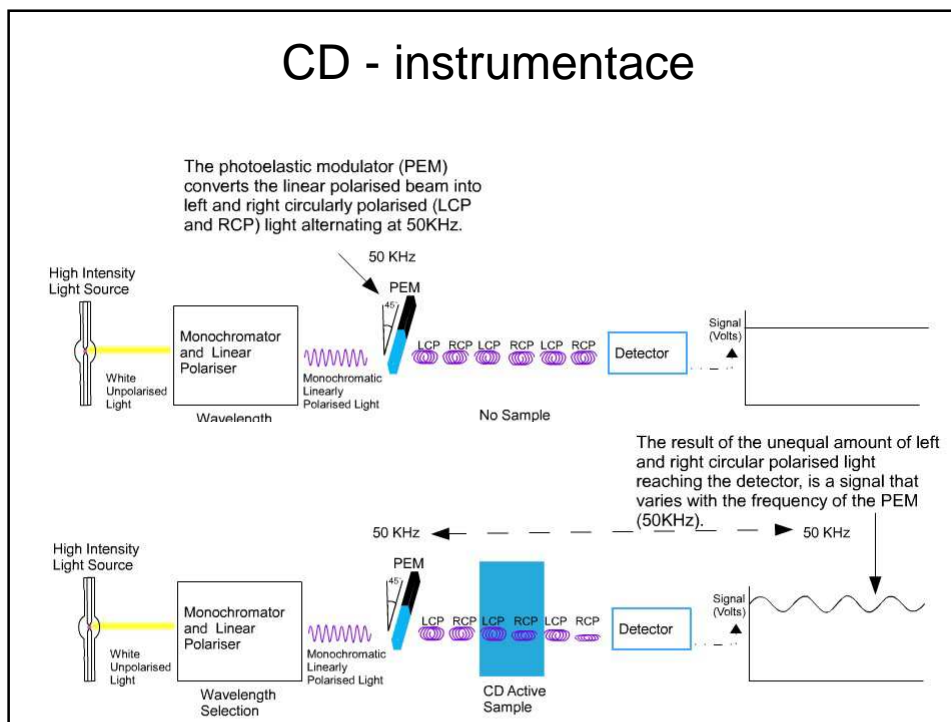
$$\theta_T = x_1 \cdot \theta_h + x_2 \cdot \theta_s + x_3 \cdot \theta_c$$



CD - fyzikální principy

- Lineárně polarizované světlo: <http://www.enzim.hu/~szia/cddemo/edemo2.htm>
- Lin. polarizované světlo+absorpce:<http://www.enzim.hu/~szia/cddemo/edemo10.htm>
- Superpozice záření: <http://www.enzim.hu/~szia/cddemo/edemo4.htm>
<http://www.enzim.hu/~szia/cddemo/edemo5.htm>
- Kruhově polarizované světlo: <http://www.enzim.hu/~szia/cddemo/edemo7.htm>
- Lineárně vs kruhově polarizované světlo:
<http://www.enzim.hu/~szia/cddemo/edemo8.htm>
- Kruhově polarizované světlo a absorpce:
<http://www.enzim.hu/~szia/cddemo/edemo11.htm>
- Kruhově polarizované světlo a cirkulární dichroismus (=rozdílná absorpce L a P složky): <http://www.enzim.hu/~szia/cddemo/edemo14.htm>

CD - instrumentace



CD - instrumentace

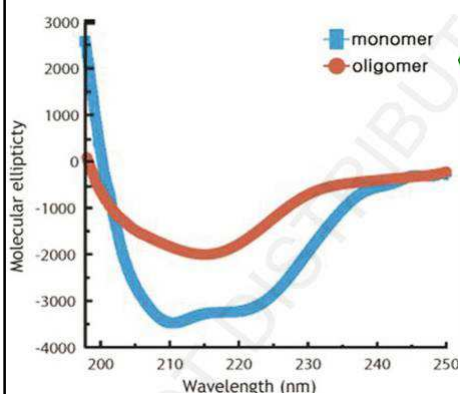
- Výrobce – např. JASCO
- Zdroj světla: Xe lampa
- Dráha světla ve vzorku: ~ 1 mm



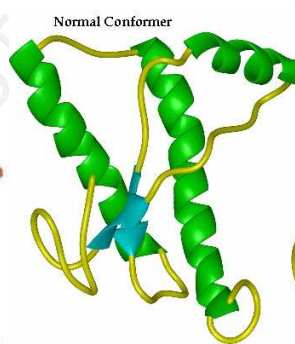
- Maximálně přečištěný vzorek
- Žádné dodatečné UV absorbenty
- Filtrace (parazitní rozptyl na mikronečistotách)
- Roztok – podmínky blízké fyziologickým

CD – příklad aplikace – prion PrPc

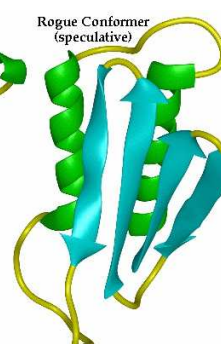
CD spektrum



RTG experiment



model



Adapted from http://www.complammasi.edatoben/essays/gallery/aw_prion.pdf

CD – výhody a nevýhody

Výhody:

- nedestruktivní metoda
- malé množství vzorku (200 ul @ 0.5 mg/ml)
- citlivost na fyziolog. změny ovlivňující sekundární strukturu
- relativně rychlá a „levná“ metoda

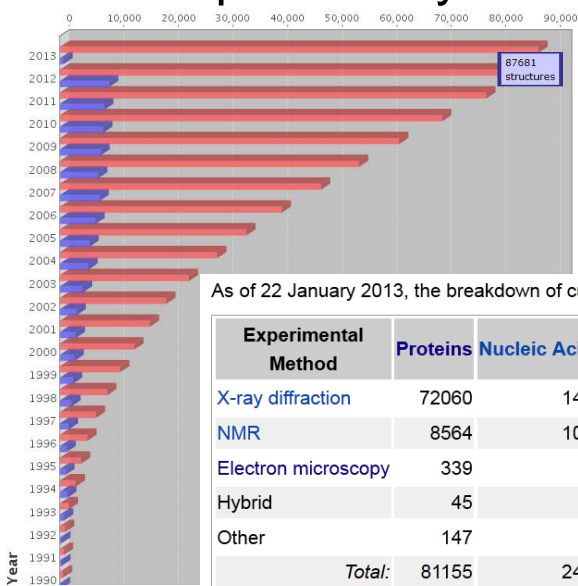
Nevýhody:

- nejde používat koncentrované absorbující pufrы
- relativně nízká přesnost num. analýzy podílu α/β struktur

Hlavní oblast použití:

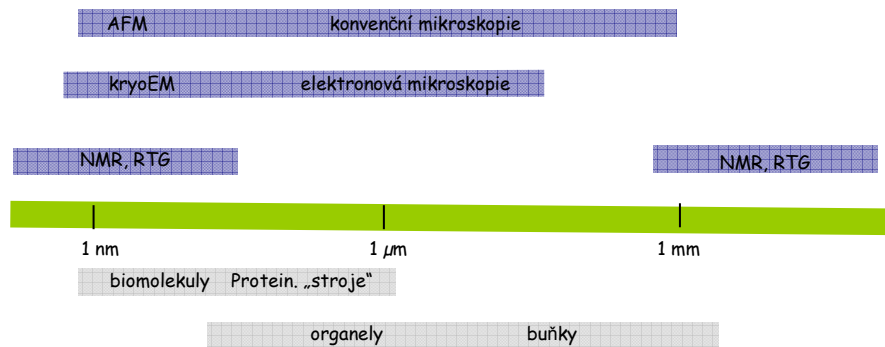
Informace o stavu „sbalení“ (tzv. foldu), resp. sekundární strukturu makromolekulárního vzorku za podmínek blízkých fyziologickým

Počet proteinových struktur v PDB



(Strukturní) biologie – exp. techniky

Oblasti rozlišení metod a velikostní škály objektů



Studium 3D struktur: sonda + vzorek

Sonda:

- (viditelné světlo ?)
- RTG záření
- vlny/částice: elektrony
- radiofrekvenční vlny

Vzorek:

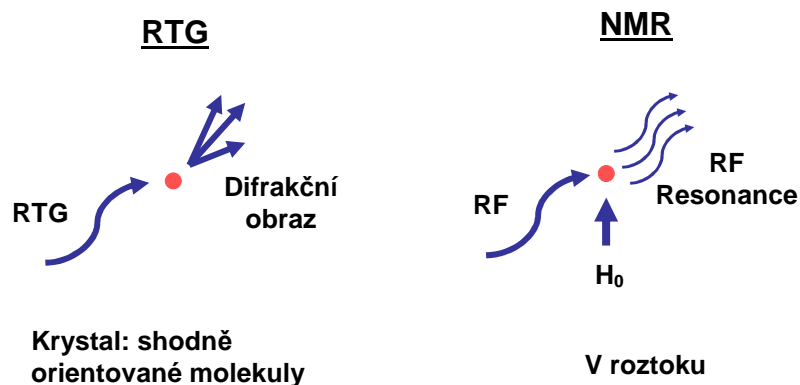
- (bio)molekuly v roztoku - NMR
- (bio)molekuly zmražené v ledu -kryoEM
- (bio)molekuly uspořádané v krystalu - RTG

Studium 3D struktur proteinů

PDB	<u>Z roztoků</u> NMR	<u>Krystaly</u> RTG difrakční techniky
2001	: 2 a ¼ tisíce	Přes 12 tisíc
2008	: 7 a ½ tisíce	44 a ½ tisíce
2013	: 8 a ½ tisíce	Přes 72 tisíc

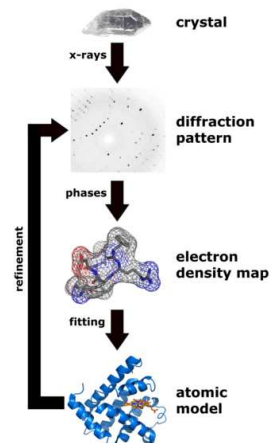
Odhad: většina struktur přinejmenším globulárních proteinů (proteinů s dobře určenou terciární strukturou = výsledky CD) bude určována difrakcí RTG záření i v budoucnu.

Studium 3D struktur: RTG+NMR



RTG krystalografie - postup

- (0.) Příprava rekombinantního proteinu, čištění, zahušťování...
1. Krystalizace
2. Difrakční experiment
3. Fázový problém, příprava modelu
4. Zpřesňování modelu



Krystaly

Krystal – periodicky uspořádaná látka

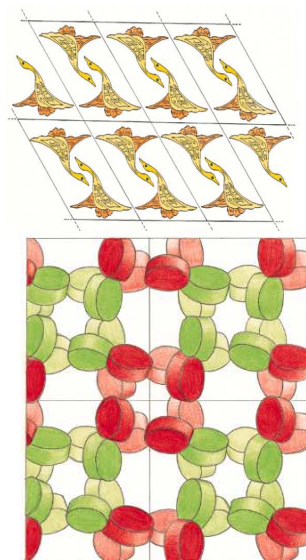
Opakování motivu:

- posun
- rotace

Krystal (bio)polymeru

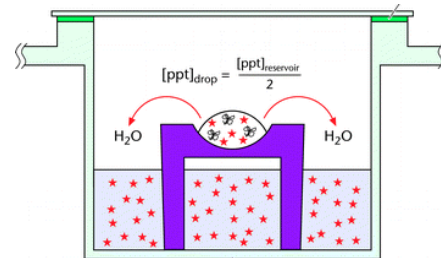
- oblast polymeru
- oblast rozpouštědla

Čistota + stabilita vzorku

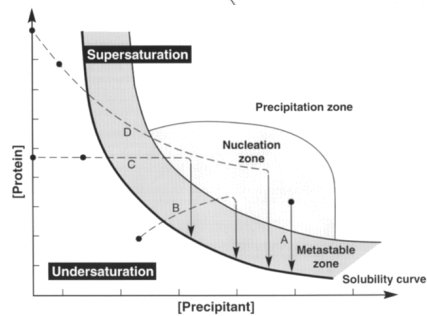


Krystalizace proteinů

- Difúzní techniky

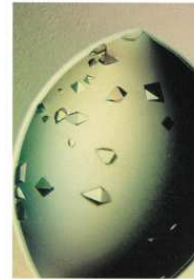


- Fázový graf



Krystalizace proteinů

Problém:
Jak „rychle“ vypěstovat
„použitelný“ krystal?

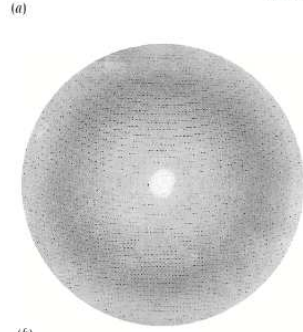
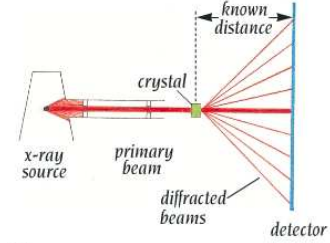
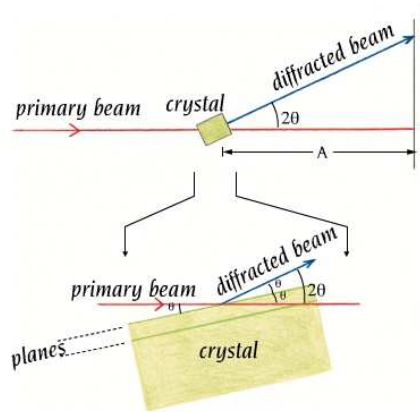


- Empirie – sady roztoků
- Souběžné experimenty
- Malé (nanolitrové) objemy

=> nasazení robotiky



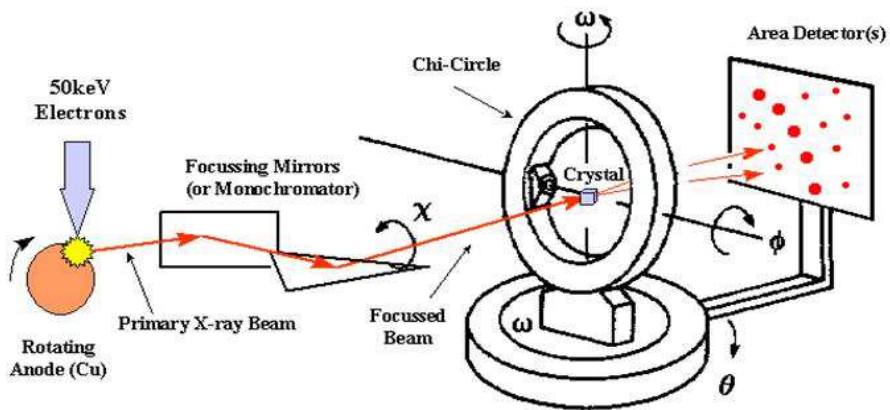
Difrakční experiment: principy



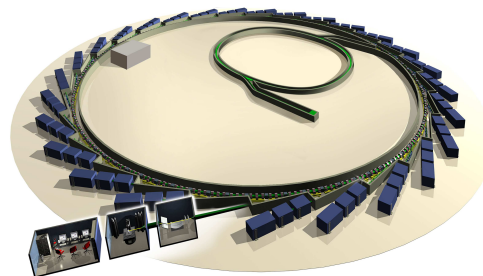
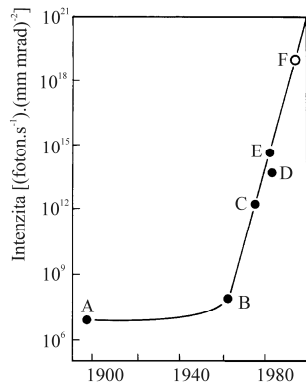
Interference = difrakce:

$$2d \cdot \sin \theta = n \lambda$$

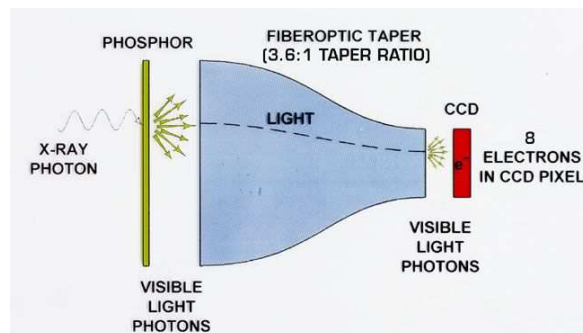
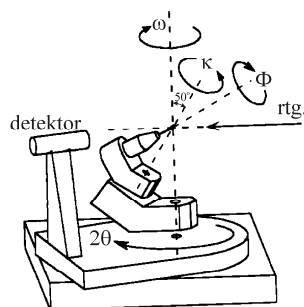
Difrakční experiment-schéma



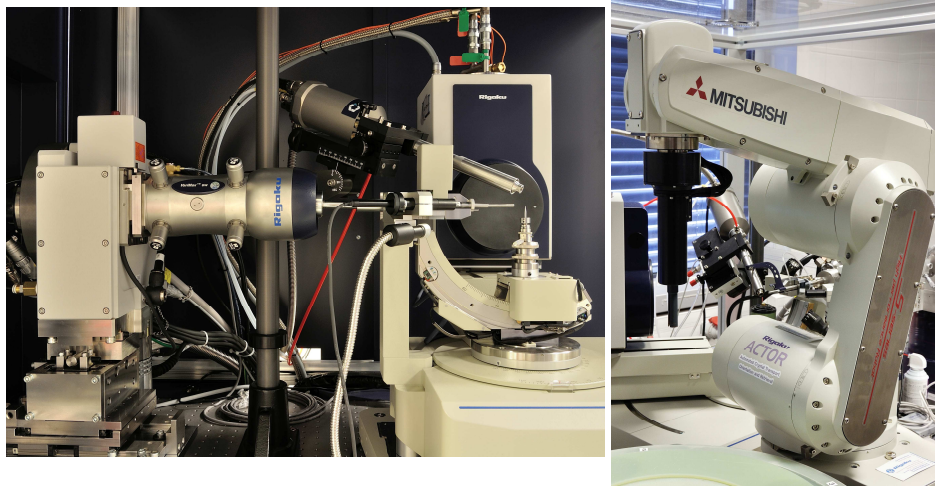
Difrakční experiment: zdroj RTG



Difrakční experiment: goniometr+detektor



Difrakční experiment: instrumentace na MU



Krykystalografie – mj. eliminace radiačního aj. rozpadu vzorku

Difrakční experiment: interpretace dat

Nabitá částice je v poli rovinného monochromatického záření sekundárním zdrojem elektromagnetického pole

$$I_Q = I_{oi} \frac{e^4}{m^2 r^2 c^4} \sin^2 \varphi$$

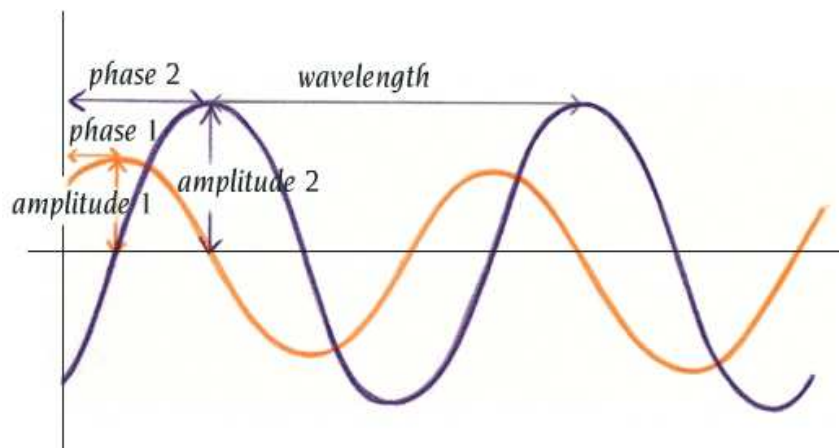
Rozptyl na protonech je nevýznamný (je 1837²x slabší), difrakcí RTG záření studujeme **elektronovou strukturu látky**

Krystalová elektronová hustota je obráceným Fourierovým obrazem strukturních amplitud

$$\rho(\vec{r}) = \int_{V^*} F(\vec{r}^*) \exp(-2\pi i \vec{r}^* \cdot \vec{r}) d\vec{r}^* = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l=-\infty}^{+\infty} F_{hkl} \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)]$$

$F(r)$ je komplexní veličina přímo neměřitelná, měříme jen její velikost => **Fázový problém krystalografie**

Difrakční experiment: vlnění, amplituda+fáze

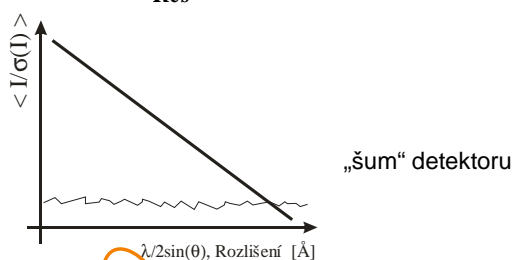
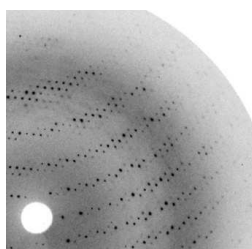


Difrakční experiment: limitované rozlišení

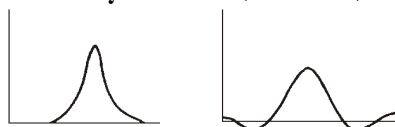
geometrické limity na počet naměřených dat

$$2d_{Res} \sin \theta = \lambda$$

$$d_{Res} = \lambda / 2 \sin \theta$$



$$\rho(\vec{r}) = \int F(\vec{r}^*) \exp(-2\pi i \vec{r}^* \cdot \vec{r}) d\vec{r}^* = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l=-\infty}^{+\infty} F_{hkl} \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)]$$



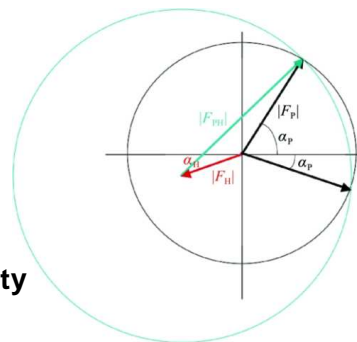
rychlé + přesné měření =>
co nejintenzivnější zdroj RTG

Fázový problém

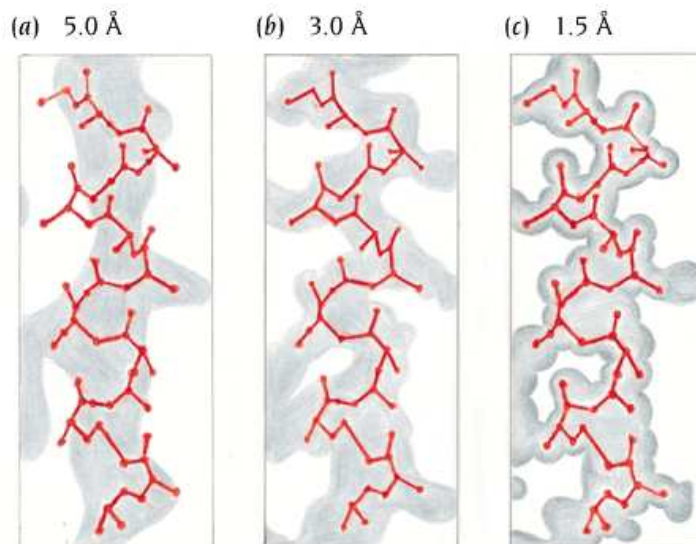
- cíl krystalografie – zjistit 3-D model studované (makro)molekuly
- prostředek – určit při difrakčním experimentu ztracenou informaci o fázích strukturních amplitud, pak Fourierovou transformací získat mapy elektronových hustot
- nejjednodušší metoda – fázový problém vůbec neřešit, využít podobnost studovaného systému se systémem s již známou 3-D strukturou (MR, molecular replacement).
- nutná je poměrně velmi vysoká podobnost mezi modelem a studovaným systémem (AA identita cca 30% a lépe, AA podobnost 50% a lépe)

Fázový problém: SeMet proteiny + kovové deriváty proteinů

- kanály rozpouštědla (krystalograficky neuspořádané vody)
- relativní stabilita terciální struktury globulárních proteinů při interakci jejich interakci s „malými“ molekulami
- nutnost opakovaných měření s různými dobře difraktujícími **izomorfními deriváty**
- podobnost struktur proteinů s jejich Se-Met analogy



Strukturní model: vliv rozlišení

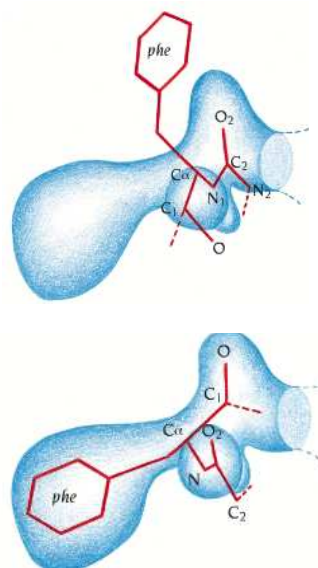
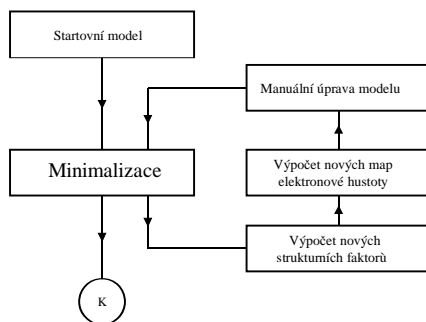


Nebezpečí: hlavní nebo vedlejší řetězec => chybně postavený model

Strukturní model: zpřesňování

Nelineární problém – iterativnost, konvergence

Kritérium správnosti : R-faktory
$$R = \frac{\sum_{\vec{h}} \|F_{\vec{h}}^o\| - K \|F_{\vec{h}}^c\|}{\sum_{\vec{h}} \|F_{\vec{h}}^o\|}$$



RTG krystalografie: výstupy

monokrystal – velikost $\sim 10^{-4}$ m, $V \sim 10^{-10}$ - 10^{-12} m³

krystalová mřížka - mřížkové parametry $\sim 10^{-8}$ - 10^{-9} m

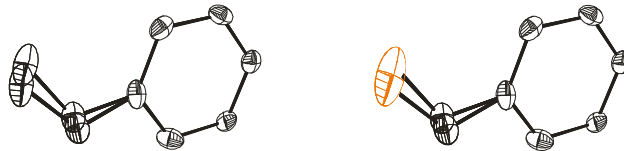
- $V \sim 10^{-24}$ - 10^{-27} m³

- typicky 2-8 „molekul“ v buňce

strukturní model – „průměrná“, rovnovážná struktura

(ze souboru 10^{12} - 10^{18} molekul)

Teplotní aj. pohyby – „teplotní faktory“ (B, ev. U)



teplotní elipsoidy (ORTEP) – pravděpodobnost výskytu

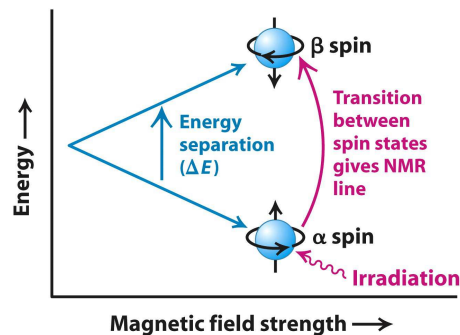
NMR spektroskopie

NMR – nukleární magnetická rezonance

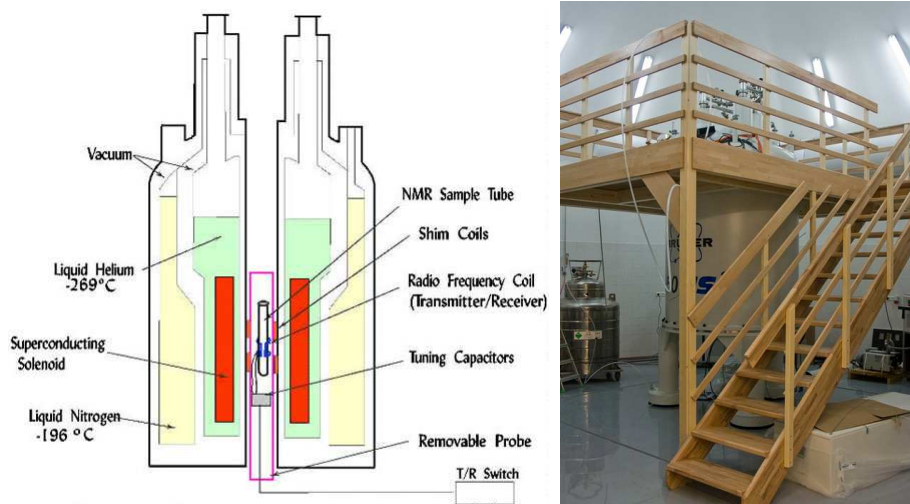
„nukleární:“ jádra izotopů s nevykompenzovanými spiny

^1H , ^{13}C , ^{15}N

- „magnetická“: externí (silné) magnetické pole
- „rezonance“: pohlcování (+ vyzařování) záření (RF pásmo) je zesilováno na rezonančních frekvencích



NMR spektroskopie: instrumentace

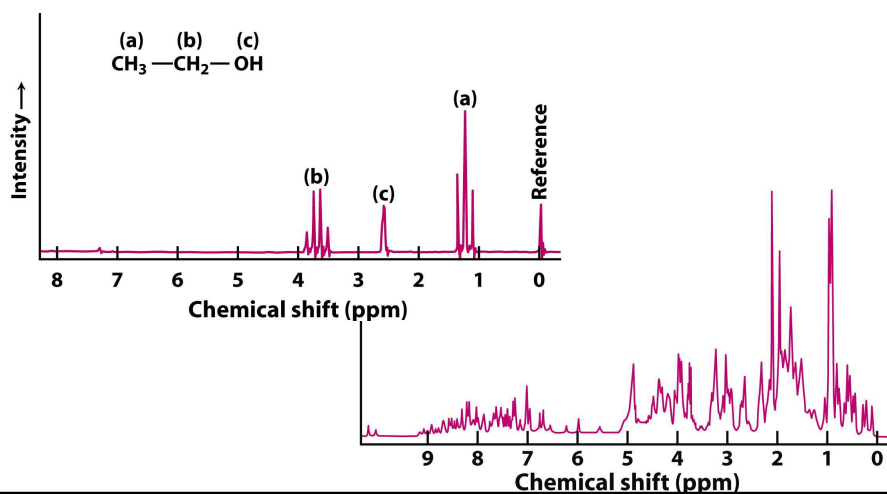


Proteinový vzorek: objem cca 300-600 μ l, mM koncentrace, čistota + stabilita

NMR spektroskopie: chemický posuv

Chemický posuv (chemical shift) – posun rezonanční frekvence (vůči standardu)

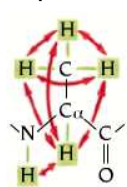
Modifikace signálu: změny magnetického pole + „chemického prostředí“



NMR spektroskopie: multi D experimenty

Korelační ovlivňování se blízkých magnetických momentů

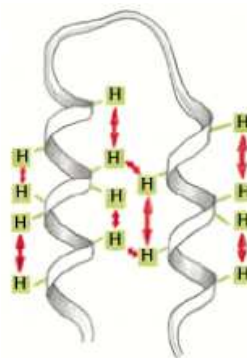
Experiment: COSY + NOE spektroskopie



Ala



Ser



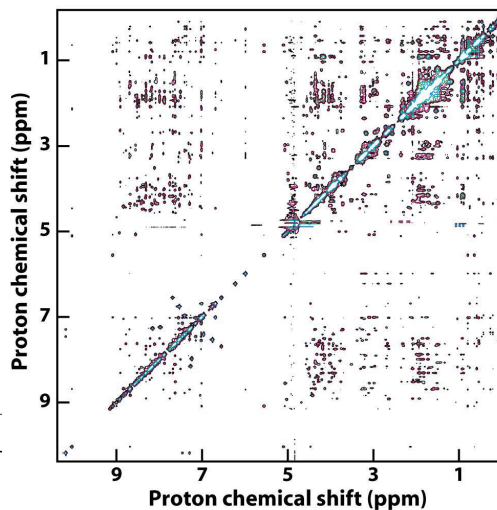
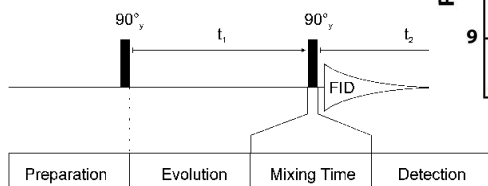
COSY – korelační spektroskopie – korelují momenty vazebně blízkých jader (např. z jednotlivých AA) - 1D

NOESY - „nuclear Overhauser effect“ spektroskopie – zdroj 2D a 3D informací o „blízkých“ ($d \leq 5 \text{ \AA}$) jádrech

NMR spektroskopie: multi D experimenty

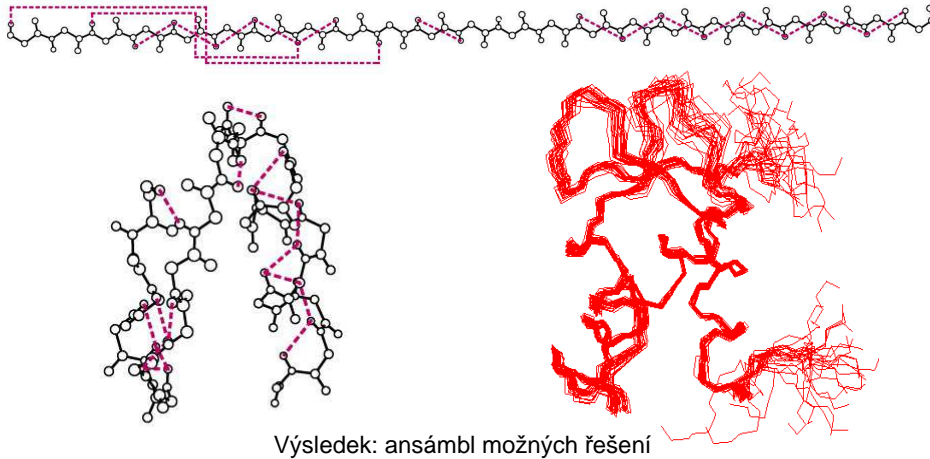
FT NMR: NMR s Fourierovou analýzou

Multi D experiment: několik budících pulsů

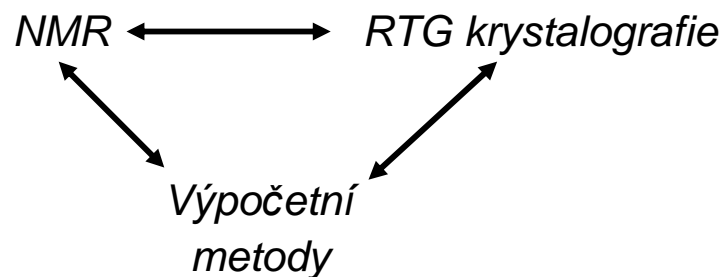


NMR spektroskopie: „nepřímá“ 3-D data

Korelační experimenty – „přiřazení“/identifikace píků vůči primární struktuře
NOE experimenty – distanční informace o blízkých jádrech



Komplementarita experimentálních technik



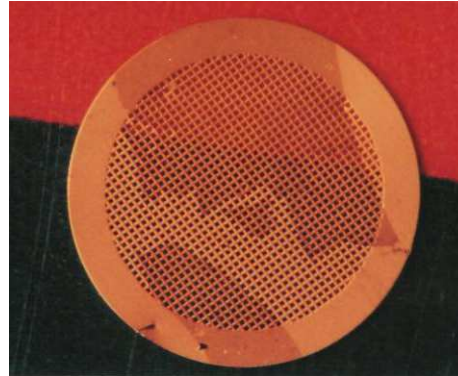
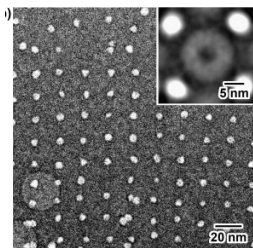
+ metodiky „budoucnosti“ : kryoEM, ...

Limitace technik: velikost studovaného systému, rychlost, možné „slepé“ uličky, ...

KryoEM: transmisní elektronová mikroskopie

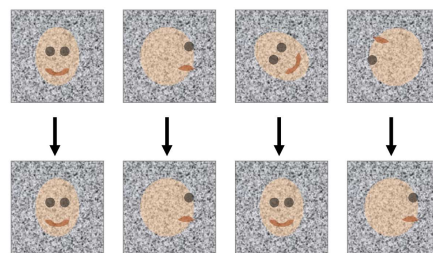
- elektronová mikroskopie → vakuum
- transmisní → tenký vzorek
- vzorek za „přirozených“ podmínek

-> Vzorek (monovrstva náhodně umístěných a náhodně orientovaných vzorků) je zmražený v (amorfním) ledu fixovaným v podpůrné mřížce

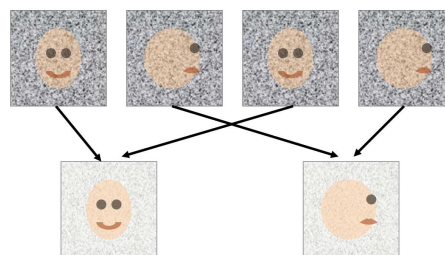


KryoEM: počítačová rekonstrukce obrazu

pohledy na „různé“ vzorky
„náhodným“ směrem

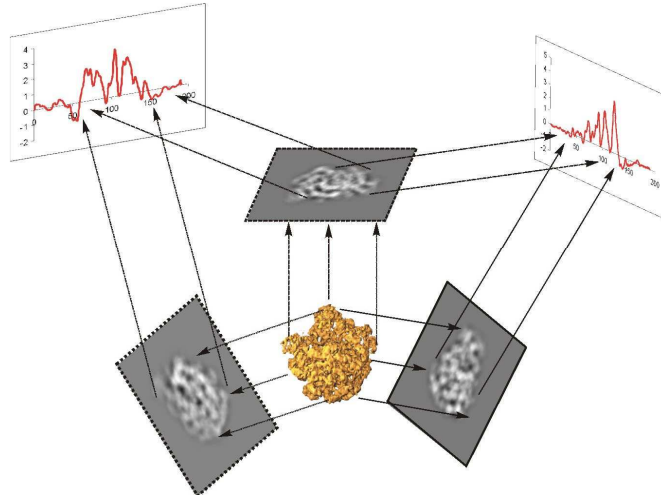


slabý/zašuměný signál



KryoEM: počítačová rekonstrukce obrazu

3D obraz : počítačová rekonstrukce z (mnoha) 2D pohledů



Strukturní informace: integrovaný přístup

Povrchová obálka alfaviru působícího „Chikungunya“ horečku.

$M_r = 25$ MDa

Červená+žlutá – 240 dimerů
protein. heterokomplexu
E1/E2 - výsledek RTG

Virion. obálka – šedá –
výsledek kryoEM

