

A biomolekuláris szerkezet és dinamika vizsgálómódszerei:

Röntgendiffrakció,
tömegspektrometria,
infravörös spektrometria.

Smeller László

1

A molekuláris szerkezet és dinamika vizsgáló módszereinek áttekintése

Szerkezet

Röntgenkristallográfia

NMR spektroszkópia

Tömegspektrometria

Infravörös spektroszkópia

Lumineszcencia spektr.

...

Dinamika

Fluoreszcencia élettartam

Dinamikus fényszórás

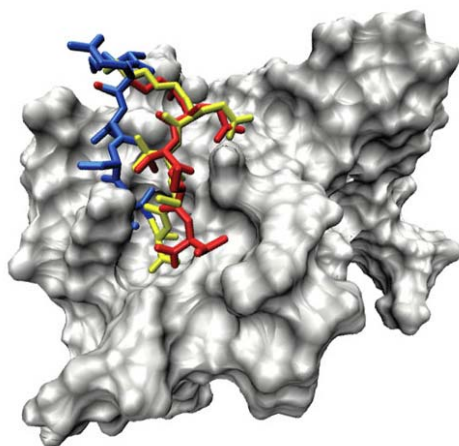
ESR (EPR) spektroszkópia

FCS (Fluoreszcencia
korrelációs spektroszkópia

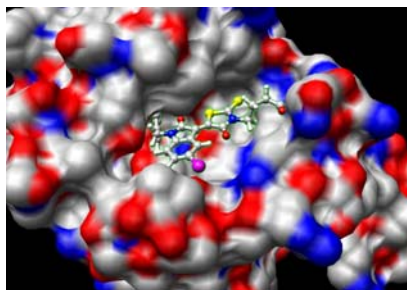
...

2

Miért fontos a szerkezet ismerete?



Kis molekulák dokkolása

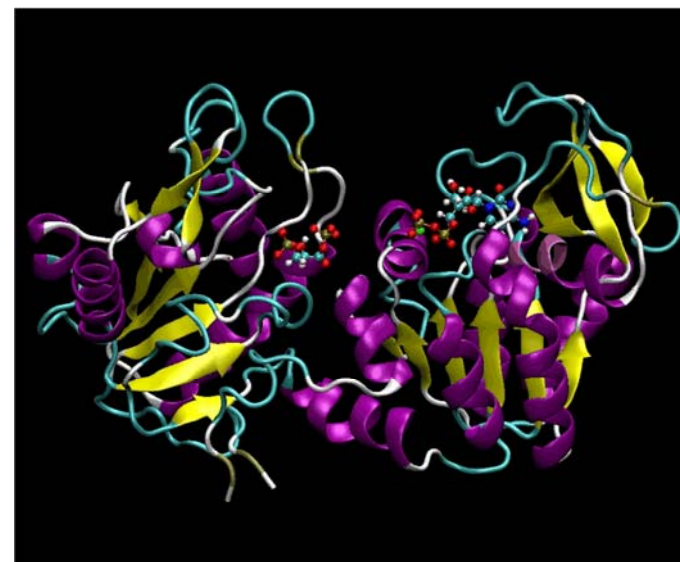


Forrás: <http://www.cipsm.de>

<http://en.academic.ru>

3

Szerkezet - dinamika



4

Röntgendiffrakció

5

Röntgendiffrakció

- **Mit** (Milyen információt ad)?
Molekulák térbeli szerkezete.
Minden (nehéz) atom x,y,z koordinátáját.
- **Miért** érdekes/hasznos az orvostudományban?
Biológiai folyamatok megértése
pl. DNS transzkripció, enzimműködés, molekuláris felismerés, mutációk hatása
Gyógyszermolekulák tervezése (kötődés, dokkolás)
- **Hogyan?**

6

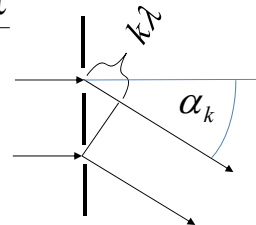
Emlékeztetőül: fényelhajlás

Fényelhajlás (diffrakció) optikai rácson:

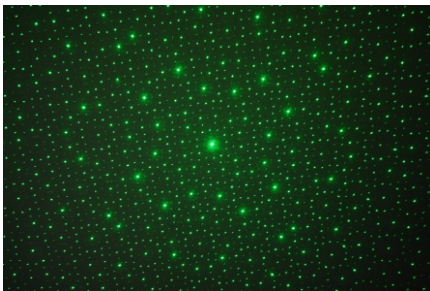
Rácsállandó:

$$d \gtrsim \lambda$$

$$\sin \alpha_k = \frac{k\lambda}{d}$$



α_k – t mérjük, λ ismert
 $\Rightarrow d$ meghatározható



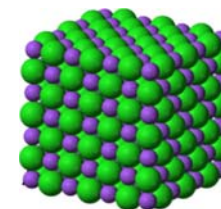
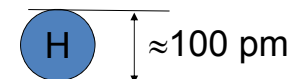
7

Röntgendiffrakció

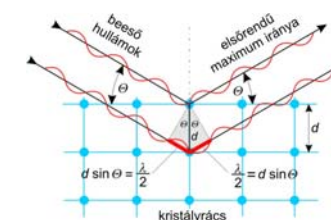
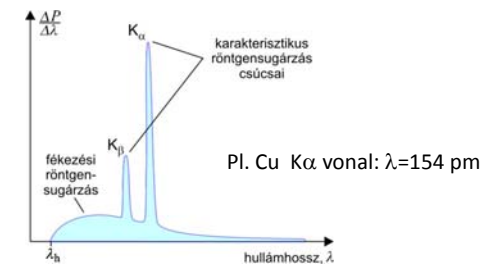
Milyen rács illik a röntgensugárzáshoz?

$$d \gtrsim \lambda$$

λ_{Rtg} 10-200 pm



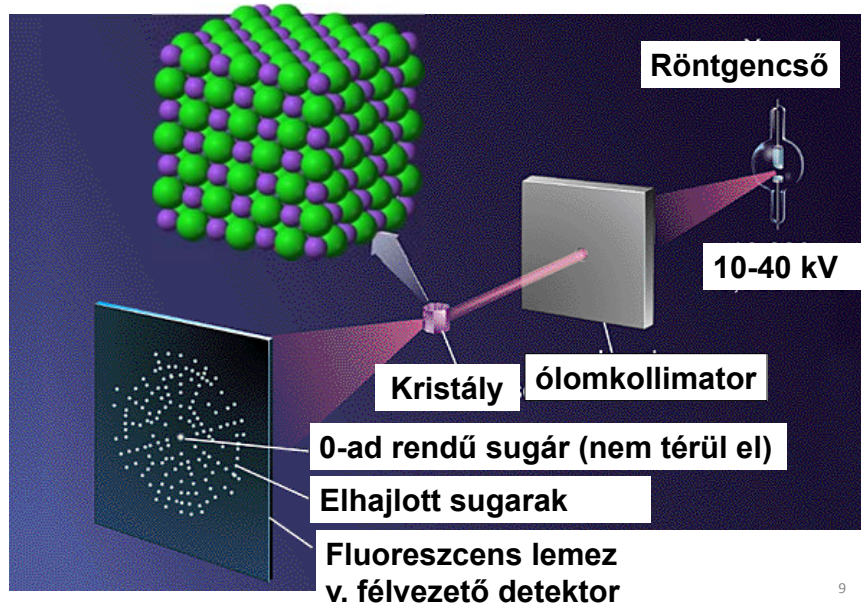
NaCl rácsállandó: 564 pm



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

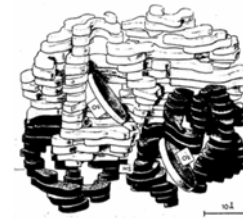
8

Röntgendiffrakciós készülék elvi vázlata

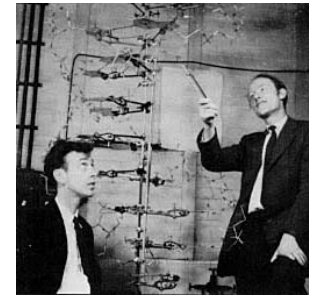


9

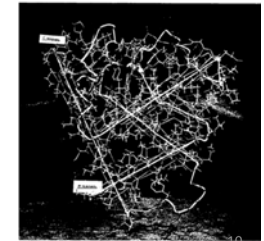
Makromolekulák szerkezetvizsgálata röntgendiffrakcióval



Nobel díj 1962
Globuláris fehérjék
szerkezetvizsgálata
M. F. Perutz,
J. C. Kendrew
mioglobin: ~1200
atom

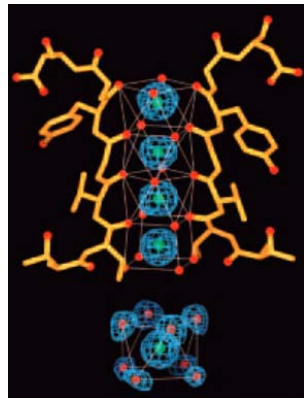


Nobel díj 1962
DNS szerkezete
Francis Crick
James Watson
Maurice Wilkins

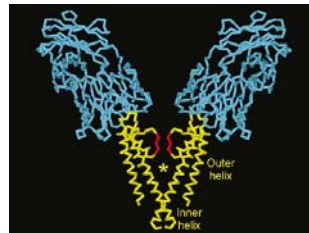


10

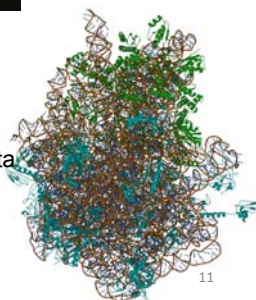
Makromolekulák szerkezetvizsgálata röntgendiffrakcióval



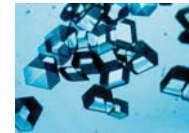
Nobel Díj 2003
Roderick MacKinnon



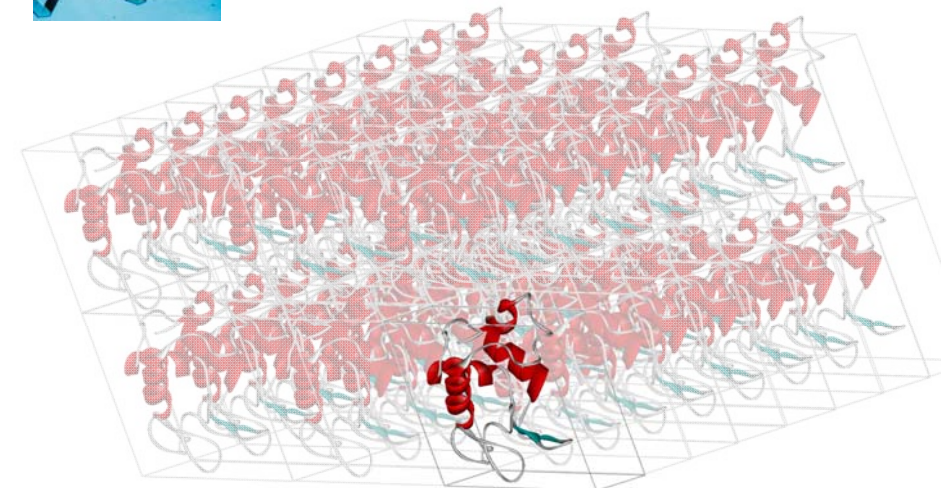
Nobel díj 2009
Riboszóma szerkezetvizsgálata
V. Ramakrishnan, T. A. Steitz,
A. E. Yonath
30S alegység: ~35000 atom,
50S alegység: ~64000 atom



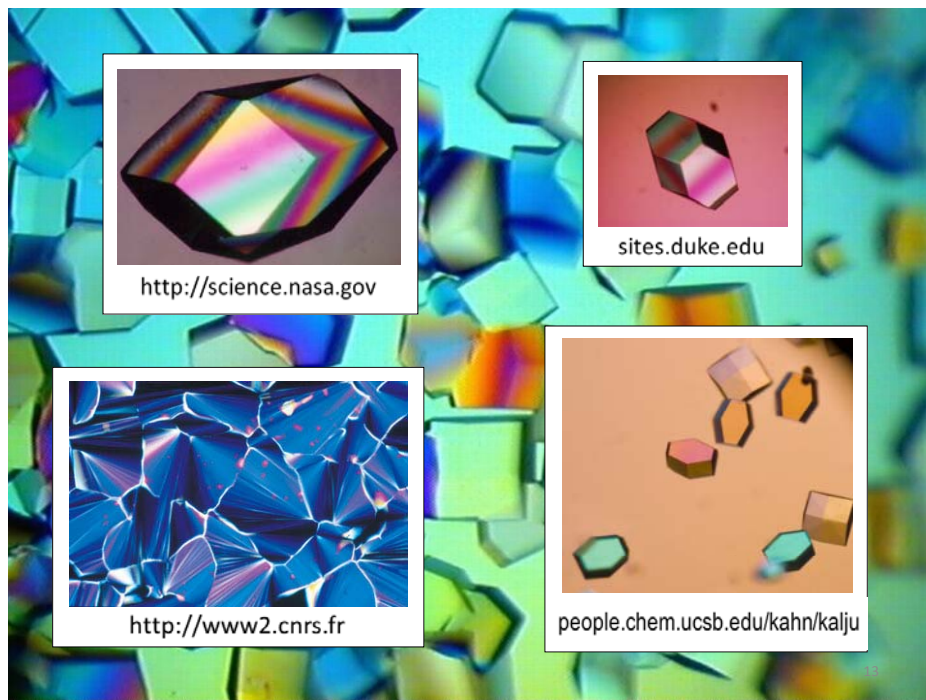
11



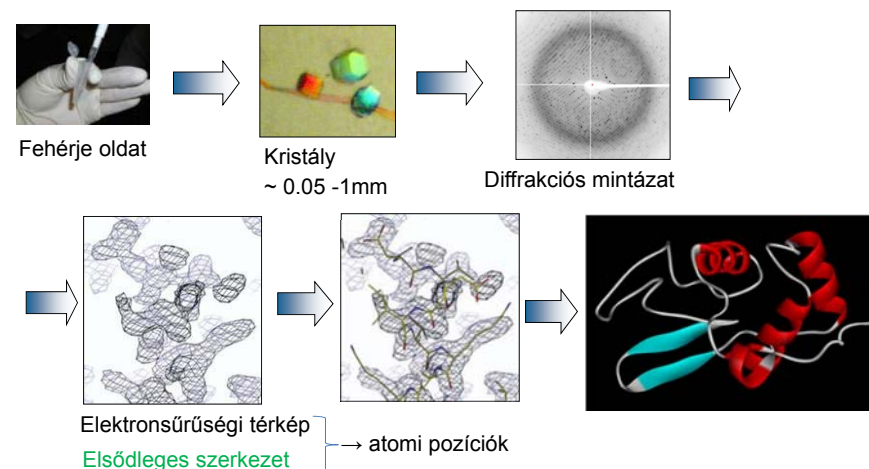
Fehérjekristályok



12



Fehérjeszerkezet meghatározása röntgendiffrakcióval

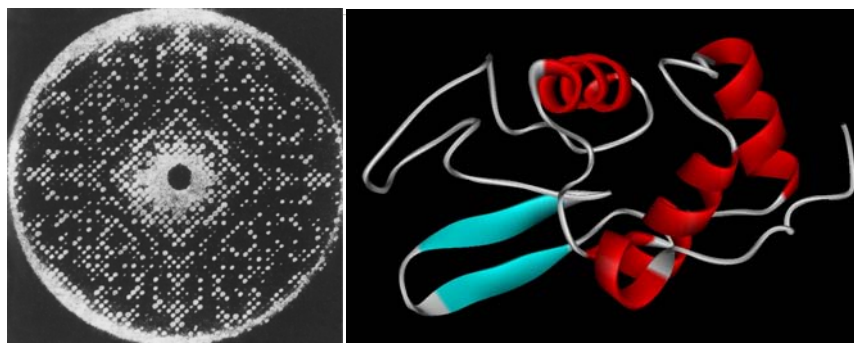


- Egykristály előállítása szükséges
 - Stabil konformációjú fehérjék vizsgálhatók (globuláris fehérjék)
- A kristálybeli **elektronsűrűség** térbeli és időbeli átlagát kapjuk meg

Fehérjeszerkezet meghatározása röntgendiffrakcióval



Lizozim



15

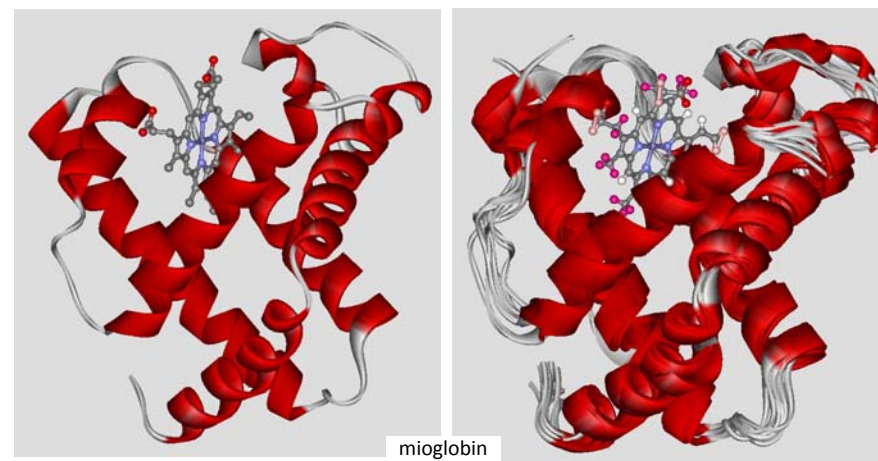
Fehérje adatbázisok

- PDB
Protein Data Bank
3D szerkezetek (>100 ezer)
Röntgenkristallográfiai ill.
NMR mérésekből
- Swiss-prot
Szekvenciák
Proteomikai segédprogramok,
Szerkezet becslés (homológia modellezés)
Kémiai paraméterek becslése (pl. izoelektromos pont...)
Szekvenciák hasonlósága...

17

Kristallográfia ↔ NMR

Avagy tényleg ugyanolyan a fehérje szerkezete fiziológiás oldatban mint a kristályban?



18

Tömegspektrometria

19

Tömegspektrometria

- **Mit** (Milyen információt ad)?
A minta molekuláit (ill. annak fragmentumait) tömeg (pontosabban m/z^*) alapján szétválasztja, azonosítja a fragmentumokat ill. a molekulákat.
- **Miért** érdekes/hasznos az orvostudományban?
proteomika, diagnosztika, szűrés, intraoperatív „szövettan”
- **Hogyan?**

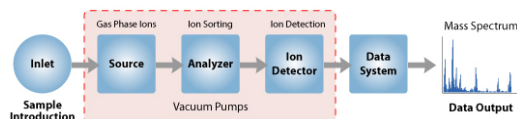
*z: a töltés elemi töltés egységeiben

20

A tömegspektrométer elve

Lépések:

1. A minta gázállapotba hozása
2. Ionizáció
3. Fragmentálás (molekulatöredékek keltése)
4. Elválasztás
5. Detektálás
6. Kiértékelés



21

Gázállapotba hozás, ionizáció

Leggyakrabban alkalmazott módszerek:

ESI (electrospray ionisation)

Elektron ionizáció

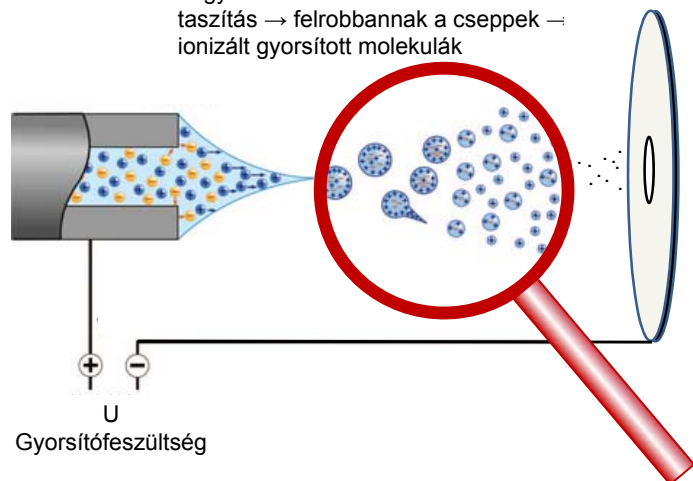
Laser deszorpció

MALDI (matrix assisted laser desorption ionisation)

22

Elektrospray ionizáció elve

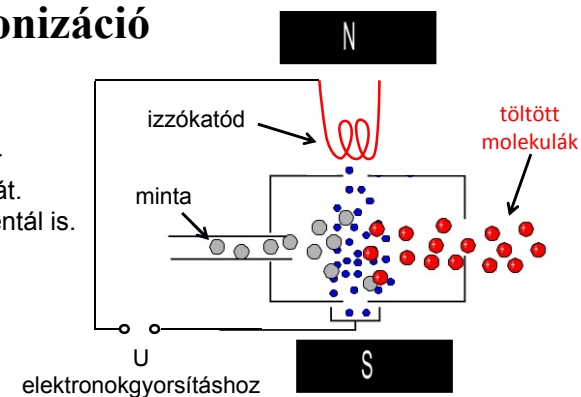
oldószer párolgás → kisebb csepp →
nagyobb felületi töltés → Coulomb
tasztítás → felrobbannak a cseppek →
ionizált gyorsított molekulák



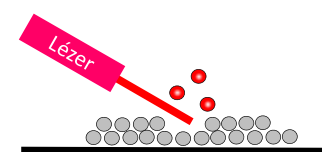
23

Elektron ionizáció

Elektronsugárral
ütköztetjük a már
gázállapotú mintát.
Ionizál és fragmentál is.



Lézer deszorpció



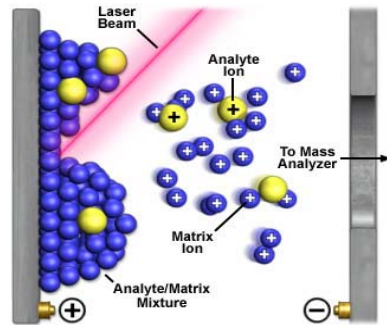
24

MALDI

matrix assisted laser desorption ionisation

A lézersugárzást a mátrix atomjai (molekulái) abszorbeálják.

Nagy molekulák vizsgálatához ideális.



25

Analízis

Mágneses

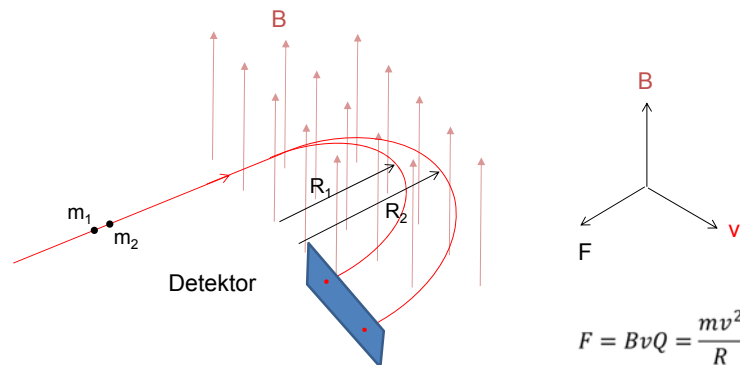
Kvadrupol

TOF

...

26

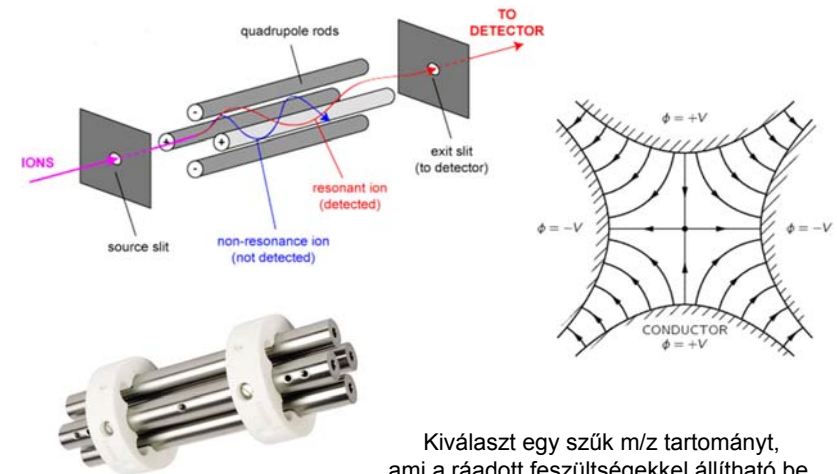
Mágneses tömeganalizátor



Manapság nem használják, mert a mágnes nagy és nehéz.

27

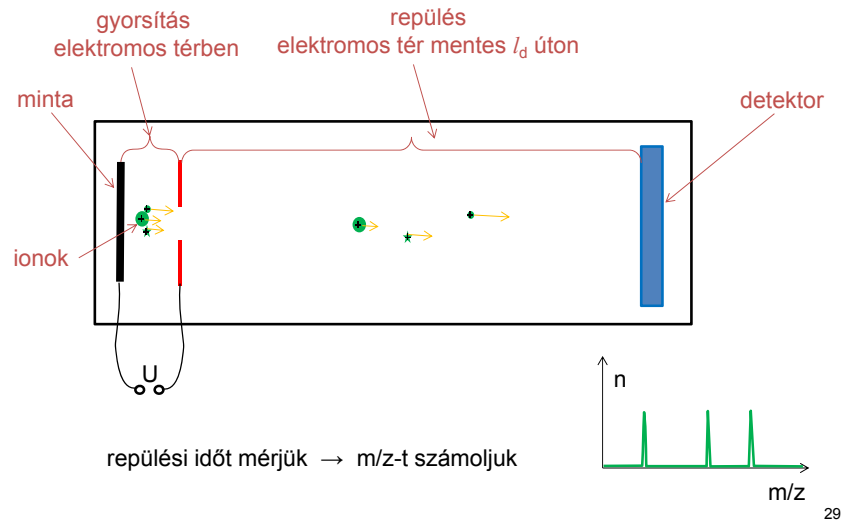
Kvadrupol tömeganalizátor



Kiválaszt egy szűk m/z tartományt, ami a ráadott feszültségekkel állítható be.

28

Time of Flight elve



29

Time of flight MS

A repülési idő számolása:

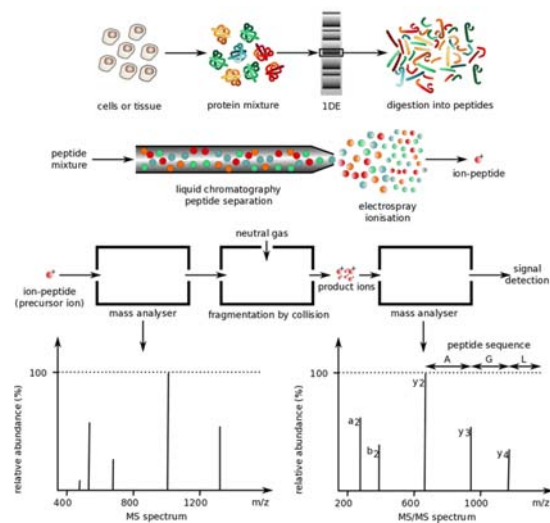
ebből az m/z arány:



Pillanatszerű mintabevitel kell (lp. lézeres deszorpció)

30

Alkalmazások: proteomika



31

Alkalmazások: diagnosztika

^{13}C -urea kilégzési teszt *Helicobacter pylori* kimutatására

^{13}C -urea tabletta



30 perc múlva a kilélegzett levegőben a $^{13}\text{CO}_2$ mennyiségének növekedése a (*Helicobacter pylori* által termelt) ureáz enzim jelenlétére utal.

A $^{13}\text{CO}_2$ mennyiségét tömegspektrometriával határozzák meg a kilélegzett levegőből.



32

Alkalmazások: szűrés

EGÉSZSÉGTUDOMÁNY, LV. ÉVFOLYAM, 2011. 4. SZÁM 2011/4

ÁZAT: Tandem tömegspektrometriával (MS/MS) szűrt betegségek Magyarországon

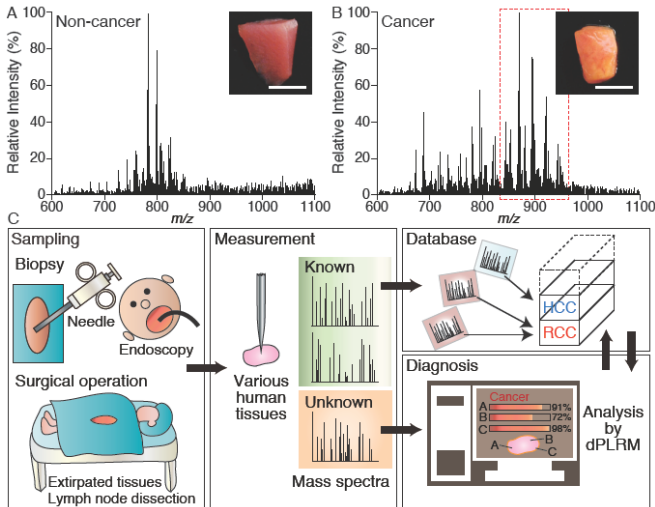
Anyagcsere betegségek szűrése csecsemőknél egy csepp vérből.

Betegcsoport	Betegség
Glukóza	Phenylketonuria (PKU)
Glukóza	Jávorfeszítő betegség (MSUD)
Glukóza	Tyrosinaemia I és II
Glukóza	Homocystinuria
Glukóza	Citrullinaemia I (argininoszuccinát szintáz hiány)
Glukóza	Citrullinaemia II (argininoszuccinát liáz hiány)
Glukóza	Propionsav acidemia (propionil-CoA karboxiláz hiány)
Glukóza	Metilmalonsav acidemia (metilmalonil-CoA mutáz hiány)
Glukóza	Izovaleriansav acidemia (izovaleril-CoA dehidrogenáz hiány)
Glukóza	Metilkrotonil-CoA karboxiláz hiány
Glukóza	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liáz hiány
Glukóza	Béta-ketotiláz hiány
Glukóza	Multiplex karboxiláz hiány
Glukóza	Glutársav aciduria I (glutaril-CoA dehidrogenáz hiány)
Glukóza	Rövidláncú acil-CoA dehidrogenáz (SCAD) hiány
Glukóza	Középláncú acil-CoA dehidrogenáz (MCAD) hiány



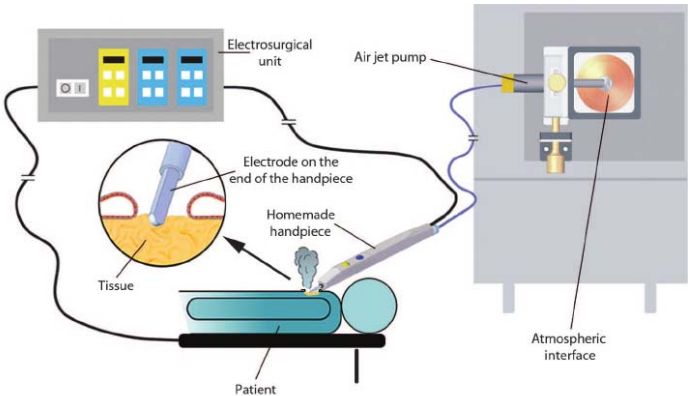
Dr. Zoltán

Alkalmazások: rákdiagnosztika



Takeda és mtsai: Innovations in Analytical Oncology - Status quo of Mass Spectrometry-Based Diagnostics for Malignant Tumor *Journal of Analytical Oncology*, 2012, 1, 74-80

Alkalmazások: intraoperatív MS



IR spektroszkópia

37

Infravörös spektroszkópia

- **Mit** (Milyen információt ad)?
Molekulák rezgési frekvenciája, térszerkezete
- **Miért** érdekes/hasznos az orvostudományban?
molekulák azonosítása
molekulaszerkezet változások követése
diagnosztika
- **Hogyan?**

38

Infravörös spektroszkópia

- Infravörös fény: $\lambda=800 \text{ nm} - 1 \text{ mm}$
közép infra tartomány: $2,5\text{-}50 \mu\text{m}$
- abszorpciós spektroszkópia
- az elnyelt infravörös sugárzás
molekularezgéseket kelt
- érzékeny a molekulaszerkezetre
- speciális detektálás: FT spektrométer

39

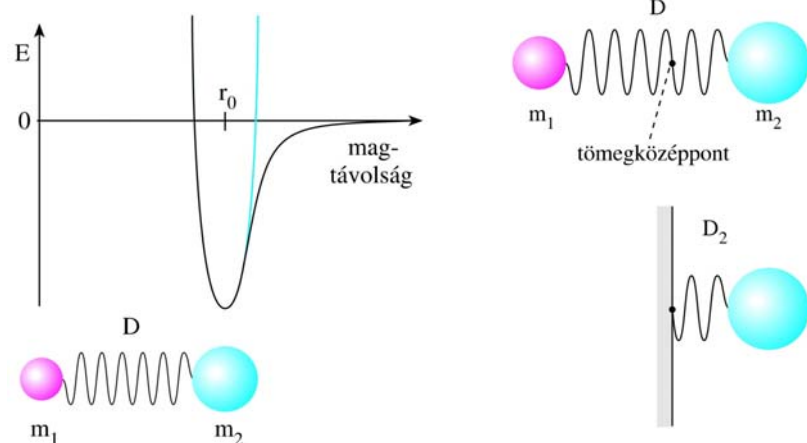
Molekularezgések

Az elektronok könnyűek, gyorsan követik az atommag mozgását, ezért az atommagok rezgéseit az elektronok nem befolyásolják.

A klasszikus fizikai leírásban az atommagok közti kötést, egy rugóval vesszük figyelembe.

40

Molekularezgések: kétatomos molekula



41

a középiskolából ismert:

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D_2}{m_2}}$$

$$\frac{m_2}{m_1} = \frac{\ell_1}{\ell_2}$$

$$\frac{D_2}{D} = \frac{F/D}{F/D_2} = \frac{\Delta\ell}{\Delta\ell_2} = \frac{\ell}{\ell_2} =$$

$$= \frac{\ell_1 + \ell_2}{\ell_2} = \frac{\ell_1}{\ell_2} + 1 = \frac{m_2}{m_1} + 1 = \frac{m_1 + m_2}{m_1}$$

$$F = D\Delta\ell$$

42

tehát: $\frac{m_1 + m_2}{m_1} = \frac{D_2}{D}$, amit az $f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D_2}{m_2}}$

egyenletbe helyettesítve
a rezgési frekvencia:

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D(m_1 + m_2)}{m_1 m_2}}$$

Redukált tömeg: $m_{\text{redukált}} = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$

ezzel a frekvencia:

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D}{m_{\text{redukált}}}}$$

43

Ilyen frekvenciájú fény hullámhossza:

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

hullámszám=a hullámhossz reciproka (ν):

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

ν [cm⁻¹]:
hány hullám fér el
egységnyi hosszúságon?

Példa: CO

A mért rezgési hullámszám: $\nu = 2143 \text{ cm}^{-1}$

$$\Rightarrow \lambda = 4,67 \mu\text{m} \Rightarrow f = 6,43 \cdot 10^{13} \text{ Hz} \quad \Rightarrow D = 1875 \text{ N/m}$$

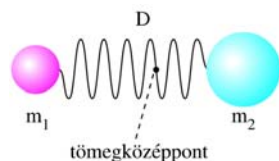
$$m_{\text{C}} = 2 \cdot 10^{-26} \text{ kg}, \quad m_{\text{O}} = 2,7 \cdot 10^{-26} \text{ kg}$$

Ha ν ismert, D számolható
ha D ismert, ν számolható

44

Klasszikus fizikai rezgések és energianívók kapcsolata

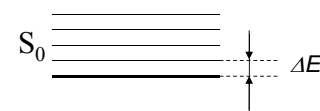
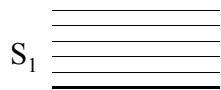
- Klasszikus kép



$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D}{m_{\text{redukált}}}}$$

rezonancia az f frekvenciájú fénnel

Energianívók



$$\Delta E = hf$$

u.a.!!!

45

A rezgési frekvencia függése a tömegtől és a kötéseerősségtől

Tömeg:

Infravörös rezgési frekvenciák (cm⁻¹)

B-H	C-H	N-H	O-H	F-H
2400	3000	3400	3600	4000
Al-H	Si-H	P-H	S-H	Cl-H
1750	2150	2350	2570	2890
	Ge-H	As-H	Se-H	Br-H
	2070	2150	2300	2650

Víz (O-H): 3600 => nehézvíz: 2600 cm⁻¹

Kötéseerősség:

C-N: 1100 cm⁻¹,
C=N: 1660 cm⁻¹,
C≡N: 2220 cm⁻¹.

Sokatomos molekulák rezgései

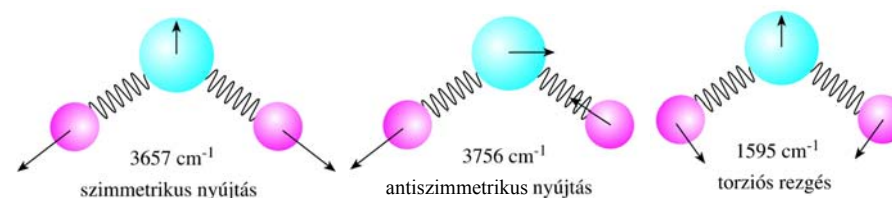
N atomos molekula:

- 3N szabadsági fok, 3-3 a teljes molekula translációja ill. rotációja
- 3N-6 rezgési szabadsági fok (lineáris molekuláknál csak 3N-5)
- normálrezgések

47

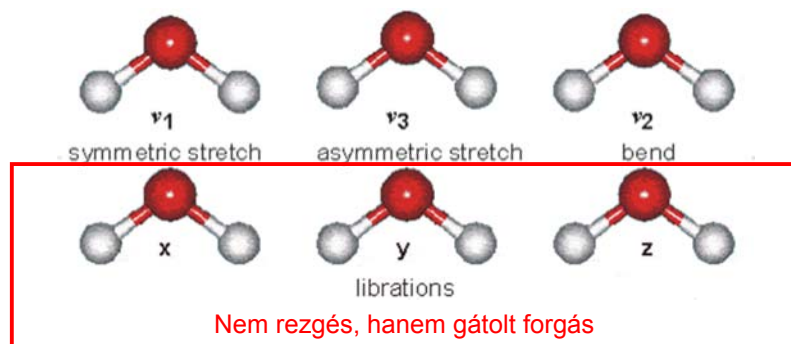
Normálrezgések

- Minden atom ugyanazzal a frekvenciával, de különböző amplitúdóval és irányban rezeg.
- Pl. víz:



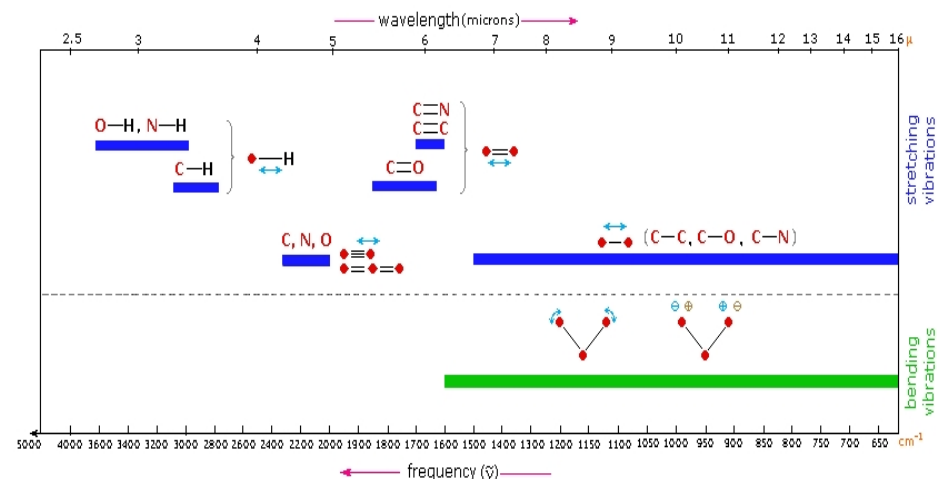
48

A víz normálrezgései



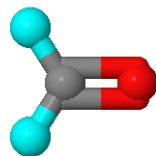
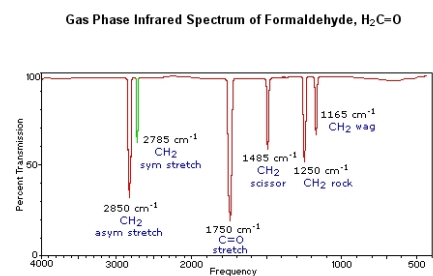
49

Néhány tipikus rezgési frekvencia



50

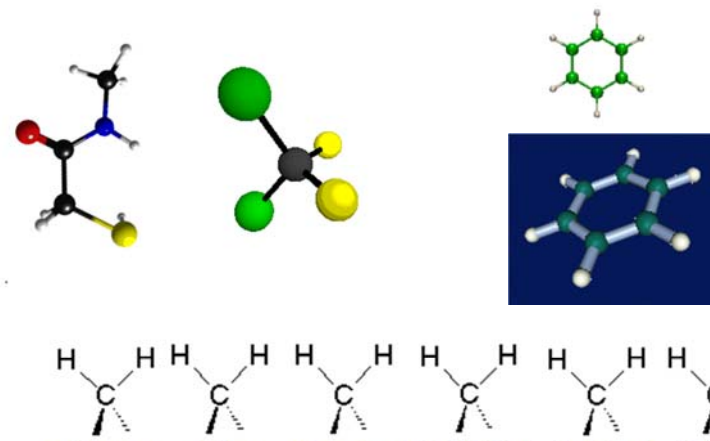
Példa: Formaldehid



- ☐ View CH₂ Asymmetric Stretch
- ☐ View CH₂ Symmetric Stretch
- ☐ View C=O Stretch
- ☐ View CH₂ Scissoring
- ☐ View CH₂ Rocking
- ☐ View CH₂ Wagging

- ☐ Ball&Stick Model
- ☐ Spacefill Model
- ☐ Stick Model
- ☐ Motion Off

Illusztrációként: különféle molekularezgések

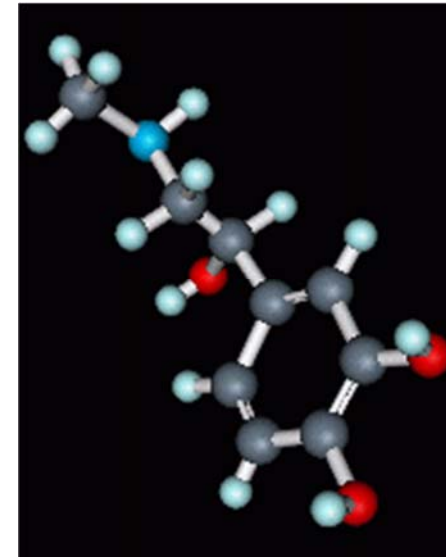


52

Flavin



53



54

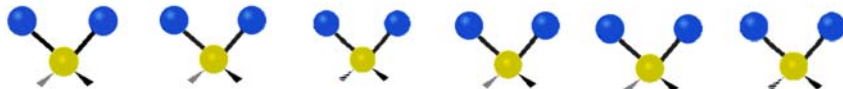
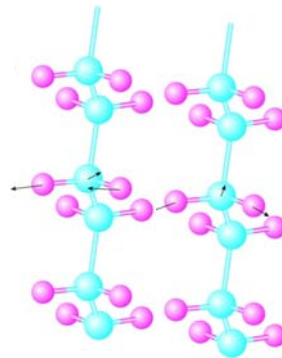
Makromolekulák rezgései

Globális rezgések (bonyolultak)

Lokalizált rezgések (csoportrezgések)
a rezgő csoport környezetéről adnak
információt

pl:

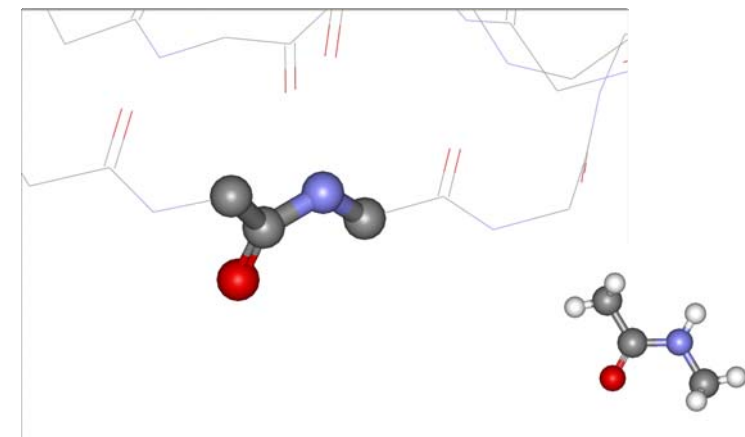
- CH_2 rezgések a lipidekben



55

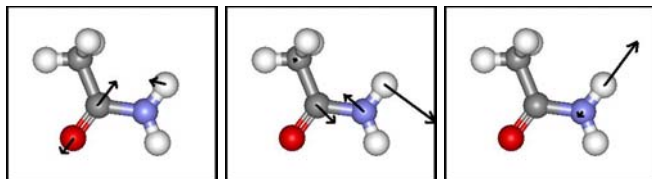
Fehérjék infravörös spektroszkópiája

Konformációérzékeny rezgés



Fehérje rezgések

Amid rezgések a fehérjékben



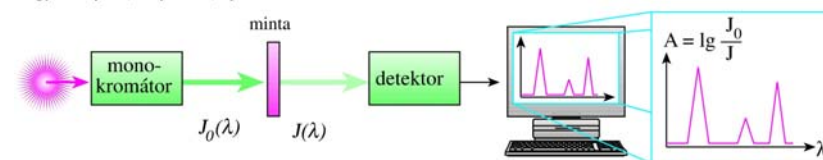
Konformációra érzékenyek:

másodlagos és harmadlagos szerkezetre

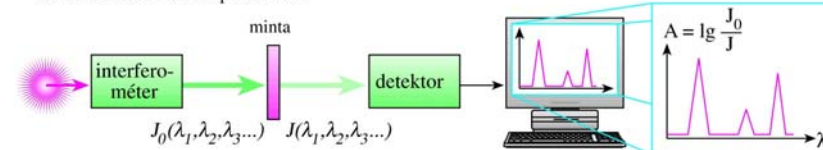
57

A spektrum mérése: Fourier transzformációs spektrométer (FTIR)

hagyományos (diszperziós) spektrométer

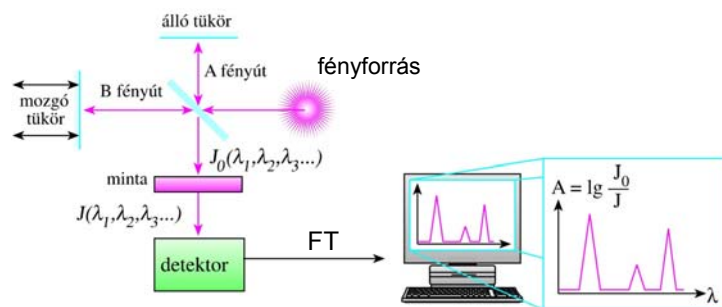


Fourier transzformációs spektrométer



tk 6.17 ábra

58



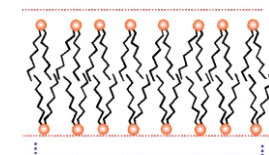
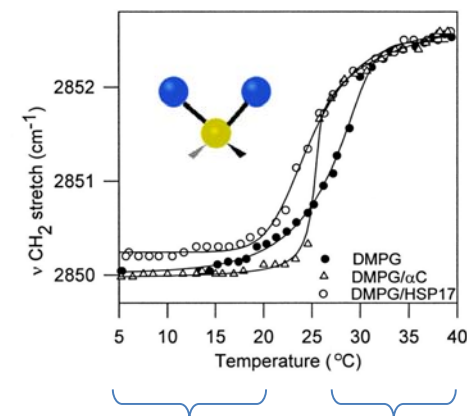
tk 6.18 ábra

59

Alkalmazások

lipid
kettősréteg
fázisátalakulása

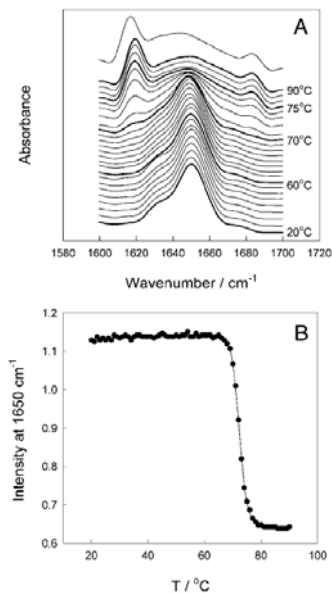
hő-sokk fehérjék
kölsönhatása
a lipidréteggel



60

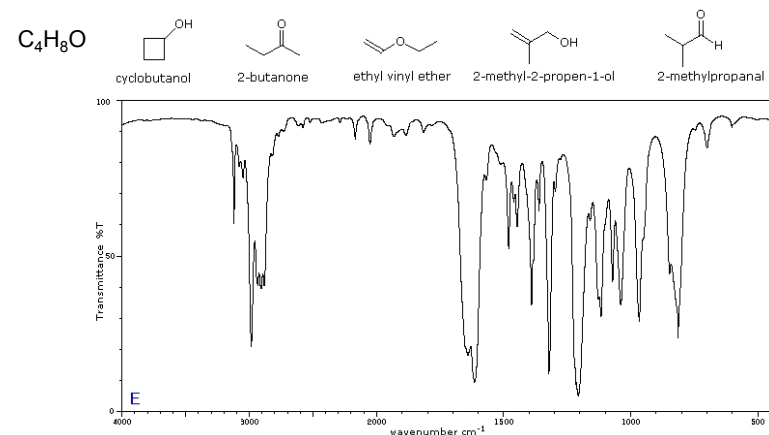
Alkalmazások

fehérjedenaturáció



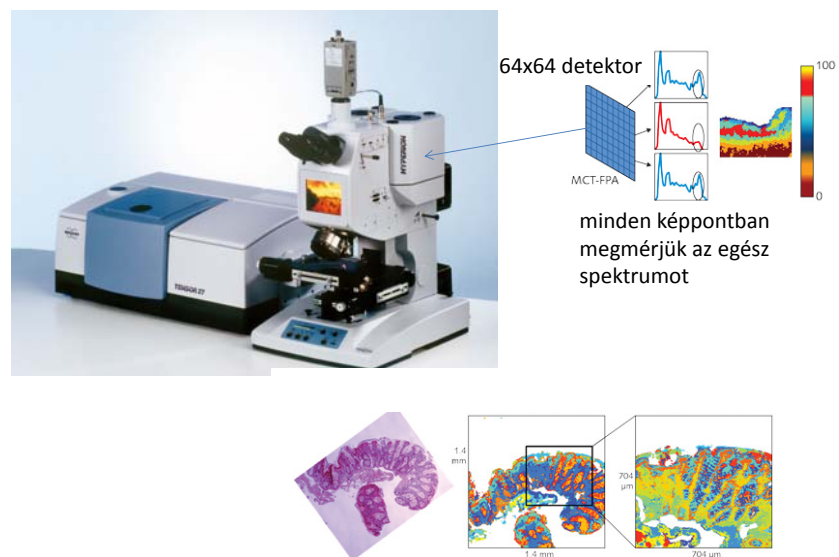
Meersman és mtsai. Biophys J.

Molekula azonosítás



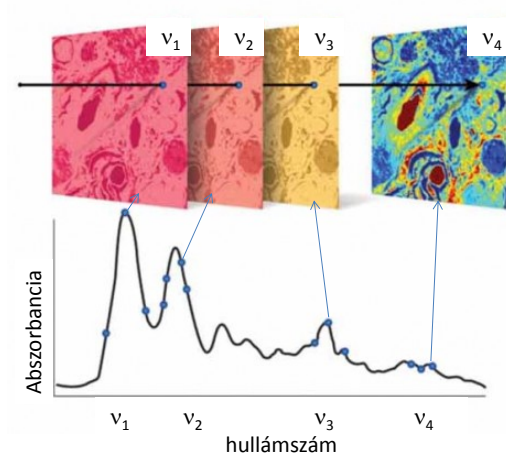
<http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectry/InfraRed/infrared.htm>

Infravörös mikroszkópia

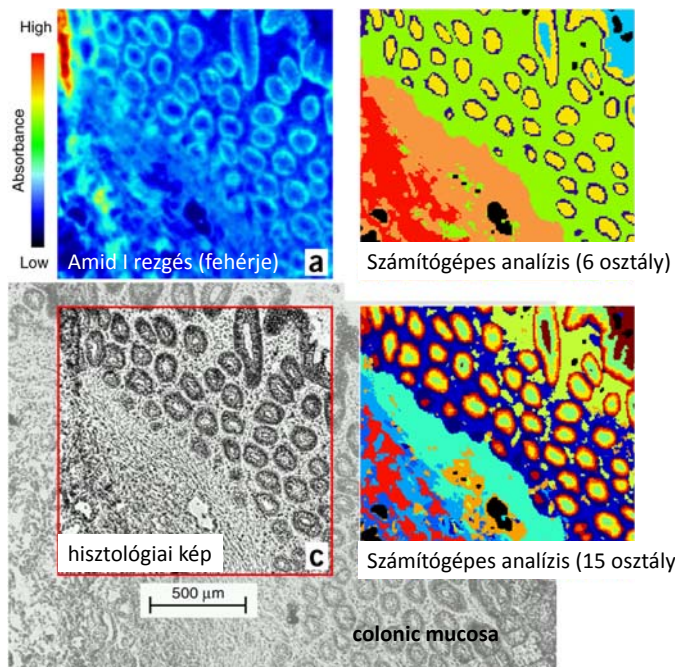


63

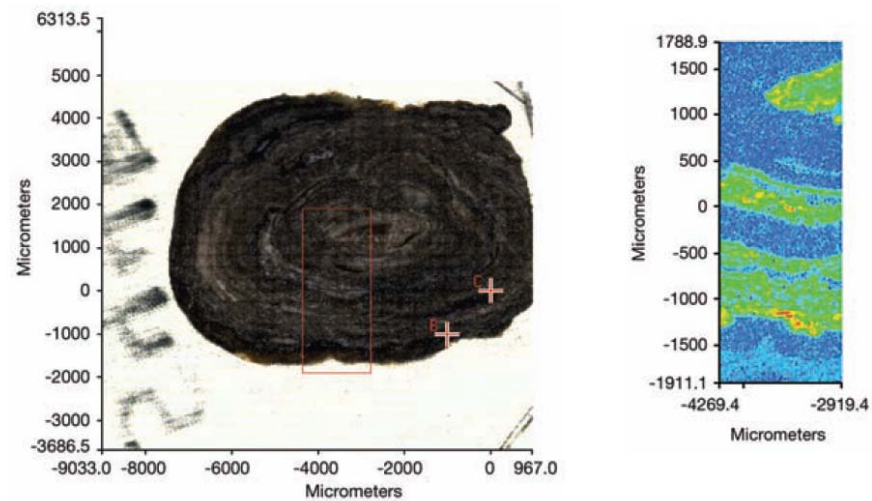
Infravörös mikroszkópia



64



Vesekövek osztályozása IR mikrospektroszkópiával



66

vége