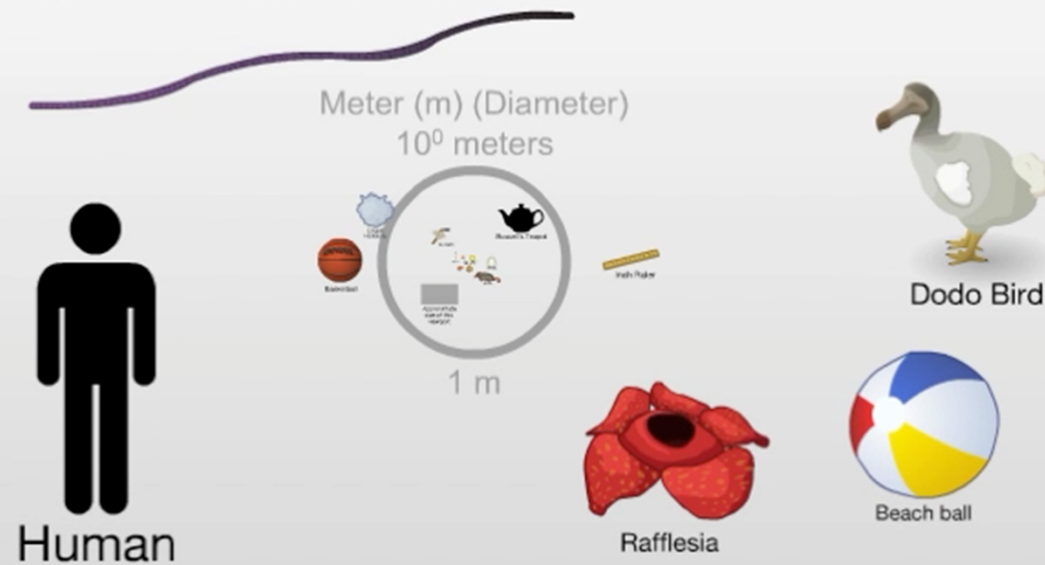


# Biomolekulák szerkezete és dinamikája

tömegspektrometria, infravörös spektroszkópia, röntgendiffrakció,  
számítógépes szimuláció

Balog Erika

# Giant Earthworm

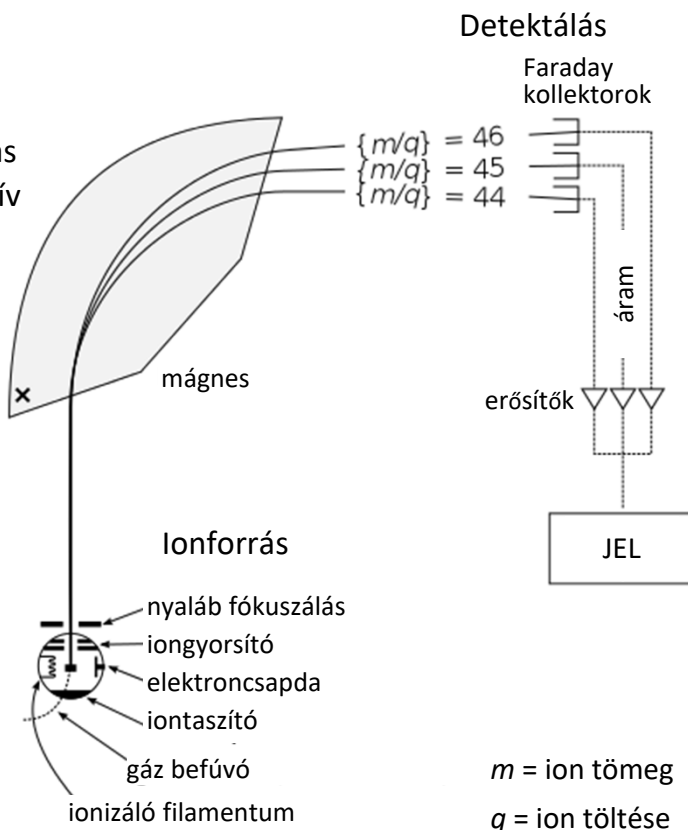


# Tömegspektrometria

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

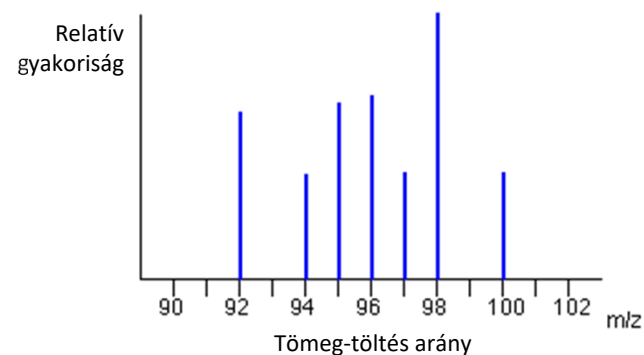
Lépések:

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



$m$  = ion tömeg  
 $q$  = ion töltése

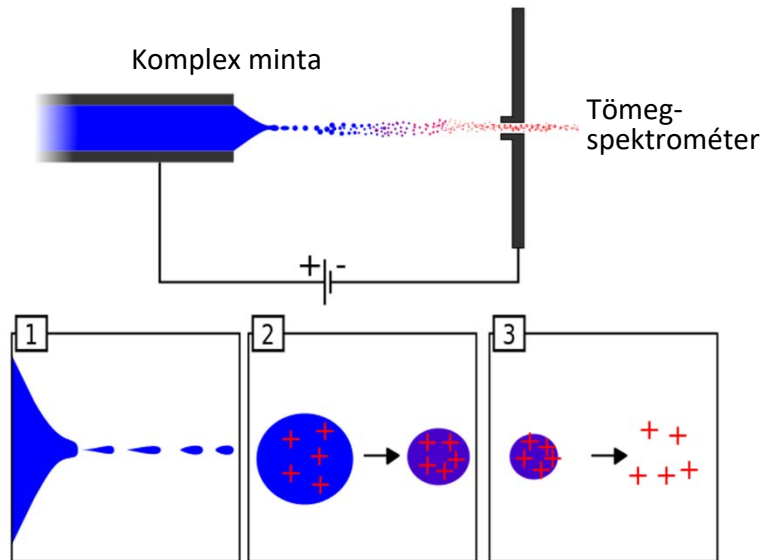
Eredmény: "Vonal" diagram



A spektrumot szerkezeti adatbázissal vetjük össze.

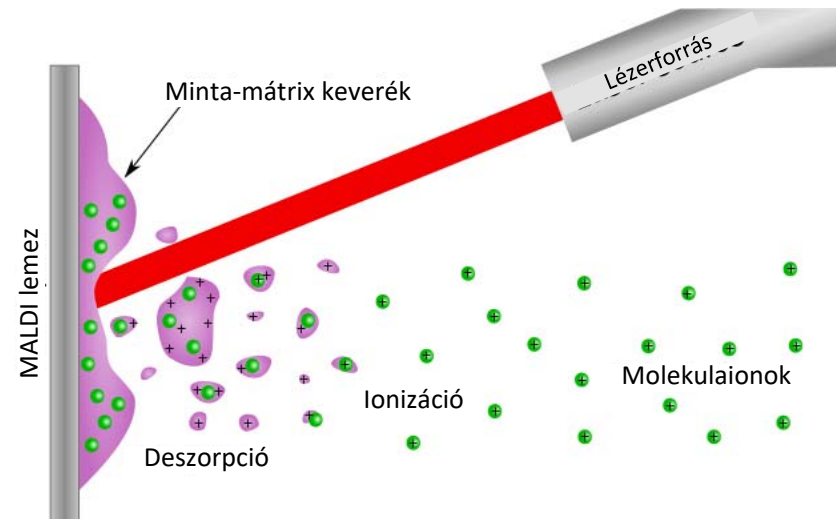
# Biológiai mintáknál alkalmazott ionizációs módszerek

## Elektrospray ionizáció



- (1) cseppekre bontás,
- (2) oldószer párolgás → kisebb csepp → nagyobb felületi töltés,
- (3) Coulomb taszítás → felrobbannak a cseppek → ionizált gyorsított molekulák.

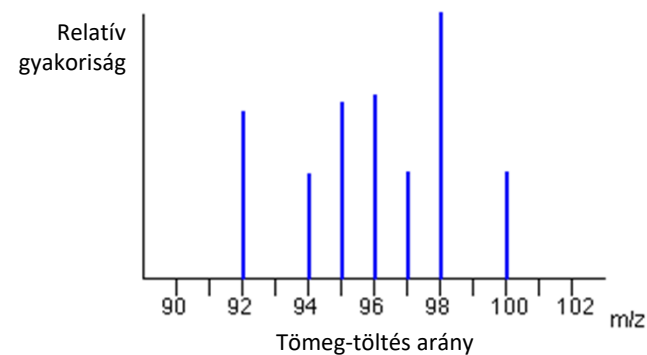
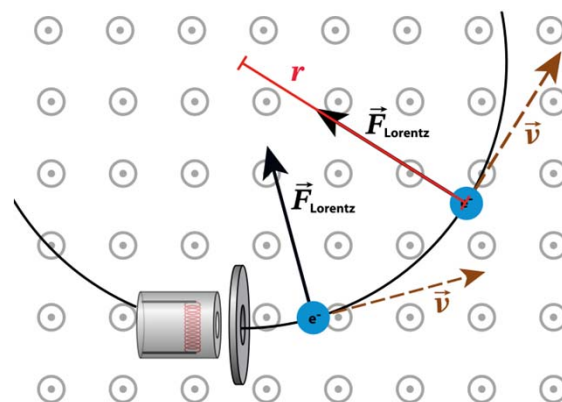
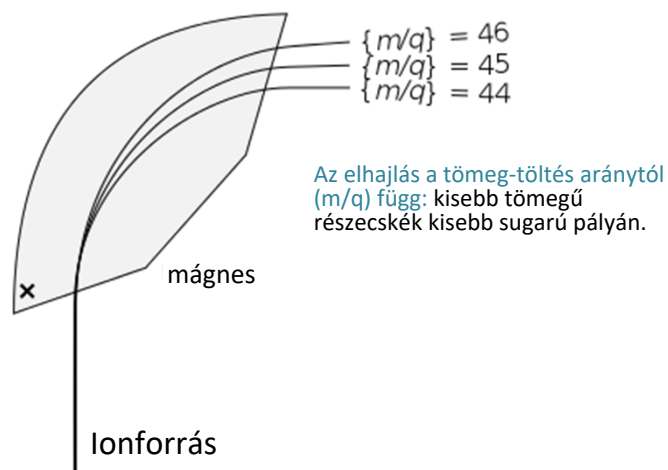
## MALDI: “matrix-assisted laser desorption/ionization”



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

# Tömeganalízis módszerei 1.

## Mágneses módszer



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

$E$ =elektromos térerősség,  $v \times B$ =sebesség és mágneses indukció vektoriális szorzata

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

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

mágneses térben:

$$\vec{F}_{Lorentz} = q(\vec{v} \times \vec{B})$$

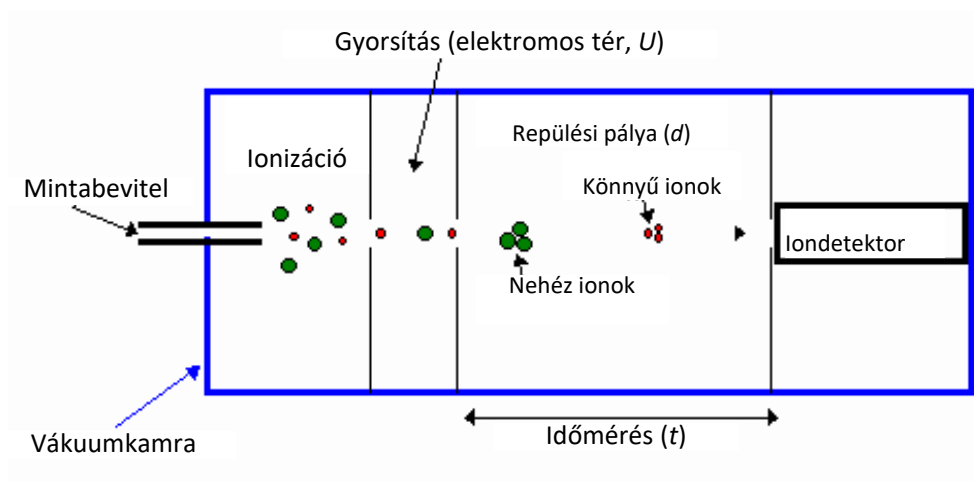
$$r = \frac{m}{q} \frac{v}{B}$$

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)



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

elektromos térben:

$$\vec{F}_{Lorentz} = q\vec{E}$$

$$qU = \frac{1}{2}mv^2$$

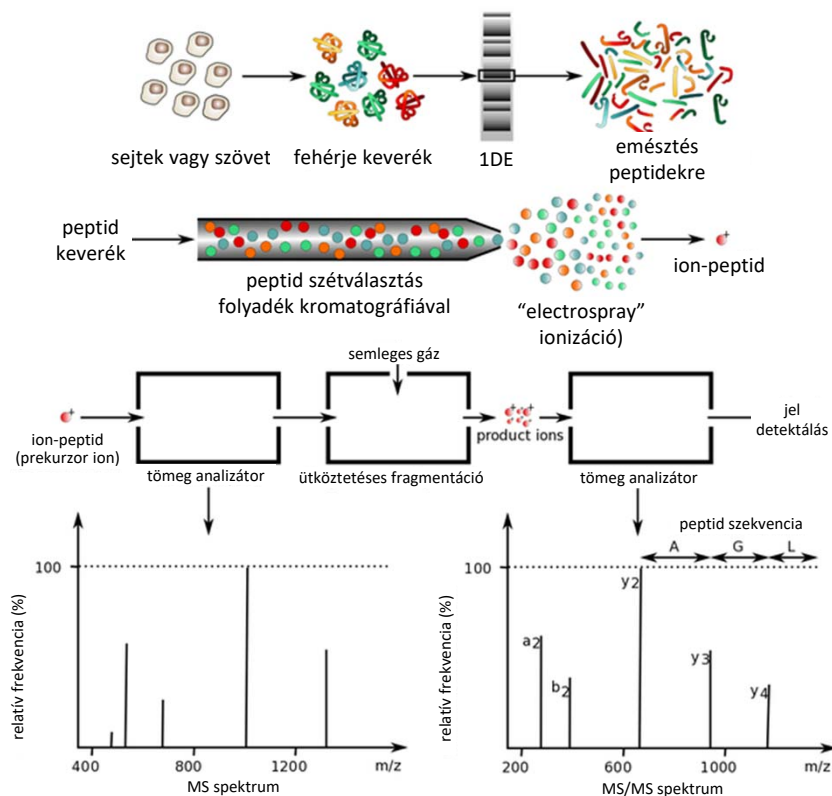
$$qU = \frac{1}{2}mv^2 = \frac{1}{2}m\left(\frac{d}{t}\right)^2$$

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

melyből a részecskére jellemző  $m/q$  meghatározható

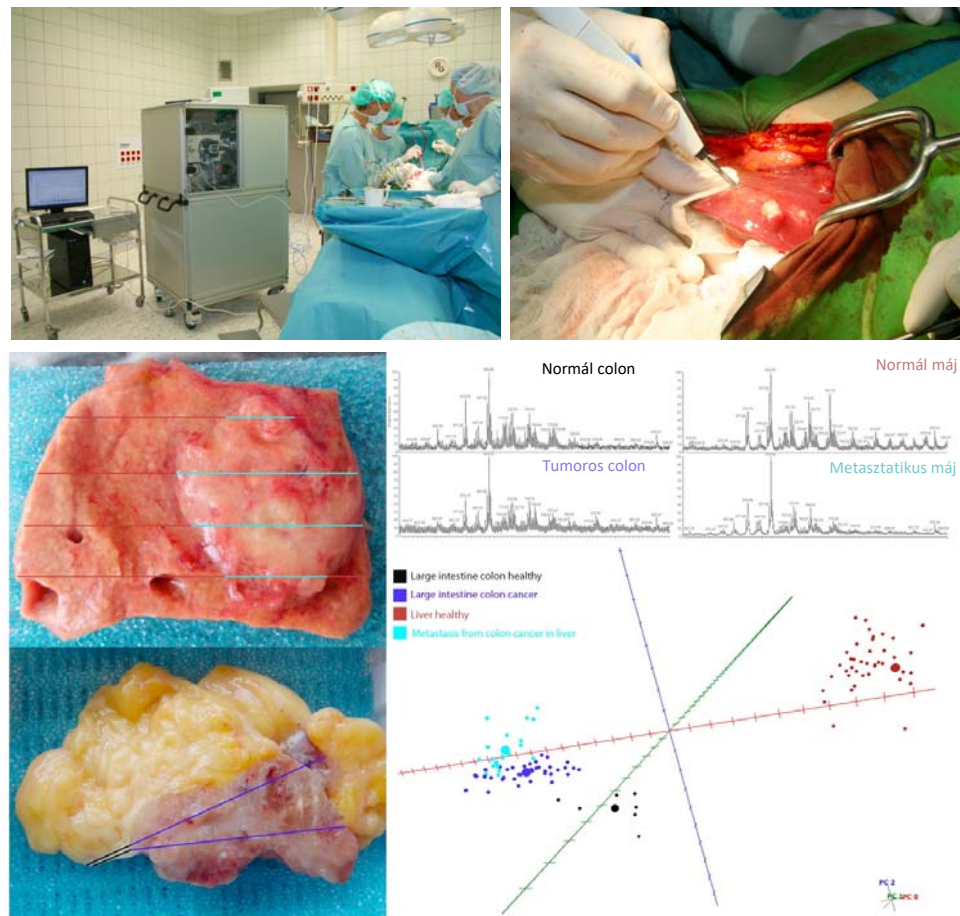
# Tömegspektrometriás alkalmazások

## 1. Fehérje analitika (proteomika)



## 2. Diagnosztikai szűrővizsgálatok: Anyagcserebetegségek (1 csepp vérből) pl. phenylketonuria (PKU)

## 3. Valós idejű szövetanalízis ("onkokés")



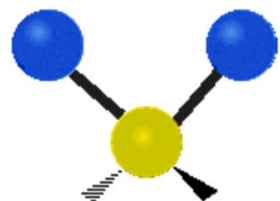
# Infravörös (IR) spektroszkópia

- molekulák rezgőmozgásait méri.

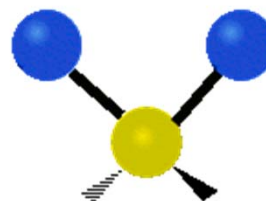
Rezgés (vibráció): periodikus mozgás a kovalens kötés mentén

Forgás (rotáció): periodikus mozgás a kovalens kötésre illesztett tengely körül

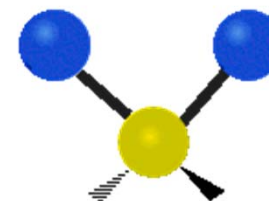
Rezgőmozgás a  
háromatomos metilén  
csoportban (-CH<sub>2</sub>-):



*Aszimmetrikus nyúlás*



*Szimmetrikus nyúlás*

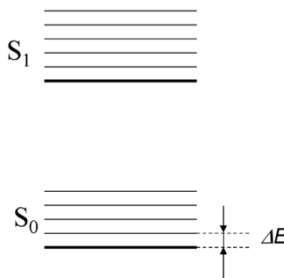


*Torziós rezgés (ollózás)*

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:

$$E_e \overset{\sim 100x}{>} E_v \overset{\sim 100x}{>} E_r$$

$$\sim 3 \times 10^{-19} \text{ J } (\sim 2 \text{ eV}) > \sim 3 \times 10^{-21} \text{ J} > \sim 3 \times 10^{-23} \text{ J}$$

*UV/látható > közép IR > távoli IR*

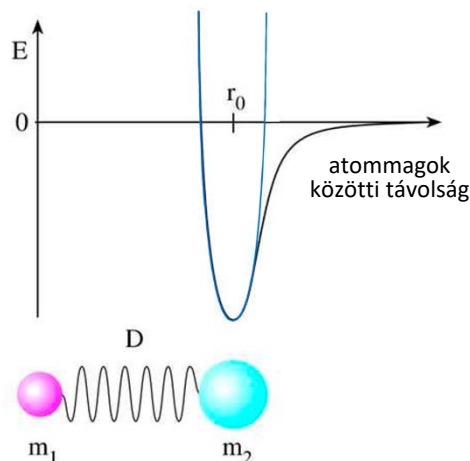


# Molekuláris rezgések

(lásd: Rezonancia gyakorlat)

## Molekula: rugóval összekötött tömeg

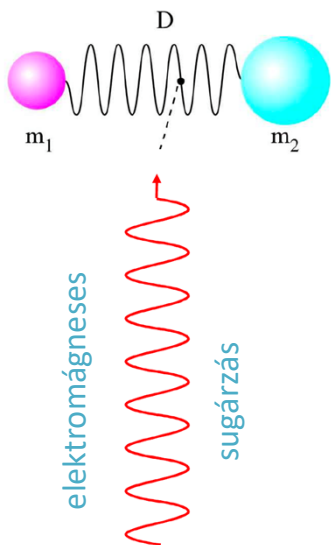
- kétatomos molekula (pl. CO)
- tömegek ( $m_1, m_2$ ): atommagok ( $m_e \ll m_{mag}$ )
- rugó: kovalens kötés
- $r_0$ : egyensúlyi atommagok közötti távolság
- $D$ : rugóállandó
- kölcsönhatási energia távolságfüggése: parabola  $E = Dx^2/2$



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

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 ( $\nu$ ) használjuk:

$$\nu = \frac{1}{\lambda} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{D}{m_{red}}}$$

Értékek a CO molekulára:

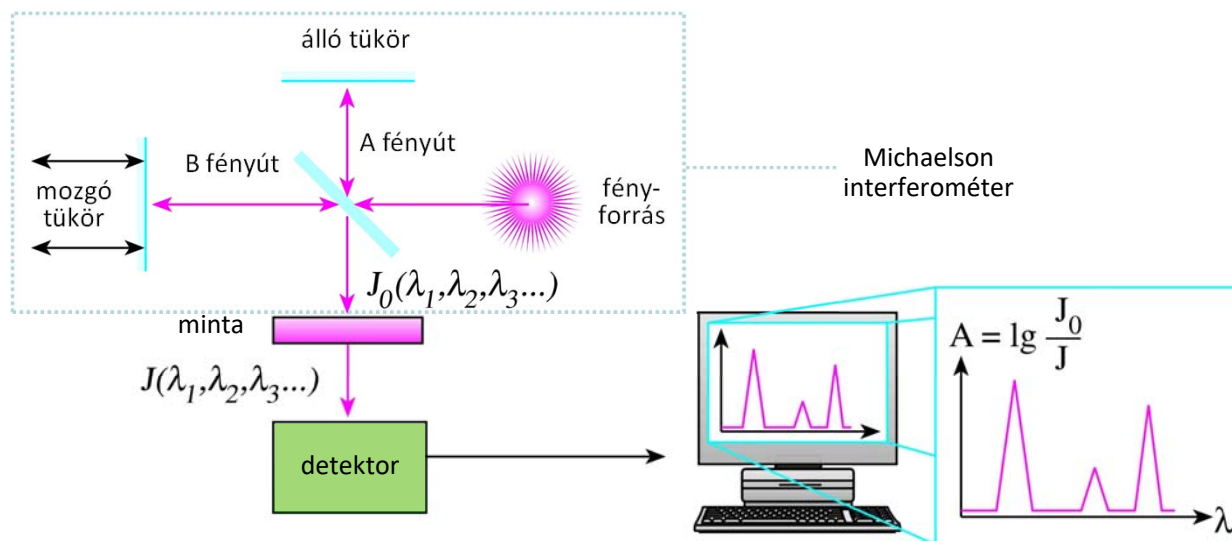
mért hullámszám,  $\nu = 2143 \text{ cm}^{-1}$

$\lambda = 4,67 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $f = 6,43 \times 10^{13} \text{ Hz}$  (64,3 THz),  $D = 1875 \text{ N/m}$

# Infravörös (IR) spektroszkópia - mérés

## Fourier Transform Infravörös (FTIR) Spektroszkópia:

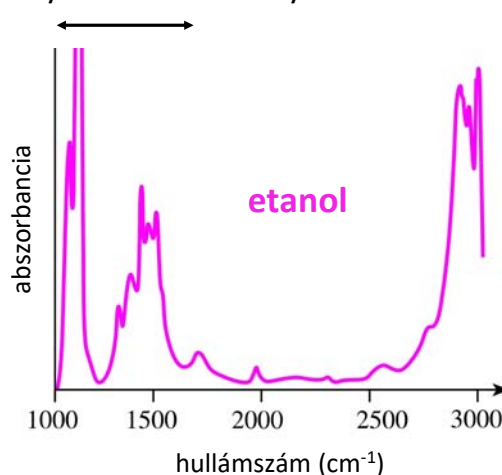
- hullámhossz kombinációt generálunk (Michelson interferométerrel)
- A hullámhossz-kombinációnál mért intenzitásokat átszámoljuk a hullámhossz függvényében megadott intenzitásokká.



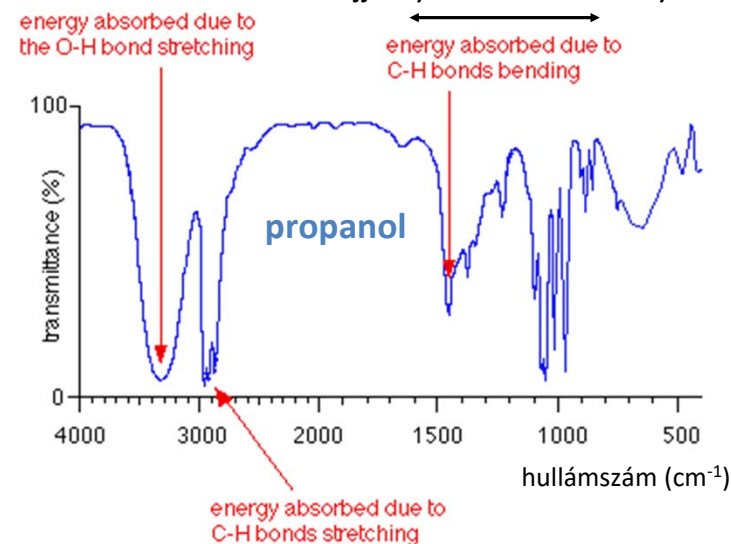
## IR spektrum:

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

“Ujjlenyomat” tartomány



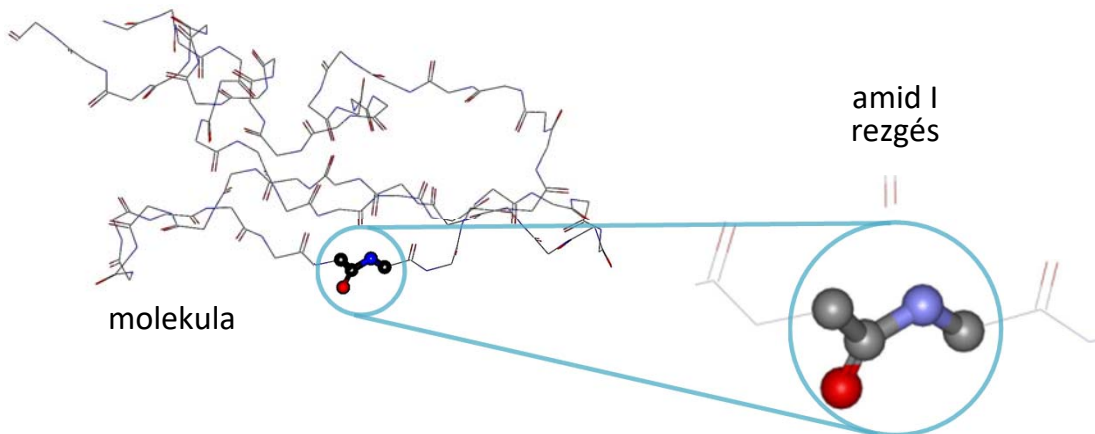
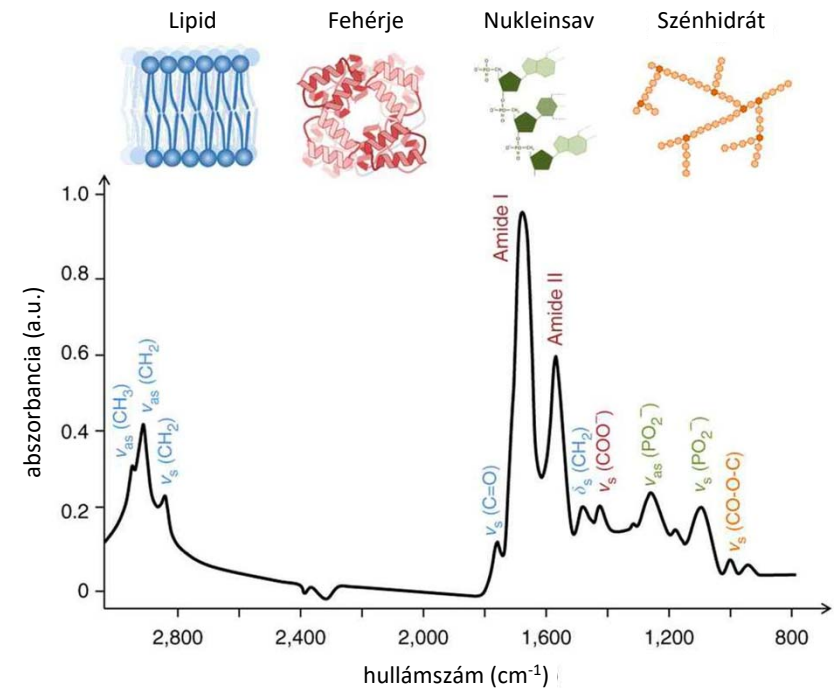
“Ujjlenyomat” tartomány



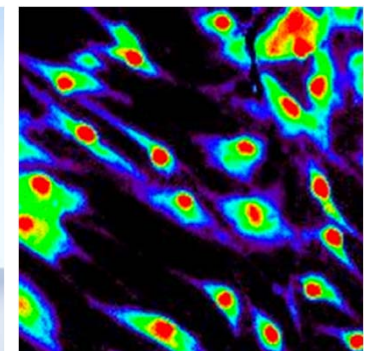
# IR spektroszkópiás alkalmazások

- kémiai azonosítás (pl. intermedierek 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.

... vizes mintában, a víz elnyelése miatt, nehéz vizet ( $D_2O$ ) használhatnak.



FTIR mikroszkópia

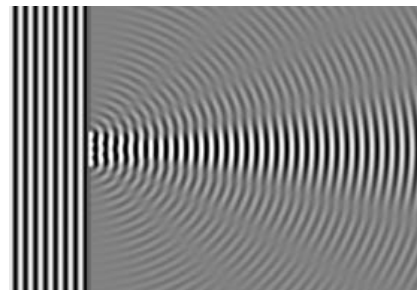
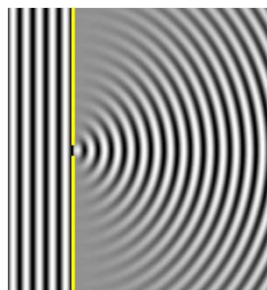
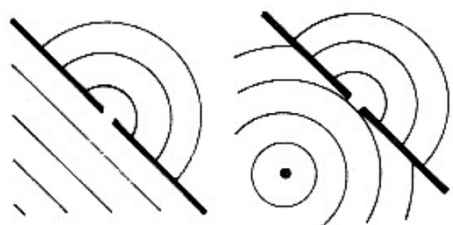


Bőr fibroblasztok, képpalkotás  
1224  $cm^{-1}$  hullámszámnál

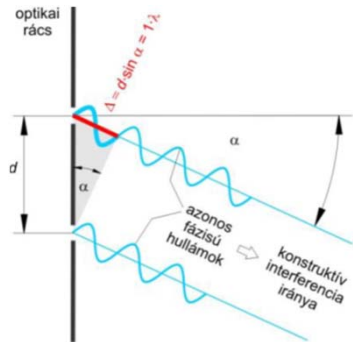
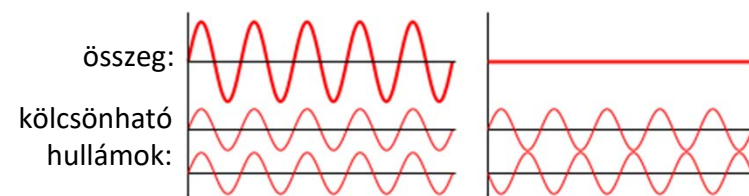
# Röntgen diffrakció, kristallográfia

## Alapja: hullámelhajlás és interferencia

Hullámhosszal azonos nagyságrendű, vagy a hullámhossznál kisebb méretű rés.

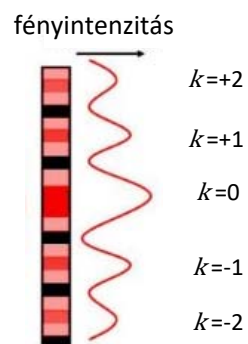


Hullámok fázisban ( $\varphi=0$ ): Ha  $\varphi=\pi$  :  
erősítés kioltás

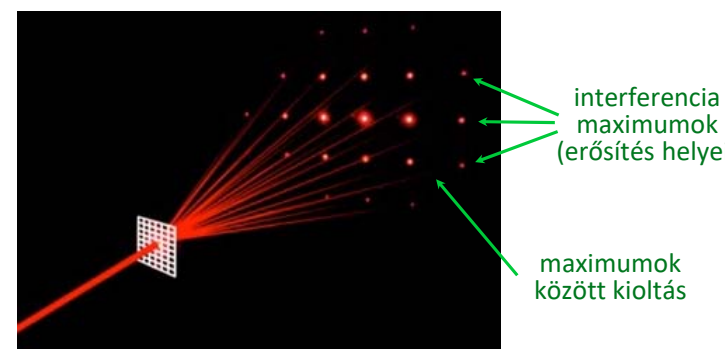


Rácsállandó ( $d$ ) és hullámhossz ( $\lambda$ ) összemérhetők

### 1D rács interferencia képe



### 2D rács interferencia képe

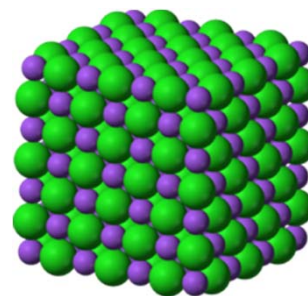
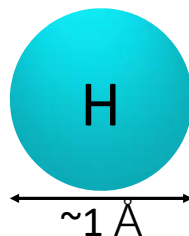


Interferencia maximum feltétele:

$$d \sin \alpha = k \lambda \quad (\text{lásd: Mikroszkópia II gyakorlat})$$

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

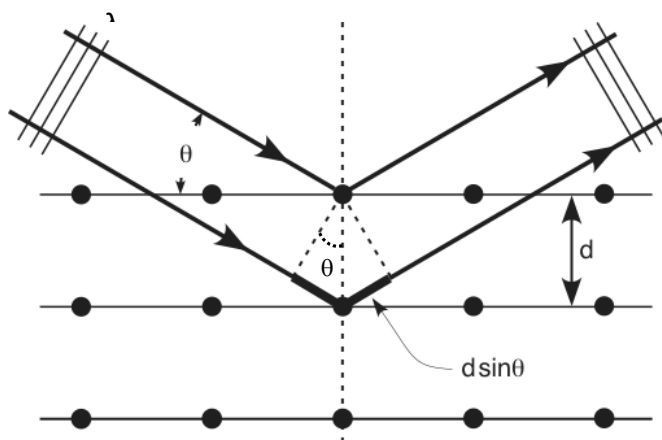
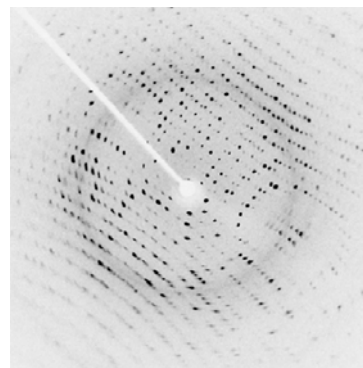
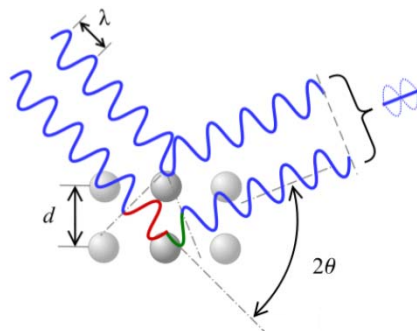
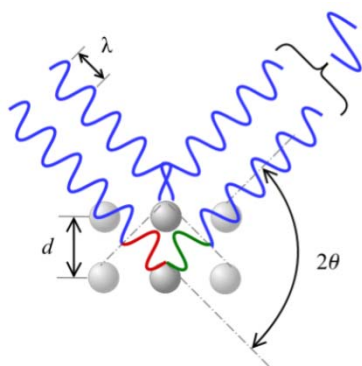
# Molekula térszerkezete



$d_{\text{NaCl}}: 5.64 \text{ \AA}$

Milyen sugárzáshoz kellene használni egy molekularácshoz?

$\lambda_{\text{Rtg}}: 0.01\text{-}10 \text{ nm} = 0.1\text{-}100 \text{ \AA}$

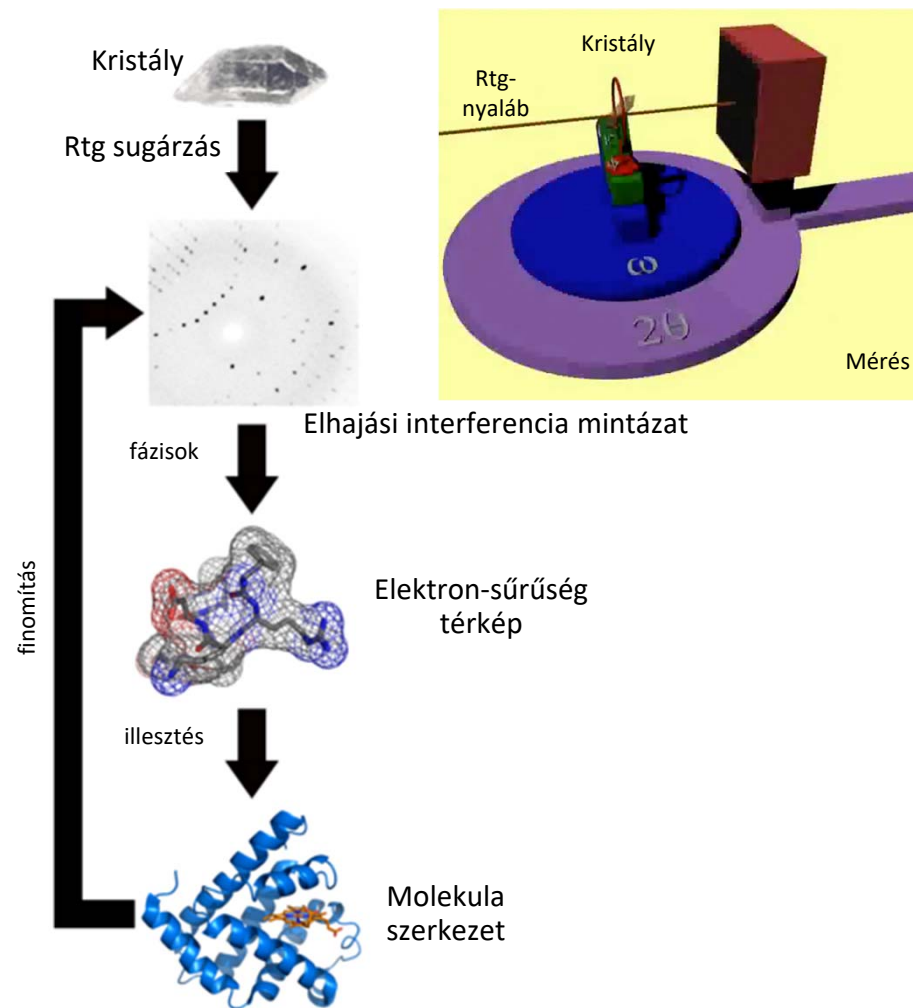


Interferencia maximum feltétele:

$$2d \sin \theta = k \lambda \longrightarrow d = \dots$$

bonyolultabb...

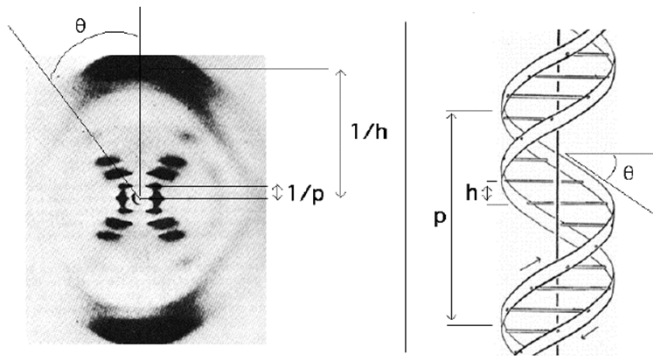
rtg-diffrakcióval kapott interferencia képből:  
atomok térbeli koordinátái  $\longrightarrow$  molekula térszerkezete





# Molekulaszerkezet meghatározása röntgen-krisztallográfiával

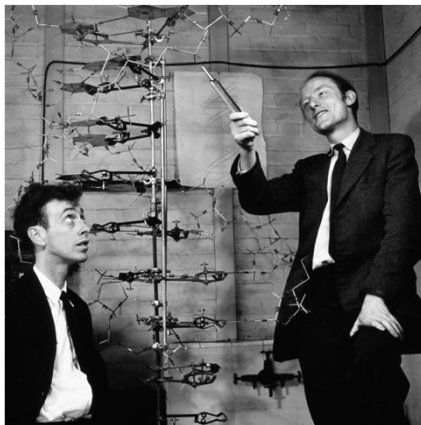
dsDNS



$\theta$  hélix dőlésszöge

$h = 3.4 \text{ \AA}$  bázisok közötti távolság

$p = 34 \text{ \AA}$  hélix menetemelkedése



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

Globuláris fehérje:  
mioglobin

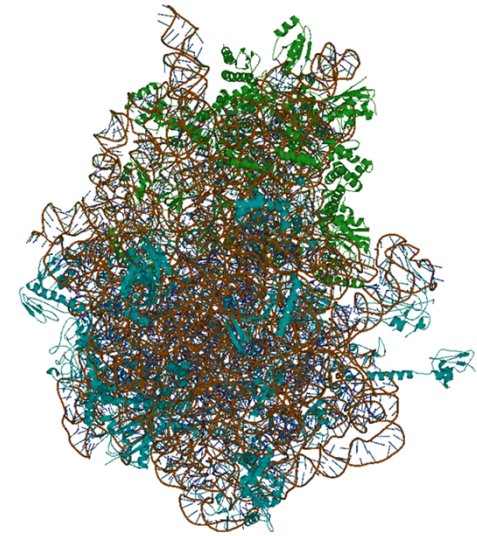


~1200 atom



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

Molekulakomplex:  
riboszóma



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

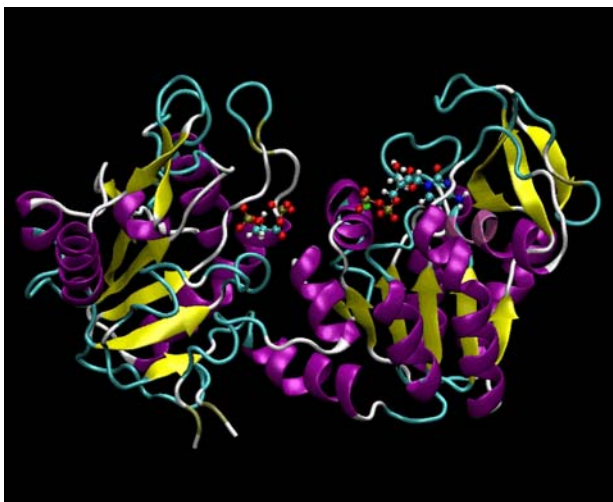
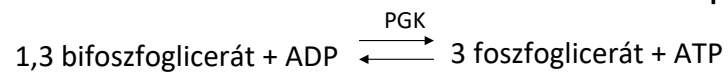


V. Ramakrishnan, T. A. Steitz, A. E. Yonath  
Nobel díj 2009

## Szerkezet - Funkció

### Röntgen kristallográfia:

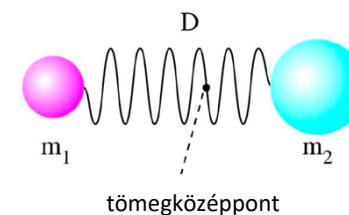
molekula 3D *szerkezete* – statikus kép



atomi koordináták

### FTIR:

kötések *rezgése*i



Melyek a molekula  
funkcionális  
mozgásai?

rugóállandók

MolekulaDinamikai (MD) szimuláció

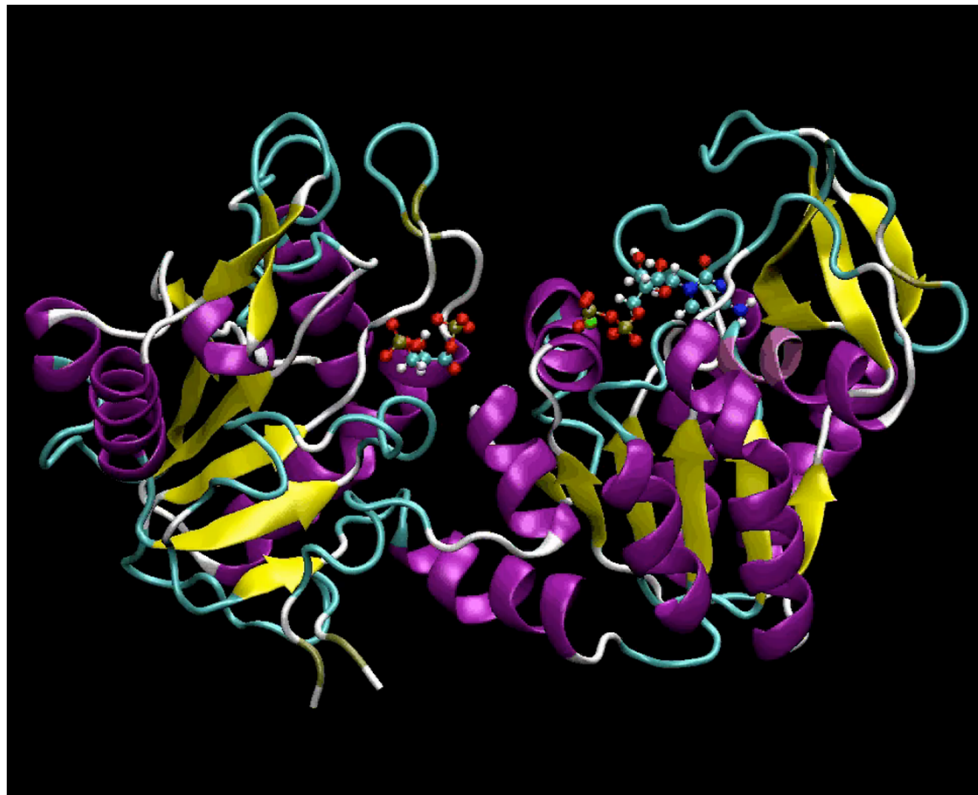
fehérjék belső mozgásait számolja



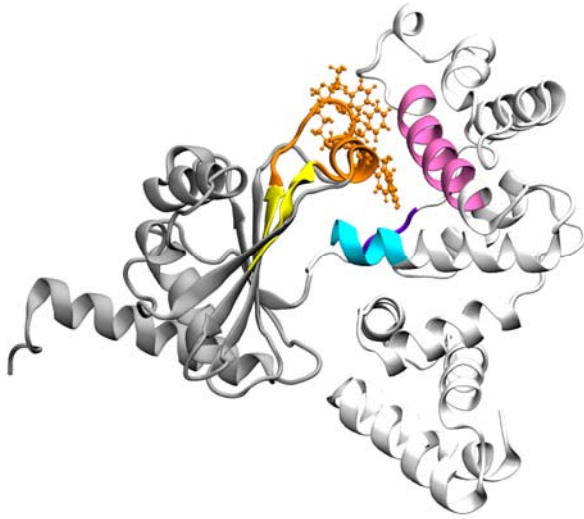
# Molekuláris dinamikai szimuláció

Cél:

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



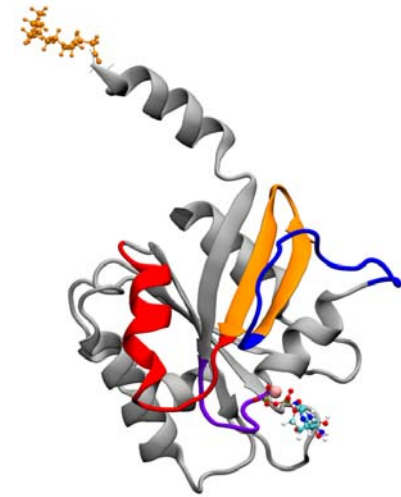
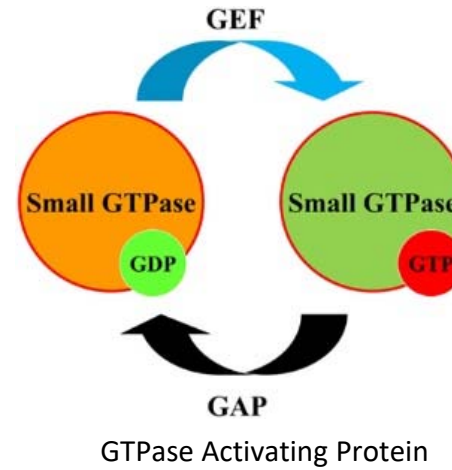
foszfoglicerát kináz (PGK)

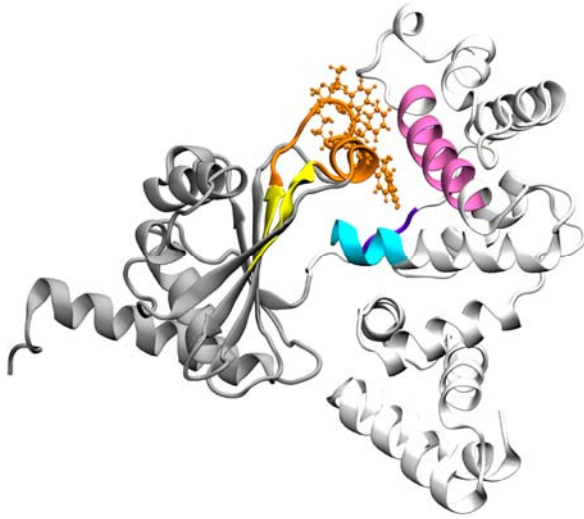


## RaIF:

- légionárius betegséget (súlyos tüdőgyulladás) okozó vírus egyik GEF-szerű effektora.

Guanine nucleotide Exchange Factor





## RalF:

- légionárius betegséget (súlyos tüdőgyulladás) okozó vírus effektora.

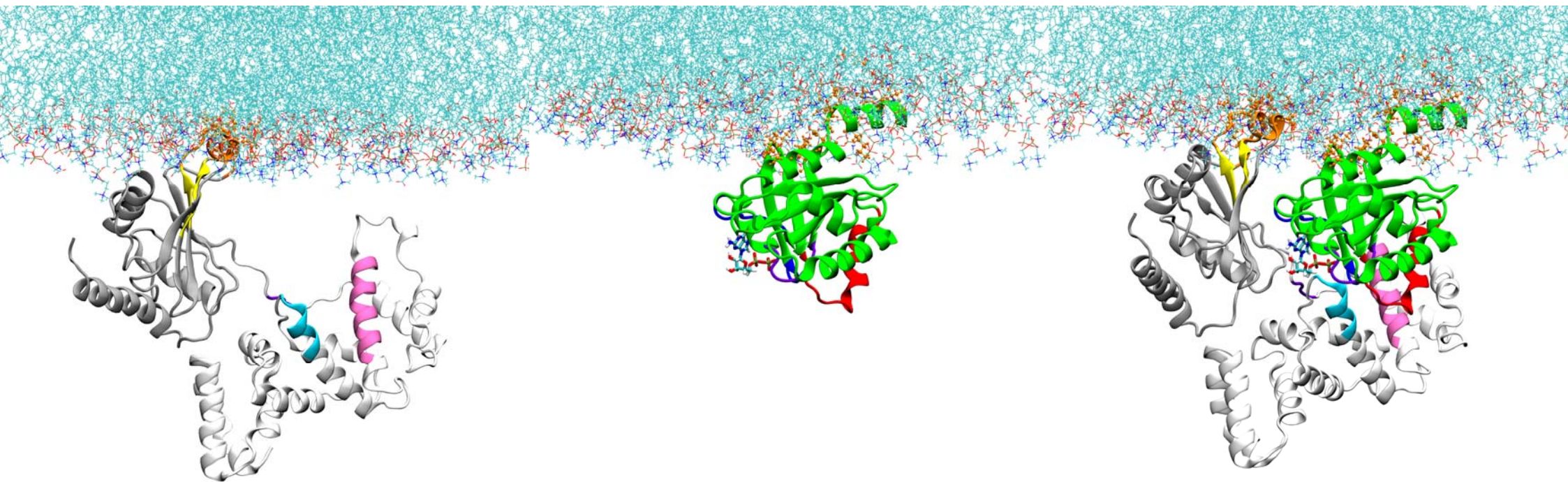
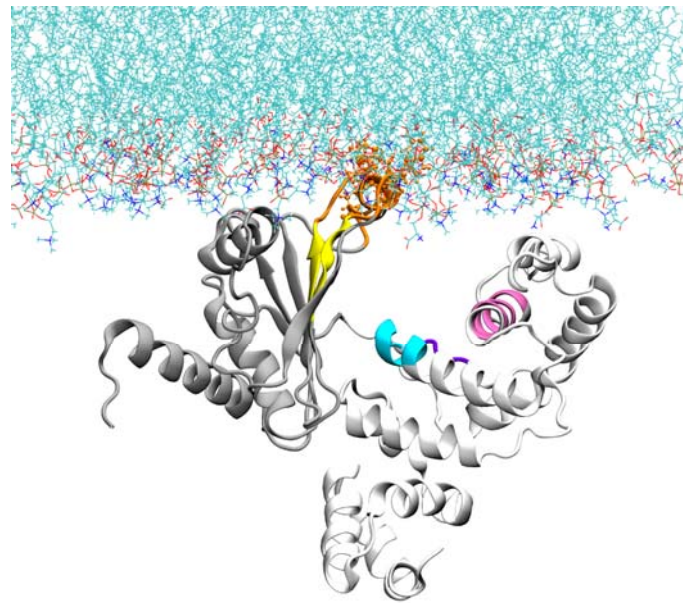
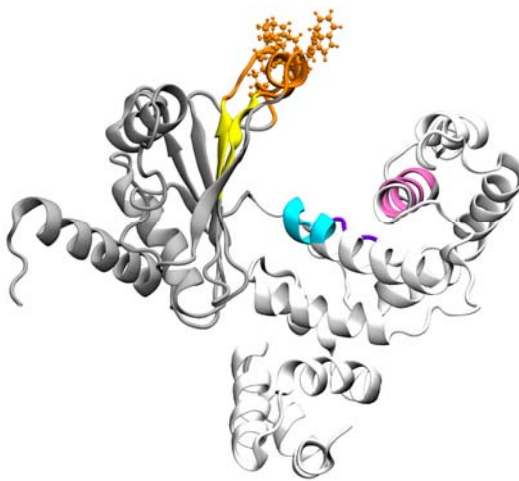
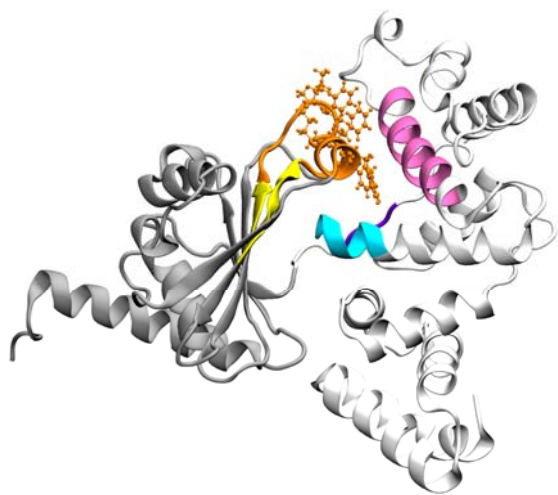
### Kísérlet:

- 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*