

# Určování struktury proteinů NMR, CryoEM a krystalografie

Tadeáš Zoubek, Eva Pecháčková, Marek Skaličan

# NMR

# Trocha historie nikoho nezabije (Krom jejích aktérů...)

- 30. léta 20. století – Isidor Isaac Rabi – první NMR experimenty v molekulárním paprsku
  - 1944 – Nobelova cena
- Po válce – Felix Bloch a Edward Purcell – nezávisle na sobě vylepšují Rabiho přístroj
- 1949 – chemický posun
- 1975 – Richard Ernst zavádí frekvenční a fázové kódování a Fourierovu transformaci pro analýzu signálu
  - 1991 Nobelova cena

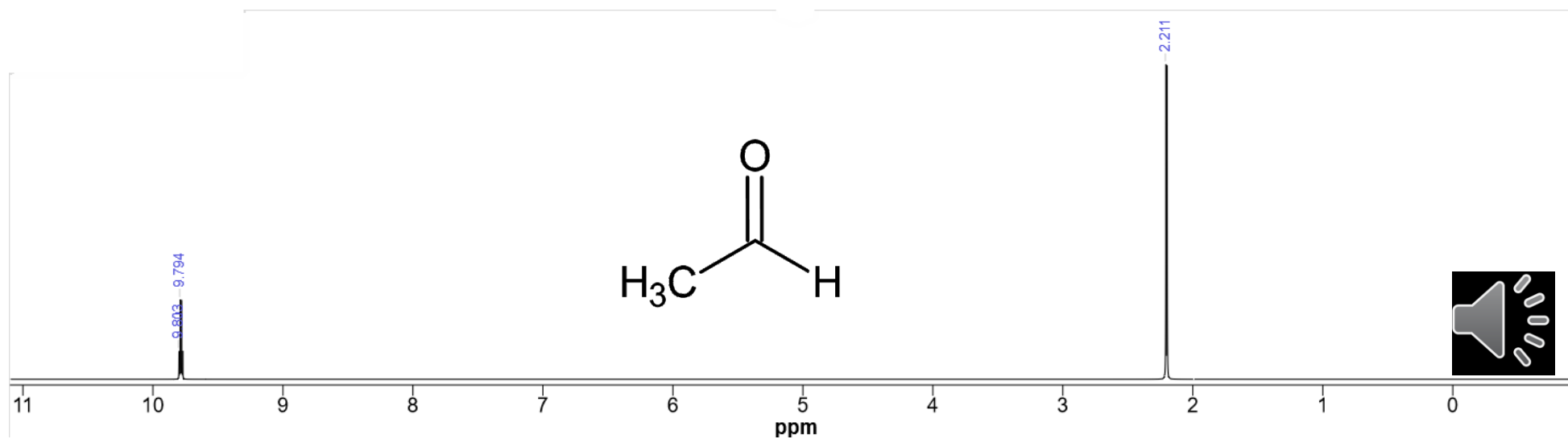
# Nukleární magnetická rezonance – není to nebezpečné?

- Nukleární – měříme jádra stabilních prvků
- Magnetická – máme velký magnet
- Rezonance – měříme frekvence jader

# Jak NMR funguje?

- Měřitelná jádra mají určitý magnetický moment
  - Mimo magnetické pole – celkový nulový magnetický moment
  - V magnetickém poli – zvýhodnění určitého směru
- Excitace → sklopení vektoru o  $90^\circ$  → vypnutí excitačního záření → sběr signálu

# Jak NMR funguje?



# Dají se měřit všechna jádra?







- Ne, jen jádra s nenulovým magnetickým spinem
- $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$  – běžné a měřitelné izotopy
- $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$  – běžné, ale neměřitelné – co s tím?
  - $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  – velmi vzácné
- Měří se i jiná jádra?
  - $^{19}\text{F}$

# Jak připravit vzorek?

- $^1\text{H}$ 
  - V proteinech přirozeně, měří se ale ve spektrech od 2D výše
- $^{31}\text{P}$ 
  - Stačí nafosforylovat
- $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ 
  - Vzácné
  - Exprese v minimálním médiu s  $^{13}\text{C}$  glukózou a  $^{15}\text{N}$  chloridem amonným
- Koncentrace 0,05 – 1 mM
- Vhodný pufr – 20 mM NaPi, pH 6
- Objem kyvety 300 – 500  $\mu\text{l}$



# 13C

 <p>Hroznový cukr - glukóza 1 kg 59,00 Kč</p> <p><a href="#">PŘIDAT DO KOŠÍKU</a></p>	 <p>Hroznový cukr - glukóza 1,8 kg 99,00 Kč</p> <p><a href="#">PŘIDAT DO KOŠÍKU</a></p>	 <p>Hroznový cukr - glukóza 25 kg 999,00 Kč</p> <p><a href="#">PŘIDAT DO KOŠÍKU</a></p>
 <p>Hroznový cukr - glukóza 3 kg 159,00 Kč</p> <p><a href="#">PŘIDAT DO KOŠÍKU</a></p>	 <p>Hroznový cukr - glukóza 500 g 39,00 Kč</p> <p><a href="#">PŘIDAT DO KOŠÍKU</a></p>	 <p>Hroznový cukr - glukóza 6 kg 269,00 Kč</p> <p><a href="#">PŘIDAT DO KOŠÍKU</a></p>

**389374** ▶ **Sigma-Aldrich**

## D-Glucose-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>

≥99 atom % <sup>13</sup>C, ≥99% (CP)

Synonym(s):  
D-Glucose-<sup>13</sup>C, Labeled Glucose, Dextrose-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>

Empirical Formula (Hill Notation):  
<sup>13</sup>C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>

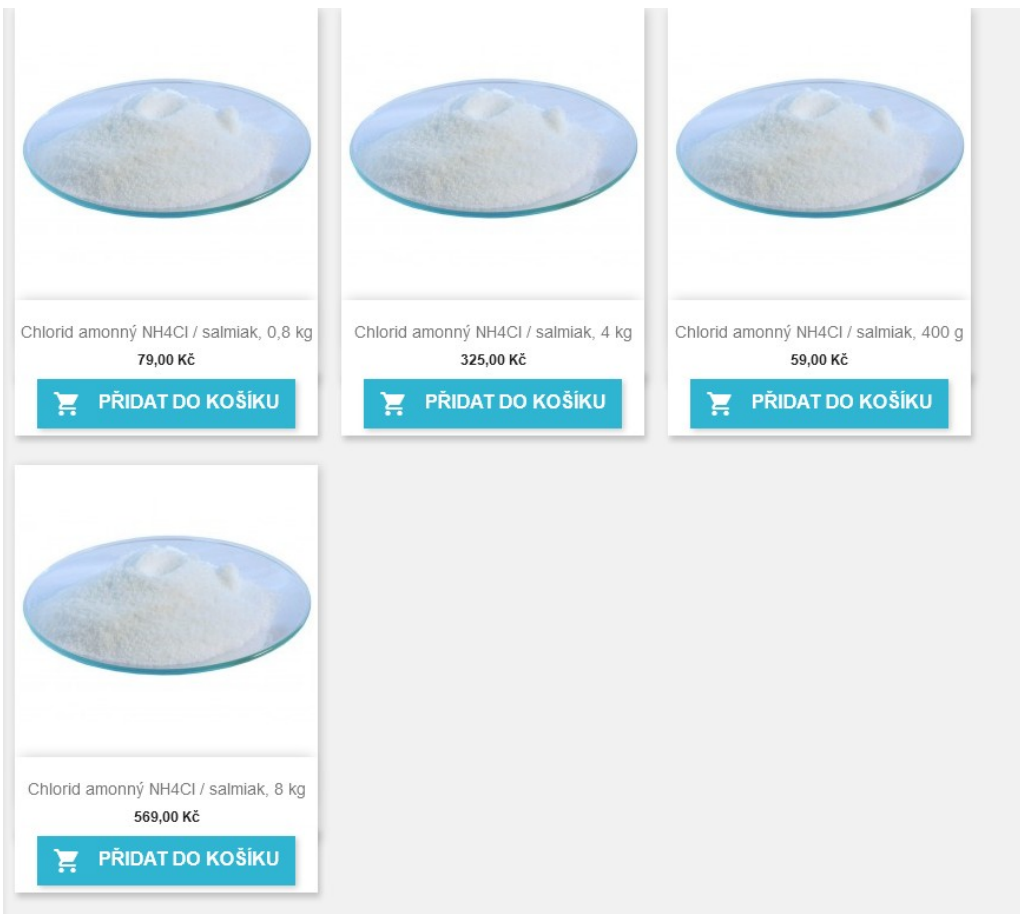
CAS Number: **110187-42-3**      Molecular Weight: 186.11      MDL number: **MFCD00037544**

PubChem Substance ID: **24864278**

SKU	Pack Size	Availability	Price	Quantity
389374-100MG	100 MG	✓ Estimated to ship on December 16, 2021 - <b>FROM</b>	CZK 2,980.00	<input type="text" value="-"/> <input type="text" value="+"/> ⓘ
389374-250MG	250 MG	✓ Estimated to ship on December 16, 2021 - <b>FROM</b>	CZK 3,360.00	<input type="text" value="-"/> <input type="text" value="+"/> ⓘ
389374-1G	1 G	✓ Estimated to ship on November 02, 2021 - <b>FROM</b>	CZK 7,700.00	<input type="text" value="-"/> <input type="text" value="+"/> ⓘ
389374-2G	2 G	✓ Estimated to ship on December 16, 2021 - <b>FROM</b>	CZK 15,300.00	<input type="text" value="-"/> <input type="text" value="+"/> ⓘ
389374-3G	3 G	✓ Estimated to ship on December 16, 2021 - <b>FROM</b>	CZK 22,900.00	<input type="text" value="-"/> <input type="text" value="+"/> ⓘ
389374-10G	10 G	✓ Estimated to ship on December 16, 2021 - <b>FROM</b>	CZK 80,000.00	<input type="text" value="-"/> <input type="text" value="+"/> ⓘ
389374-25G	25 G	✓ Estimated to ship on December 16, 2021 - <b>FROM</b>	CZK 188,500.00	<input type="text" value="-"/> <input type="text" value="+"/> ⓘ

[Request a Bulk Order](#) [Add To Cart](#)

# 15N



Chlorid amonný NH<sub>4</sub>Cl / salmiak, 0,8 kg  
79,00 Kč  
[PŘIDAT DO KOŠÍKU](#)

Chlorid amonný NH<sub>4</sub>Cl / salmiak, 4 kg  
325,00 Kč  
[PŘIDAT DO KOŠÍKU](#)

Chlorid amonný NH<sub>4</sub>Cl / salmiak, 400 g  
59,00 Kč  
[PŘIDAT DO KOŠÍKU](#)

Chlorid amonný NH<sub>4</sub>Cl / salmiak, 8 kg  
569,00 Kč  
[PŘIDAT DO KOŠÍKU](#)

299251 ▶ [Sigma-Aldrich](#).

## Ammonium-<sup>15</sup>N chloride

≥98 atom % <sup>15</sup>N, ≥99% (CP)

Synonym(s):  
<sup>15</sup>N Labeled ammonium chloride

Linear Formula:  
<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl

CAS Number: [39466-62-1](#)

Molecular Weight: 54.48

MDL number: [MFCD00075417](#)

PubChem Substance ID: [24858029](#)

SKU	Pack Size	Availability	Price	Quantity
299251-250MG	250 MG	✓ Estimated to ship on November 02, 2021 - <b>FROM</b>	CZK 2,610.00	<input type="text" value="-"/> <input type="text" value="+"/> ⓘ
299251-1G	1 G	✓ Estimated to ship on November 02, 2021 - <b>FROM</b>	CZK 2,890.00	<input type="text" value="-"/> <input type="text" value="+"/> ⓘ
299251-10G	10 G	✓ Estimated to ship on November 02, 2021 - <b>FROM</b>	CZK 21,100.00	<input type="text" value="-"/> <input type="text" value="+"/> ⓘ
299251-20G	20 G	✓ Estimated to ship on November 02, 2021 - <b>FROM</b>	CZK 37,200.00	<input type="text" value="-"/> <input type="text" value="+"/> ⓘ
299251-50G	50 G	✓ Estimated to ship on November 02, 2021 - <b>FROM</b>	CZK 82,400.00	<input type="text" value="-"/> <input type="text" value="+"/> ⓘ
299251-100G	100 G	✓ Estimated to ship on November 02, 2021 - <b>FROM</b>	CZK 150,100.00	<input type="text" value="-"/> <input type="text" value="+"/> ⓘ

[Request a Bulk Order](#)

[Add To Cart](#)

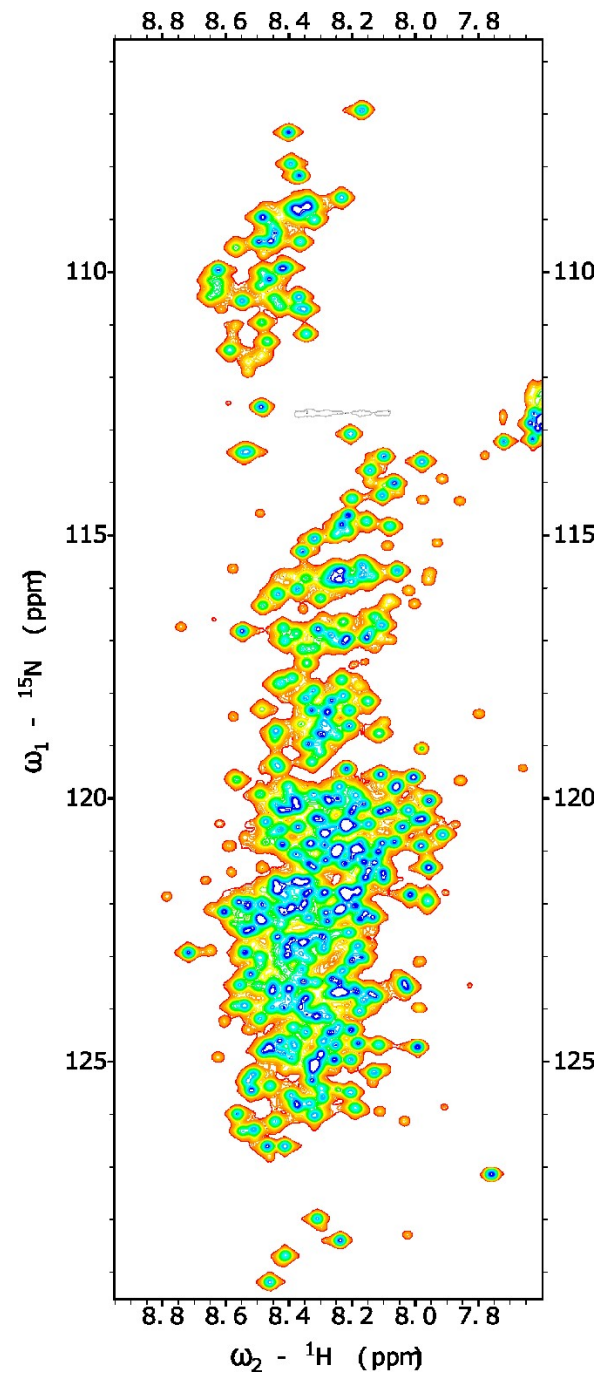
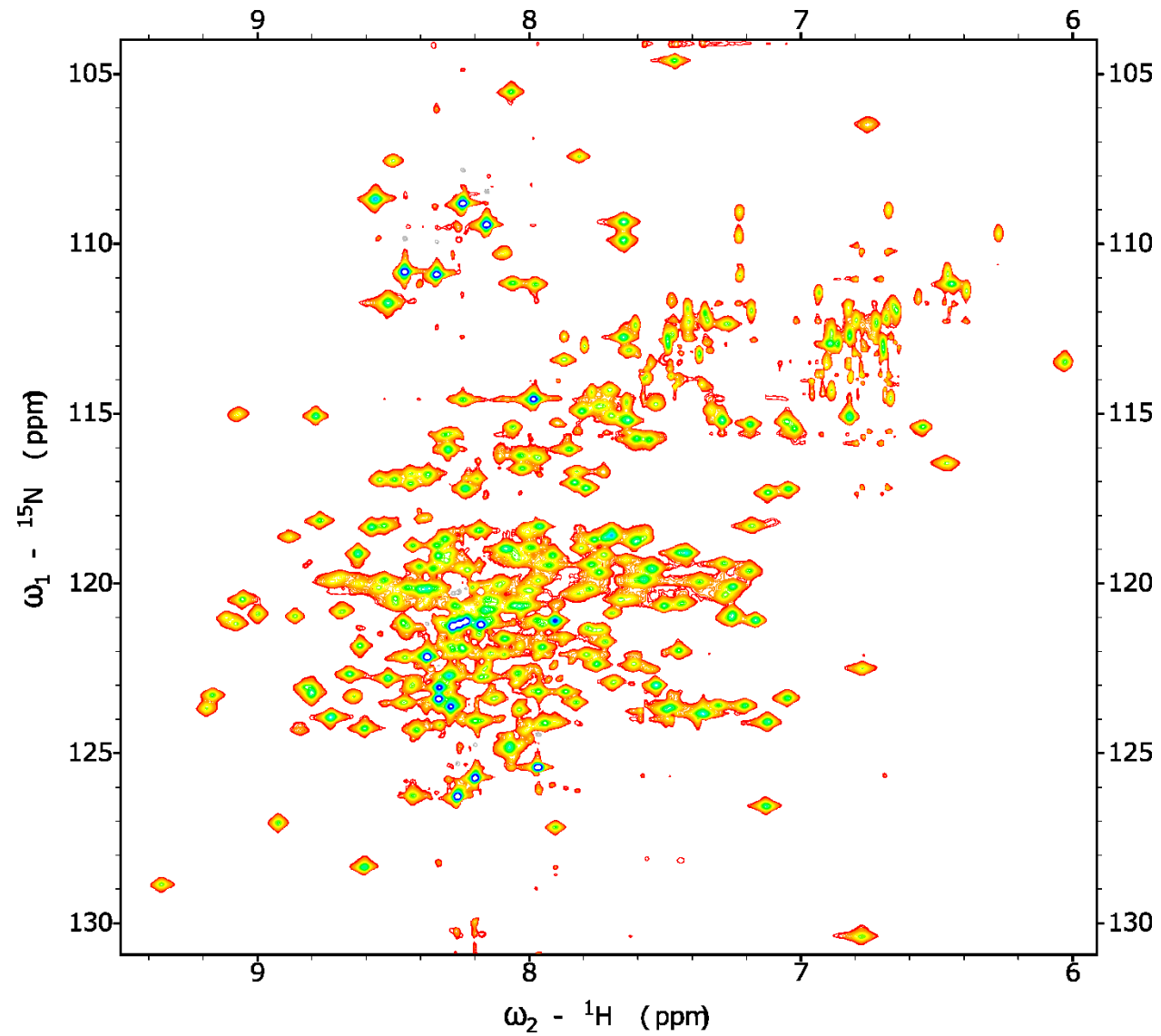
# A co $^{19}\text{F}$ ?

- $^{19}\text{F}$  značené aminokyseliny
- V případě vazby na uhlík  $^{19}\text{F} = 1\text{H}$
- Expres v auxotrofních bakteriích
- Cell-free protein synthesis

# Spektra

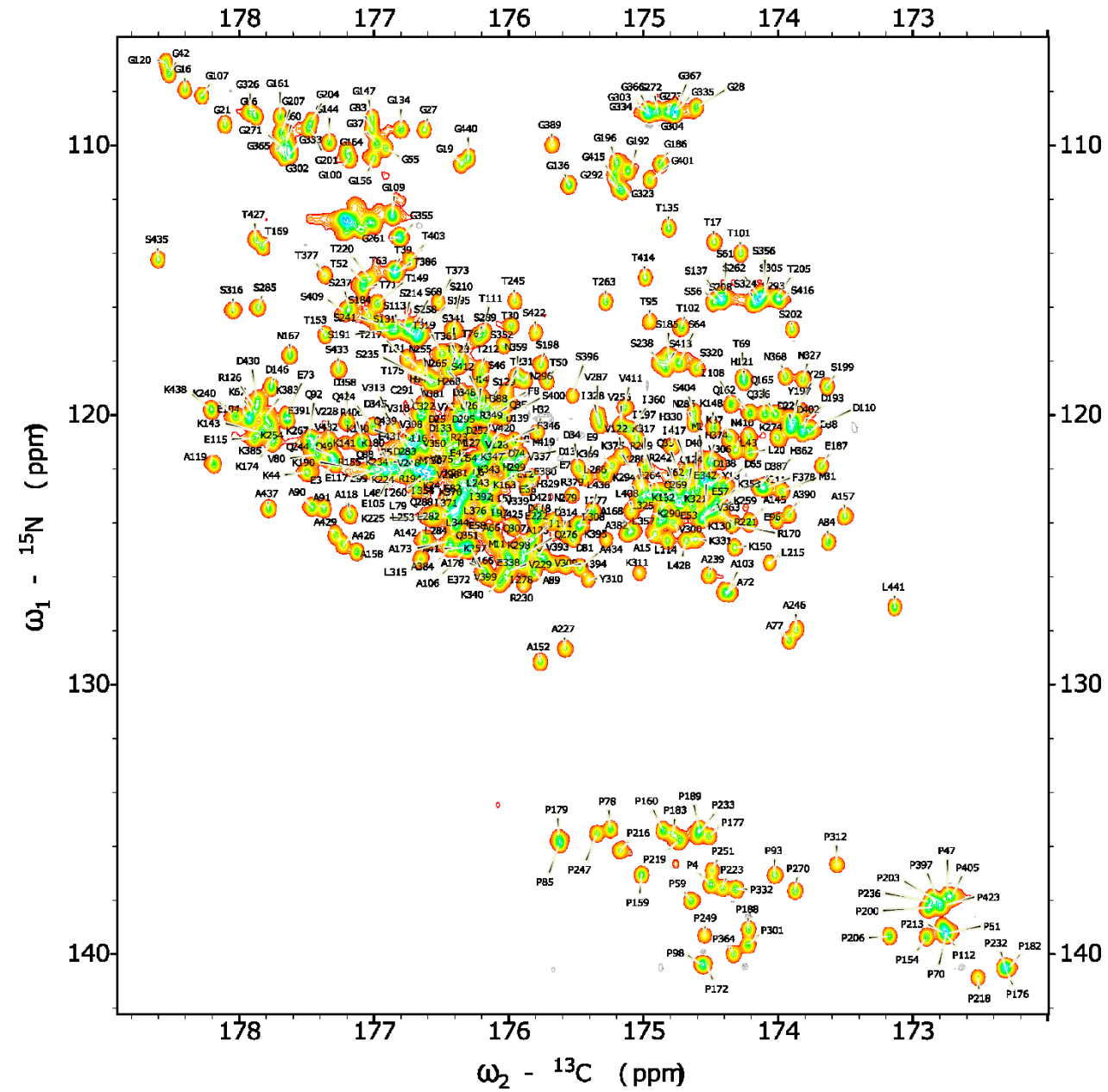
- 1D
  - $^1\text{H}$  – nepoužitelné
  - $^{31}\text{P}$  – studium kinetiky
  - $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  – nedělají se
- 2D a vyšší
  - Korelace jader
    - Homonukleární ( $^1\text{H}$ ) – COSY, TOCSY, INADEQUATE
    - Heteronukleární ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) – HSQC, CON, CAN
    - Přes vazby
    - Přes prostor – NOESY

# HSQC



# CON

- Optimalizovaný pro IDP a velké proteiny



# NOESY

- Nuclear Overhauser Effect spectroscopy
- Měří se vzdálenosti mezi jádry

# Shrnutí

## Výhody

- Nativní stav
- Rychlost přípravy
- Nulové poškození vzorku
- Lze zde studovat i IDP
- Není limitované velikostí proteinů
- Použitelné nejenom pro studium struktury, ale i pro interakce

## Nevýhody

- Cena chemikálií pro značení
- Časová náročnost přiřazení signálů
- Nízká senzitivita
- Chemický posun záleží na pH a složení pufru



# CryoEM

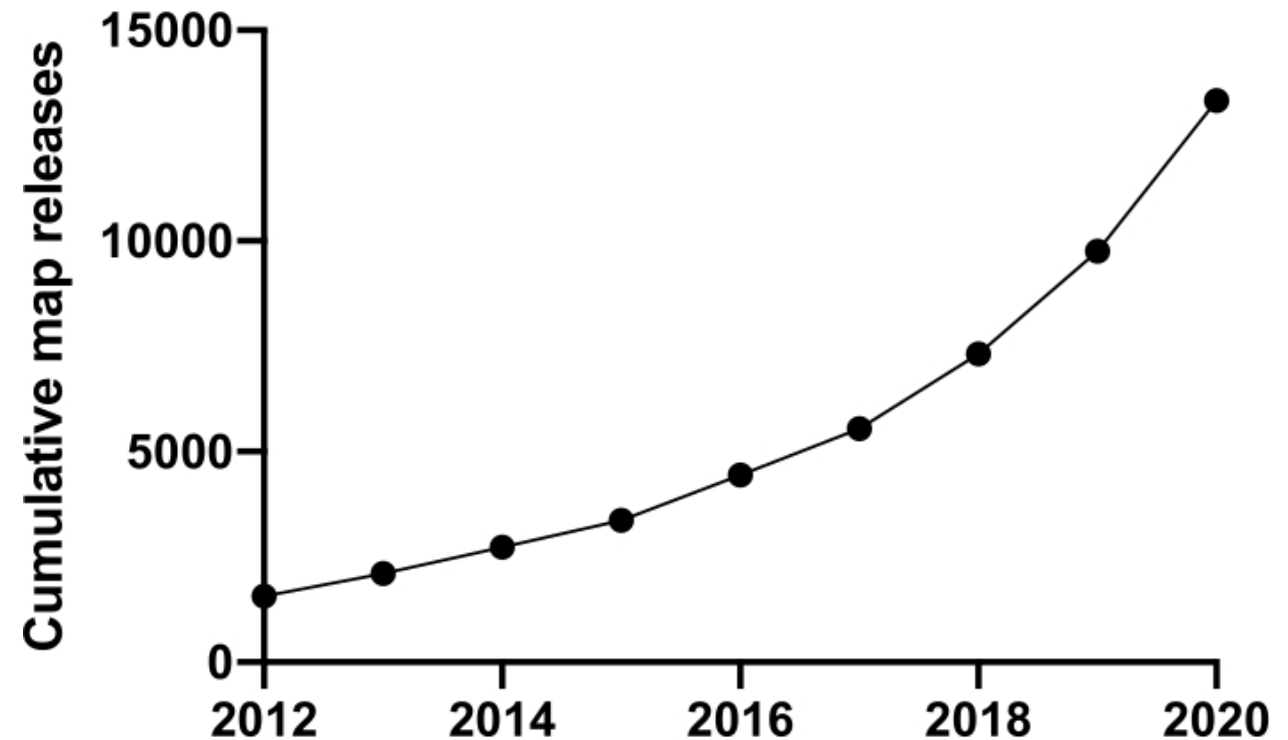
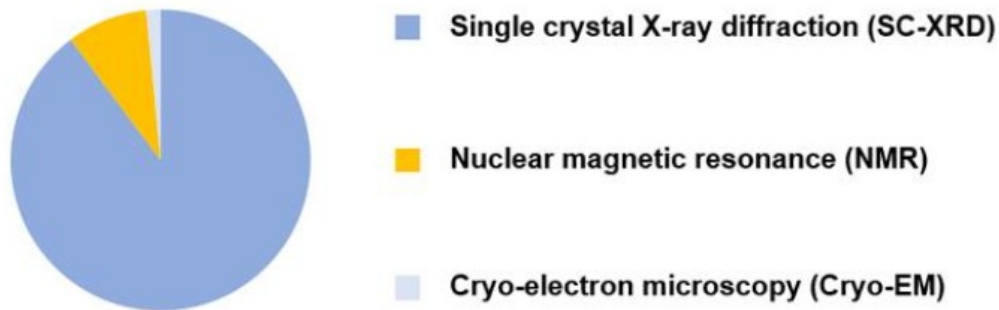
# Co je CryoEM?

- Kryogenní elektronová mikroskopie - výkonná technika ve strukturální biologii, která je schopna poskytovat mapy hustoty makromolekulárních struktur s vysokým rozlišením (1,5 Å)
- Jedná se o TEM, která je navržena pro udržování kryogenních teplot v komoře
- Dosažení těchto teplot je velice rychlé, aby se zabránilo krystalizaci molekul vody – protein má pak přirozenou strukturu
- Cryo-EM se stal oblíbenou metodou pro vědce po celém světě

# Historie

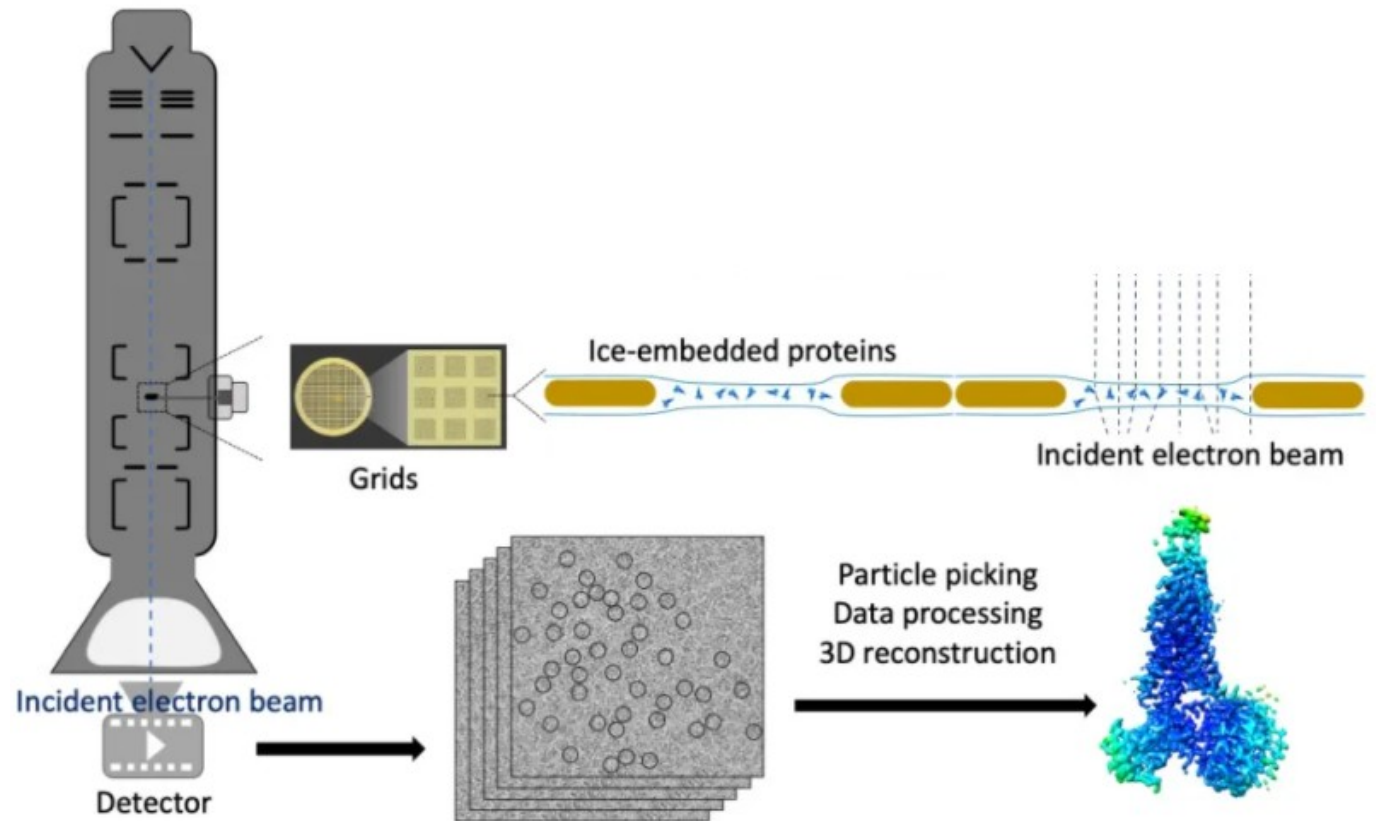
- Poprvé objevena v roce 1968 (TEM)
- Pro snížení radiačního poškození byla v roce 1974 vytvořena kryogenní elektronová mikroskopie.
- V posledních letech udělala technologie Cryo-EM revoluční pokrok, zejména v analýze jednotlivých částic.
- Od roku 2012 - obrovský pokrok v elektronovém detektoru a zpracování obrazu - rozlišení Cryo-EM je nyní srovnatelné s rentgenovou difrakcí jediného krystalu.

- Od 2013 se stala hlavní technikou pro určování proteinové struktury a její použití se dramaticky zvýšilo.
- V roce 2017 byla za Cryo-EM udělena Nobelova cena

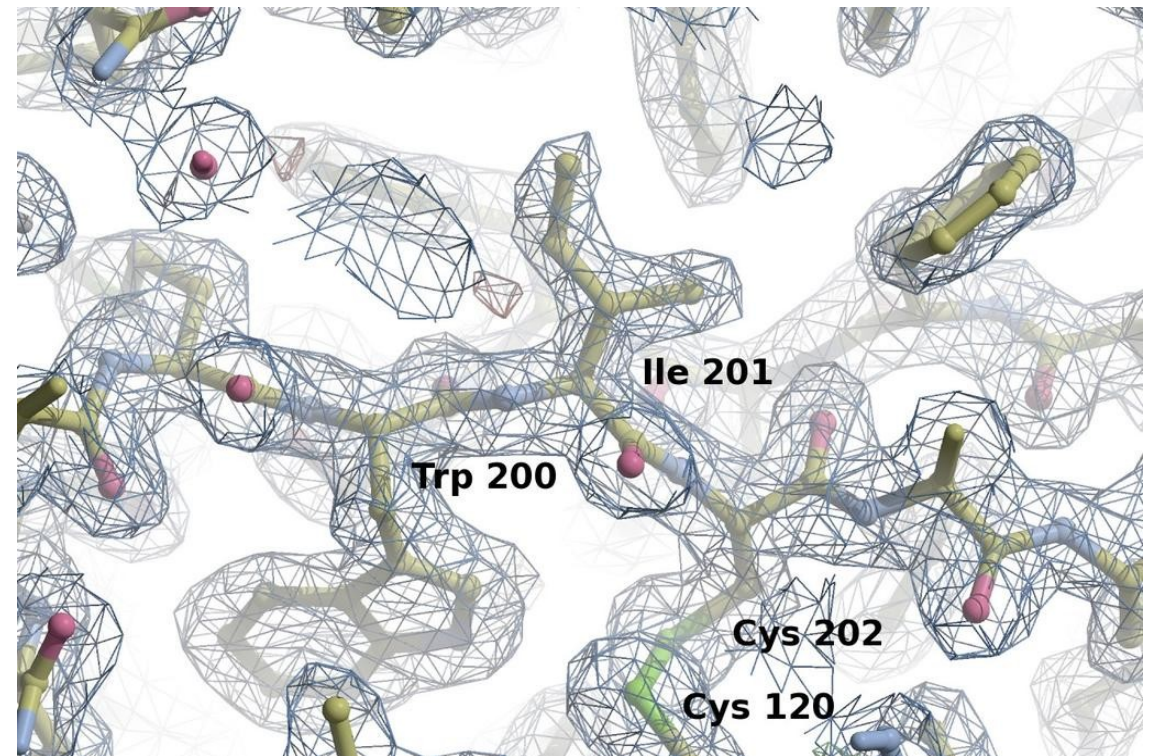


# Jak to funguje?

- Elektronový mikroskop vystřelí elektrony rychlostí světla na vzorek, poté kamery zaznamenávají paprsky elektronů (200 kV nebo 300 kV) a určí kombinací promítaných obrazů do 3D struktury daného proteinu

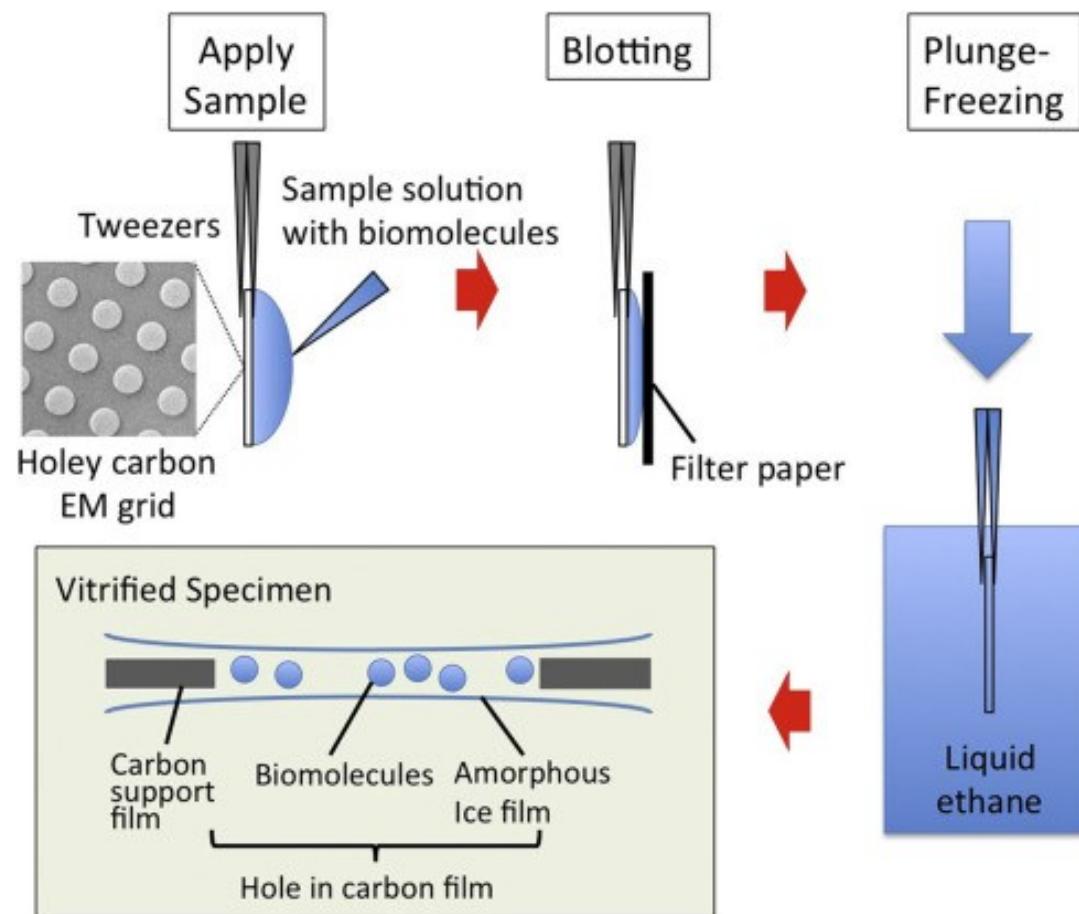


- Každý snímek je zašuměný a neúplný - desítky nebo stovky tisíc snímků částic jsou zarovnány a zprůměrovány.
- Kvalita konečné mapy molekuly závisí na přesnosti, s jakou lze obrazy částic zarovnat - lépe pro větší částice



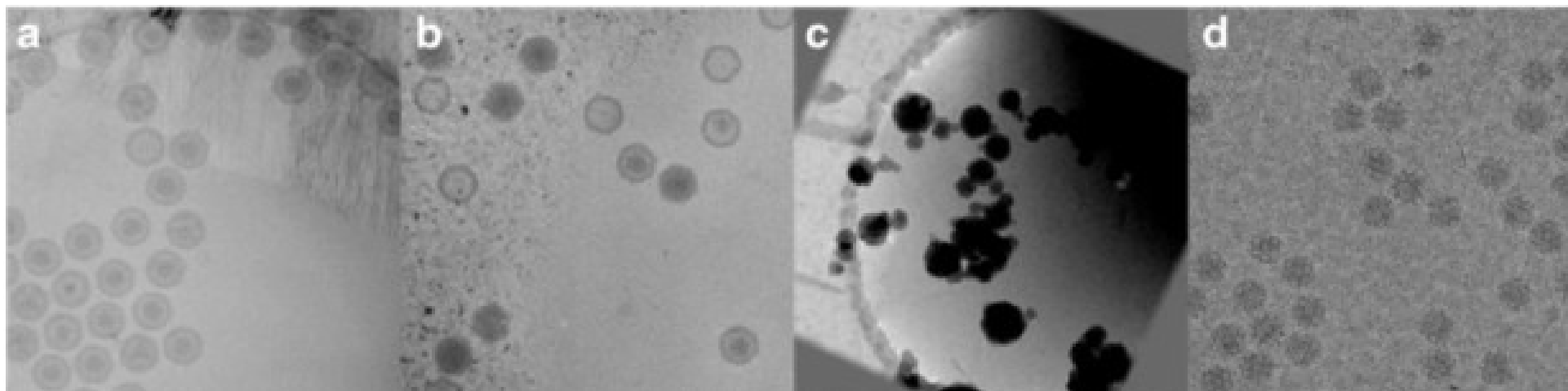
# Zmrazování vzorku

- Nosná mřížka (1-2  $\mu\text{m}$ )
- Vzorek 3-5  $\mu\text{l}$
- Odsátí filtračním papírem
- Tloušťka ledu hraje velkou roli
- Rychlý ponor do tekutého etanu - zabrání tvorbě krystalů ledu - vitrifikovaný led
- Teplota musí zůstat při teplotě kapalného dusíku ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ )



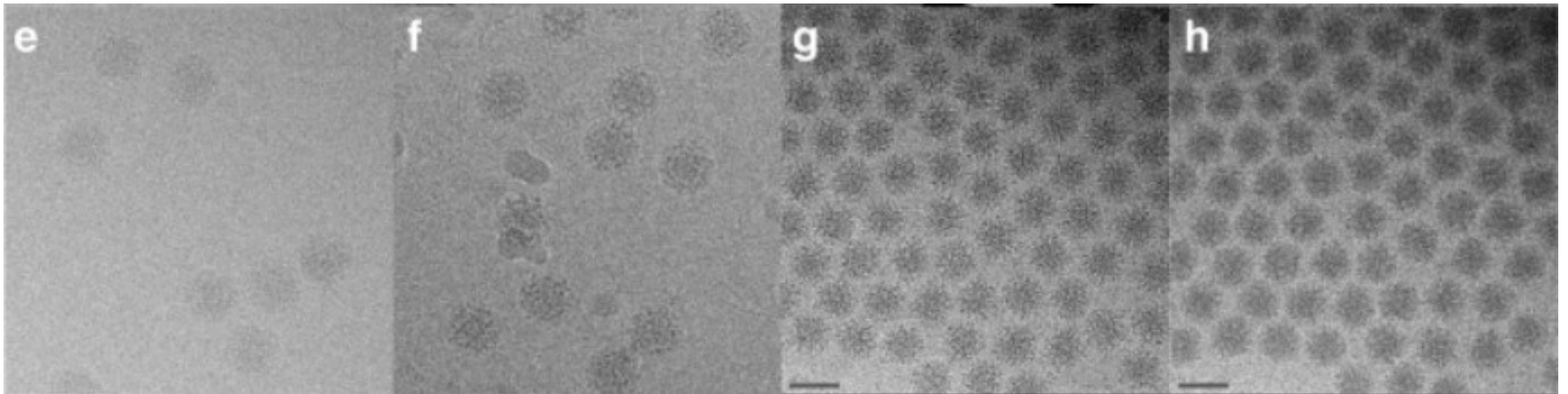
# Jak odlišit dobrý a špatný vzorek?

- Nedostatečně rychlé zmražení - hexagonální led (a)
- Zahřívání vzorku - krychlový led (b)
- Při vkládání vzorku do TEM je vzorek vystaven vodní páře - námraza (c)
- Kontaminace uvnitř kolony, nízké vakuum – led z leopardí kůže (d)





- Je potřeba zajistit správné nastavení kontrastu - vyšší rozostření zlepšuje kontrast, ale za cenu nižšího rozlišení (e,f)
- Vzorky jsou náchylné k radiačnímu poškození - bublinky plynu (g,h)



# Výhody vs. nevýhody

## Výhody

- Vzorky ve stavu vodného roztoku – nejsou narušeny krystalickou strukturou
- Stačí malý objem vzorku
- Cryo-EM dokáže rozlišit širokou škálu různých vzorků
- Oproti TEM negativnímu barvení nevyžaduje kontrastní činidlo solí těžkých kovů, která může ovlivnit složení biomolekuly

## Nevýhody

- Nelze dostatečně dobře rozlišit nukleové kyseliny a proteiny menší než 75kDa (kontrast)
- Nízký signál v porovnání se šumem
- Náročná manipulace se vzorkem
- Výpočetně náročná rekonstrukce obrazu - trvá to dlouho
- Drahá metoda

# Zhodnocení

- I když má Cryo-EM své problémy, je cenným nástrojem v různých biologických oblastech
- Stále více se používá i v jiných průmyslových odvětvích, jako je farmacie, zdravotnictví a kosmetika
- Protože dokáže překonat řadu omezení, kterým čelí jiné techniky umožnil Cryo-EM vědcům a technikům pozorovat a studovat širokou škálu molekul a jejich struktur
- Problémy Cryo-EM jsou stále opravovány aby se stal jedním z nejlepších nástrojů v biologii, medicíně a výzkumu pro určování struktur makromolekul.

# Krystallografie

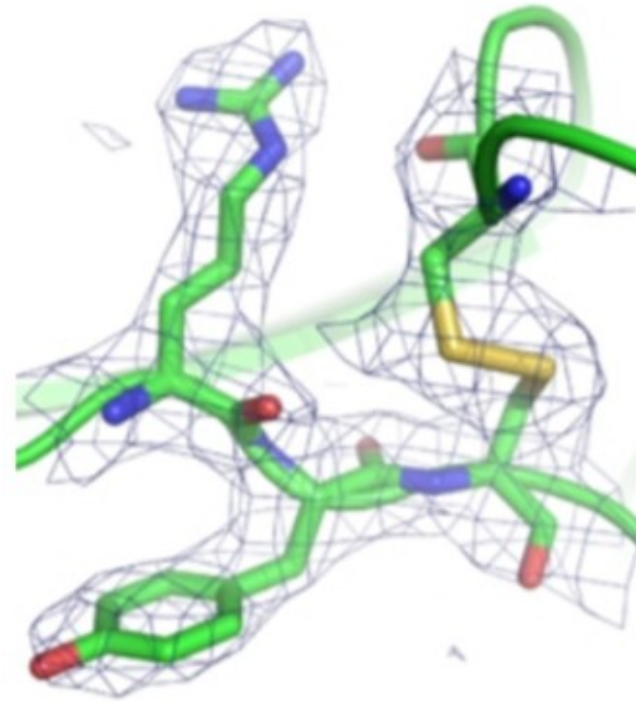
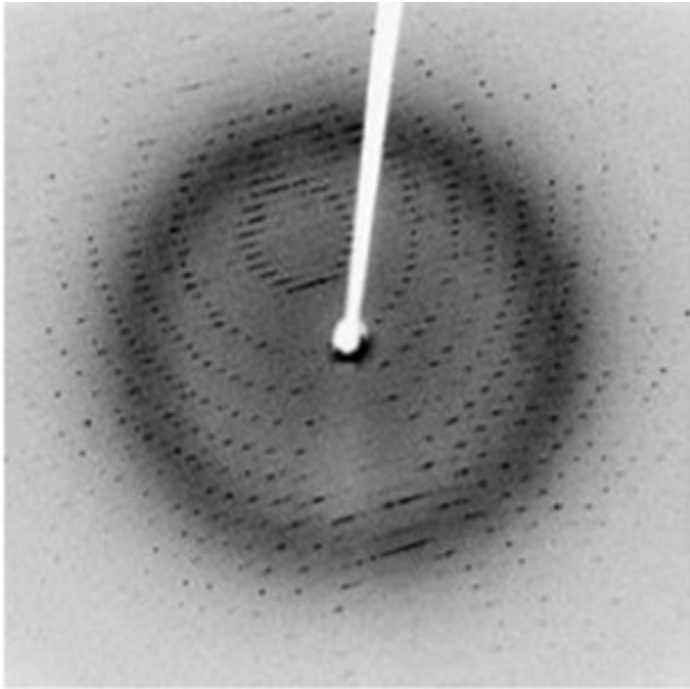
# História

- 80. roky 19. storočia - návrh niekoľko kryštalických štruktúr
- 1914 – Max von Laue – Nobelová cena za difrakciu RTG žiarenia kryštálom
- 1915 - William Lawrence Bragg a William Henry Bragg: Nobelová cena za prvé použitie rentgenovej kryštalografie
- 1949- James Batcheller Sumner: Nobelová cena za objav kryštalizácie enzýmov

# Ako funguje RTG Kryštalografia

- RTG žiarenie 0.01 – 10 nm
- Najčastejšie používaná  $\lambda = 1 \text{ \AA}$  ( 0.1 nm)
- Žiarenie aplikované na kryštál proteínu
- Vznik difrakčného vzoru
- Podľa elektrónovej hustoty určíme štruktúru proteínu

# Ako funguje RTG Kryštalografia

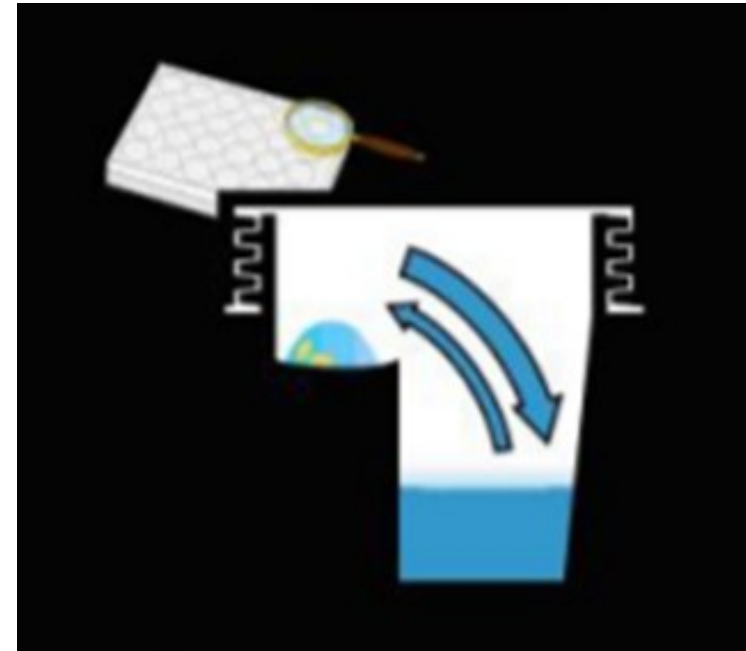
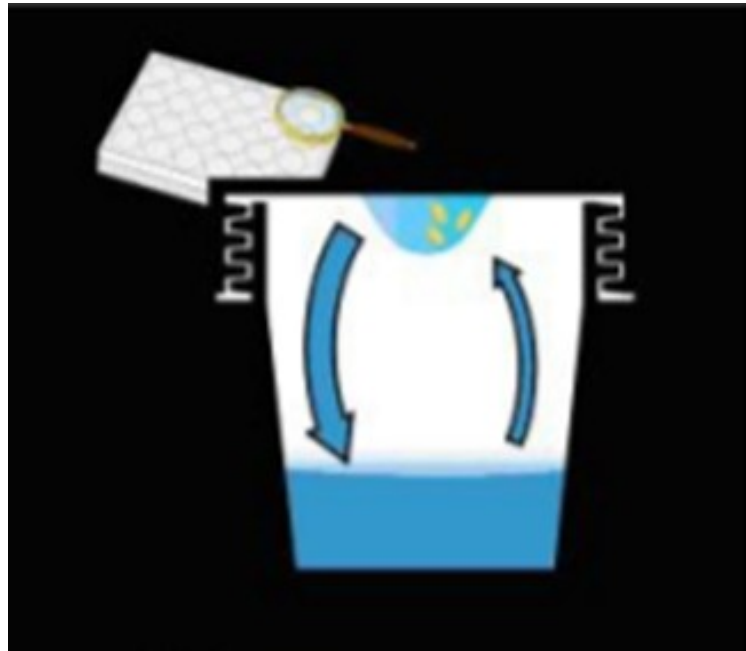


# Príprava Kryštálov

- 2 najpoužívanejšie metódy tvorby kryštálov
  - Metóda visiacej kvapky
  - Metóda sediacej kvapky
- Jeden veľký nepoškodený kryštál
- Bežná veľkosť asi 0.1 mm
- Kryštalizácia môže zabrať pár dní až 2 roky



# Príprava Kryštálov



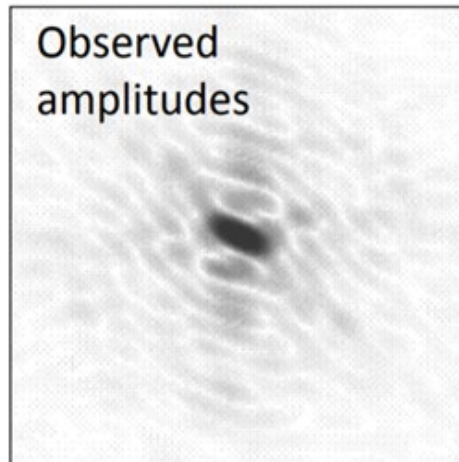
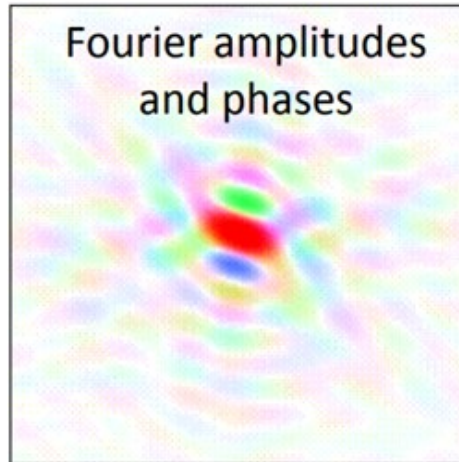
# Príprava Kryštálov

- Veľmi ťažké odhadnúť dobré podmienky nukleácie a rastu kryštálov
- Nie vždy sú podmienky nukleácie a rastu kryštálov rovnaké
- Prednosť sa dáva podmienkam rastu kryštálov
- V praxi sa využíva screening – skúšanie sady vzorkov s rôznymi koncentraciami proteínu a soli (NaCl), rôzna teplota, pH...
- Dnes je tento krok automatizovaný

# Meranie dát

- Kryštál je namontovaný na goniometer a postupne rotovaný za bombardovania RTG žiarením
  - Rotácia musí dosiahnuť  $180^\circ$
  - Pri vysoko symetrických kryštáloch stačí  $90^\circ$  alebo  $45^\circ$
- Vytvorenie difrakčného vzoru
- Intenzita zaznamenaná fotografickým filmom, plošným detektorom alebo obrazový snímač CCD
- Pretvorenie z 2D vzoru do 3D modelu elektrónovej hustoty pomocou Fourierovej transformácie
- Na správne určenie štruktúry elektrónovej hustoty potrebujeme intenzitu difrakčných bodov a ich fázu

# Fázový problém



Circular rainbow scale of  
phases



Linear intensity scale  
of amplitude size

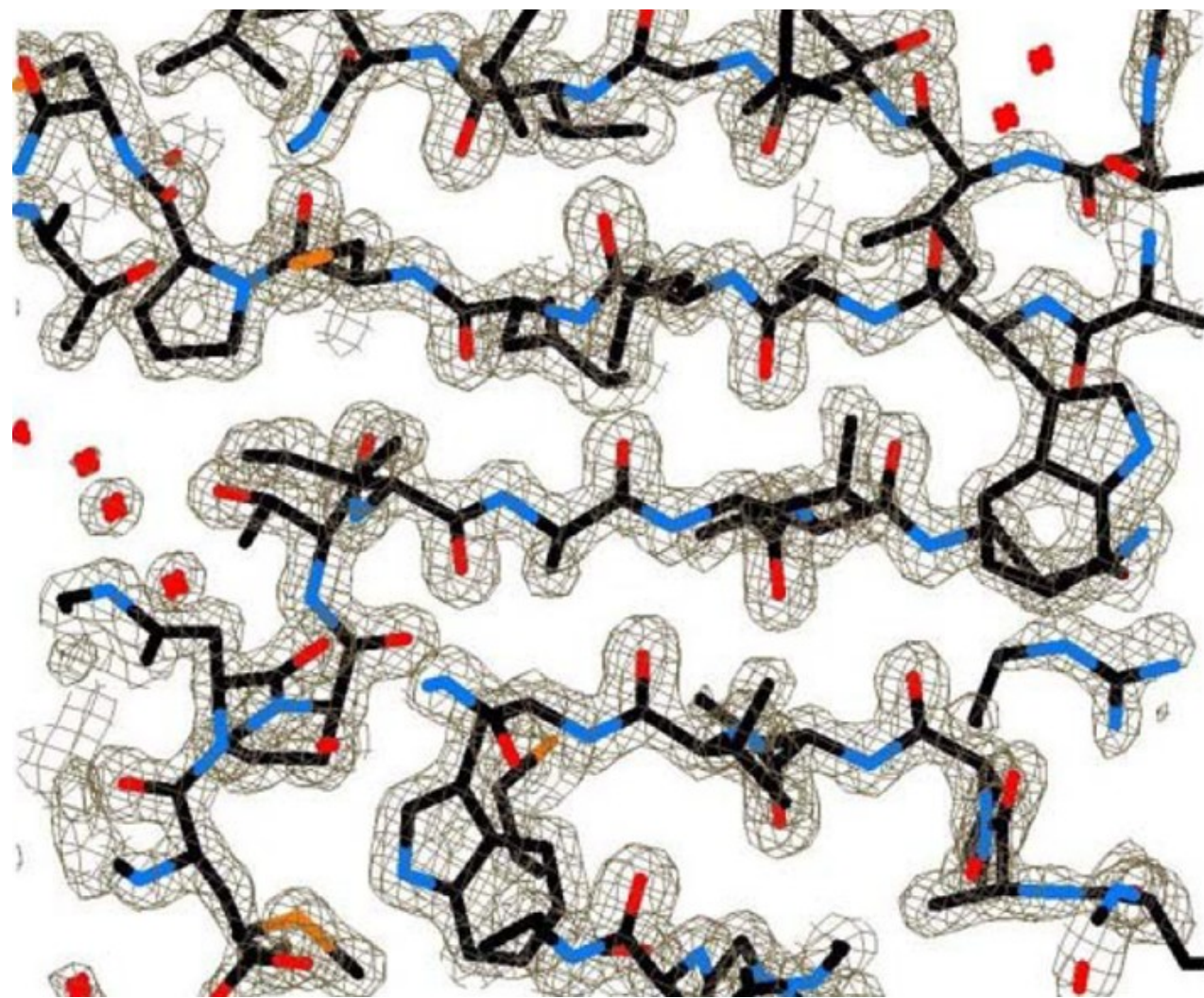


# Molekulárna náhrada (Molecular replacement)

- Nájdeme podobnú štruktúru proteínu, ktorá bola už určená ( z protein data bank (PDB) ) – fourierovou transformáciou dostaneme difrakčný vzor s fázami
- Snažíme sa nasmerovať určený proteín, aby čo najviac sedel nášmu nameranému difrakčnému vzoru
- Matematicky dopočítame fáze nášho proteínu
- Pomocou našich vypočítaných fáz určíme štruktúru elektrónovej hustoty

# Ďalšie riešenia fázového problému

- Zakomponovanie ťažkých kovov do kryštálu (Multiple isomorphous replacement)
- Ab initio phasing/priame metódy – používané na malých proteinoch
- Anomálny RTG rozptyl ( anomalous x-ray scattering)



# Záver

## **Výhody**

- Pomerne lacná metóda
- Použiteľná pre veľké štruktúry
- Dostaneme 3D štruktúru
- Nelimitovaná atomárnou hmotnosťou

## **Nevýhody**

- Tvorba kryštálov
- Fázový problém
- Vzorok musí byť kryštalizovateľný