

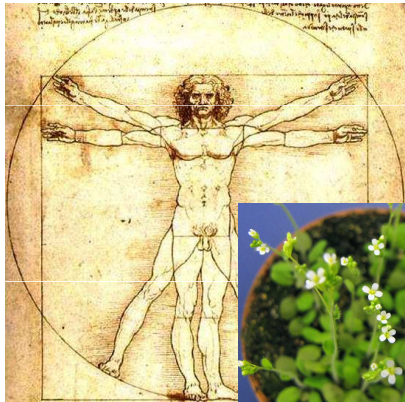
# Metody makromolekulární strukturní analýzy

Jaromír MAREK,  
Centrum strukturní biologie,  
CEITEC MU

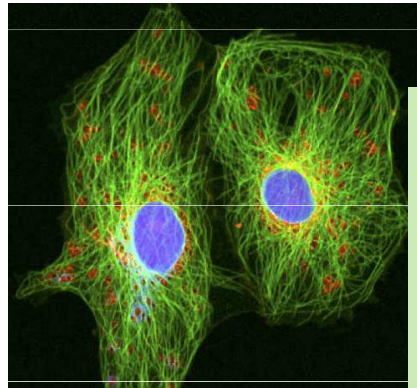
# Obsah

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

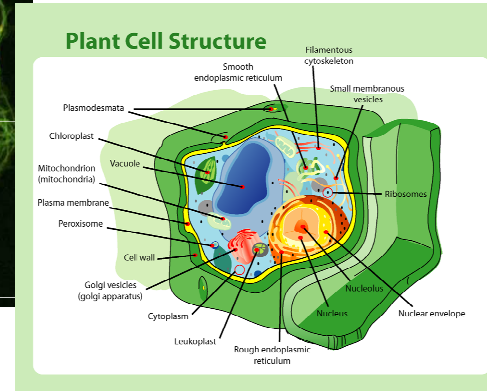
# (Bio)makromolekulární strukturní analýza



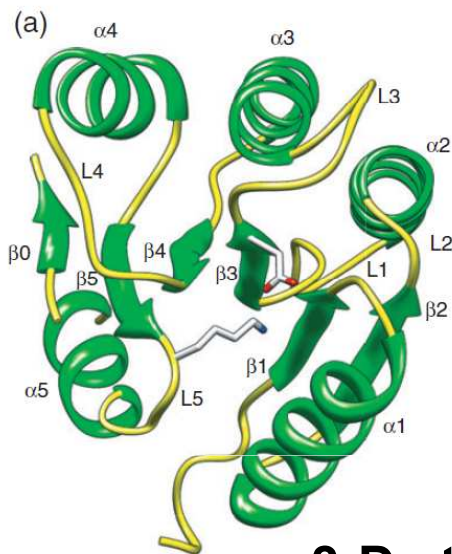
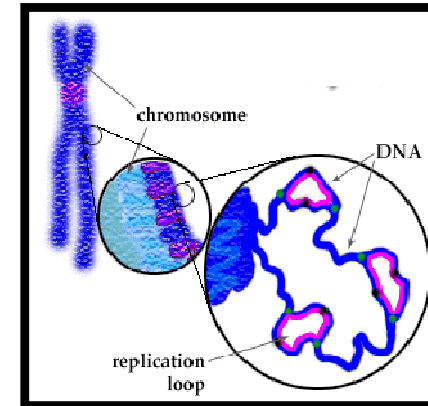
Organismy



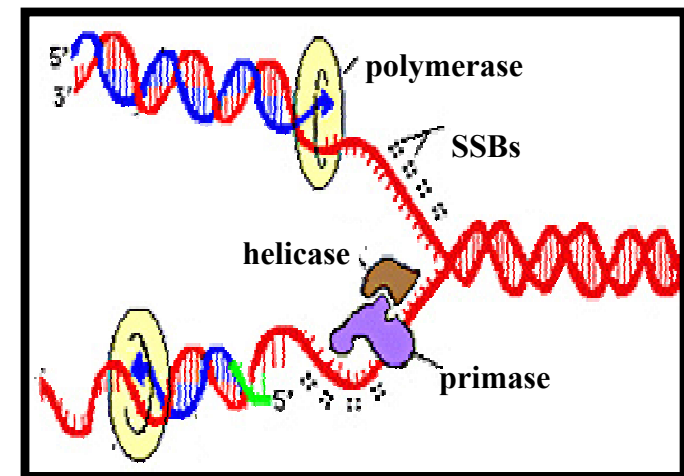
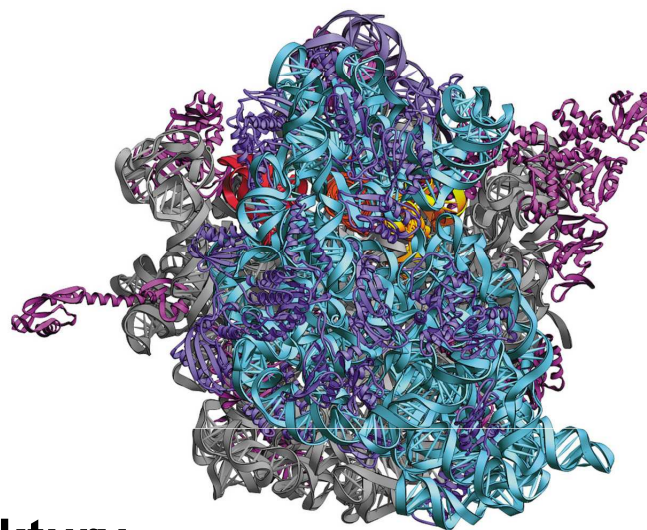
Buňky



Buněčné struktury

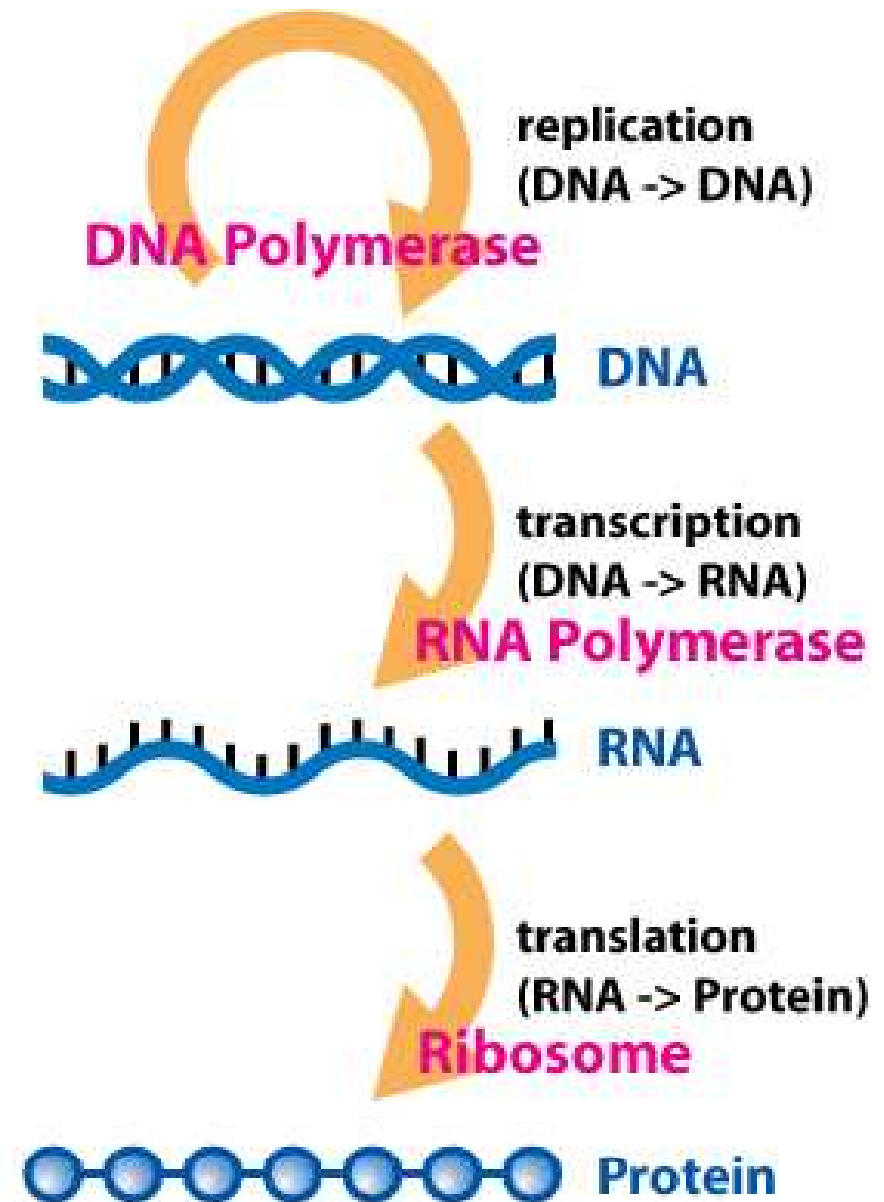
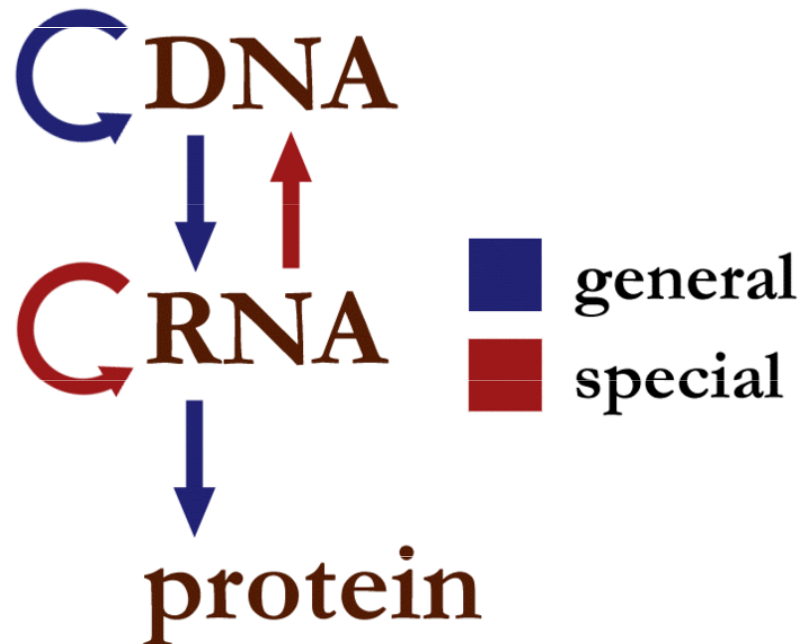
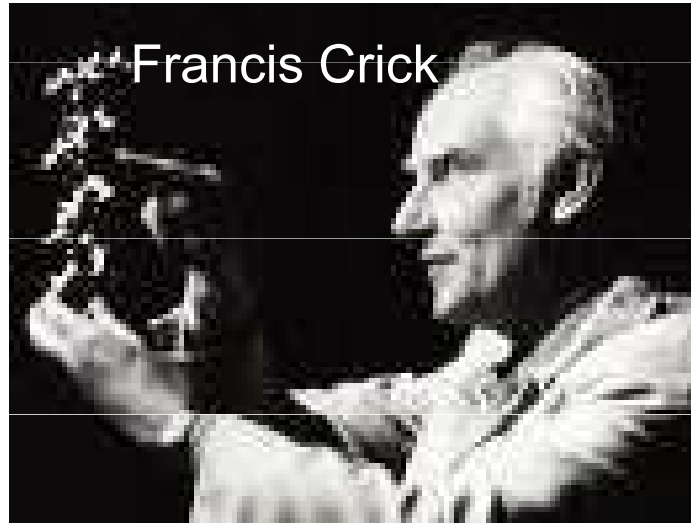


3-D struktury

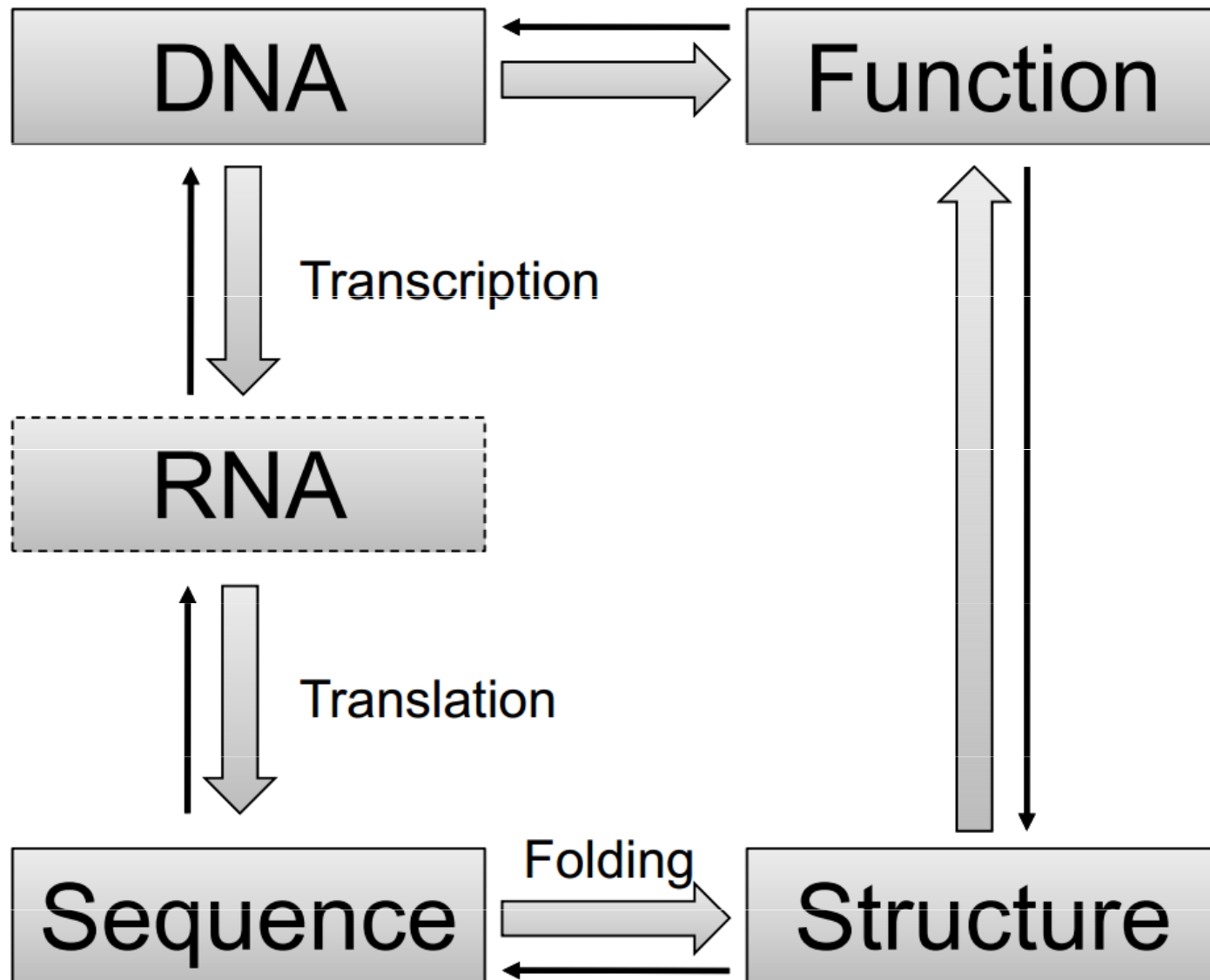


Molekulární komplexy

# Centrální dogma molekulární biologie



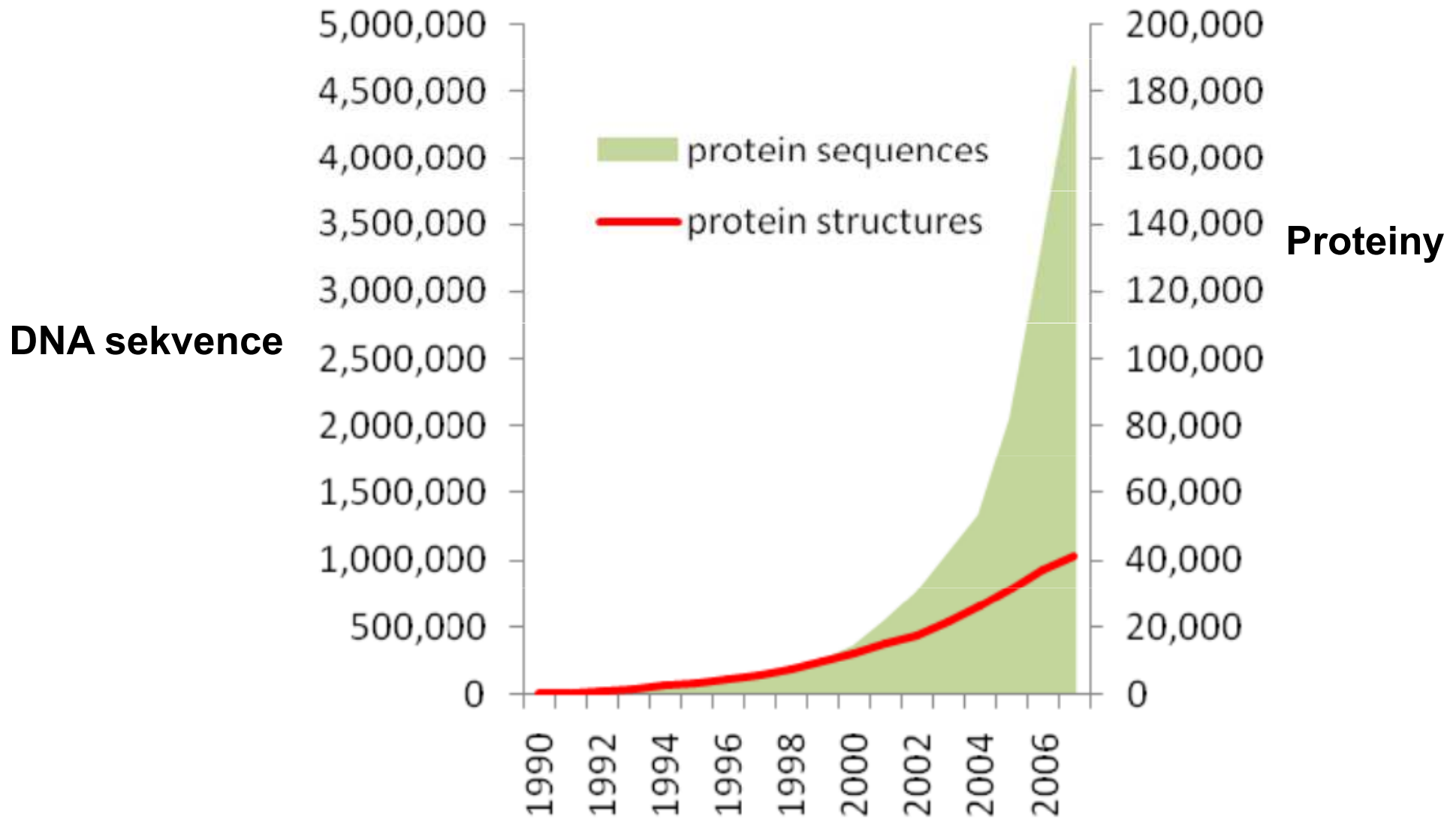
# Centrální dogma strukturní biologie



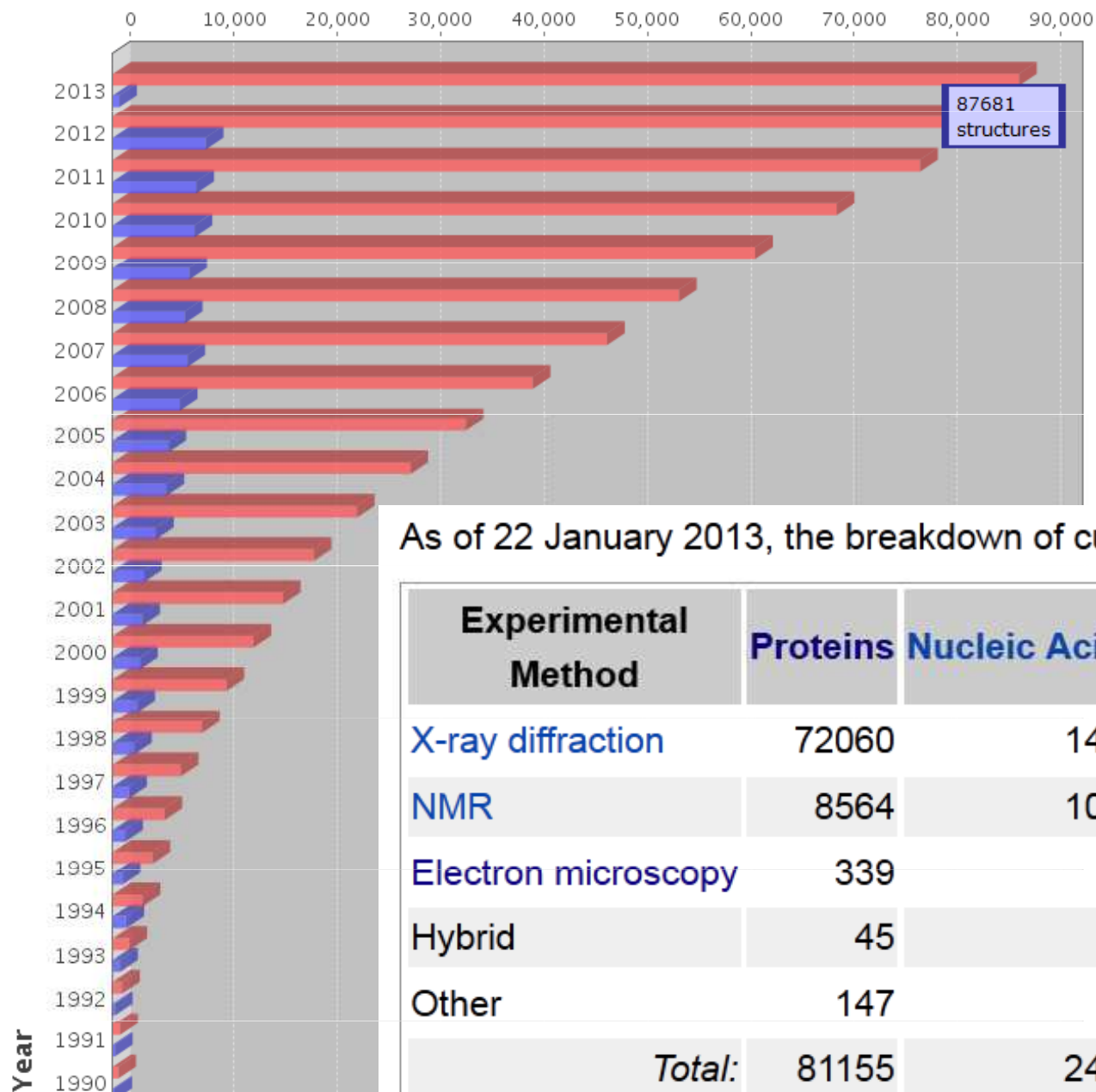
# Počet struktur k určení

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

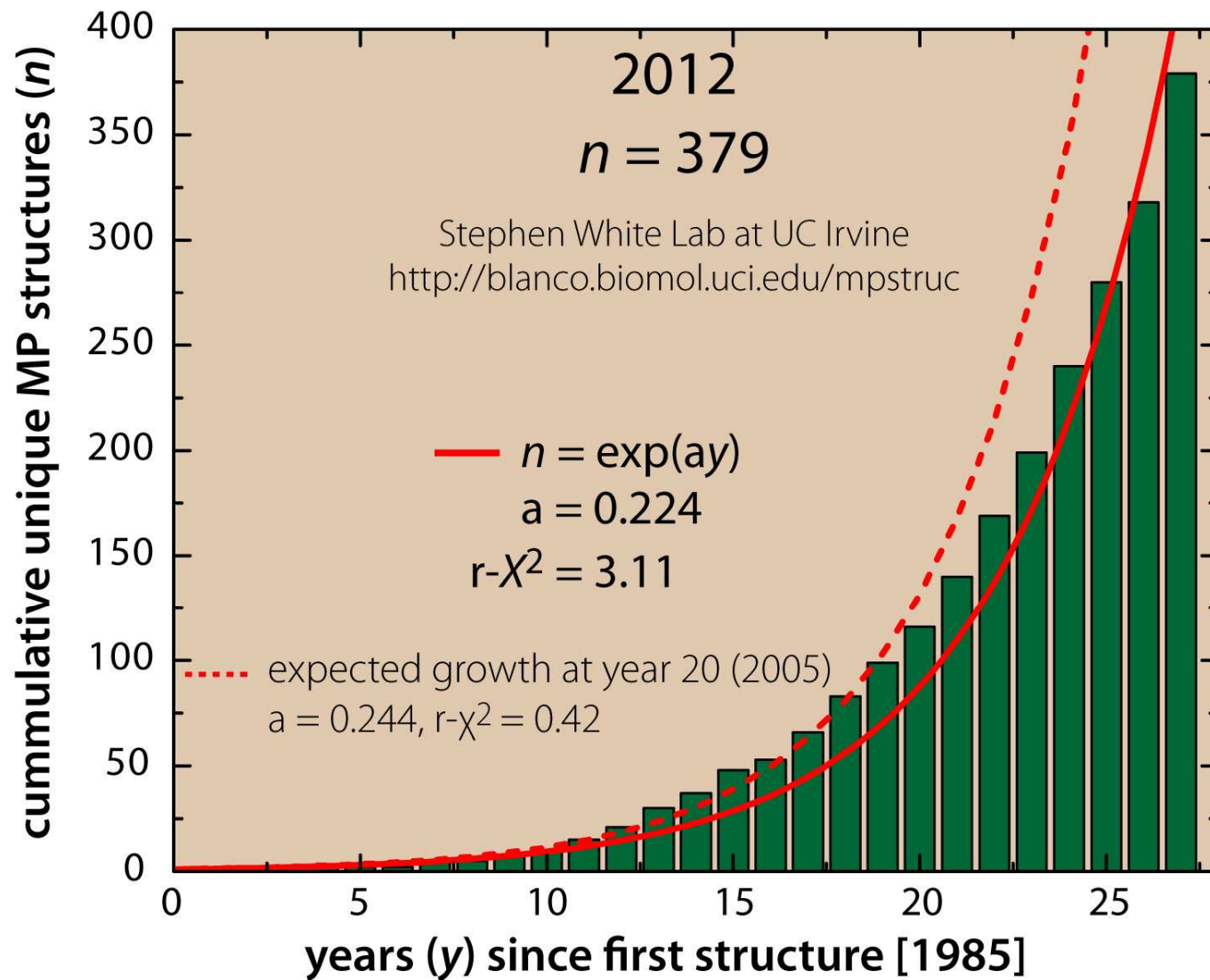


As of 22 January 2013, the breakdown of current holdings is as follows:

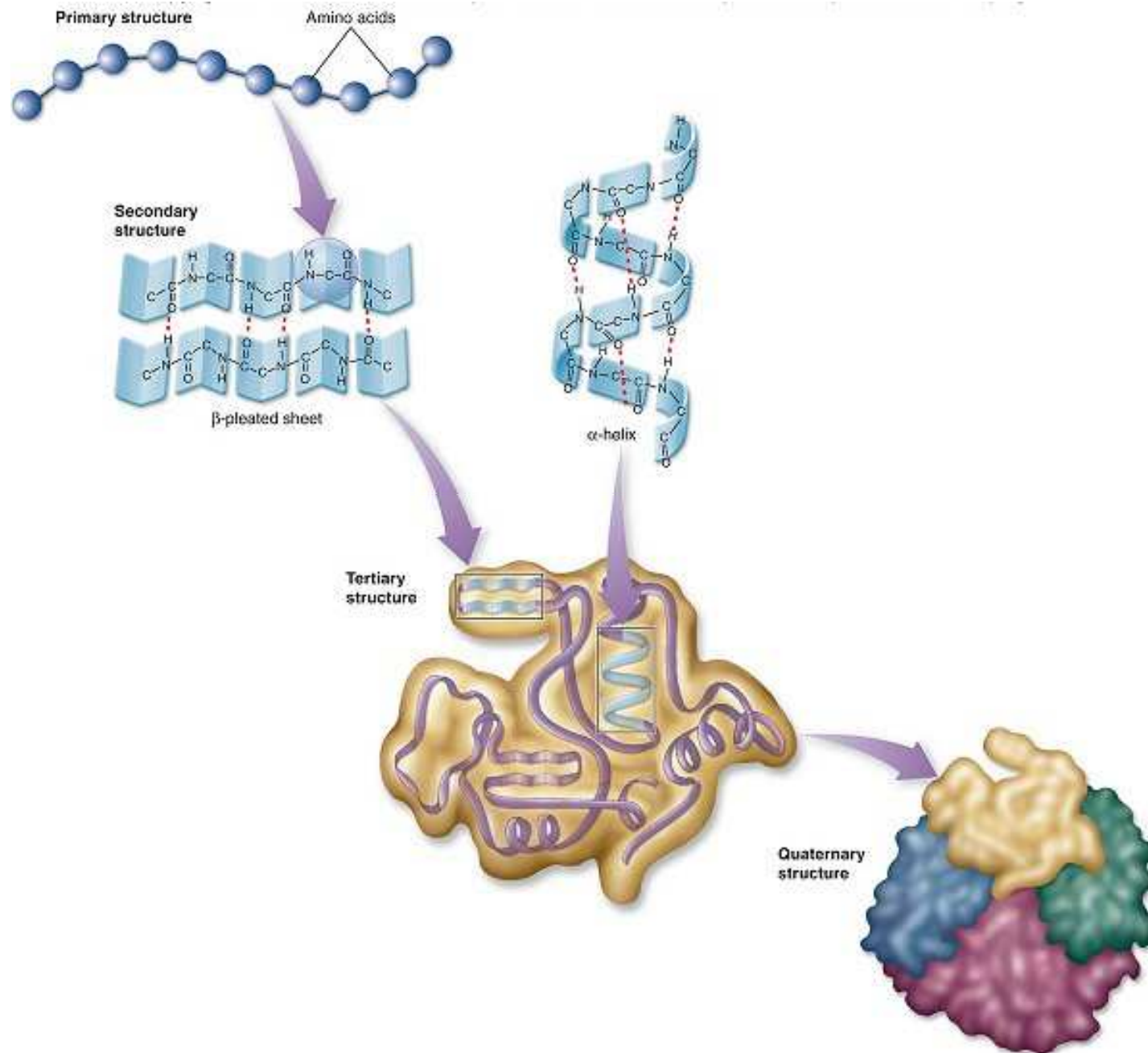
Experimental Method	Proteins	Nucleic Acids	Protein/Nucleic Acid complexes	Other	Total
X-ray diffraction	72060	1432	3686	3	77181
NMR	8564	1017	191	7	9779
Electron microscopy	339	39	123	0	501
Hybrid	45	3	2	1	51
Other	147	4	5	13	169
<i>Total:</i>	81155	2495	4007	24	87681



# Membránové proteiny



# Úrovně popisu (bio)struktur

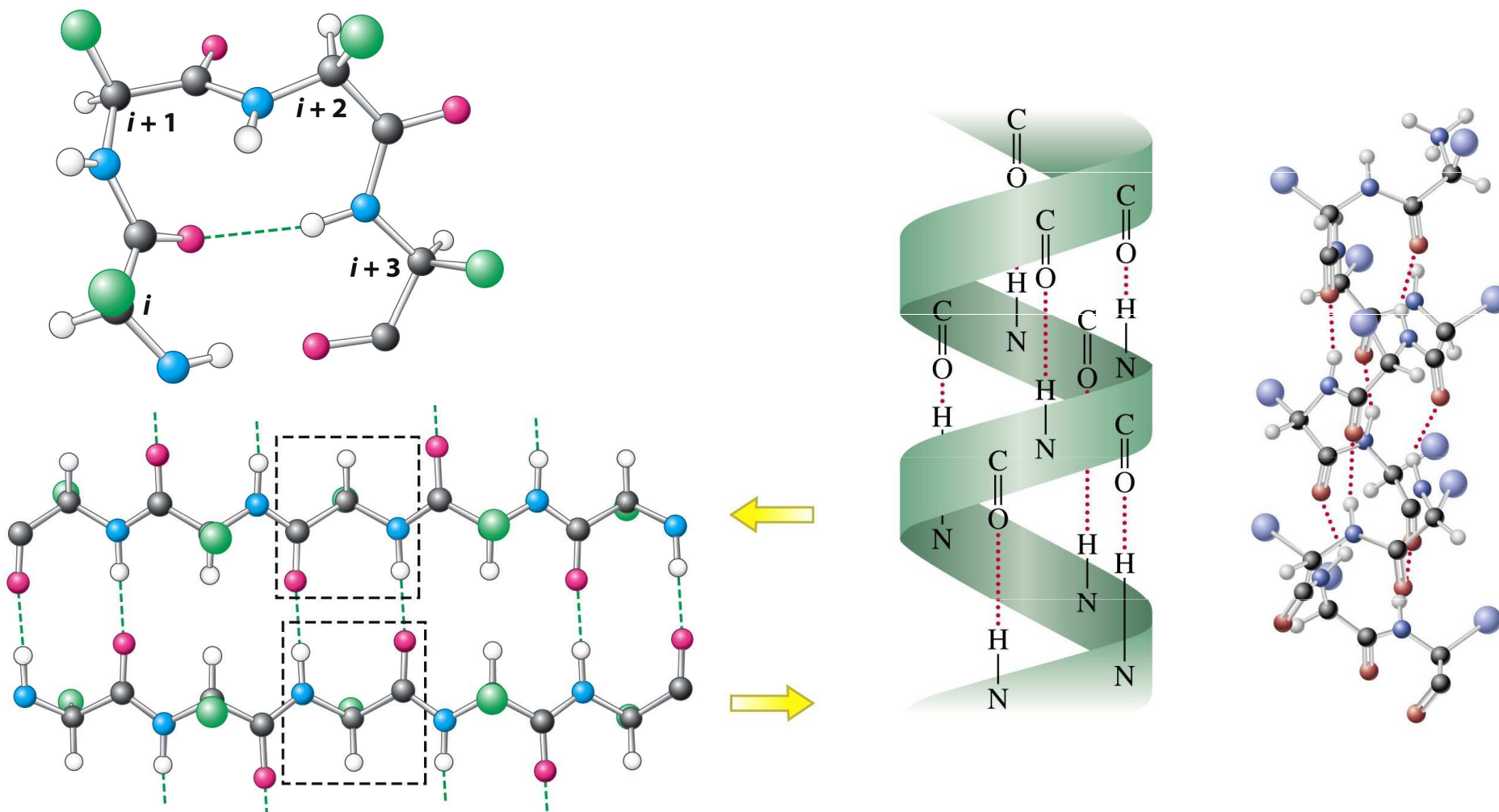


# Primární struktura – přímé určení

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

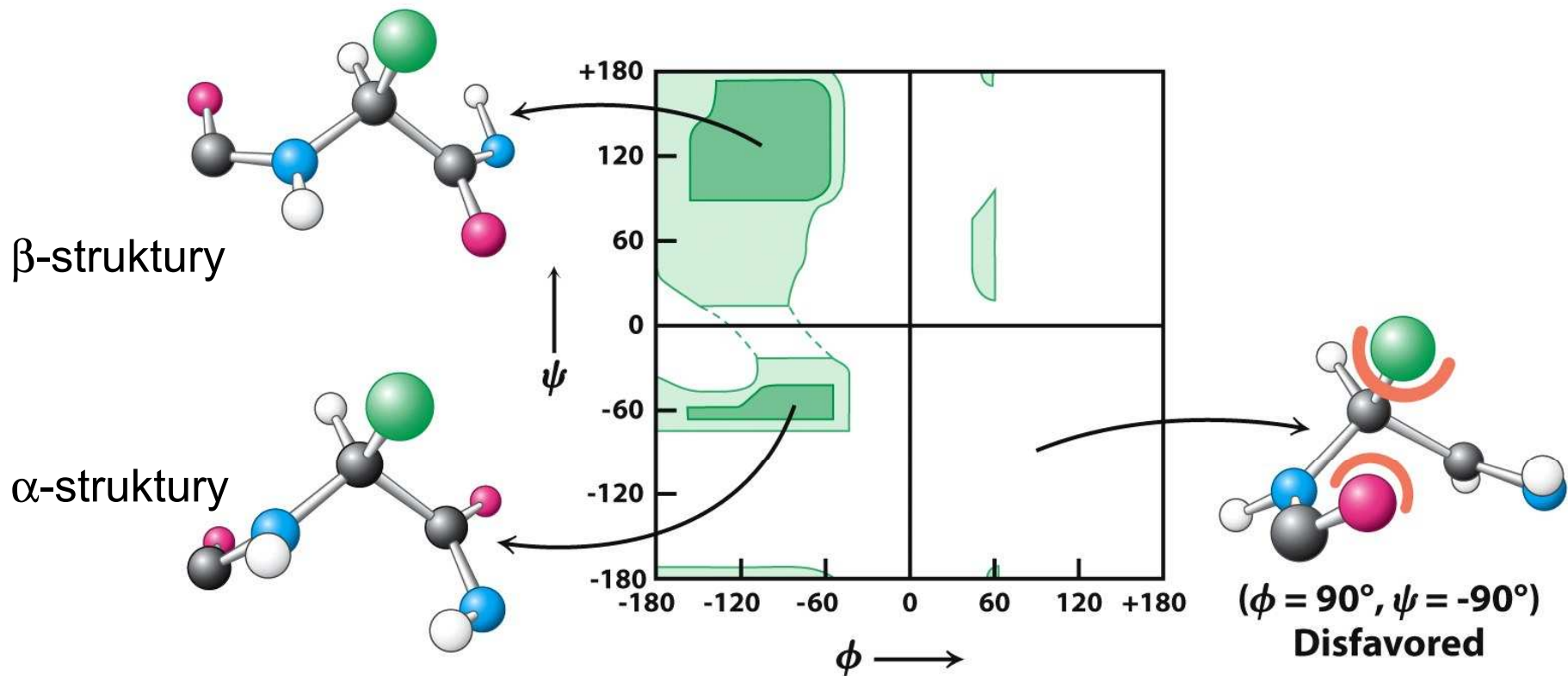
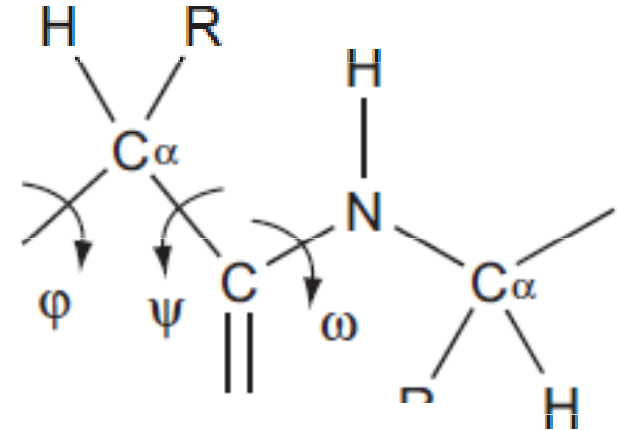
# Sekundární struktura – definice

Určující interakce – strukturu stabilizující vodíkové můstky



# Sekundární struktura – nepřímé určení

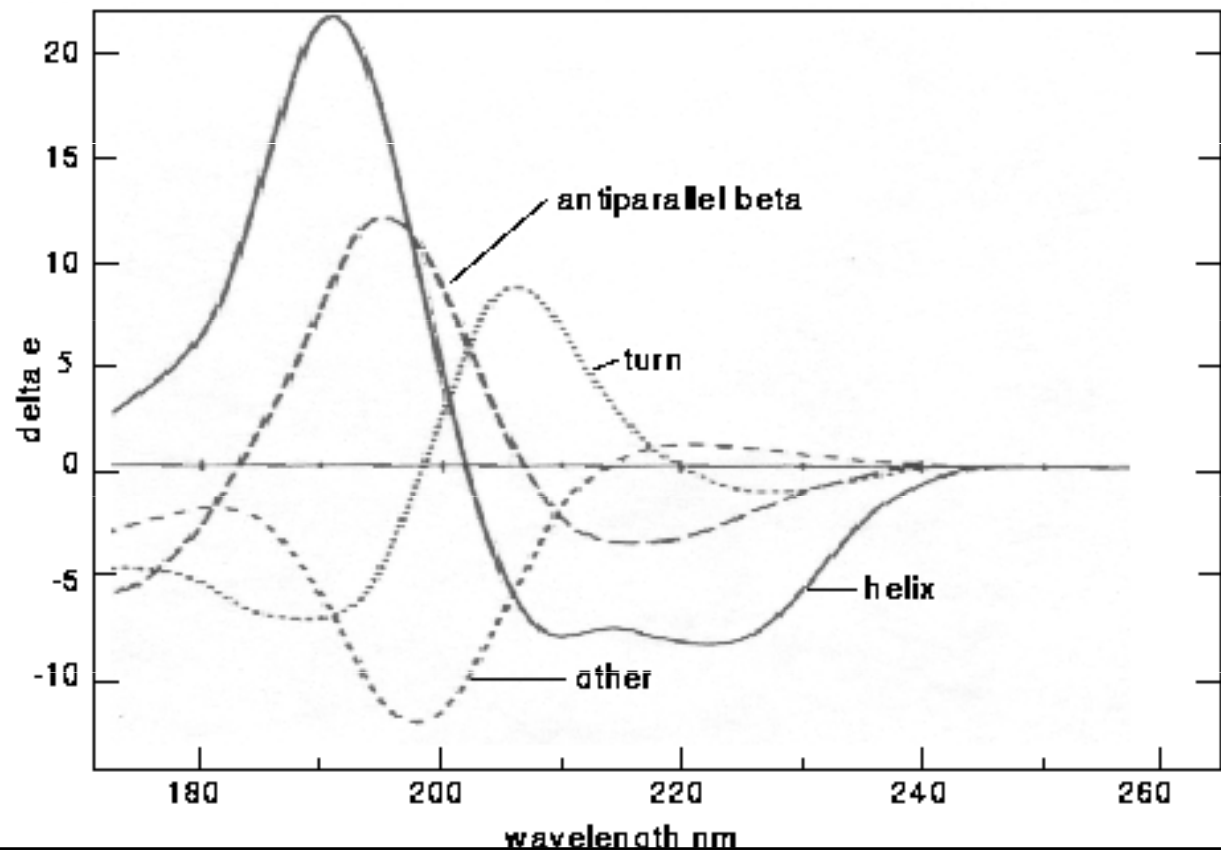
- Úhly  $\phi$  a  $\psi$
- Vazby zapojené v  $\alpha$  a  $\beta$  strukturách



# 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)

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



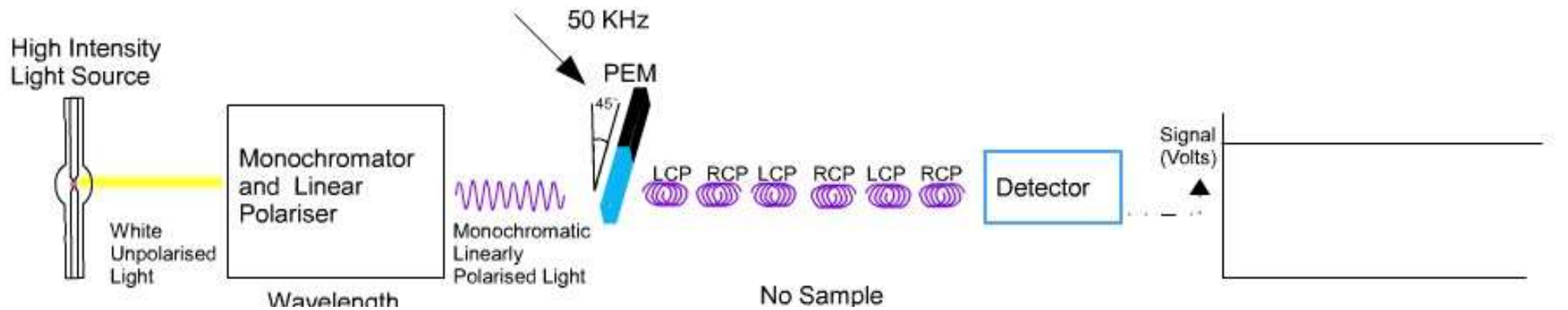
# CD - fyzikální principy

- 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>

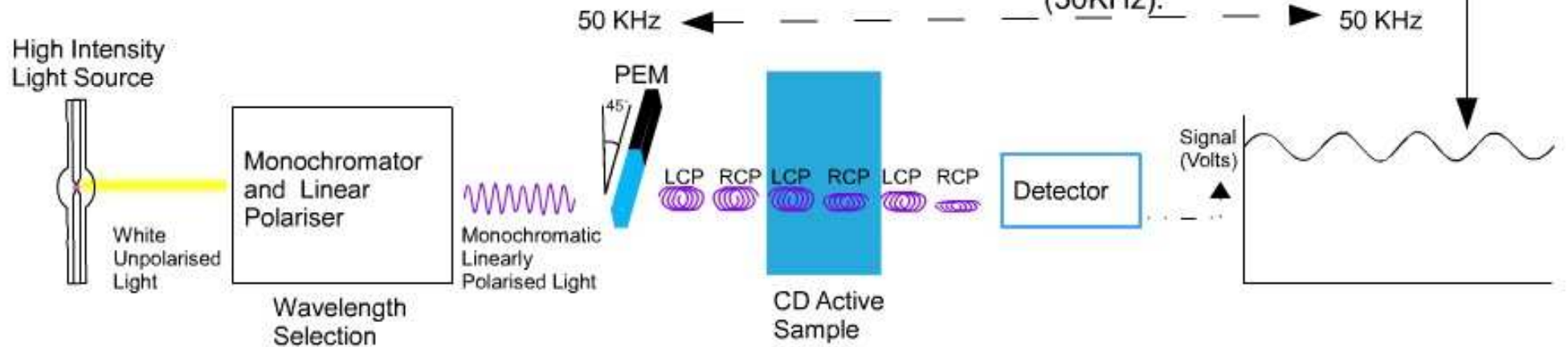


# CD - instrumentace

The photoelastic modulator (PEM) converts the linear polarised beam into left and right circularly polarised (LCP and RCP) light alternating at 50KHz.



The result of the unequal amount of left and right circular polarised light reaching the detector, is a signal that varies with the frequency of the PEM (50KHz).





# CD - instrumentace

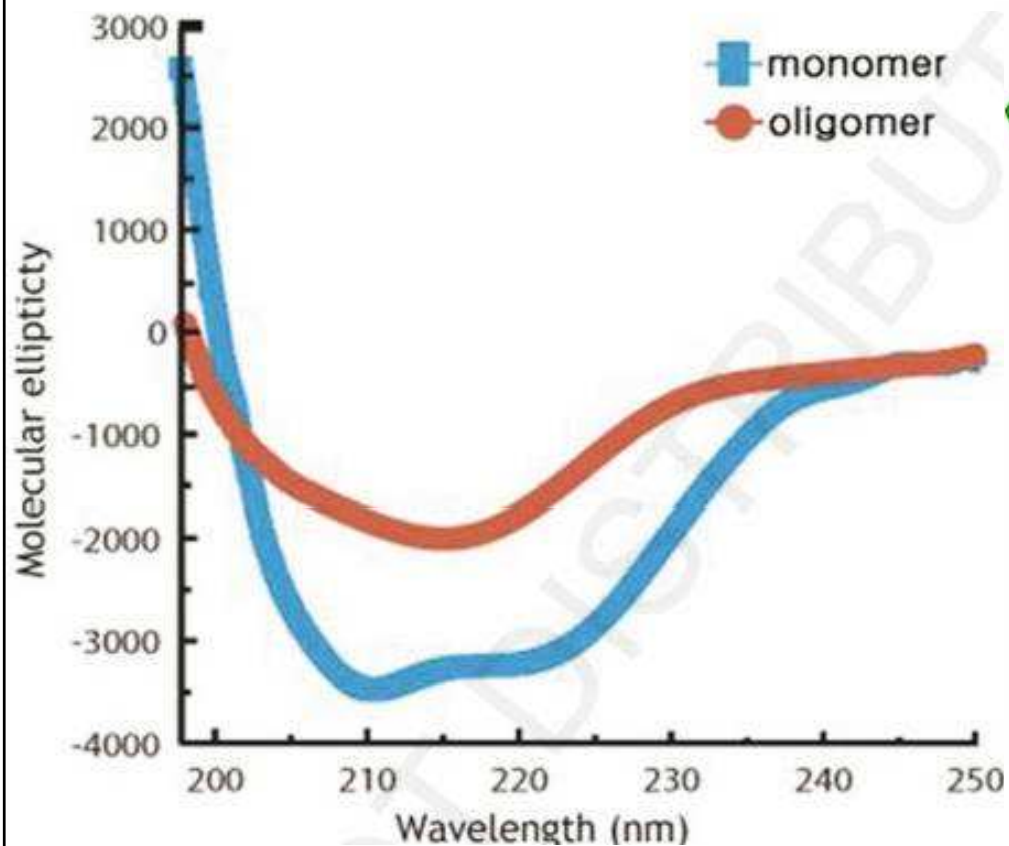
- Výrobce – např. JASCO
- Zdroj světla: Xe lampa
- Dráha světla ve vzorku: ~ 1 mm



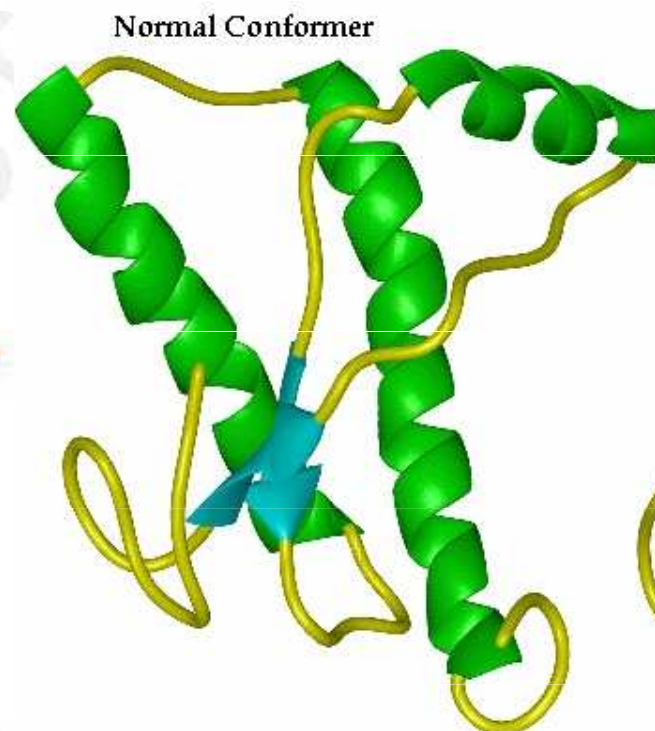
- Maximálně přečištěný vzorek
- Žádné dodatečné UV absorbenty
- Filtrace (parazitní rozptyl na mikronečistotách)
- Roztok – podmínky blízké fyziologickým

# CD – příklad aplikace – prion PrPc

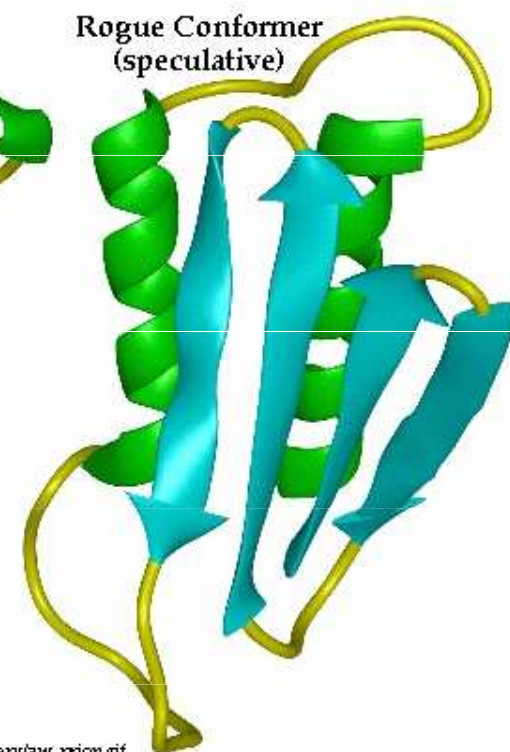
CD spektrum



RTG experiment



model



Adapted from [http://www.cmp.korn.usf.edu/cohen/research/gallery/aw\\_prion.gif](http://www.cmp.korn.usf.edu/cohen/research/gallery/aw_prion.gif)

# 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

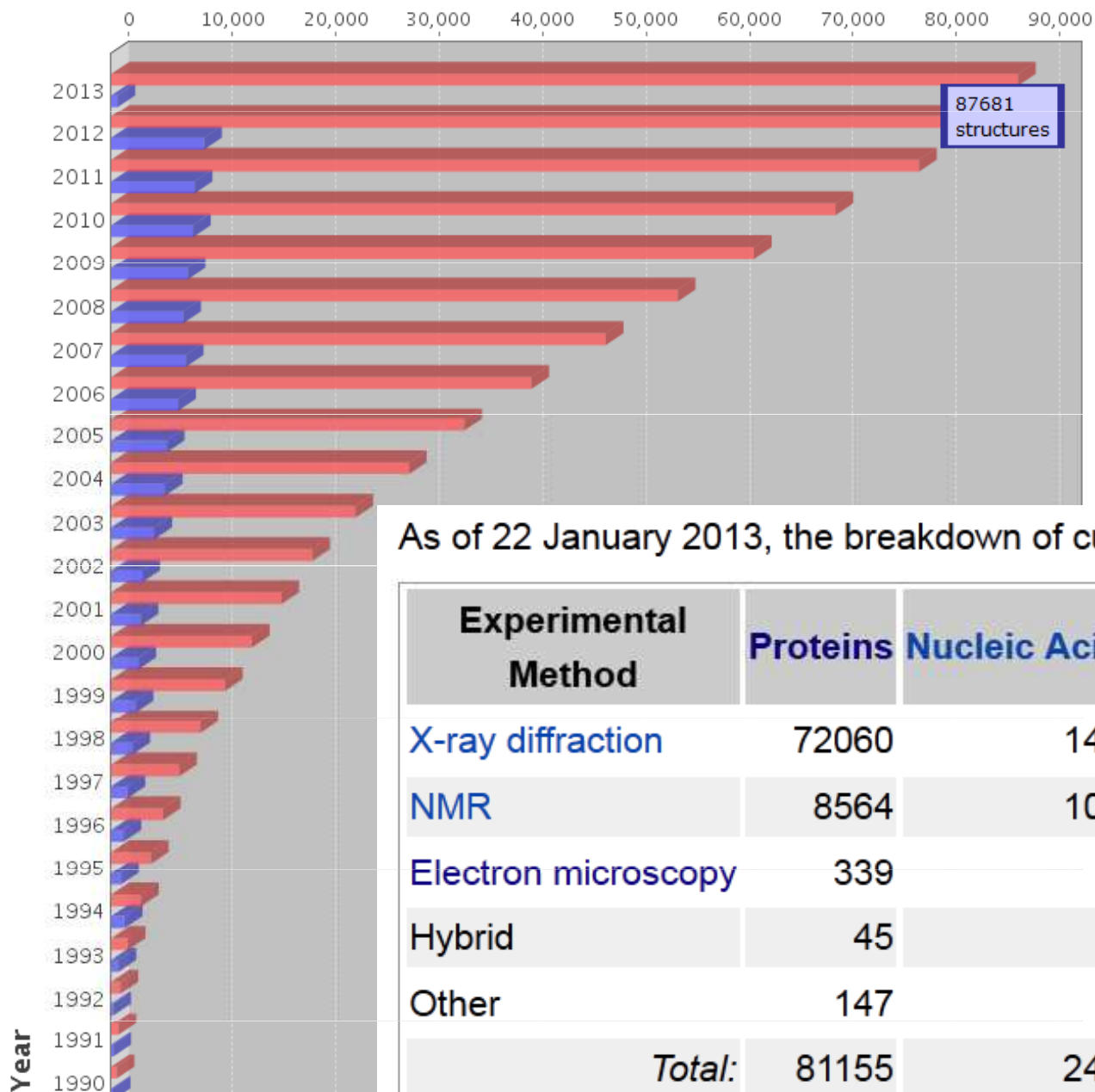
## Nevýhody:

- nejde používat koncentrované absorbující pufry
- relativně nízká přesnost num. analýzy podílu  $\alpha/\beta$  struktur

## Hlavní oblast použití:

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

# Počet proteinových struktur v PDB

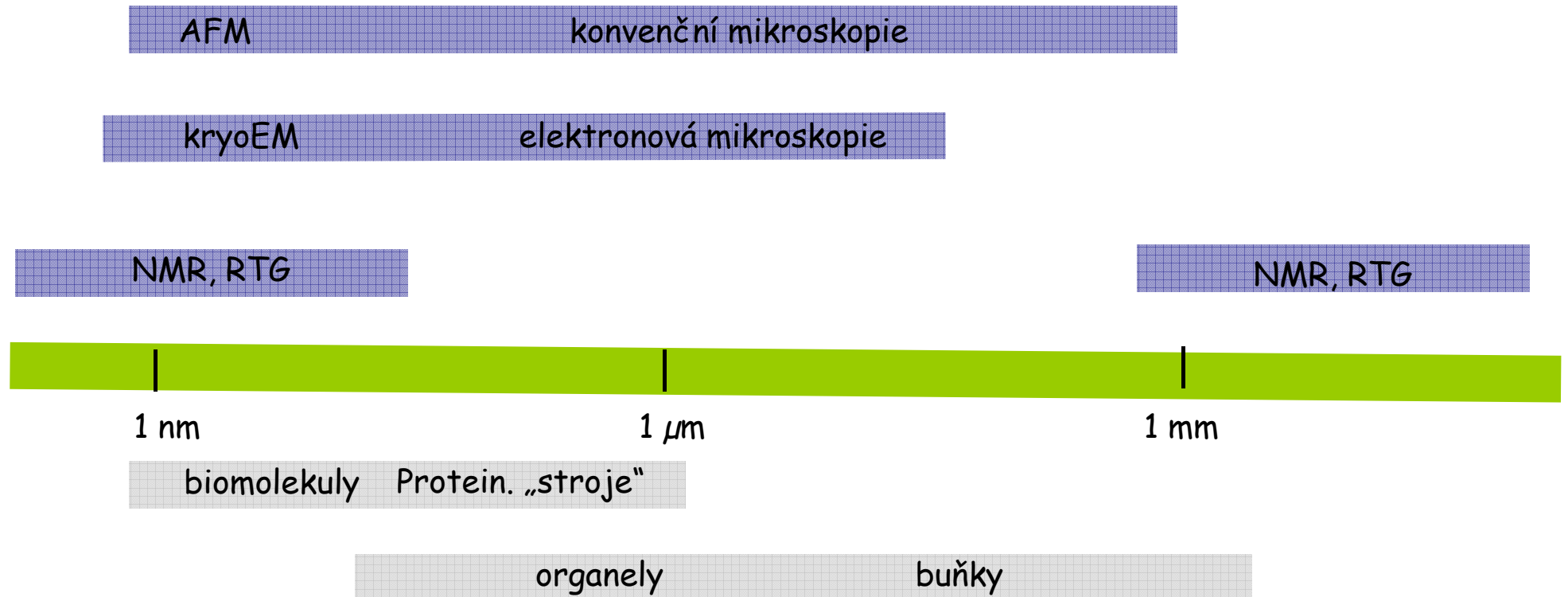


As of 22 January 2013, the breakdown of current holdings is as follows:

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
<i>Total:</i>	81155	2495	4007	24	87681

# (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

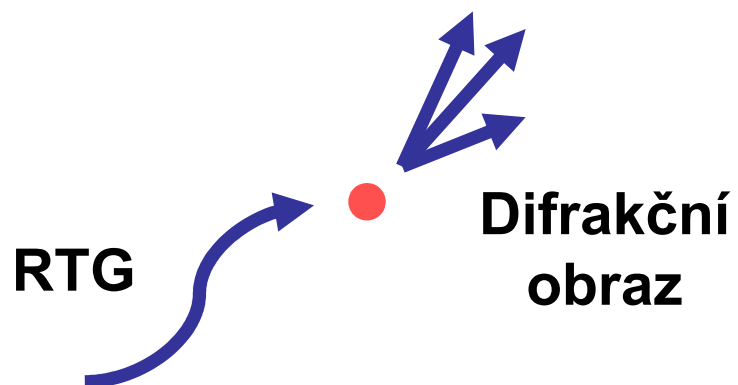
# Studium 3D struktur proteinů

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.

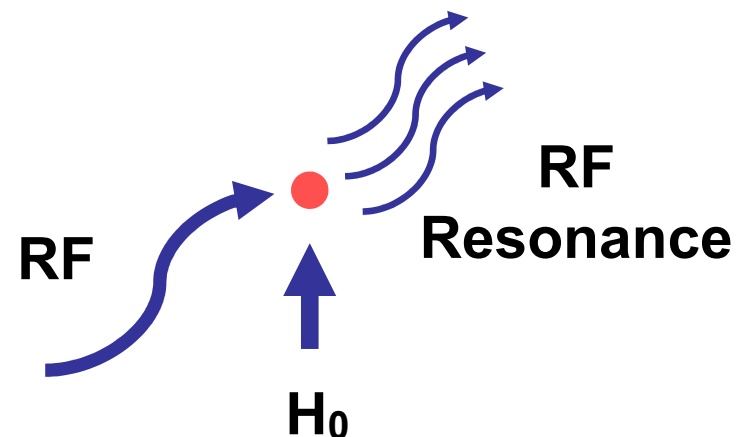
# Studium 3D struktur: RTG+NMR

RTG



Krystal: shodně orientované molekuly

NMR

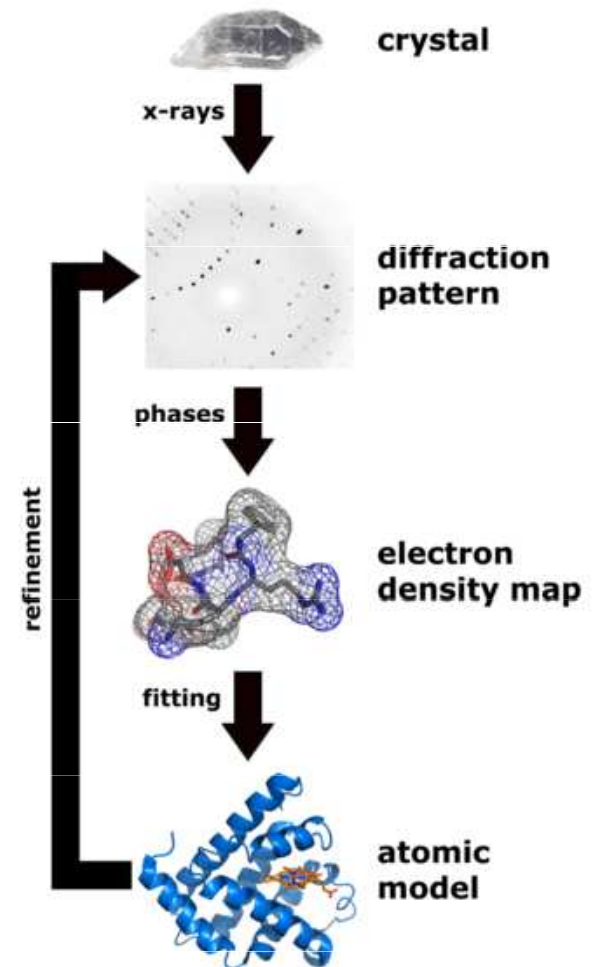


V roztoku



# 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

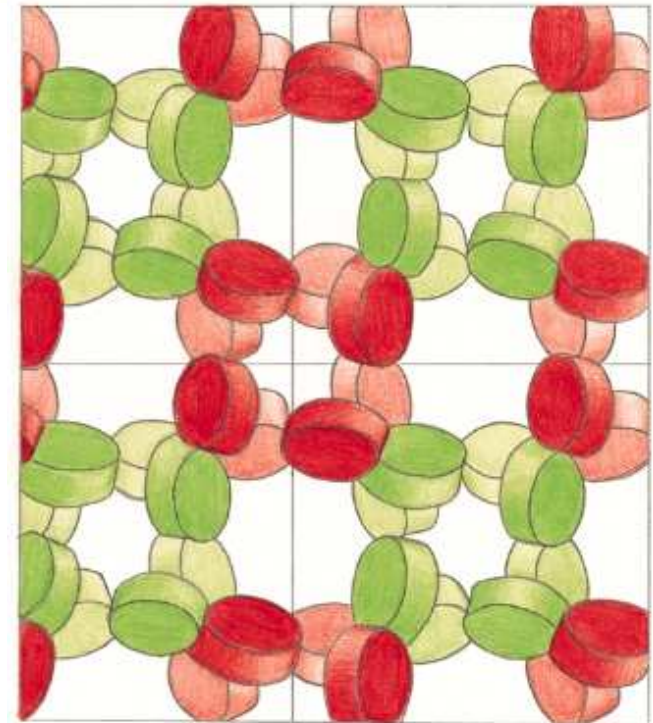
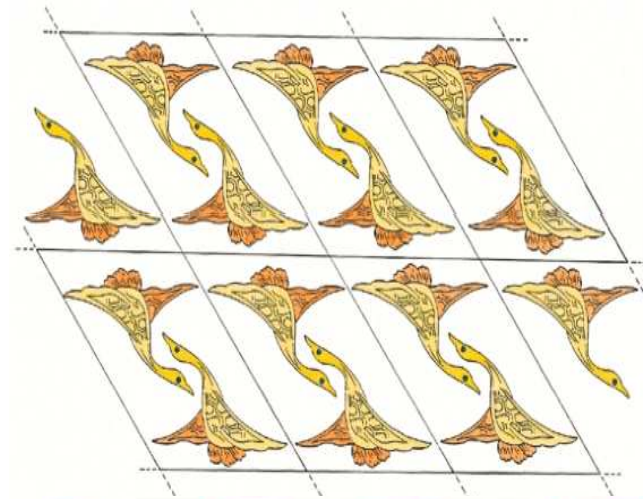
Opakování motivu:

- posun
- rotace

Krystal (bio)polymeru

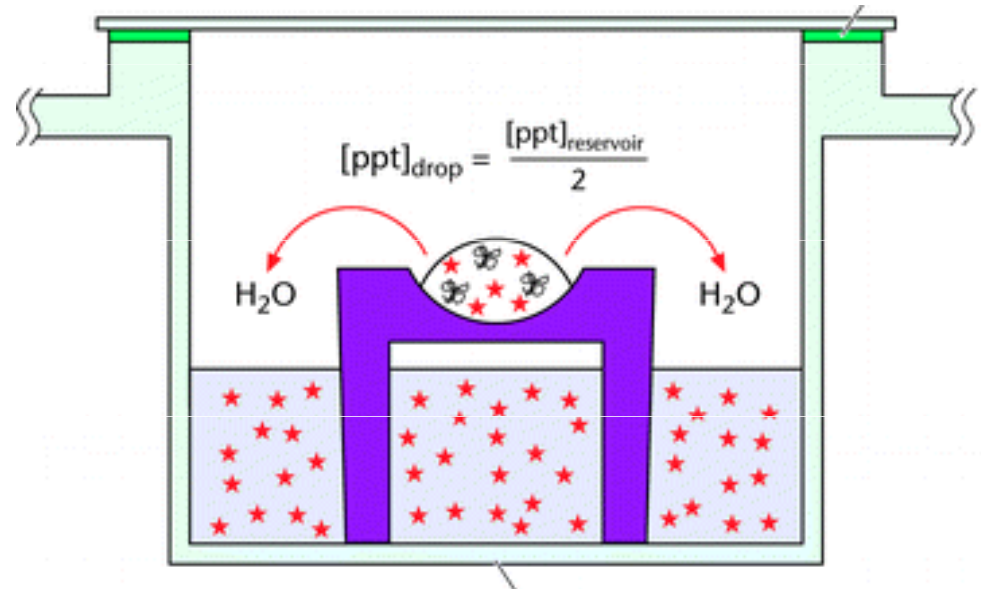
- oblast polymeru
- oblast rozpouštědla

Čistota + stabilita vzorku

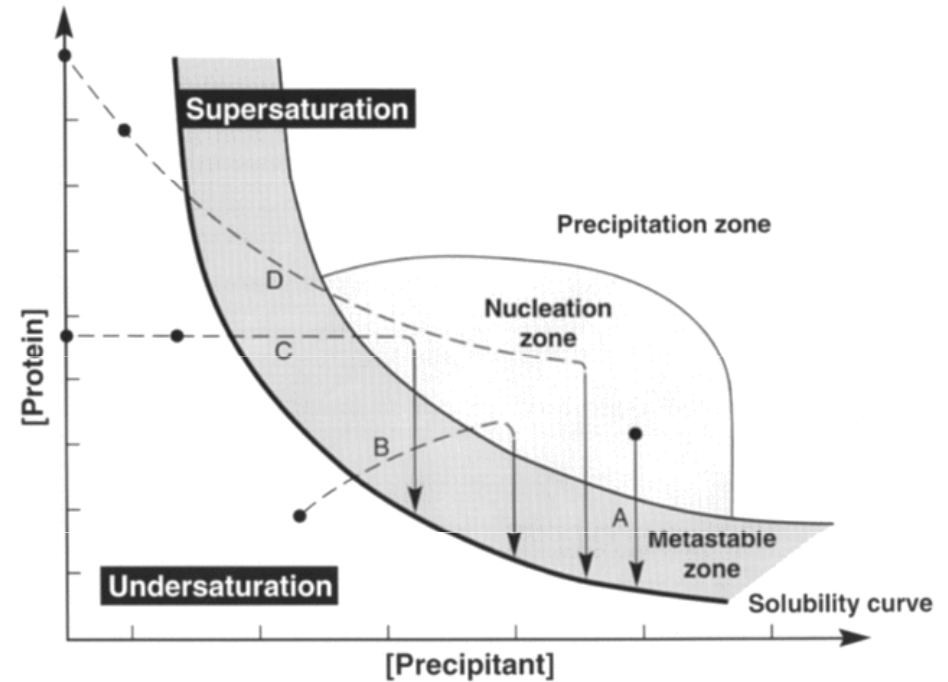


# Krystalizace proteinů

- Difúzní techniky



- Fázový graf



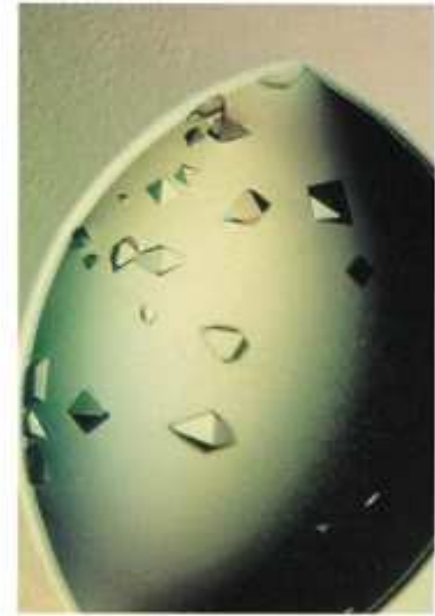
# Krystalizace proteinů

Problém:

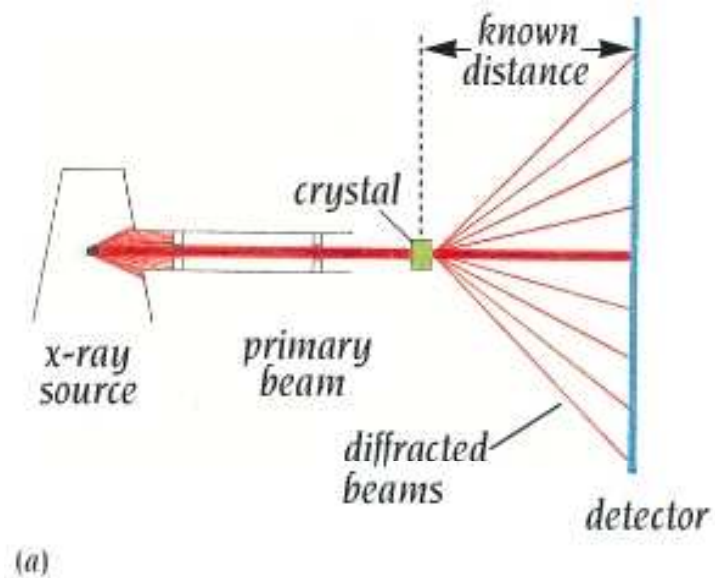
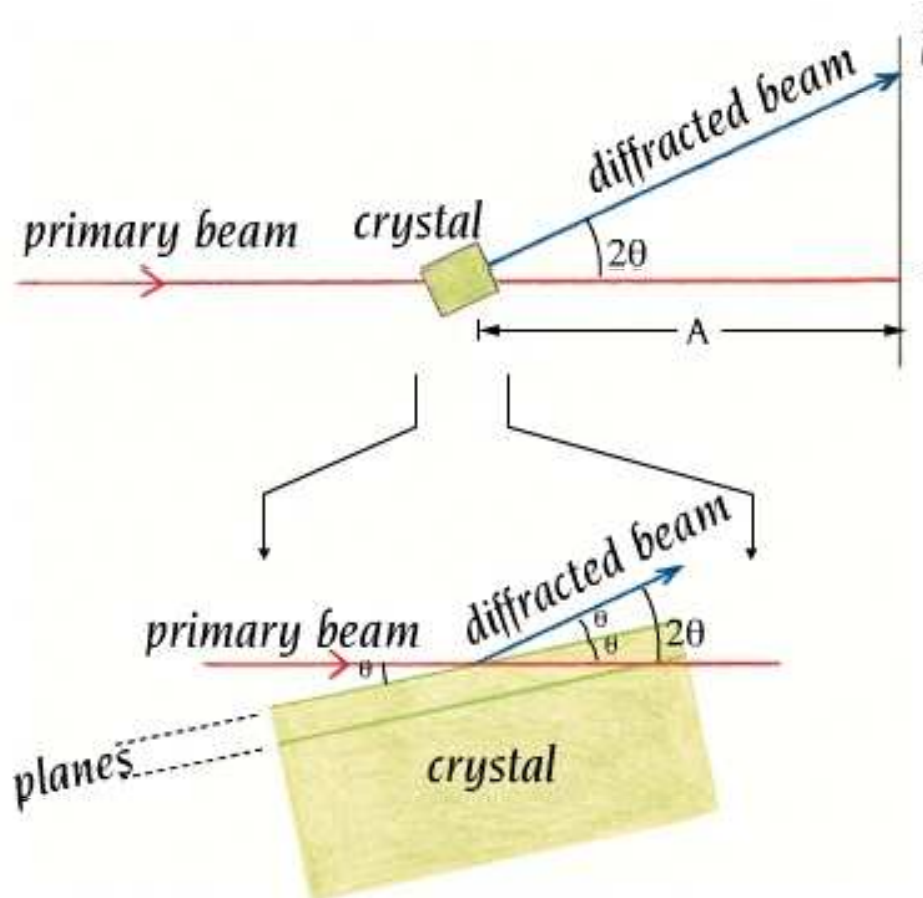
Jak „rychle“ vypěstovat  
„použitelný“ krystal?

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

=> nasazení robotiky

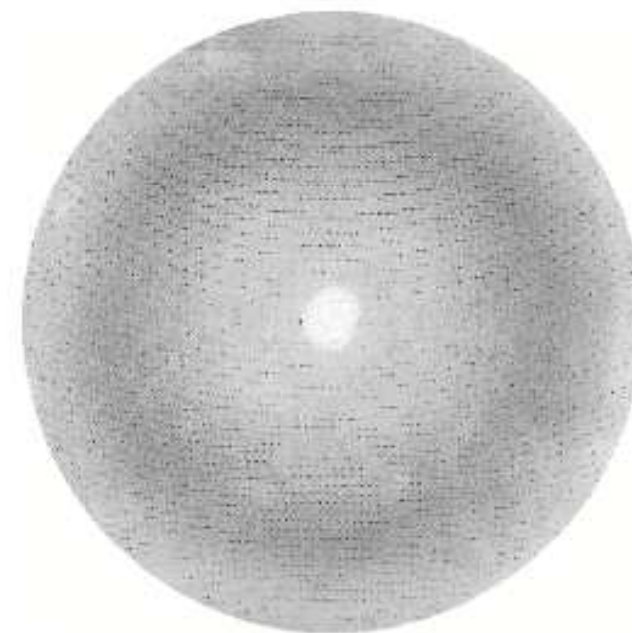


# Difrakční experiment: principy



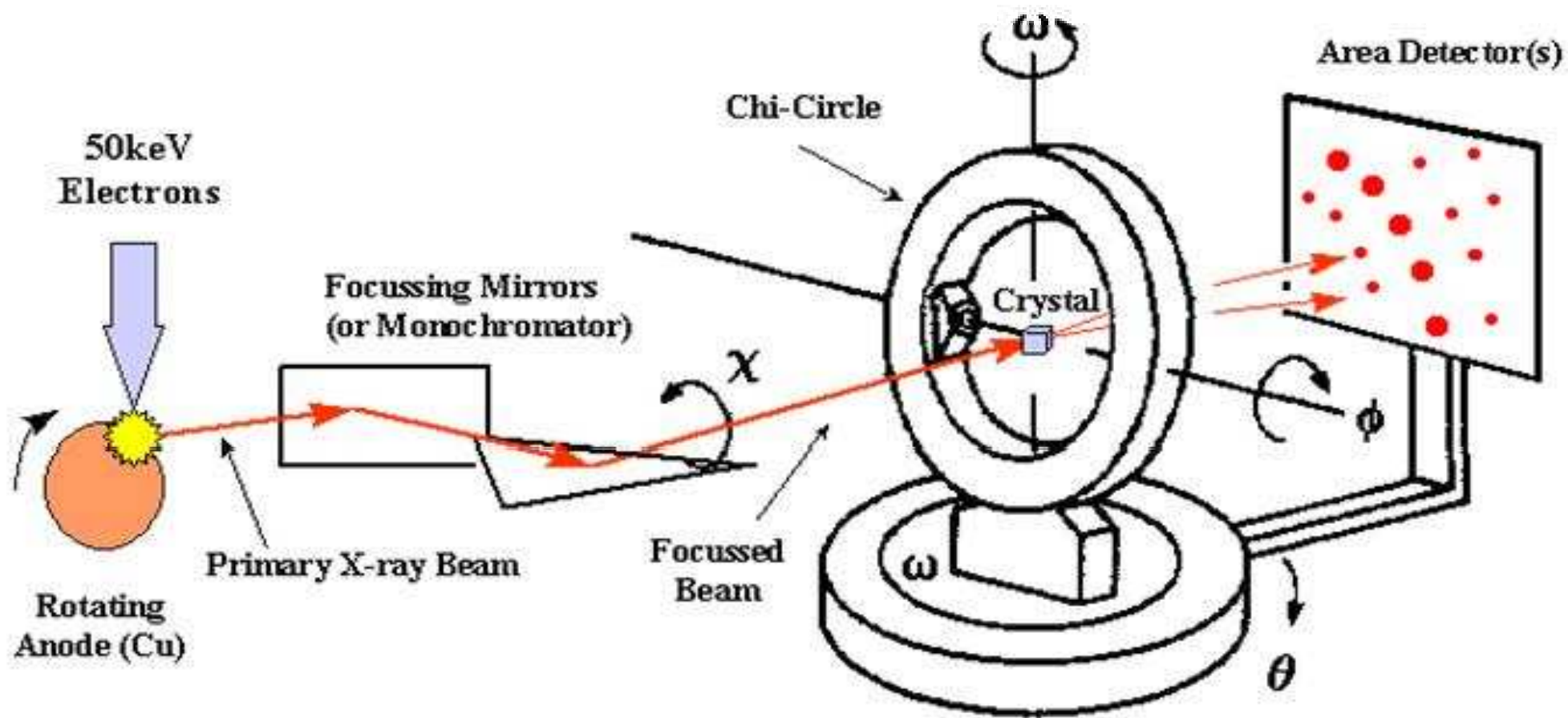
Interference = difrakce:

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

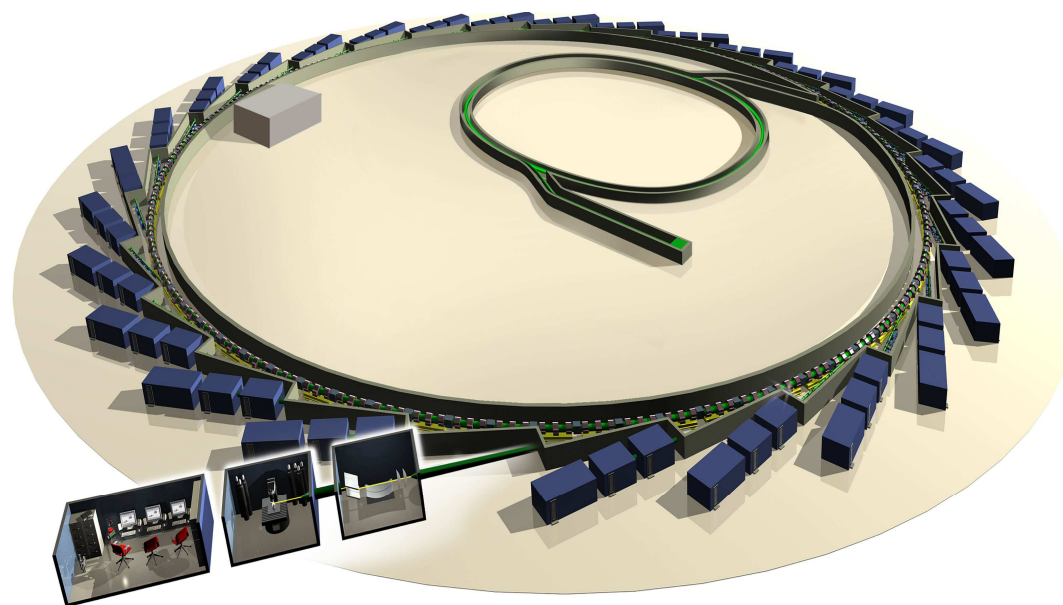
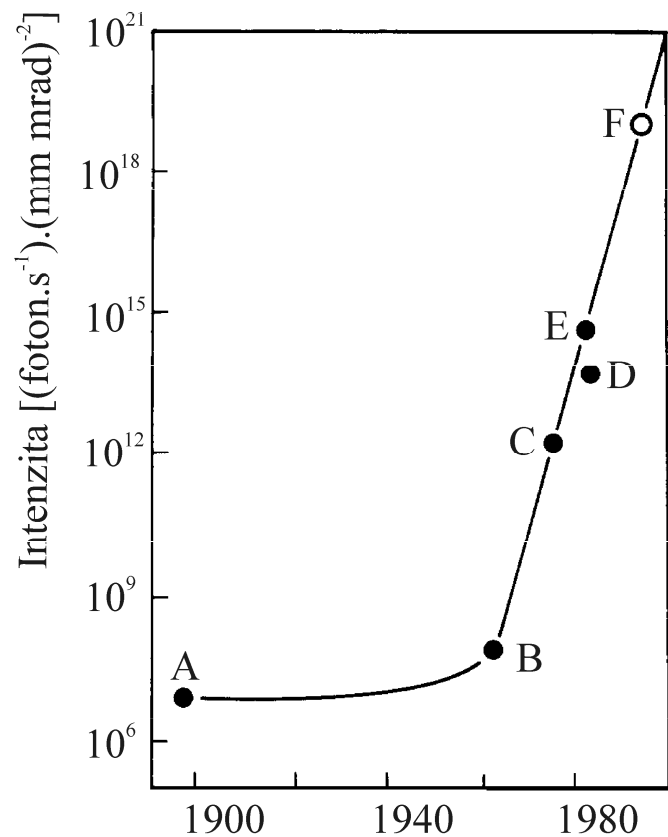




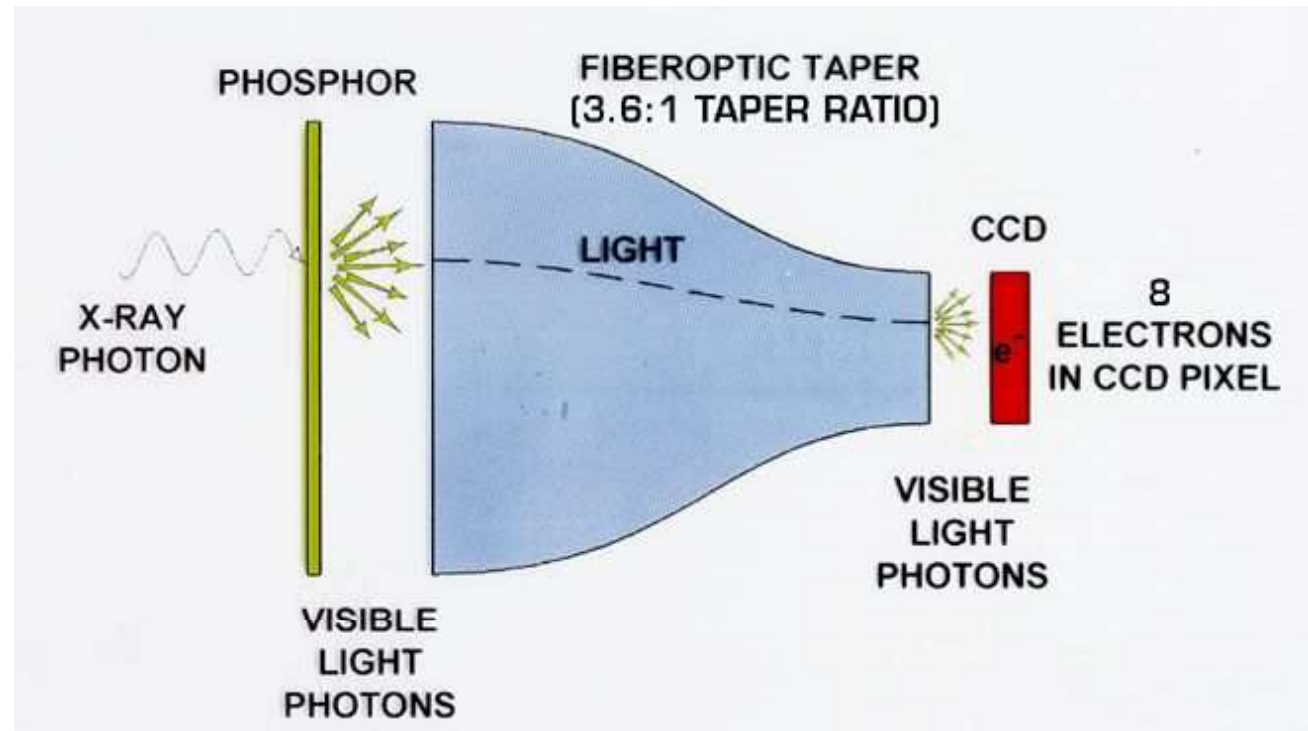
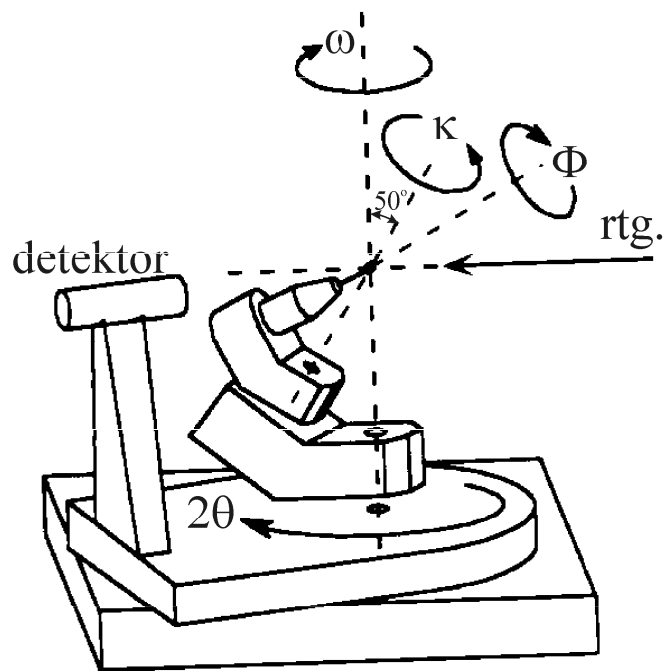
# Difrakční experiment-schéma



# Difrakční experiment: zdroj RTG

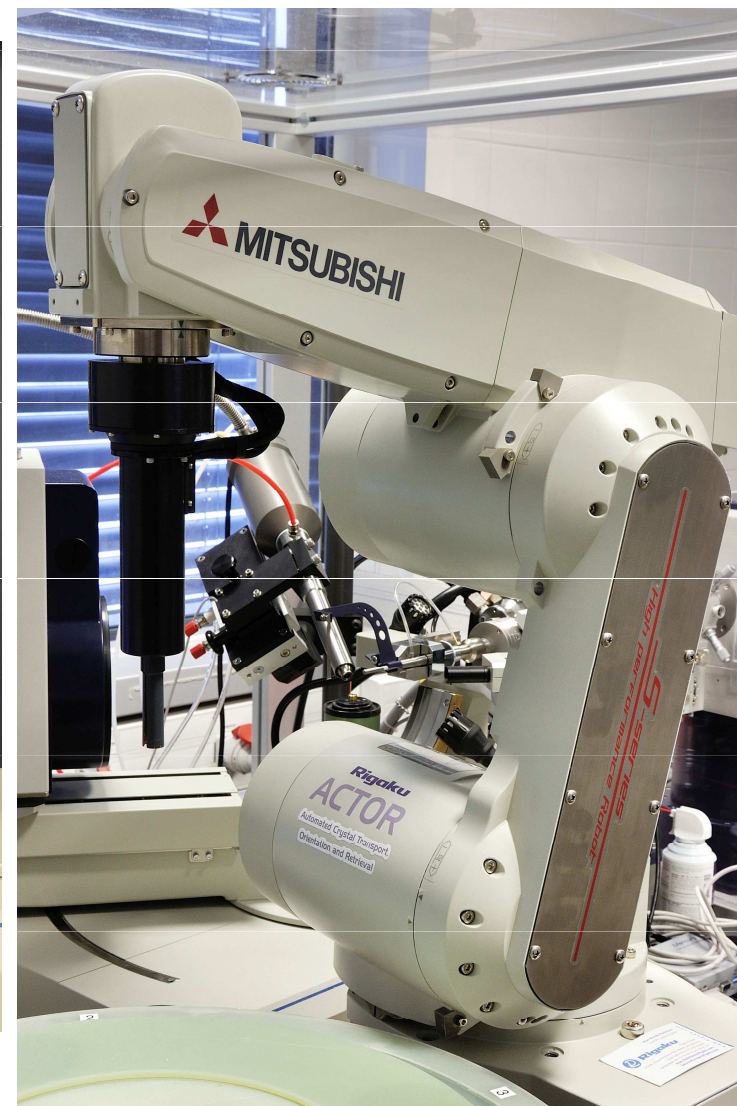
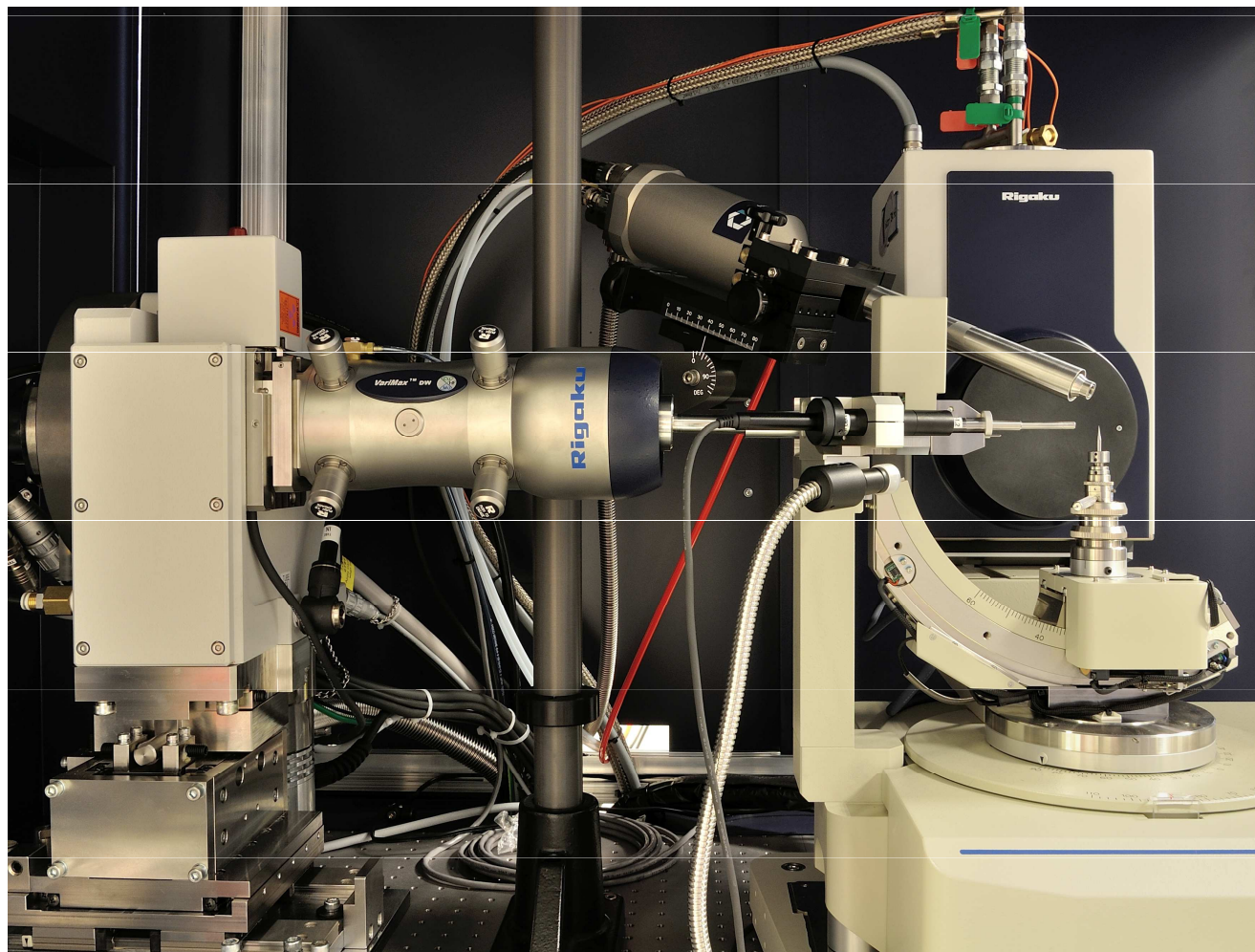


# Difrakční experiment: goniometr+detektor





# Difrakční experiment: instrumentace na MU



Kryokristalografie – mj. eliminace radiačního aj. rozpadu vzorku

# Difrakční experiment: interpretace dat

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

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

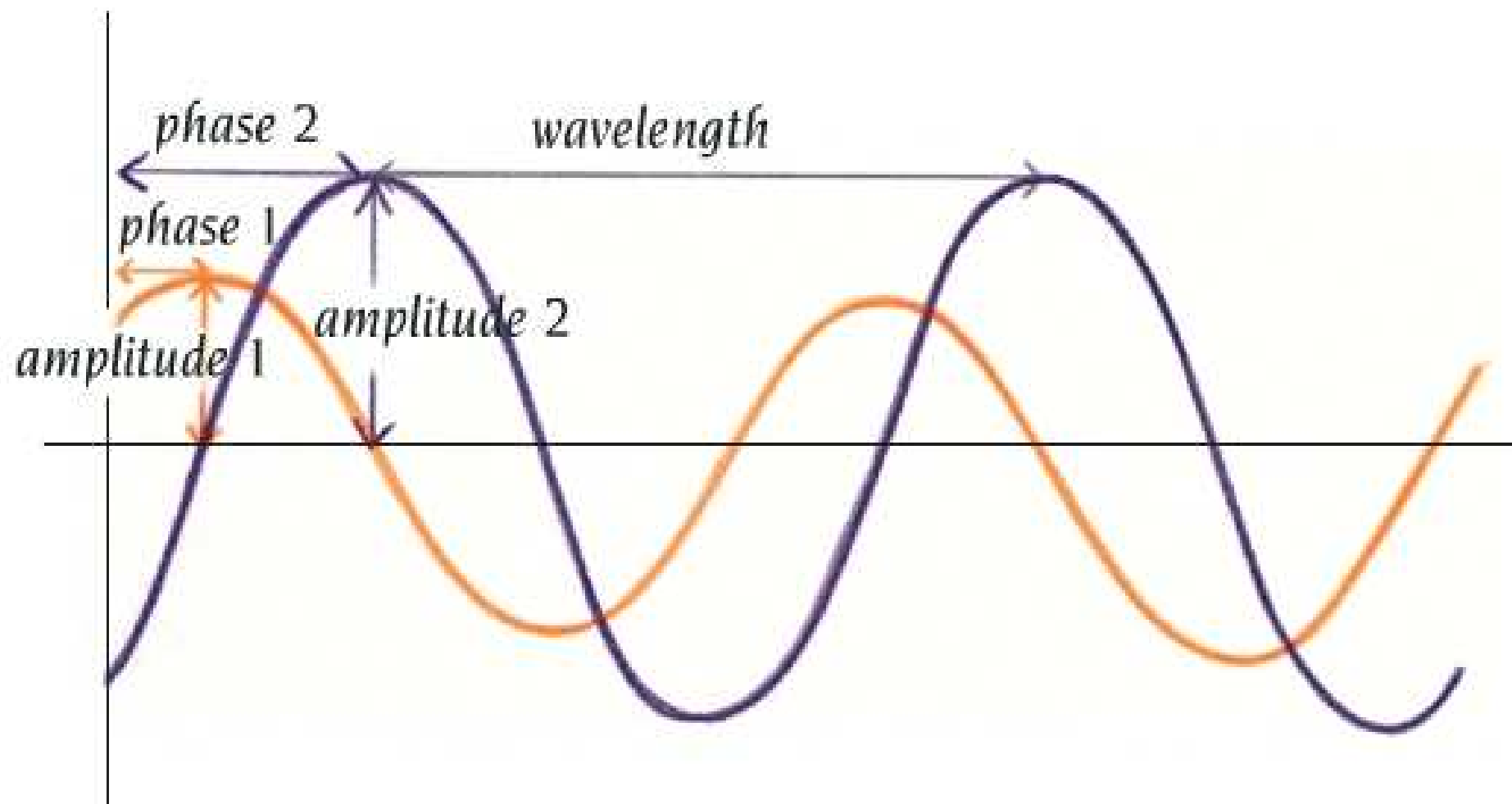
Rozptyl na protonech je nevýznamný (je  $1837^2$ x slabší), difrakcí RTG záření studujeme **elektronovou strukturu látky**

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

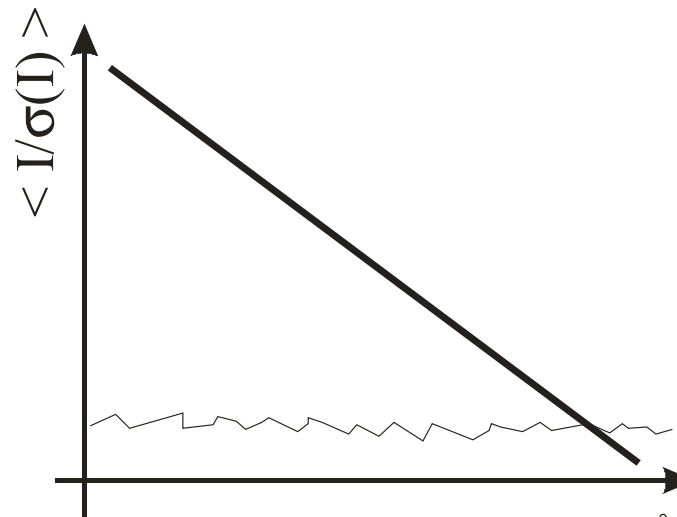
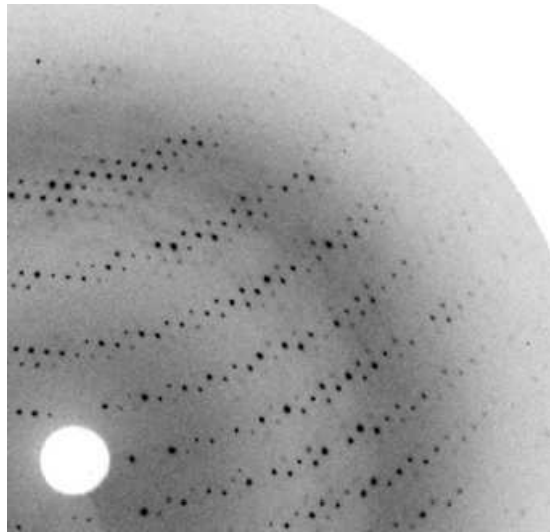


# Difrakční experiment: limitované rozlišení

geometrické limity na počet naměřených dat

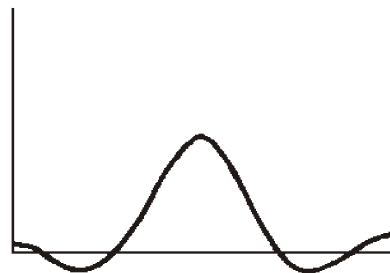
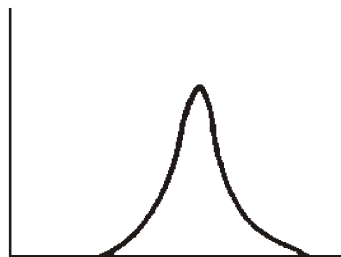
$$2d_{Res} \sin \theta = \lambda$$

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



„šum“ detektoru

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



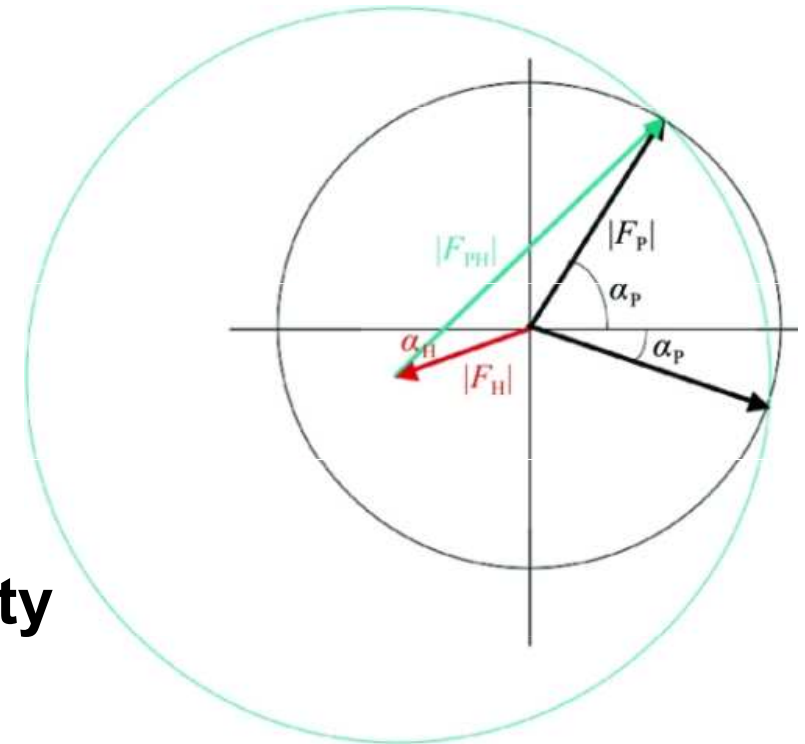
rychlé + přesné měření =>  
co nejintenzivnější zdroj RTG

# 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

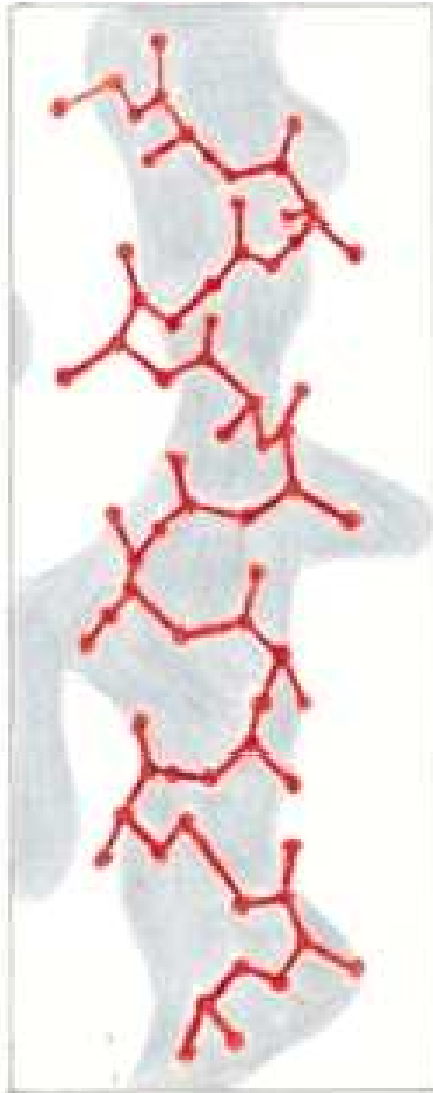
- kanály rozpouštědla (krystalograficky neuspořádané vody)
- relativní stabilita terciální struktury globulárních proteinů při interakci jejich interakci s „malými“ molekulami
- nutnost opakovaných měření s různými dobře difraktujícími **izomorfními deriváty**
- podobnost struktur proteinů s jejich Se-Met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



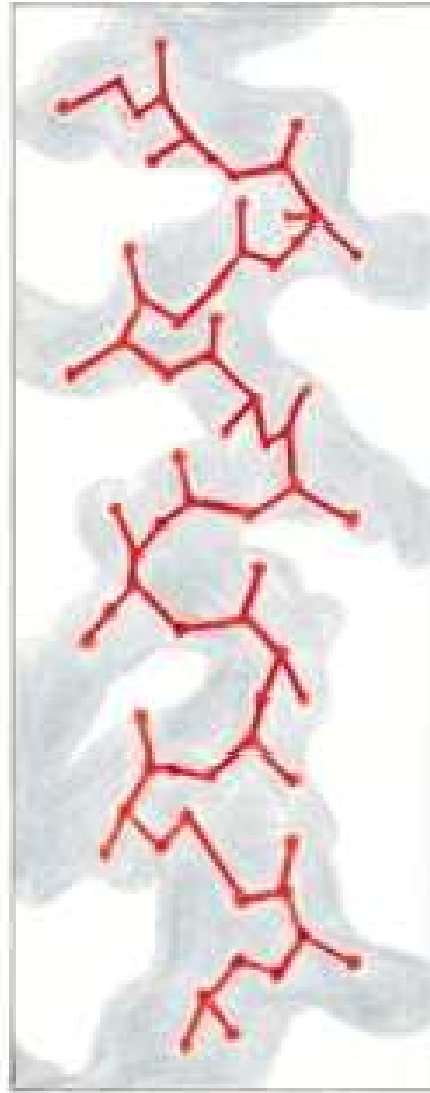


# Strukturní model: vliv rozlišení

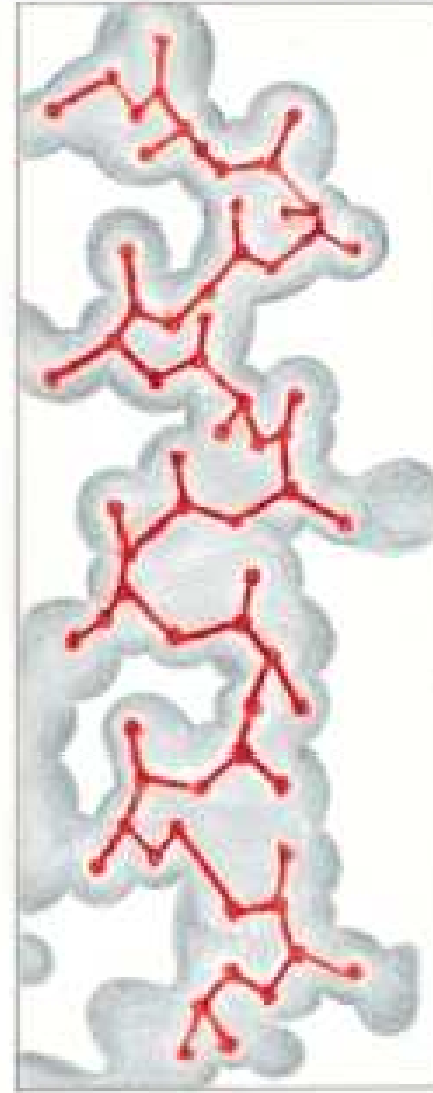
(a) 5.0 Å



(b) 3.0 Å



(c) 1.5 Å

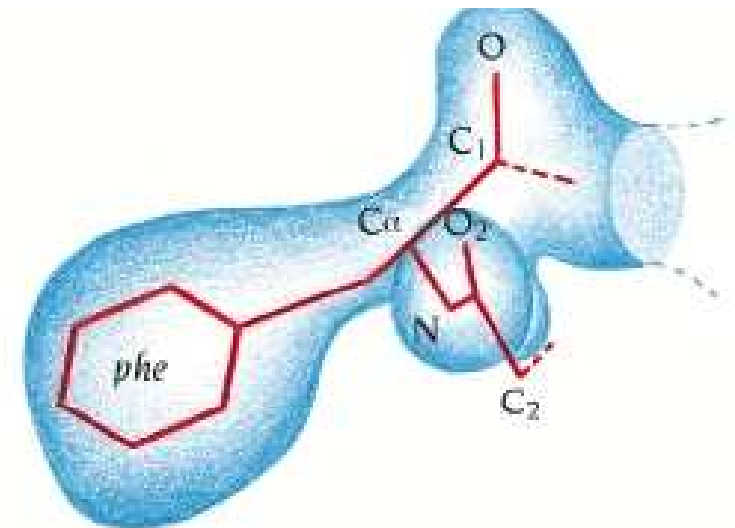
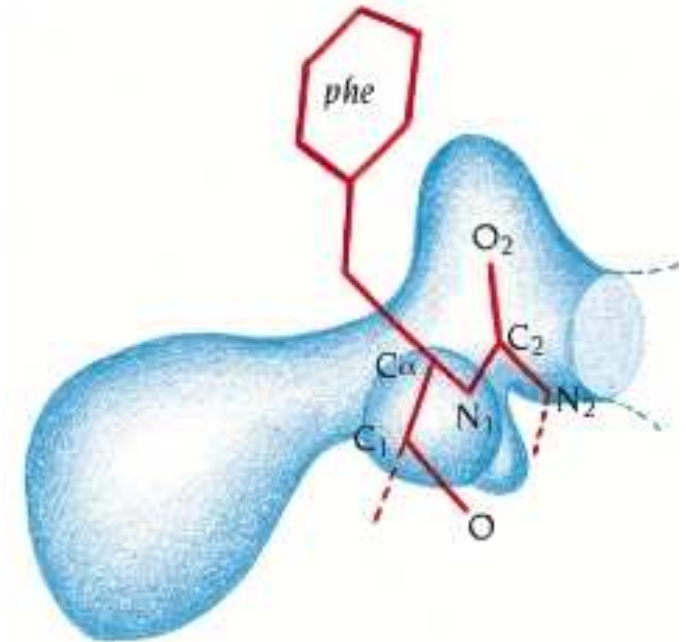
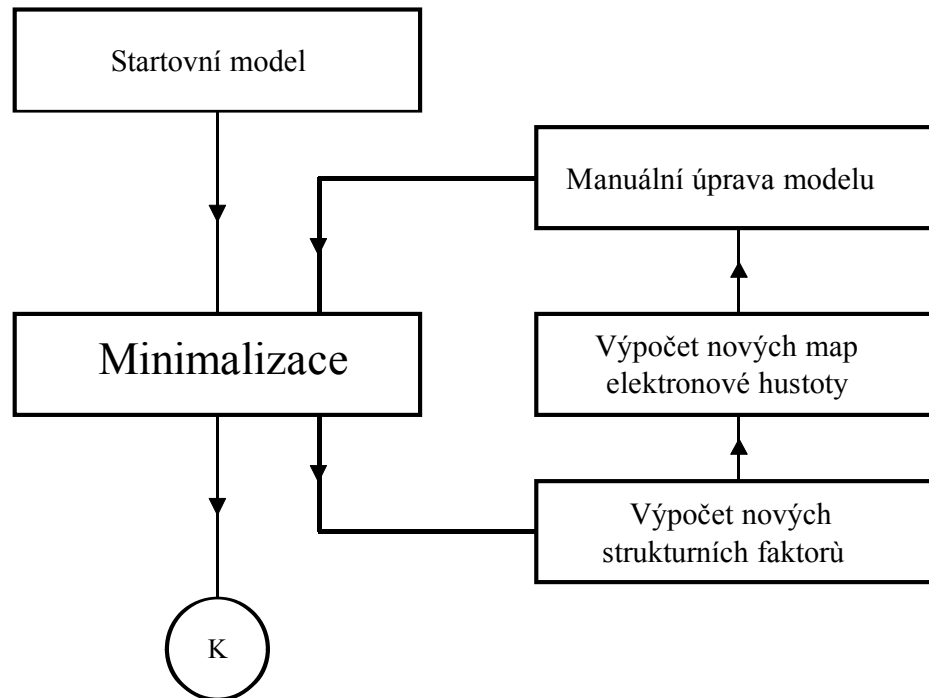


Nebezpečí: hlavní nebo vedlejší řetězec => chybně postavený model

# Strukturní model: zpřesňování

Nelineární problém – iterativnost, konvergence

Kritérium správnosti : R-faktory

$$R = \frac{\sum_H \left| |F_H^o| - K|F_H^c| \right|}{\sum_H |F_H^o|}$$




# RTG krystalografie: výstupy

monokrystal – velikost  $\sim 10^{-4}$  m,  $V \sim 10^{-10}$ - $10^{-12}$  m<sup>3</sup>

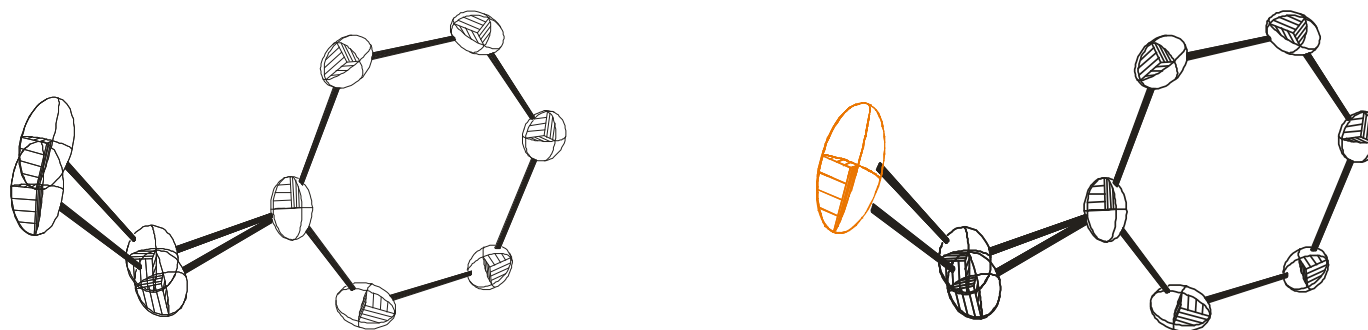
krystalová mřížka - mřížkové parametry  $\sim 10^{-8}$  -  $10^{-9}$  m

-  $V \sim 10^{-24}$ - $10^{-27}$  m<sup>3</sup>

- 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

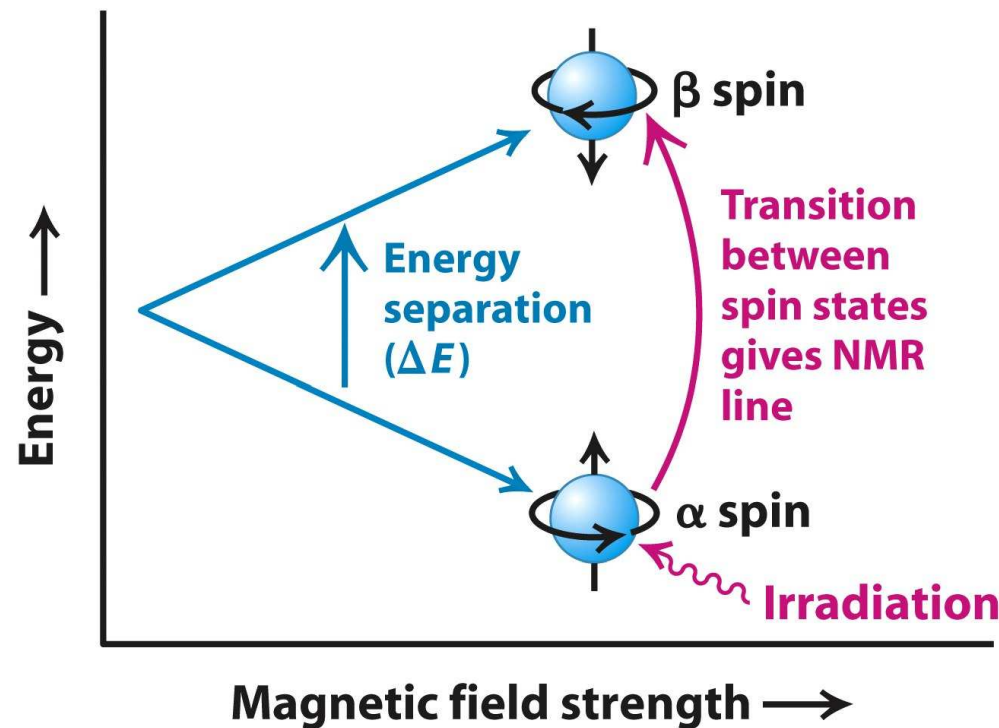
# NMR spektroskopie

NMR – nukleární magnetická rezonance

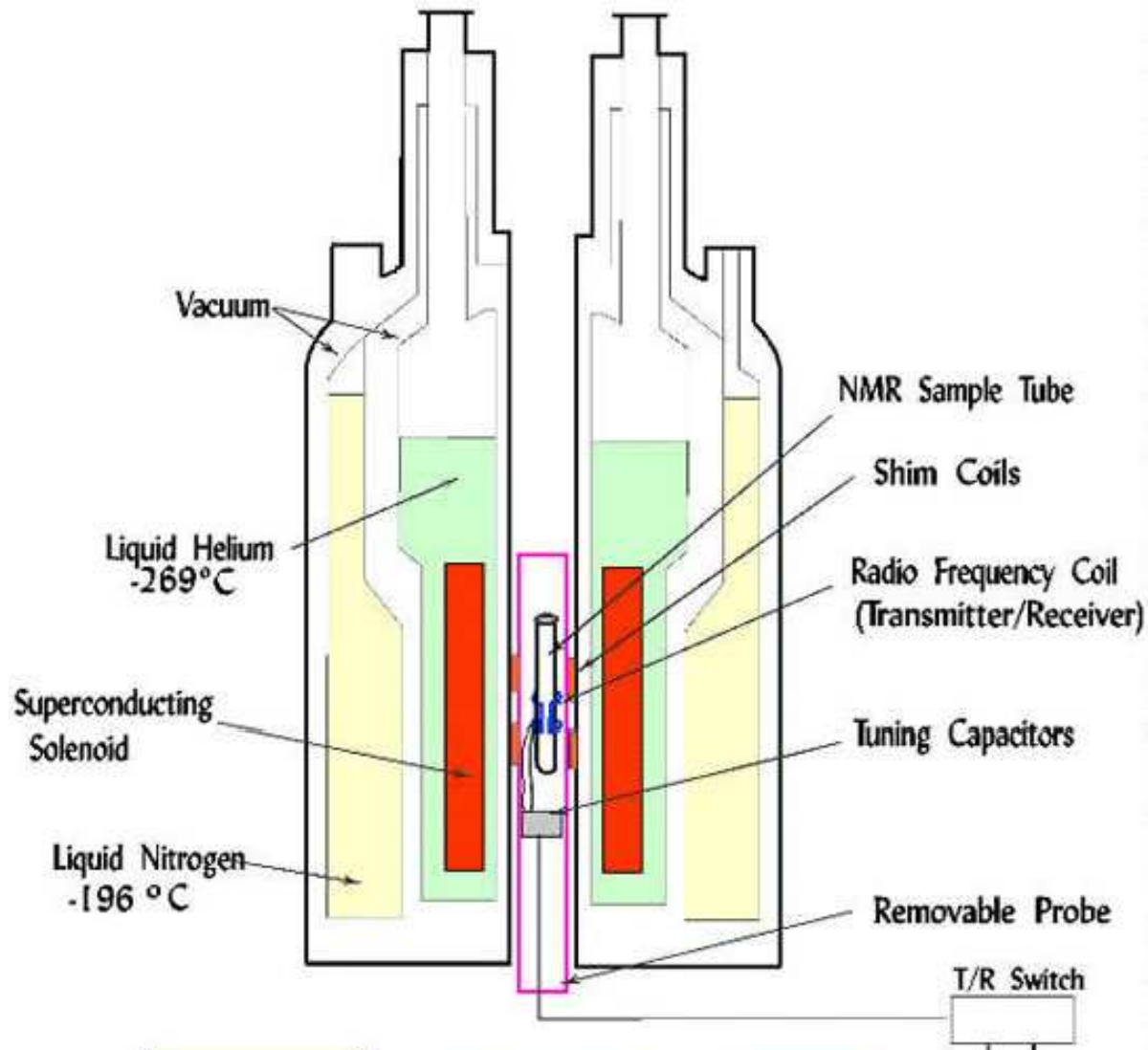
„nukleární“: jádra izotopů s nevykompenzovanými spiny

$^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$

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



# NMR spektroskopie: instrumentace

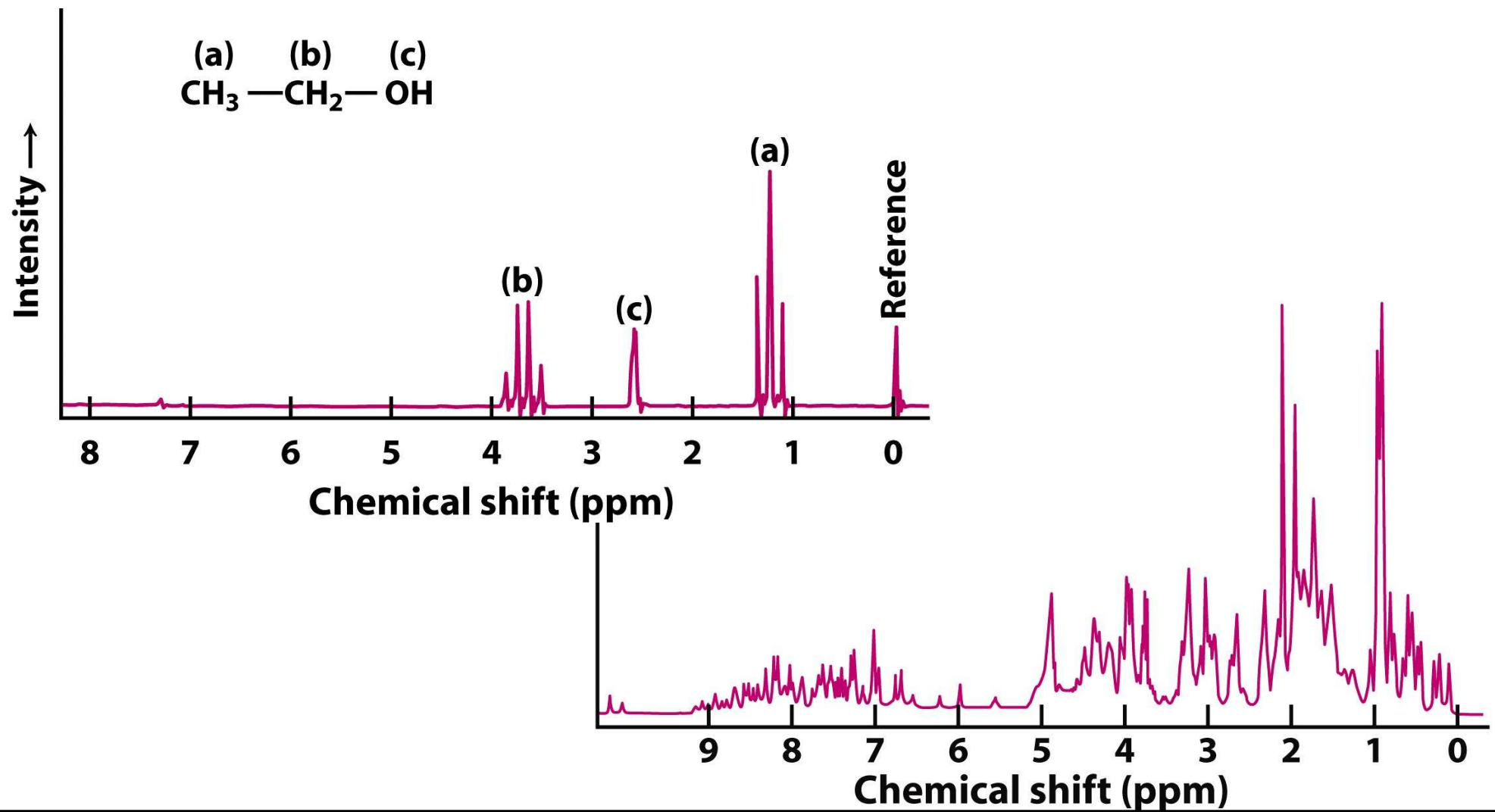


Proteinový vzorek: objem cca 300-600  $\mu\text{l}$ , mM koncentrace, čistota + stabilita

# NMR spektroskopie: chemický posuv

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

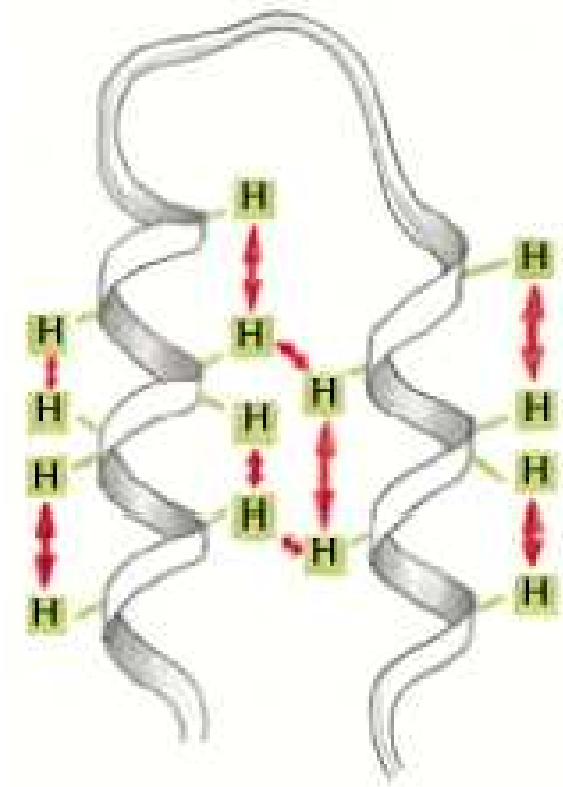
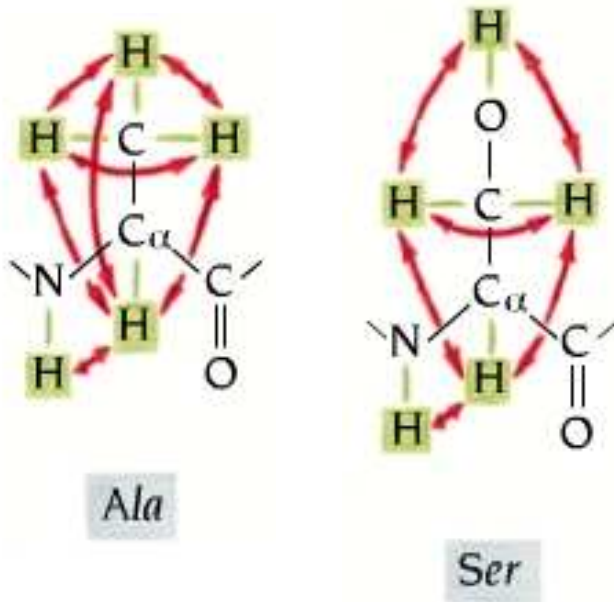
Modifikace signálu: změny magnetického pole + „chemického prostředí“



# NMR spektroskopie: multi D experimenty

Korelační ovlivňování se blízkých magnetických momentů

Experiment: COSY + NOE spektroskopie



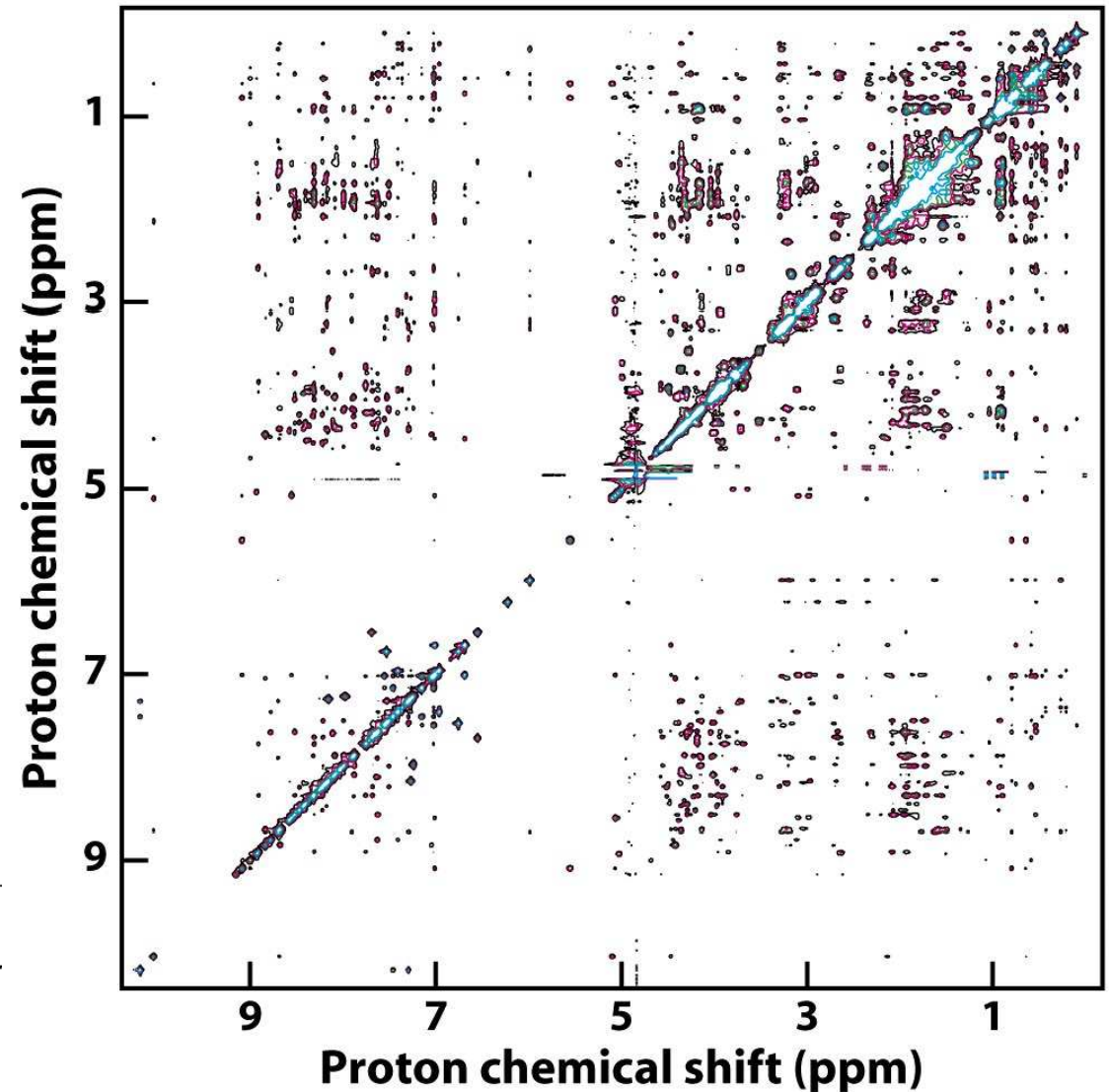
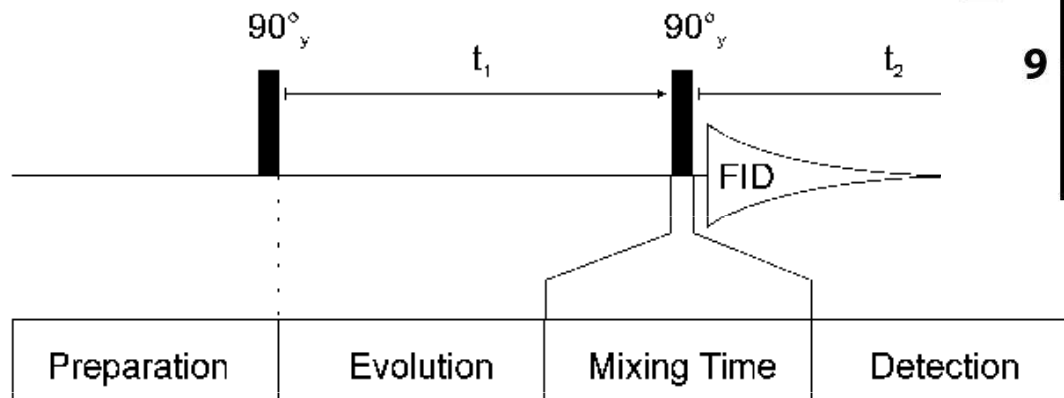
COSY – korelační spektroskopie – korelují momenty vazebně blízkých jader (např. z jednotlivých AA) - 1D

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

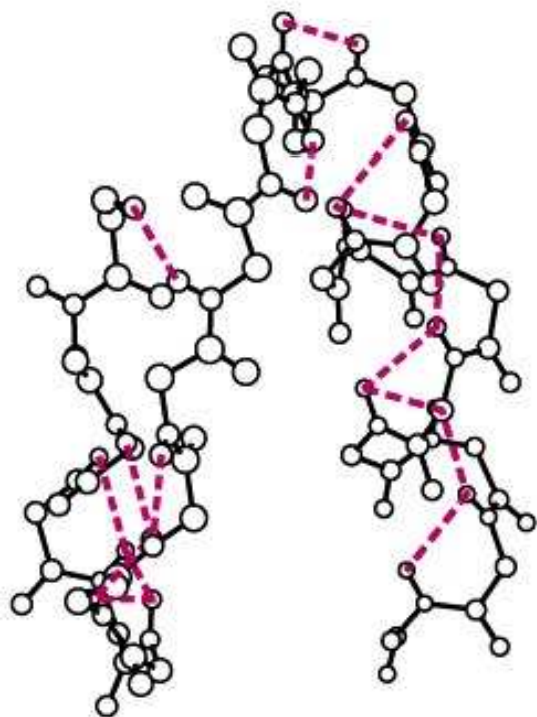
Multi D experiment:  
několik budících pulsů





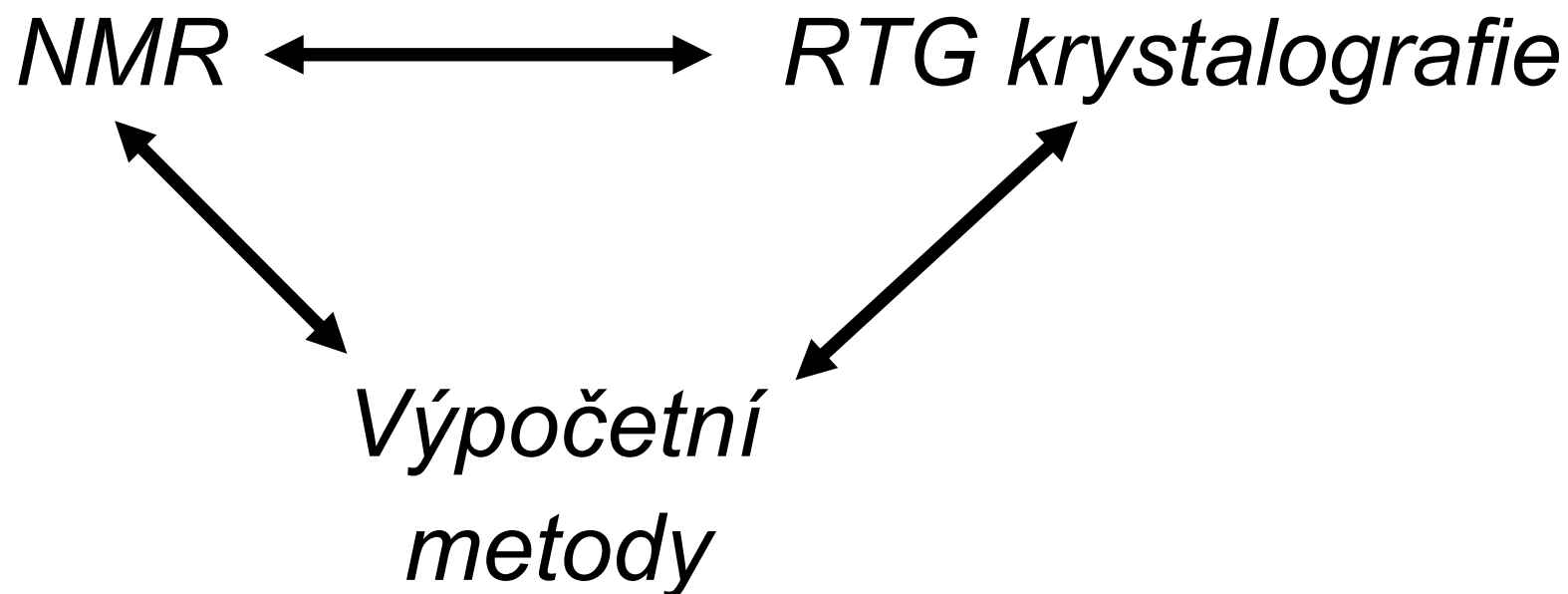
# NMR spektroskopie: „nepřímá“ 3-D data

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



Výsledek: ansámbl možných řešení

# Komplementarita experimentálních technik



**+ metodiky „budoucnosti“ : kryoEM, ...**

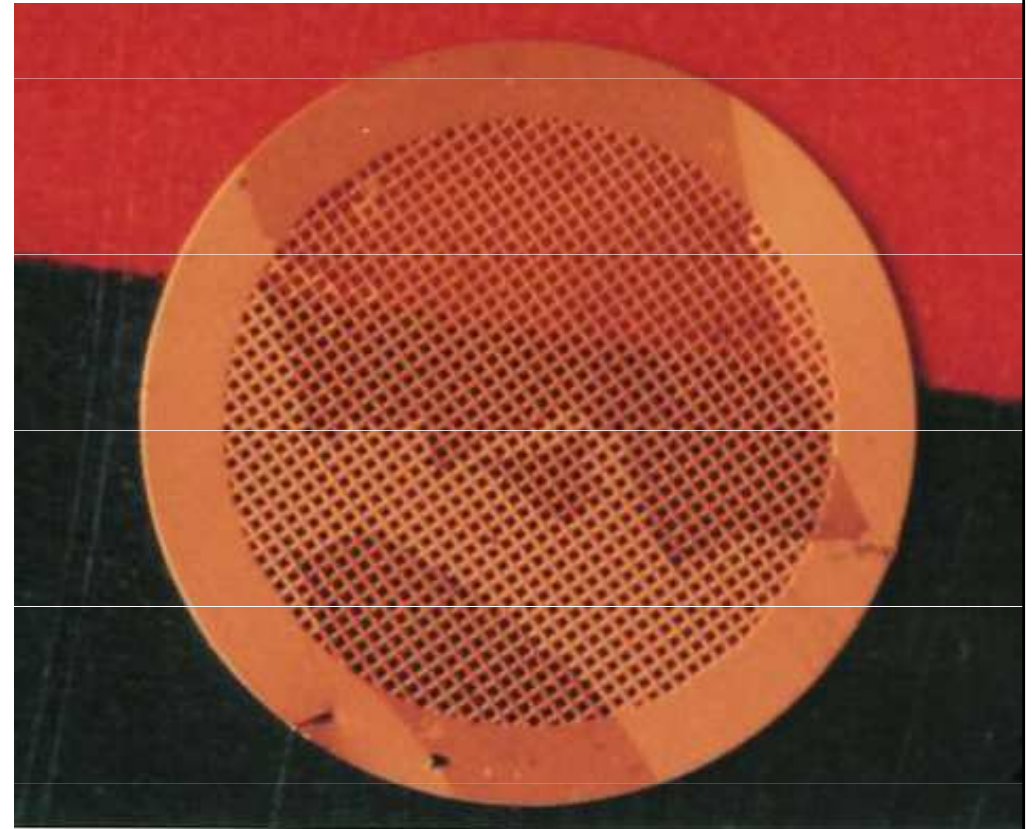
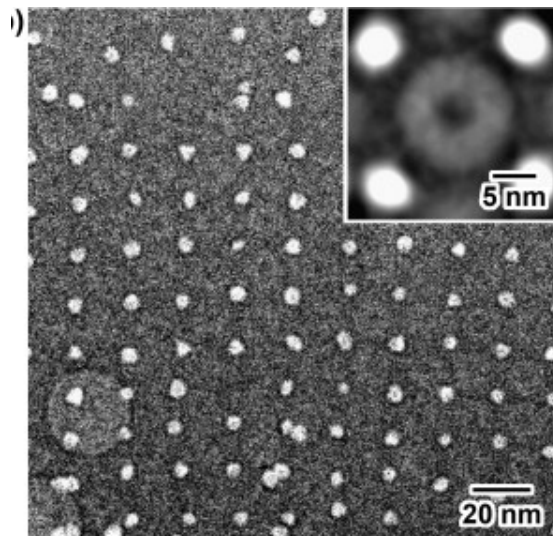
Limitace technik: velikost studovaného systému, rychlost, možné „slepé“ uličky, ...



# KryoEM: transmisní elektronová mikroskopie

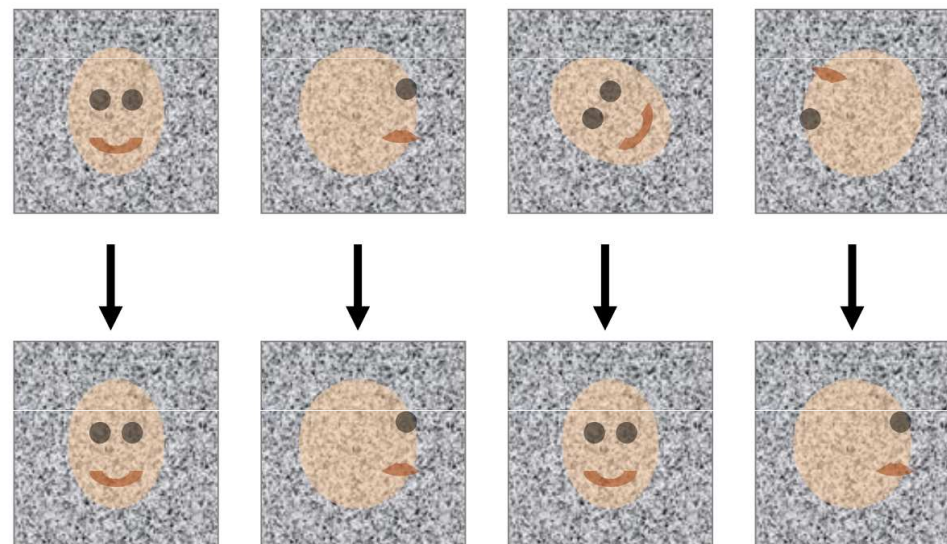
- elektronová mikroskopie → vakuum
- transmisní → tenký vzorek
- vzorek za „přirozených“ podmínek

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

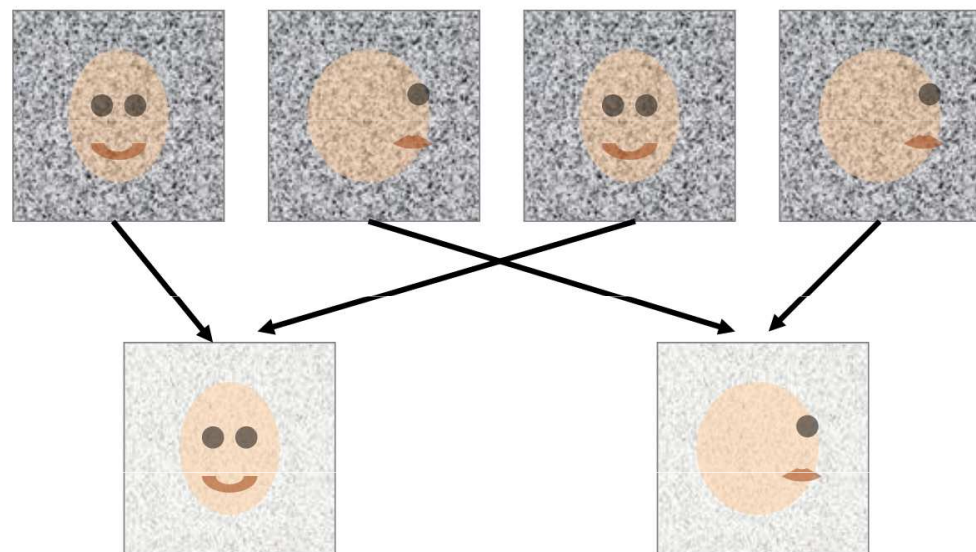


# KryoEM: počítačová rekonstrukce obrazu

pohledy na „různé“ vzorky  
„náhodným“ směrem

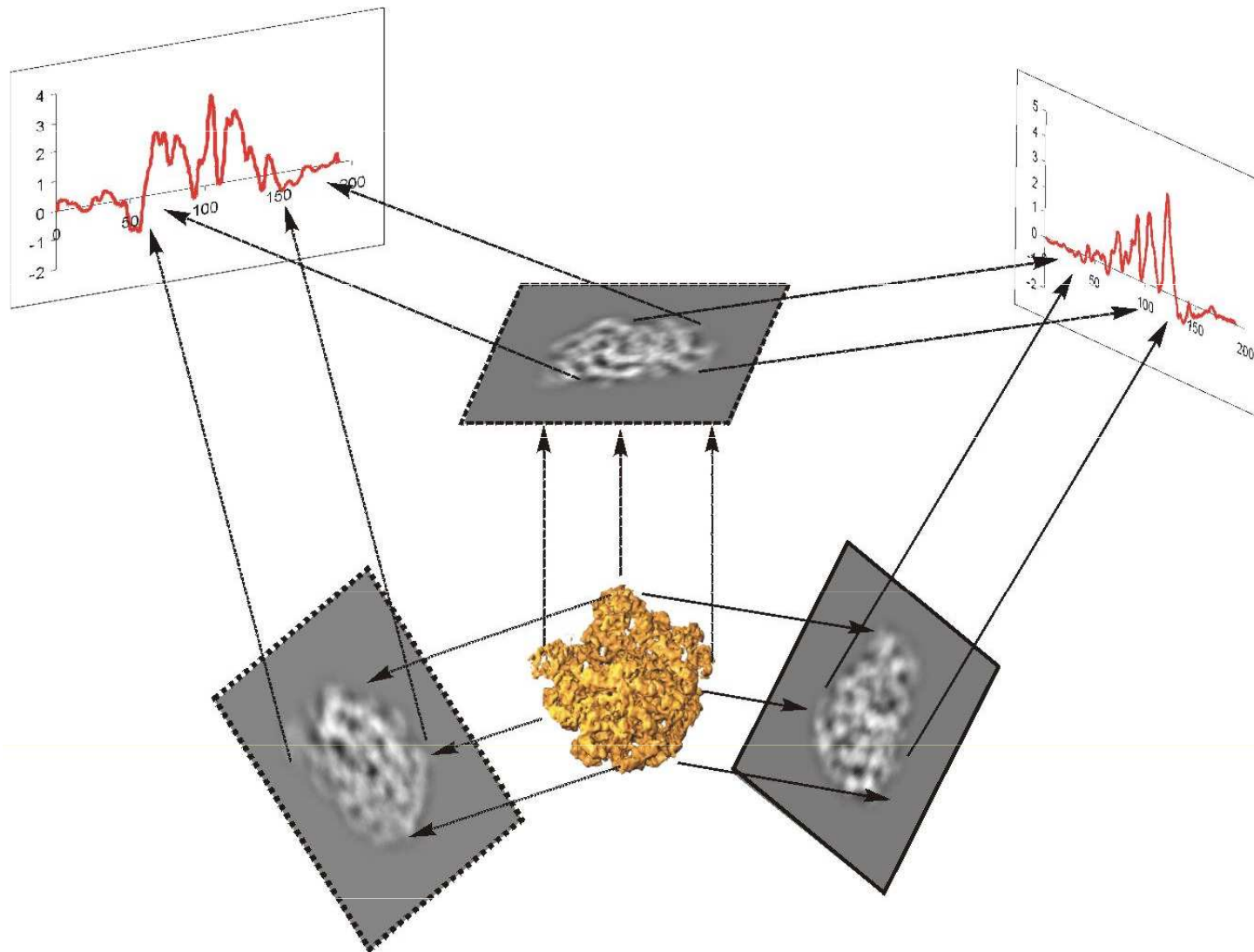


slabý/zašuměný signál



# KryoEM: počítačová rekonstrukce obrazu

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





# Strukturní informace: integrovaný přístup

Povrchová obálka alfaviru působícího „Chikungunya“ horečku.

$M_r = 25 \text{ MDa}$

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

Virion. obálka – šedá –  
výsledek kryoEM

