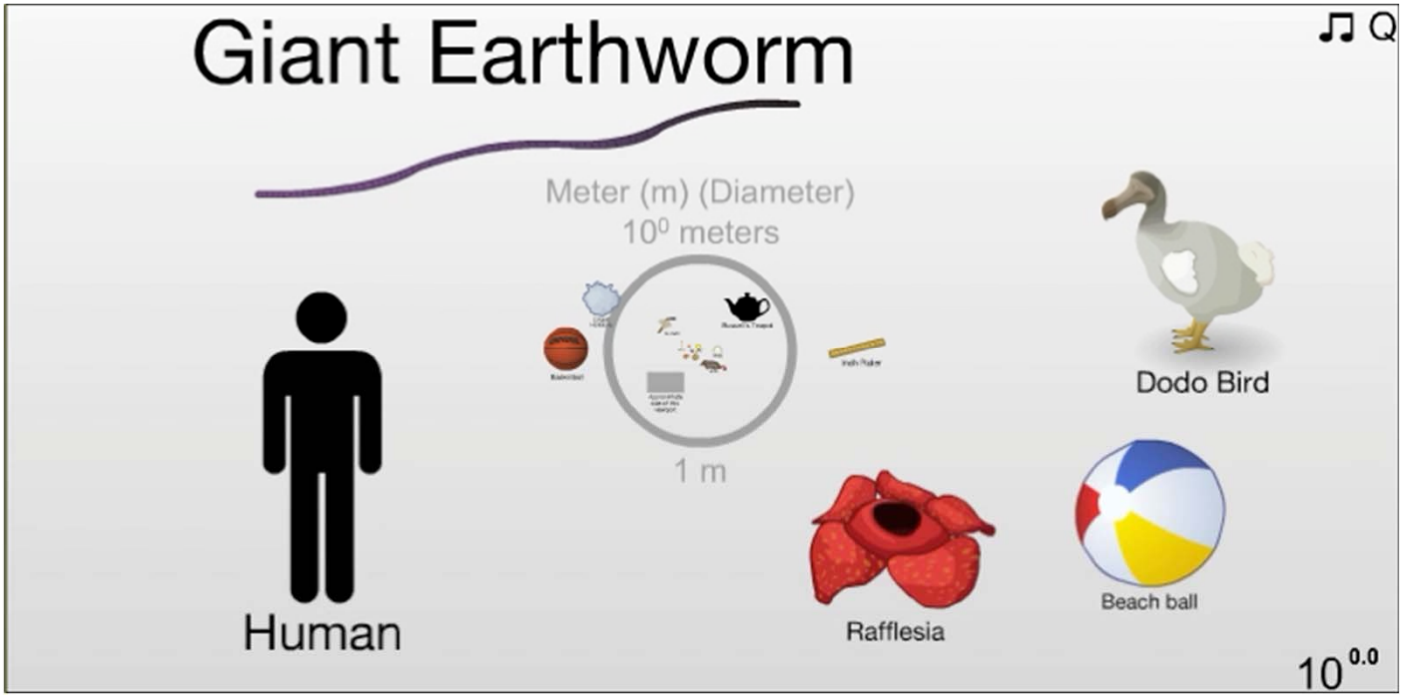
Biomolekuláris szerkezet és dinamika

tömegspektrometria, infravörös spektroszkópia, röntgendiffrakció,
számítógépes szimuláció

Balog Erika

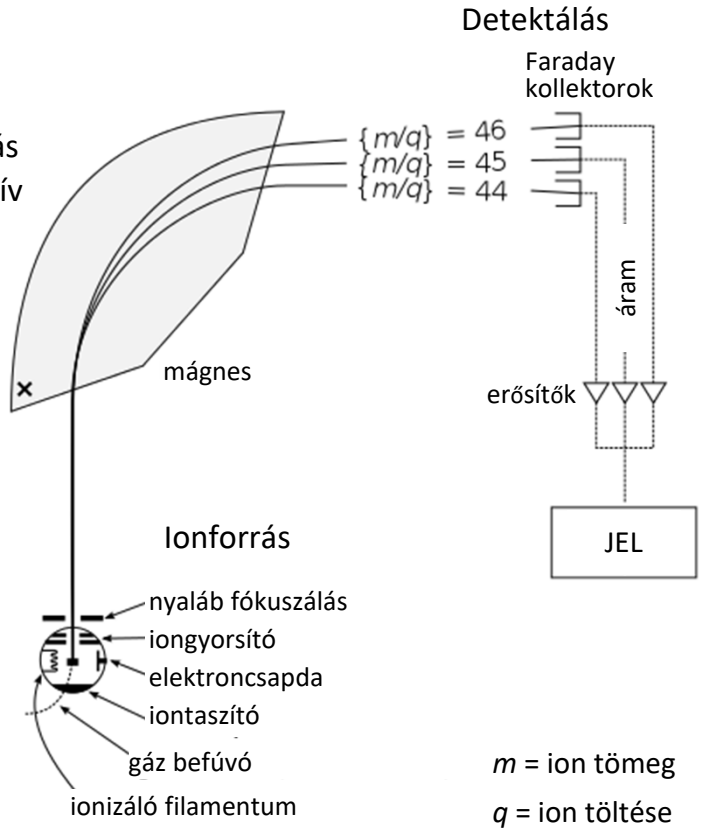

Giant Earthworm
Meter (m) (Diameter)
10^0 meters
1 m
Human
Rafflesia
Beach ball
Dodo Bird
$10^{0.0}$

Tömegspektrometria

- a minta atomjai és molekulái tömegeinek eloszlását mérő analitikai módszer. A megmért spektrum a minta elemi (izotóp) ujjlenyomata.

Lépések:

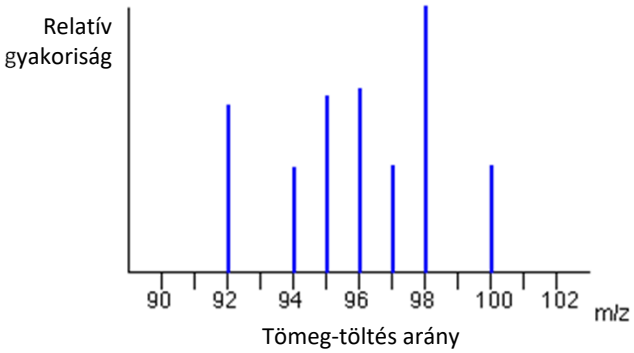
1. Ionizáció
2. Tömeg azonosítás
3. Detektálás (relatív mennyiség meghatározás)



m = ion tömeg

q = ion töltése

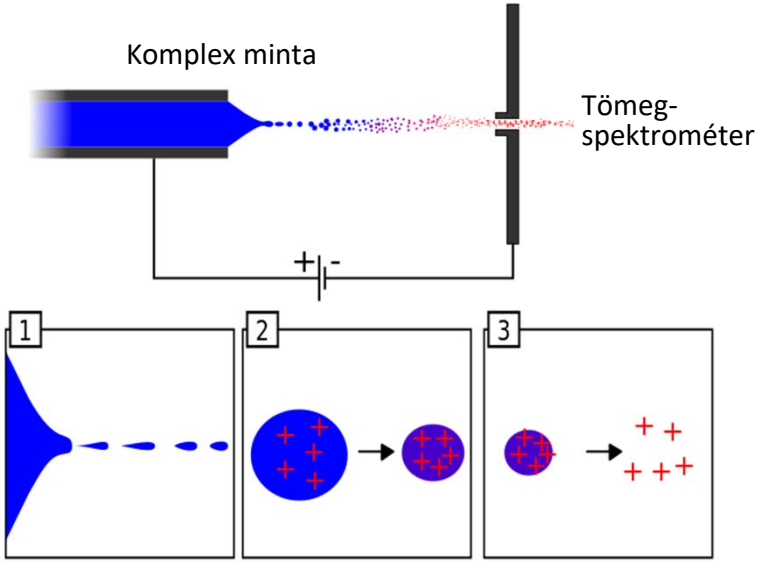
Eredmény: “Vonal” diagram



A spektrumot szerkezeti adatbázissal vetjük össze.

Biológiai mintáknál alkalmazott ionizációs módszerek

Elektrospray ionizáció

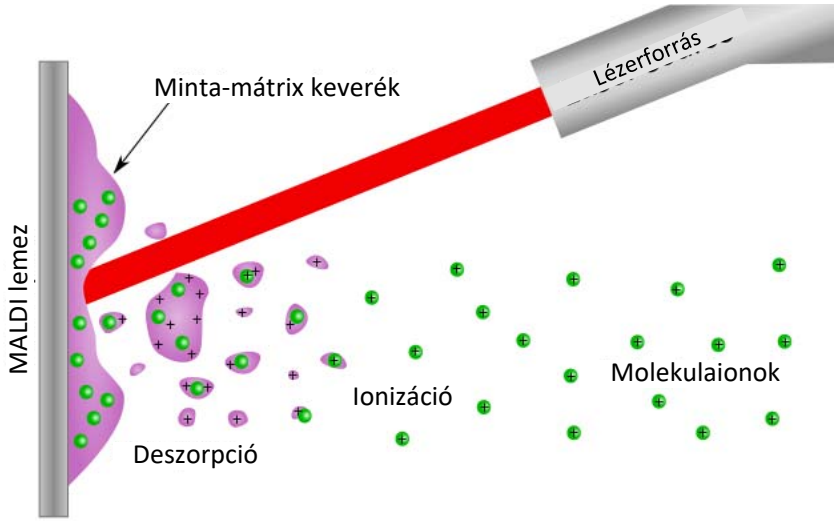


(1) cseppekre bontás,

(2) oldószer párolgás → kisebb csepp → nagyobb felületi töltés,

(3) Coulomb taszítás → felrobbannak a cseppek → ionizált gyorsított molekulák.

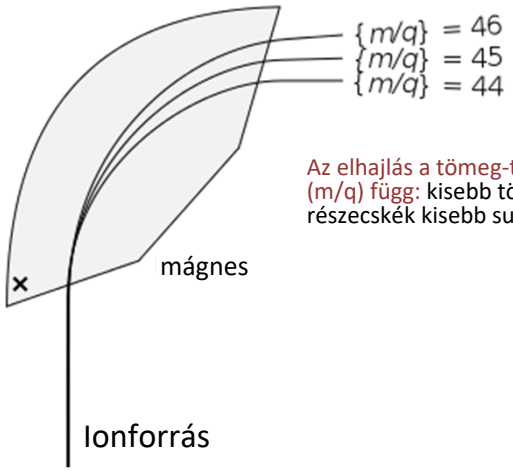
MALDI: “matrix-assisted laser desorption/ionization”



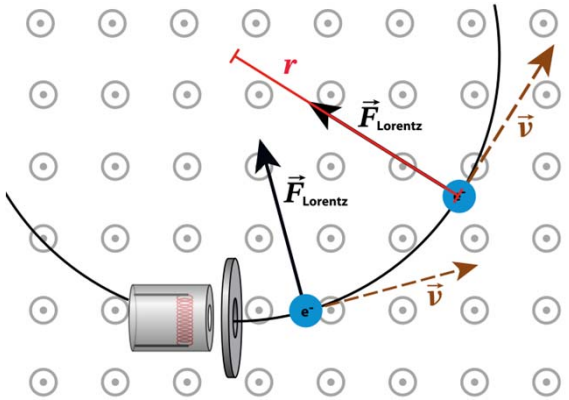
- a lézersugárzást a mátrix atomjai (molekulái) abszorbeálják.
- nagy molekulák vizsgálatához ideális.

Tömeganalízis módszerei 1

Mágneses módszer



Az elhajlás a tömeg-töltés aránytól (m/q) függ: kisebb tömegű részecskék kisebb sugarú pályán.



$$\vec{F}_{Lorentz} = q\left(\vec{E} + \vec{v} \times \vec{B}\right)$$

E=elektromos térerősség, *vxB*=sebesség és mágneses indukció vektoriális szorzata

$$\vec{F}_{Lorentz} = \vec{F}_{centrip}$$

$$qvB = \frac{mv^2}{r}$$

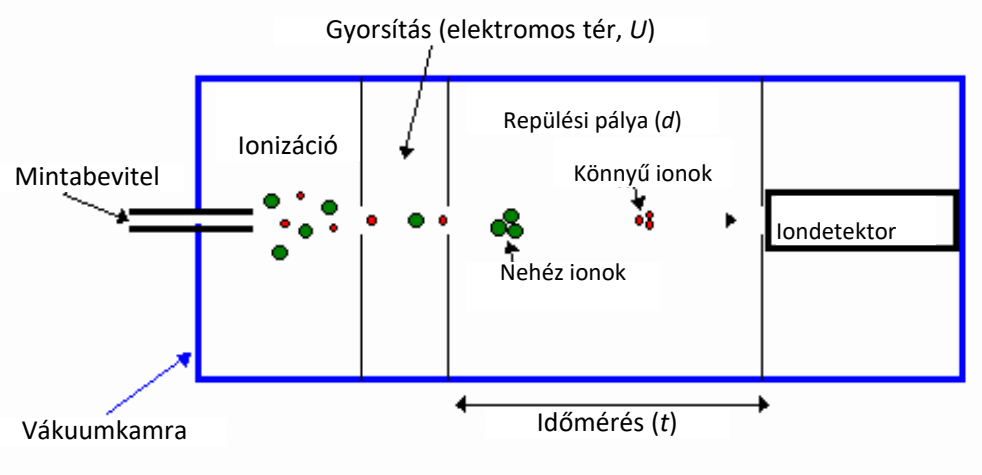
$$r = \frac{m}{q}\,\frac{v}{B}$$

melyből a részecskére jellemző *m/q* meghatározható

m/q helyett általában az *m/z*-t használnák, ahol *z=q/e* (dimenzió nélküli szám).

Tömeganalízis módszerei 2.

“Time-of-flight” (repülési idő)



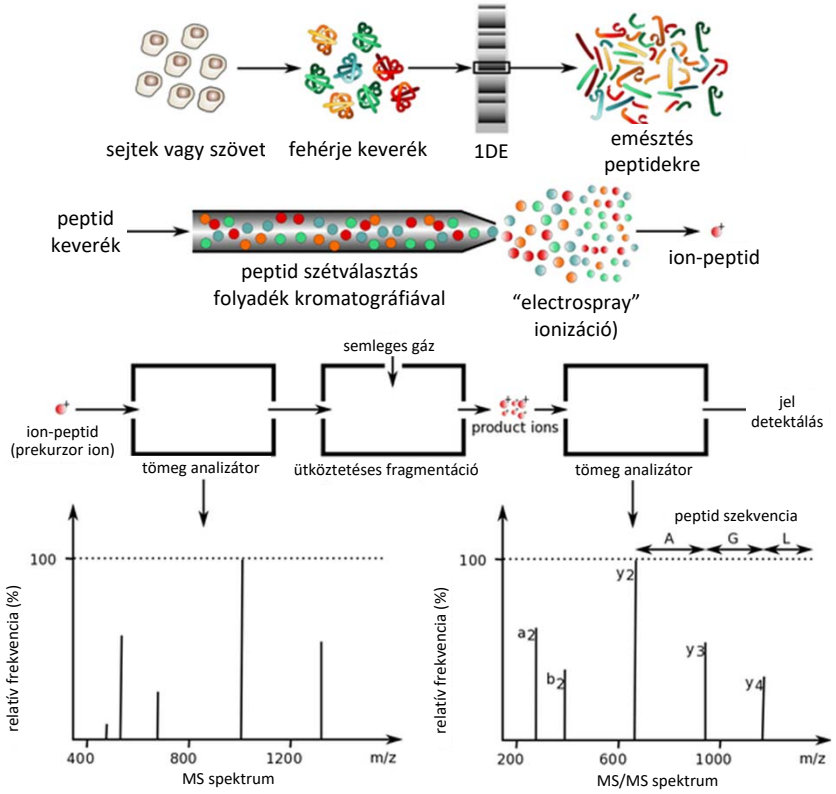
$$qU = \frac{1}{2}mv^2 = \frac{1}{2}m\left(\frac{d}{t}\right)^2$$

$$t = \frac{d}{\sqrt{2U}}\sqrt{\frac{m}{q}} = k\sqrt{\frac{m}{q}}$$

melyből a részecskére jellemző *m/q* meghatározható

Tömegspektrometriás alkalmazások

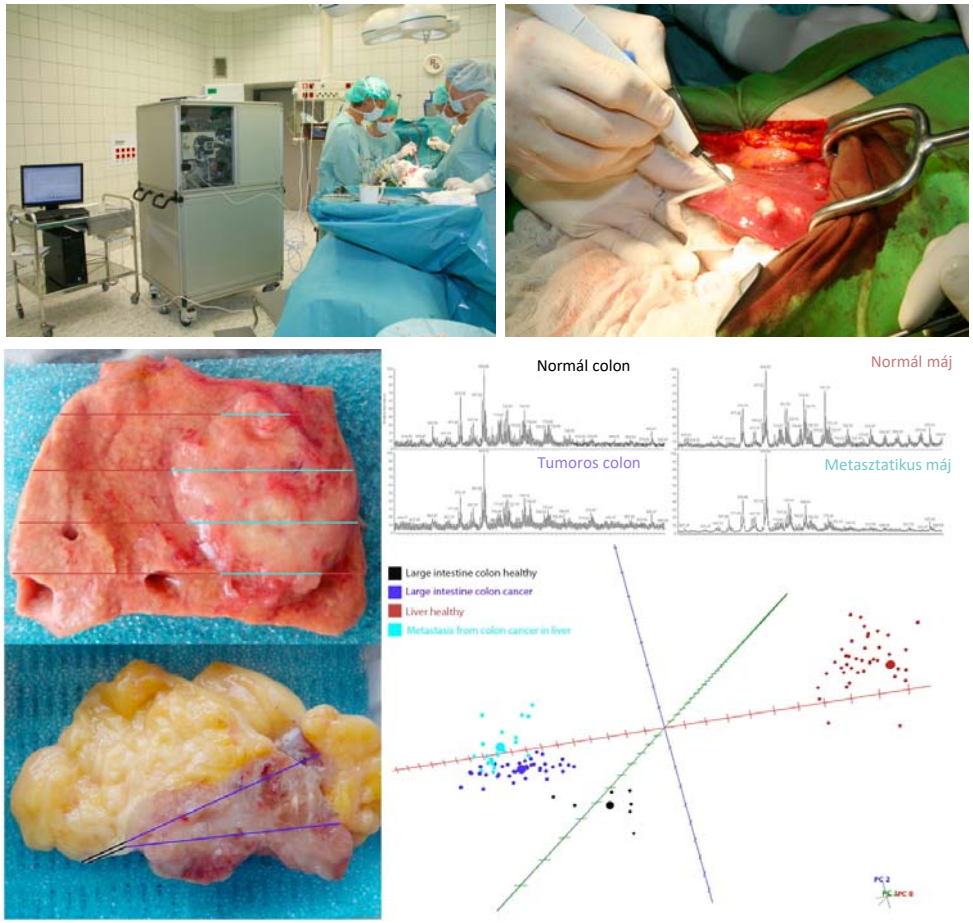
1. Fehérje analitika (proteomika)



2. Diagnosztikai szűrővizsgálatok:

Anyagcserebetegségek (1 csepp vérből)
pl. phenylketonuria (PKU)

3. Valós idejű szövetanalízis ("onkokés")

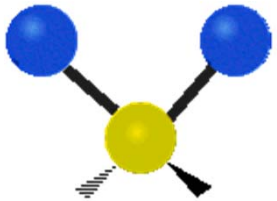


Infravörös (IR) spektroszkópia

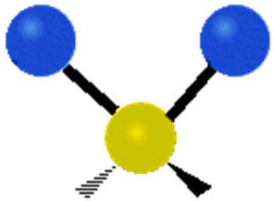
- molekulák rezgőmozgásait méri.

Rezgés (vibráció): periodikus mozgás a kovalens kötés mentén
Forgás (rotáció): periodikus mozgás a kovalens kötésre illesztett tengely körül

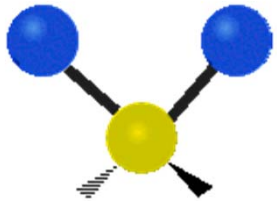
Rezgőmozgás a háromatomos metilén csoportban (-CH_2-):



Aszimmetrikus nyúlás



Szimmetrikus nyúlás

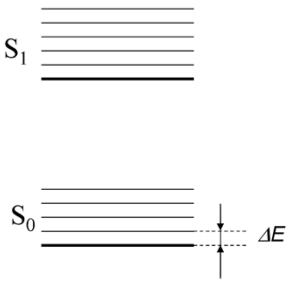


Torziós rezgés (ollózás)

Molekula energiája: Born-Oppenheimer - közelítés:

$$E_{total} = E_e + E_v + E_r$$

- Energia állapotok egymástól függetlenek (csatolás elhanyagolható).
- Állapotok energianívói kvantáltak.
- Átmenetek "energiacsomag" (kvantum) elnyelésével/kibocsátásával járnak.
- Energiaszintek közötti különbségek nagyságrendje különbözik.



Energiák skálázódása: E_e (~100x) E_v (~100x) E_r

~$3x10^{-19}$ J (~2 eV) > ~$3x10^{-21}$ J > ~$3x10^{-23}$ J

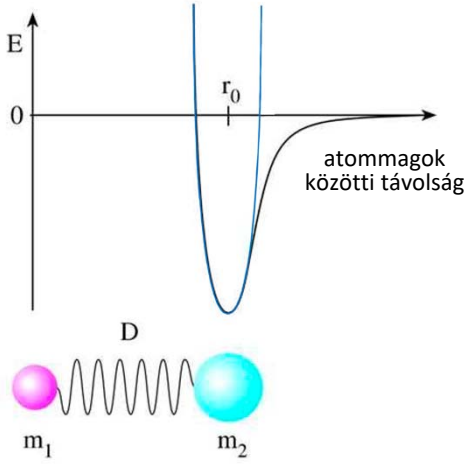
UV/látható > közép IR > távoli IR

Molekuláris rezgések

(lásd: Rezonancia gyakorlat)

Molekula: rugóval összekötött tömeg

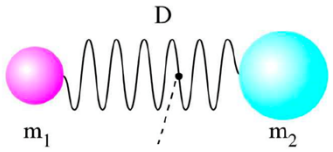
- kétatomos molekula (pl. CO)
- tömegek (m_1, m_2): atommagok ($m_e << m_{mag}$)
- rugó: kovalens kötés
- r_0: egyensúlyi atommagok közötti távolság
- D: rugóállandó
- kölcsönhatási energia távolságfüggése: parabola $E=Dx^2/2$

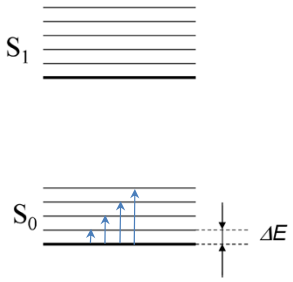


$$f = \frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{D}{m_{red}}} = \frac{\Delta E}{h}$$

ahol: $$m_{red} = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

$$\lambda = \frac{c}{f} = 2\pi\sqrt{\frac{m_{red}}{D}}$$





Az IR spektroszkópiában a hullámszámot (ν) használjuk: $$\nu = \frac{1}{\lambda} = \frac{1}{2\pi c}\sqrt{\frac{D}{m_{red}}}$$

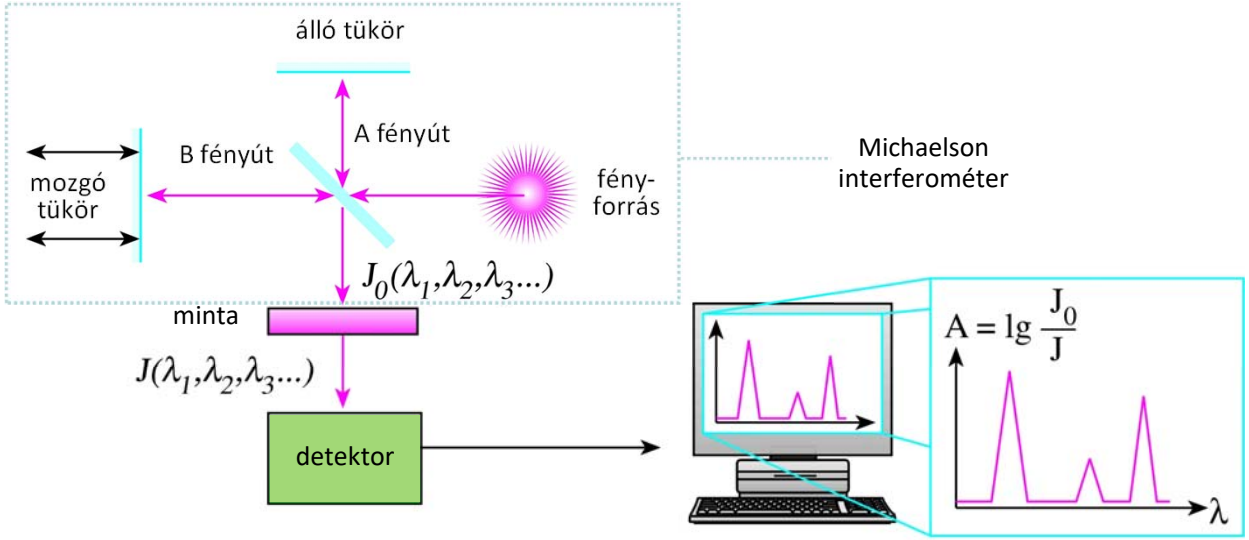
Értékek a CO molekulára: mért hullámszám, ν =2143 cm^{-1}

λ =4,67 µm, f=6,43x10^{13}Hz (64,3 THz), D=1875 N/m

Infravörös (IR) spektroszkópia - mérés

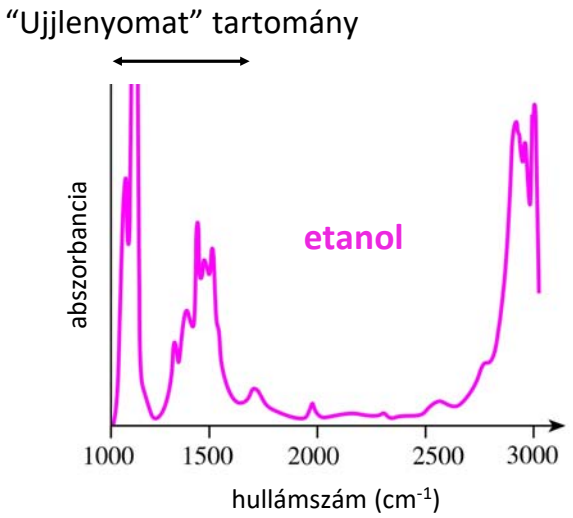
Fourier Transform Infravörös (FTIR) Spektroszkópia:

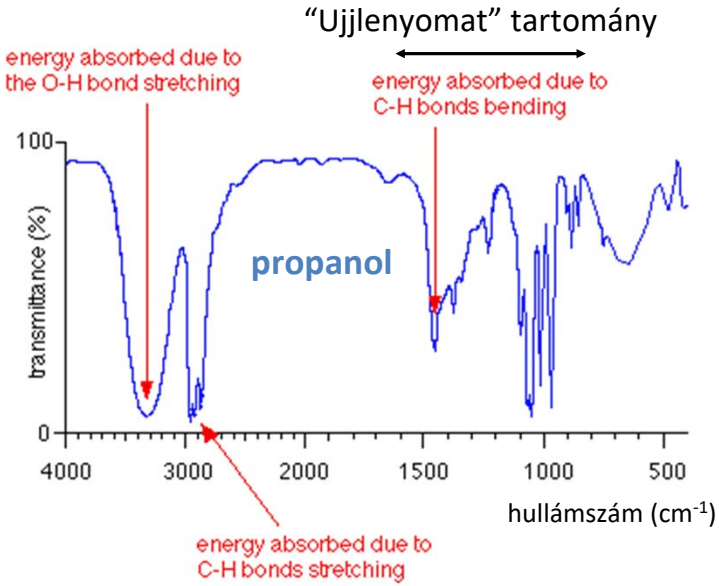
- hullámhossz kombinációt generálunk (Michaelson interferométerrel)
- A hullámhossz-kombinációnál mért intenzitásokat átszámoljuk a hullámhossz függvényében megadott intenzitásokká.



IR spektrum:

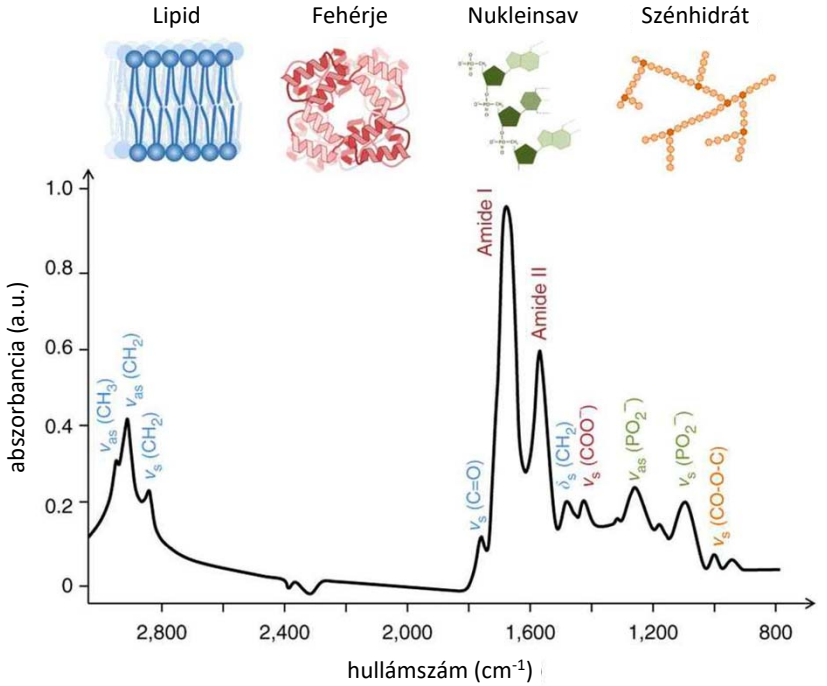
- gazdag információ a molekuláris szerkezetről és a vibrációs tulajdonságról
- abszorbancia *versus* hullámszám
- transzmittancia *versus* hullámszám

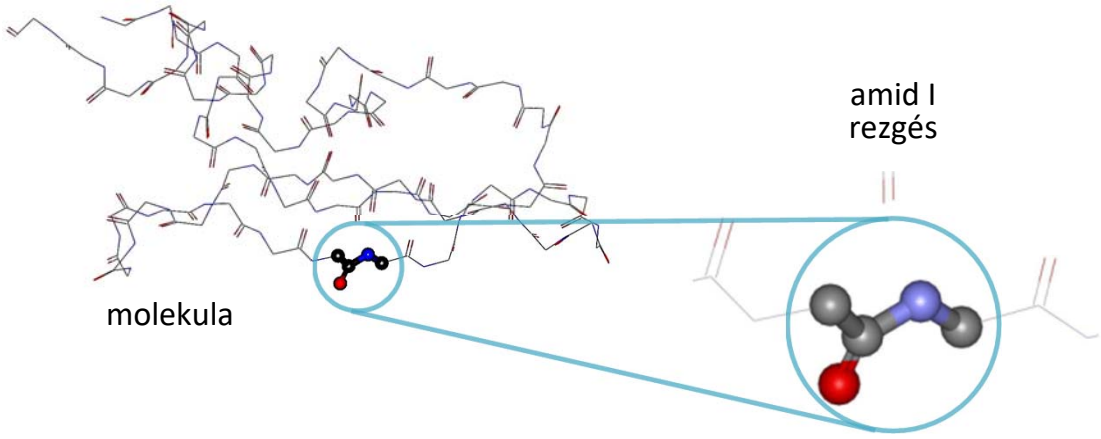




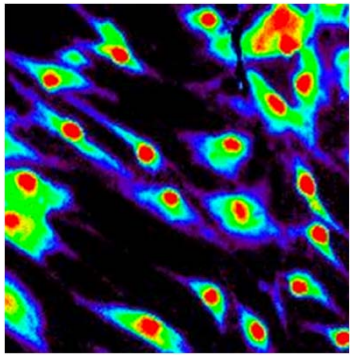
IR spektroszkópiás alkalmazások

- kémiai azonosítás (pl. intermedier és végtermékek)
- Molekulaszerkezet azonosítása és igazolása
- Metabolitok keresése
- A fehérjékben mind a gerinc (amid rezgések), mind az oldallánc (ligandum kötődés) viselkedése követhető (pl., denaturáció, folding, aggregáció)
- Nukleinsavakban a bázisok, a cukor és a foszfát komponensek egymástól függetlenül vizsgálhatók.
- Lipidekben a fázisátmenetek (pl., rendezett-rendezetlen) vizsgálhatók.
- N.B.: vizes mintában, a víz elnyelése miatt, nehéz vizet (D_2O) használhatnak.





FTIR mikroszkópia

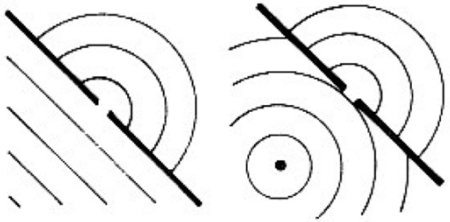


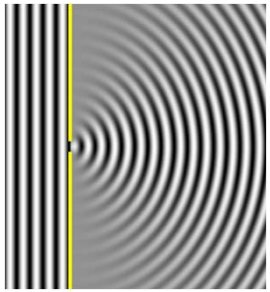
Bőr fibroblasztok, képalkotás 1224 cm^{-1} hullámszámnál

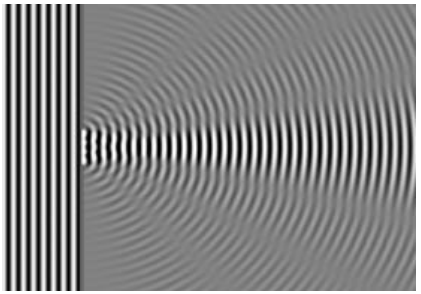
Röntgen diffrakció, krisztallográfia

Alapja: hullámelhajlás és interferencia

Hullámhosszal azonos nagyságrendű, vagy a hullámhossznál kisebb méretű rés.

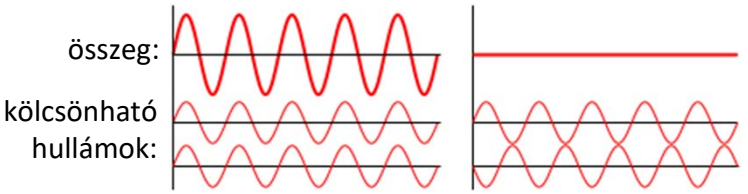


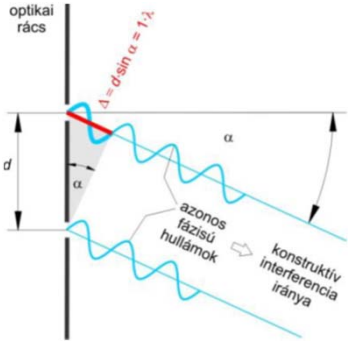




Hullámok fázisban (φ=0): erősítés

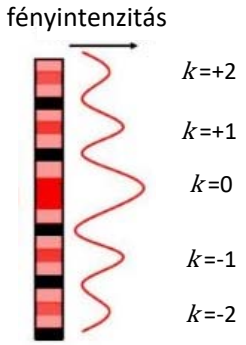
Ha $\varphi=\pi$: kioltás



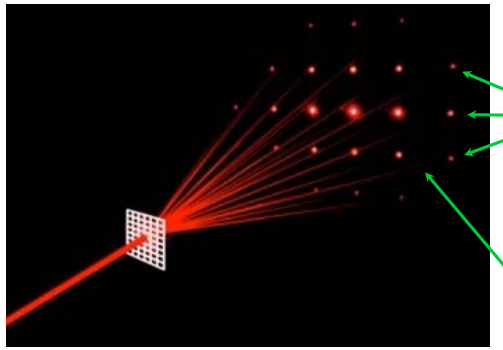


Rácsállandó (d) és hullámhossz (λ) összemérhetők

1D rács interferencia képe



2D rács interferencia képe

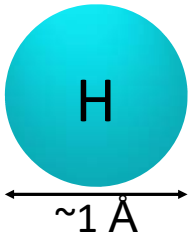


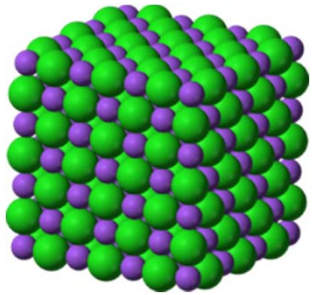
Interferencia maximum feltétele:

$$d\ sin\alpha = k\ \lambda$$ (lásd: Mikroszkópia II gyakorlat)

$$d = k\ \frac{\lambda}{sin\alpha}\ \ k = 0, \pm 1,\ \pm 2 \ldots$$

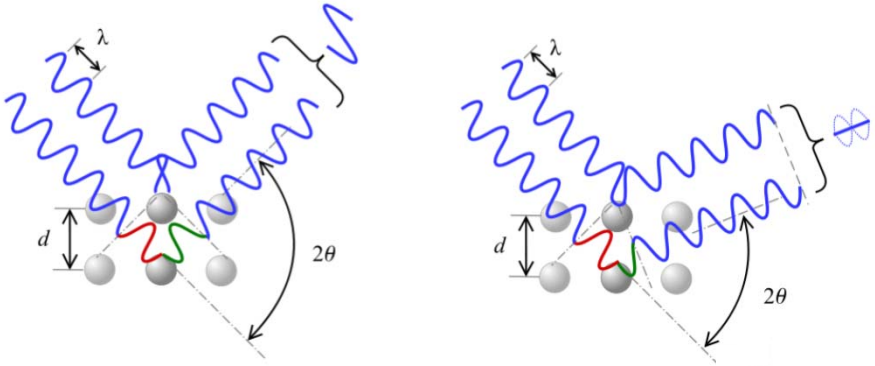
Molekula térszerkezete

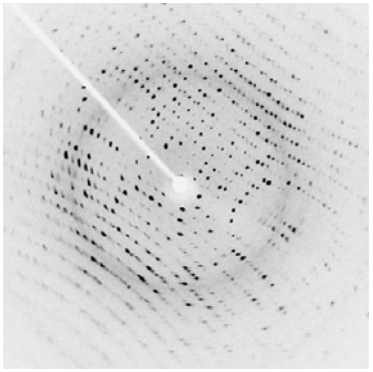


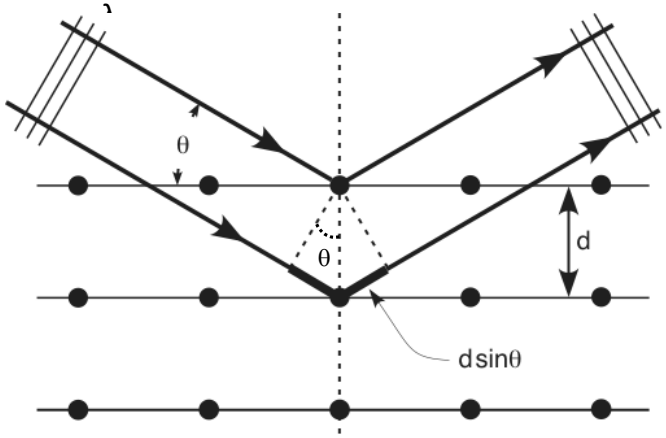


d_{NaCl}: 5.64 Å

Milyen sugárzáshoz kellene használni egy molekularácshoz?
λ_{Rtg}: 0.01-10 nm = 0.1-100 Å



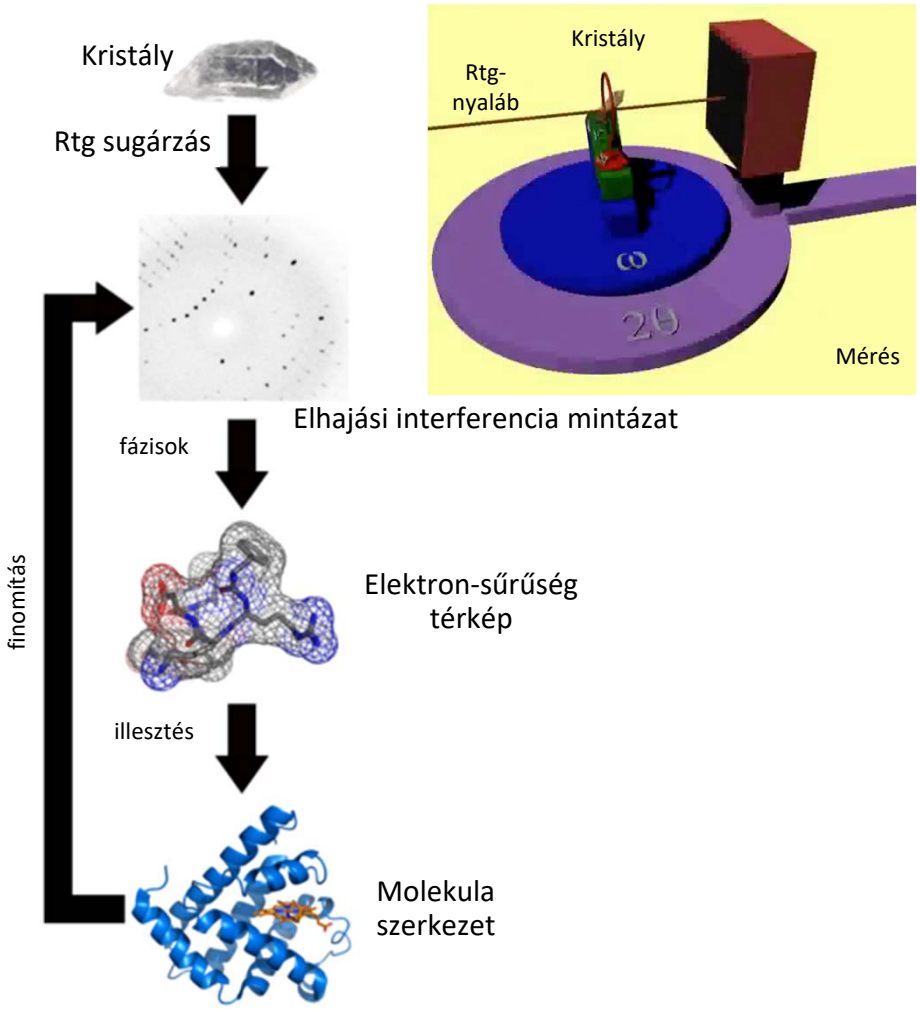




Interferencia maximum feltétele:

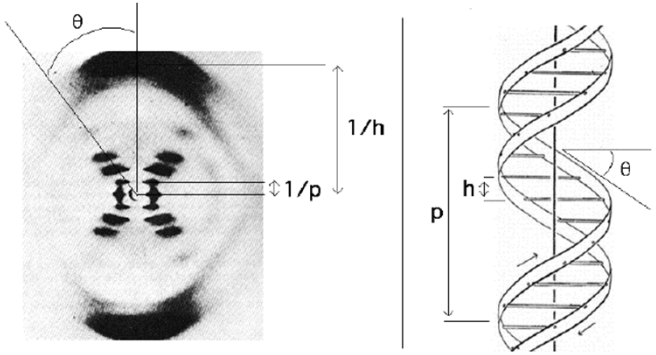
$2d\ sin\theta = k\ \lambda$ ⟶ $d = \ldots$ bonyolultabb…

rtg-diffrakcióval kapott interferencia képből:
atomok térbeli koordinátái ⟶ molekula térszerkezete


Kristály
Rtg sugárzás
Kristály
Rtg-
nyaláb
ω
2θ
Mérés
Elhajási interferencia mintázat
fázisok
Elektron-sűrűség
térkép
illesztés
finomítás
Molekula
szerkezet

Molekulaszerkezet meghatározása röntgen-krisztallográfiával

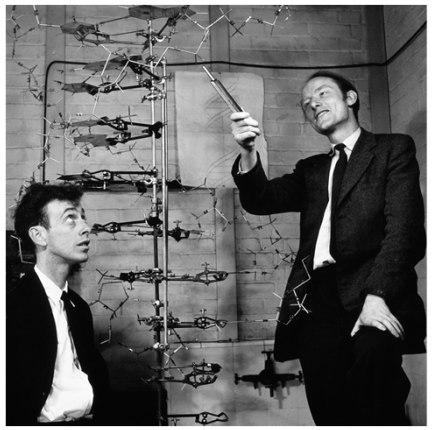
dsDNS



θ hélix dőlésszöge

h = 3.4 Å bázisok közötti távolság

p = 34 Å hélix menetemelkedése



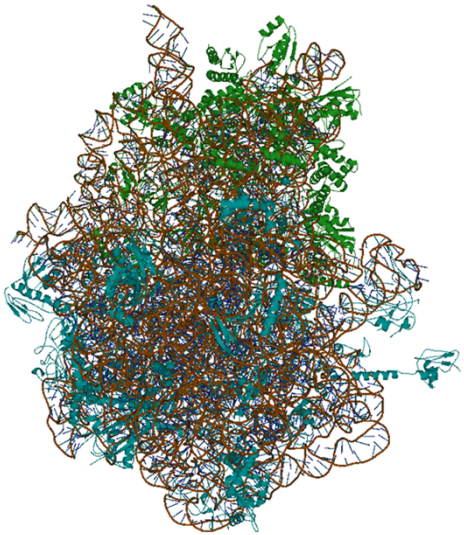
J.D. Watson és F. Crick
Nobel-díj 1953

Globuláris fehérje: mioglobin

~1200 atom

M. F. Perutz, J. C. Kendrew
Nobel díj 1962

Molekulakomplex: riboszóma



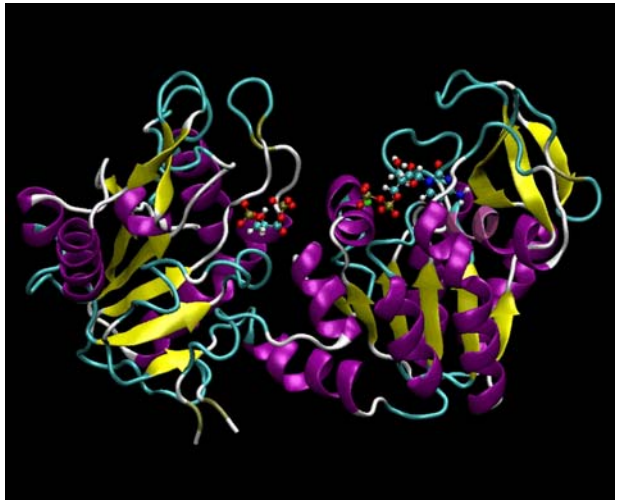
30S alegység: ~35000 atom,
50S alegység:~64000 atom

V. Ramakrishnan, T. A. Steitz, A. E. Yonath
Nobel díj 2009

Szerkezet - Funkció

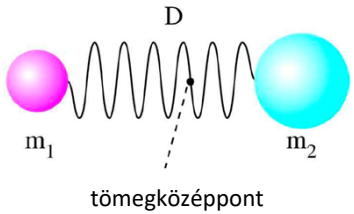
Röntgen krisztallográfia:

molekula 3D *szerkezete* – statikus kép



FTIR:

kötések *rezgés*ei



Melyek a molekula funkcionális mozgásai?

atomi koordináták

rugóállandók

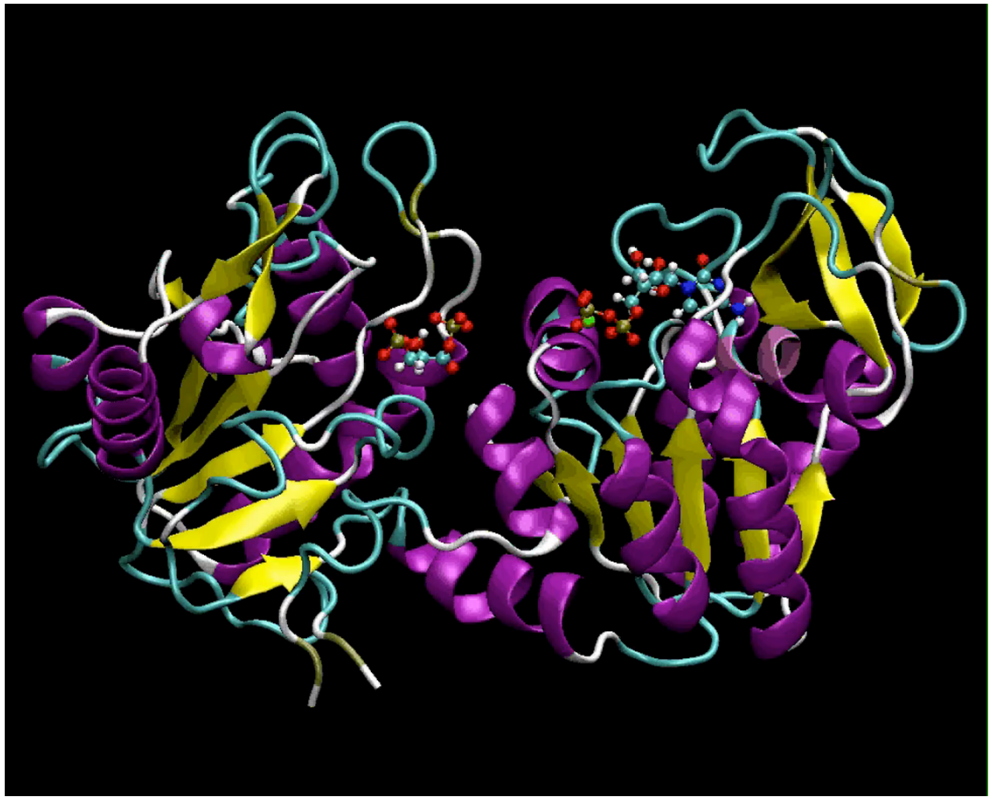
MolekulaDinamikai (MD) szimulácó

fehérjék belső mozgásait számolja

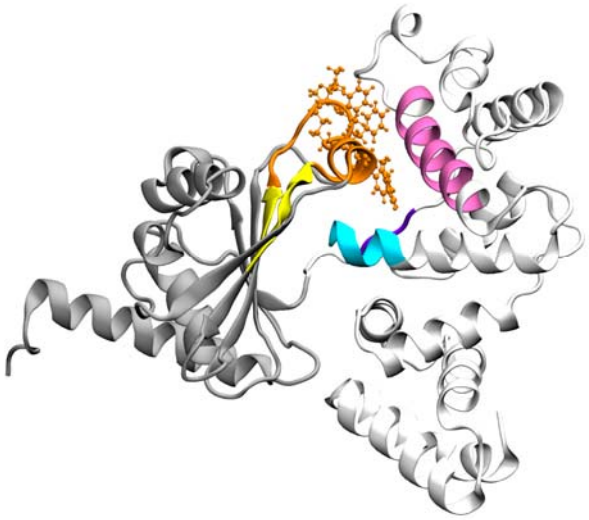
Molekuláris dinamikai szimuláció

Cél:

- kísérleti adatokból kiindulva a makromolekulák belső mozgását feltérképezni, működését megérteni,
- atomi szintű értelmezést adni a kísérleti eredményeknek.



foszfoglicerát kináz (PGK)



RalF:

- légionárius betegséget (súlyos tüdőgyulladás) okozó vírus effektora.

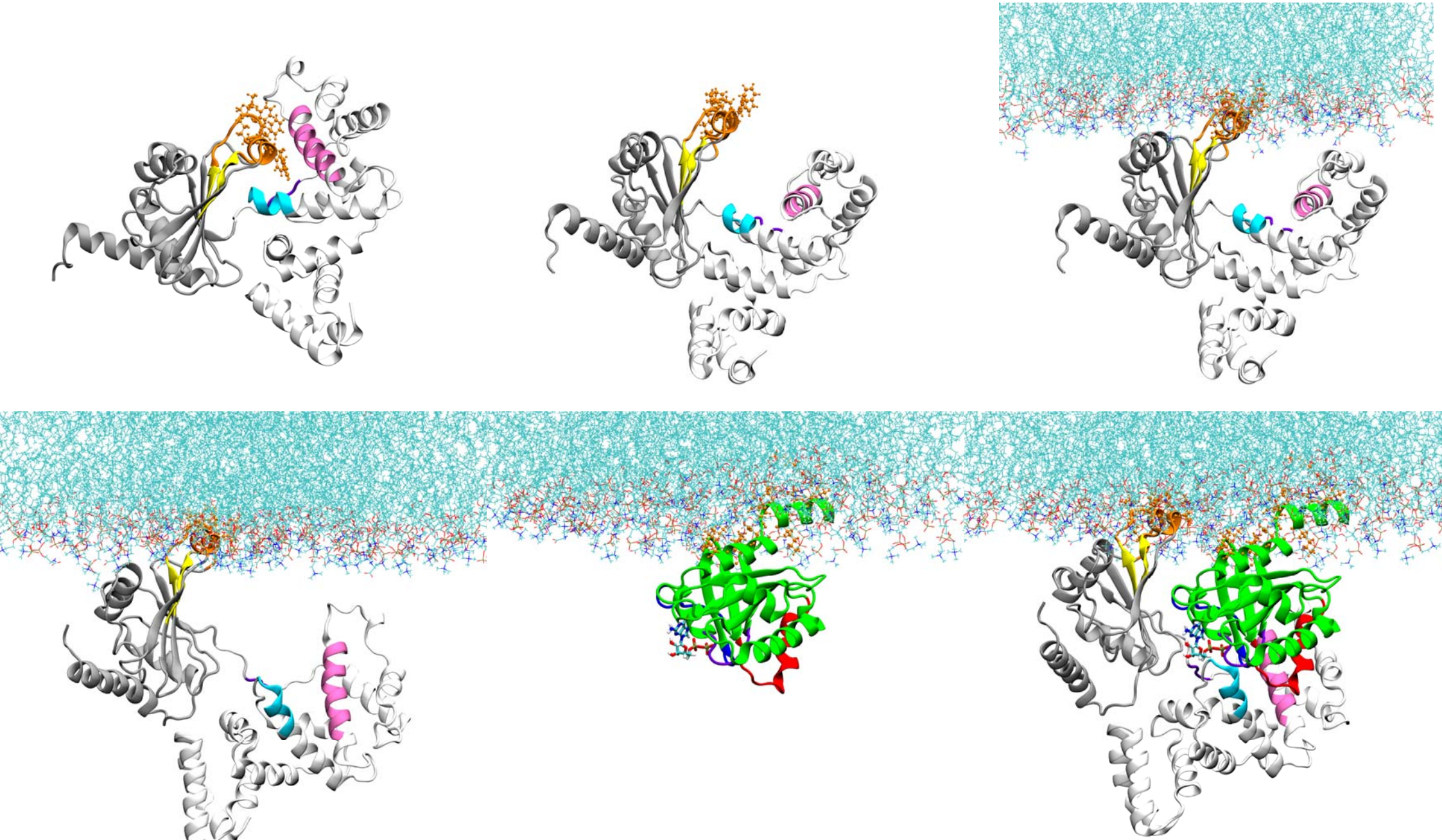
Kísérlet:

- kristályszerkezet inaktív állapotban,
- membránhoz kötődve aktiválódik (narancssárgával jelölt aminosavak).

De: membrán felületéhez kötődő fehérjét nem lehet kristályosítani.
Aktív állapotban konformációját röntgen diffrakcióval nem lehet meghatározni.

Hogyan működik?

Számítógépes szimuláció



kísérlet – szimuláció komplementaritás