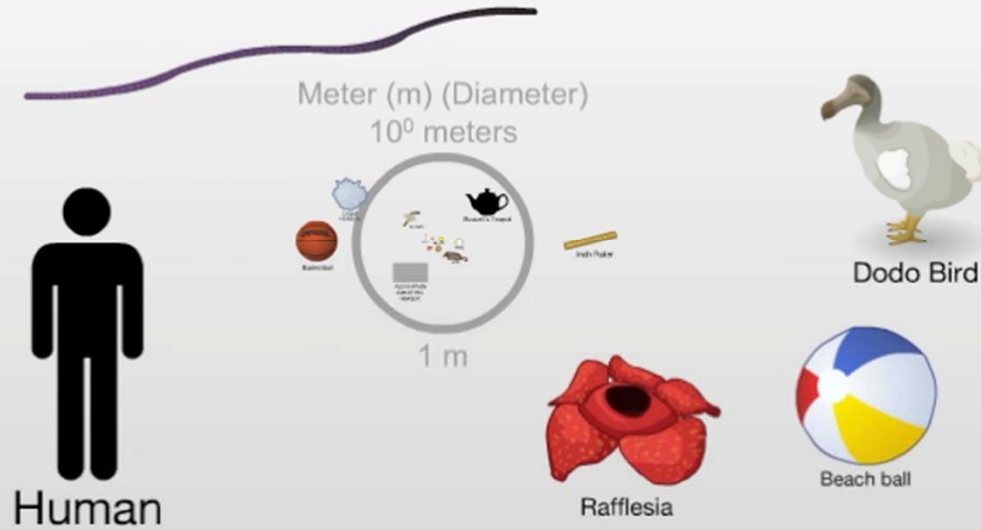


Biomolekuláris szerkezet és dinamika

tömegspektrometria, infravörös spektroszkópia, röntgendiffrakció,
számítógépes szimuláció

Balog Erika

Giant Earthworm



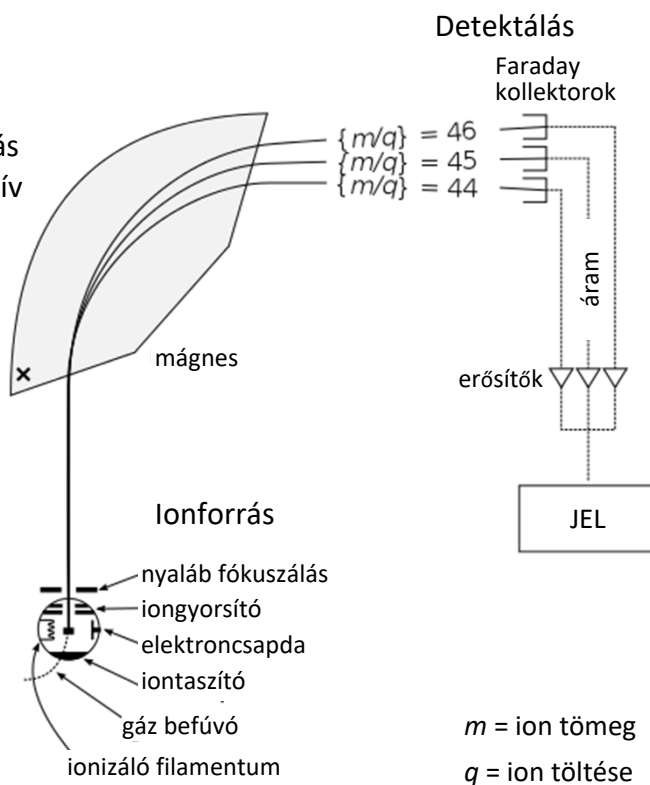
$10^{0.0}$

Tömegspektrometria

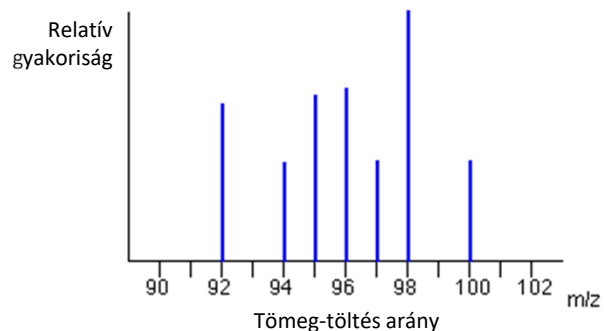
- a minta atomjai és molekulái tömegeinek eloszlását mérő analitikai módszer. A megmért spektrum a minta elemi (izotóp) ujjlenyomata.

Lépések:

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



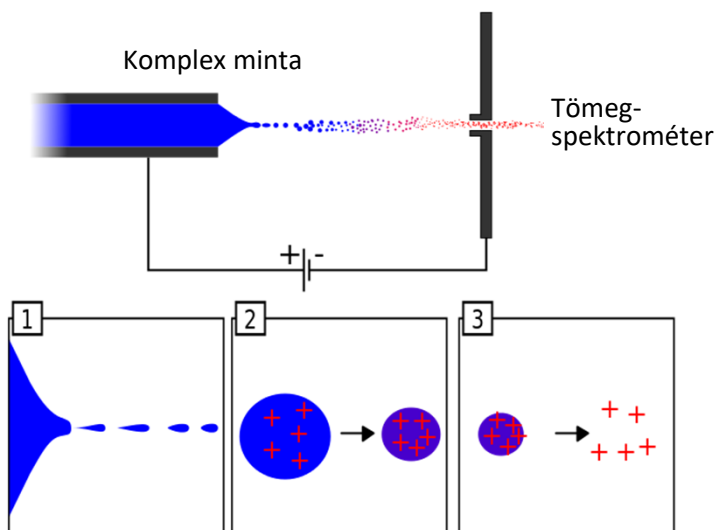
Eredmény: "Vonal" diagram



A spektrumot szerkezeti adatbázissal vetjük össze.

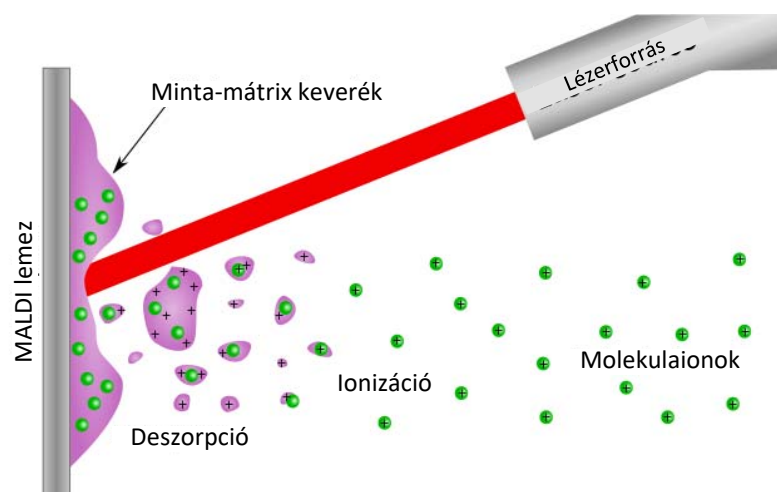
Biológiai mintáknál alkalmazott ionizációs módszerek

Elektrospray ionizáció



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

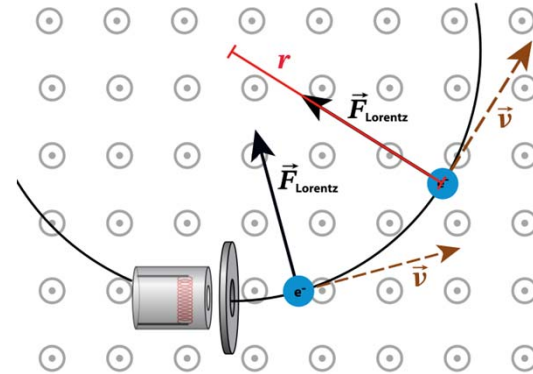
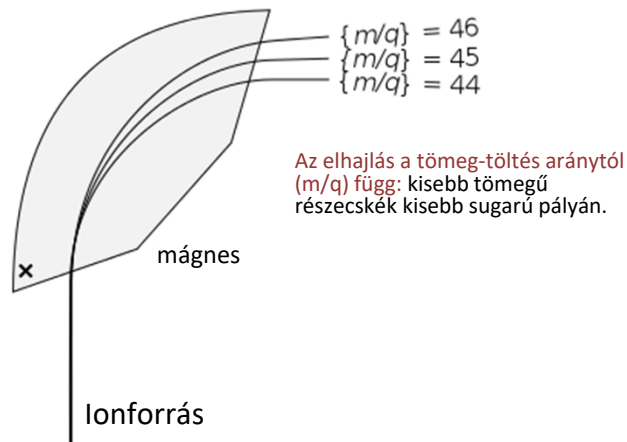
MALDI: “matrix-assisted laser desorption/ionization”



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

Tömeganalízis módszerei 1.

Mágneses módszer



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

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

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

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

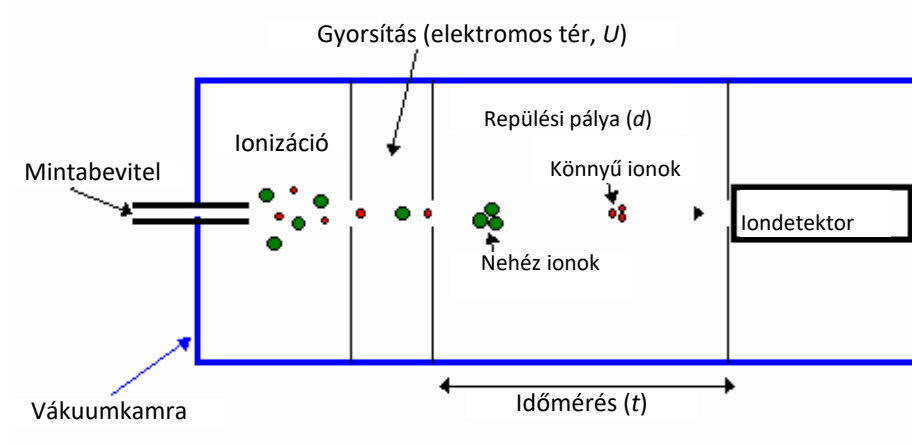
$$r = \frac{m}{q} \frac{v}{B}$$

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)



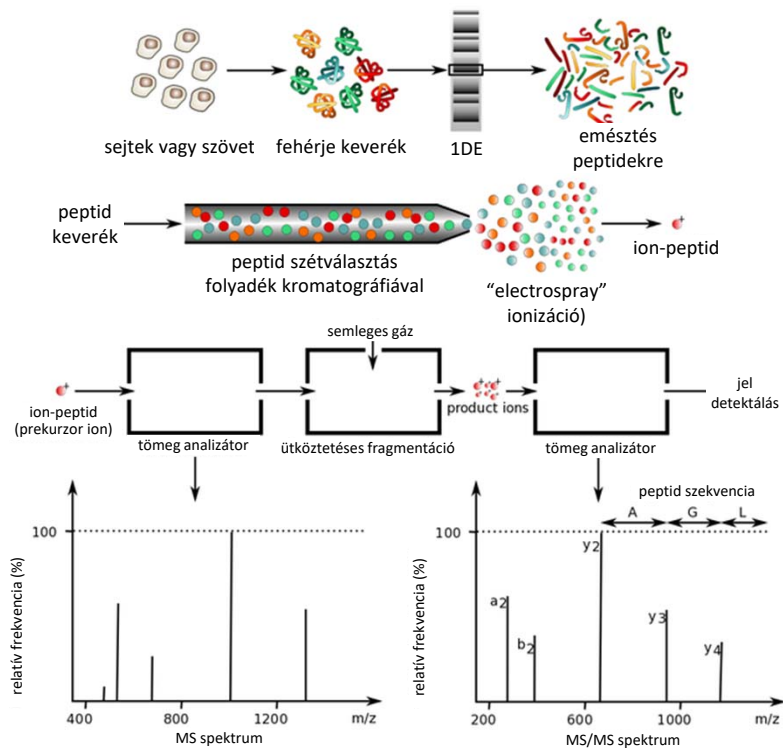
$$qU = \frac{1}{2}mv^2 = \frac{1}{2}m\left(\frac{d}{t}\right)^2$$

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

melyből a részecskére jellemző m/q meghatározható

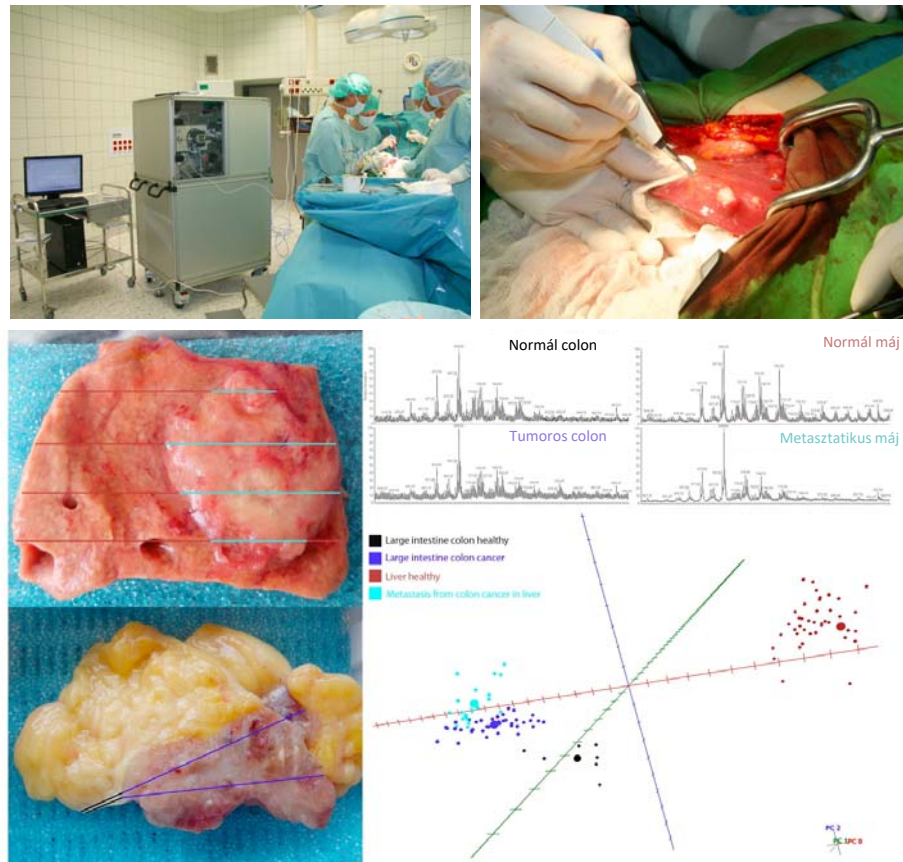
Tömegspektrometriás alkalmazások

1. Fehérje analitika (proteomika)



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

3. Valós idejű szövetanalízis ("onkokés")



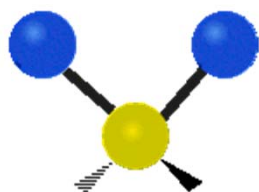
Infravörös (IR) spektroszkópia

- molekulák rezgőmozgásait méri.

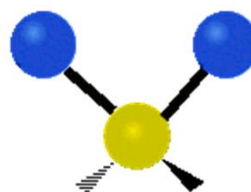
Rezgés (vibráció): periodikus mozgás a kovalens kötés mentén

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

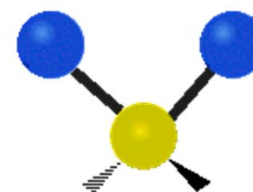
Rezgőmozgás a
háromatomos metilén
csoportban (-CH₂-):



Aszimmetrikus nyúlás



Szimmetrikus nyúlás

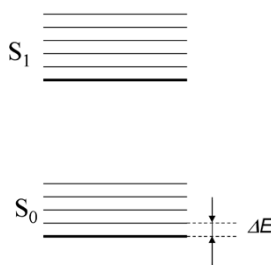


Torziós rezgés (ollózás)

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:

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

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

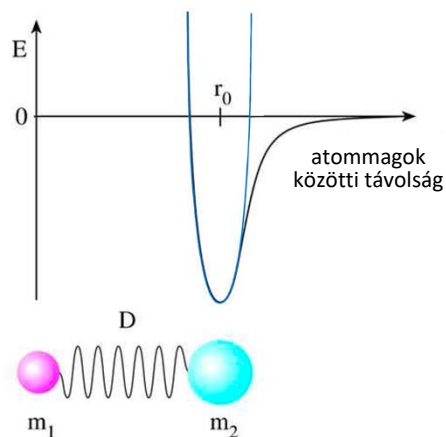
$$UV/látható > \text{közép IR} > \text{távoli IR}$$

Molekuláris rezgések

(lásd: Rezonancia gyakorlat)

Molekula: rugóval összekötött tömeg

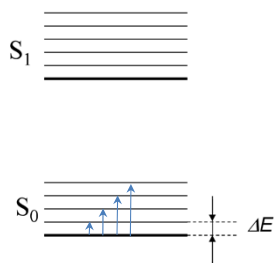
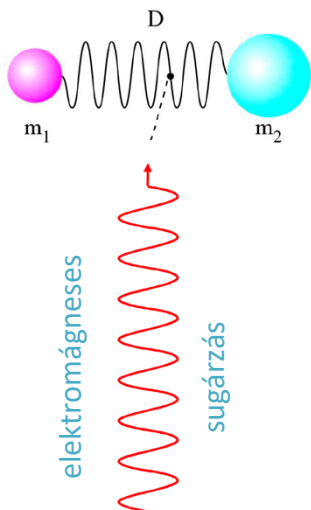
- kétatomos molekula (pl. CO)
- tömegek (m_1, m_2): atommagok ($m_e \ll m_{\text{mag}}$)
- rugó: kovalens kötés
- r_0 : egyensúlyi atommagok közötti távolság
- D : rugóállandó
- kölcsönhatási energia
távolságfüggése: parabola $E = Dx^2/2$



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

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:

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

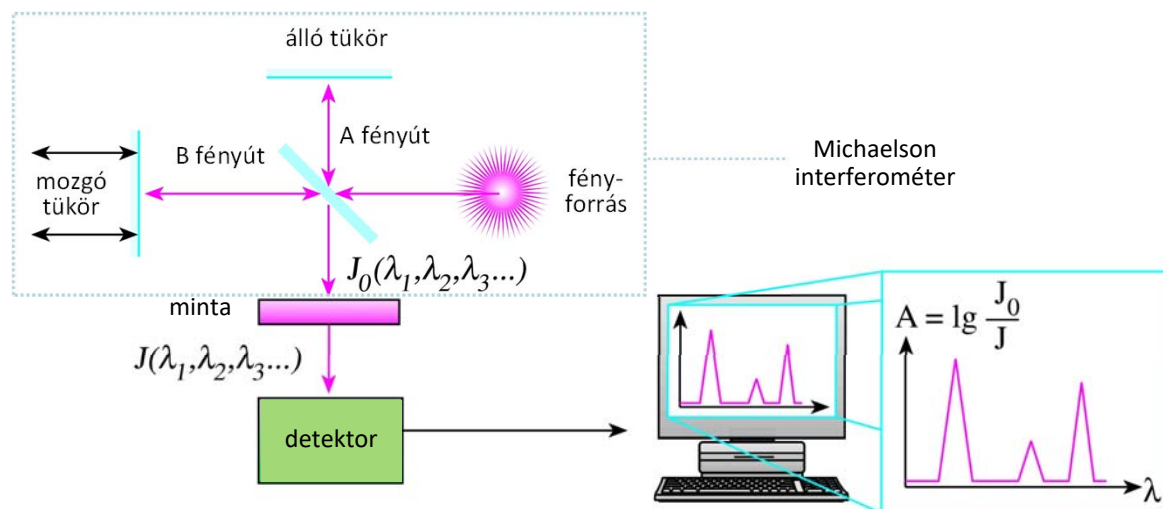
Értékek a CO molekulára: mért hullámszám, $\nu = 2143 \text{ cm}^{-1}$

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

Infravörös (IR) spektroszkópia - mérés

Fourier Transform Infravörös (FTIR) Spektroszkópia:

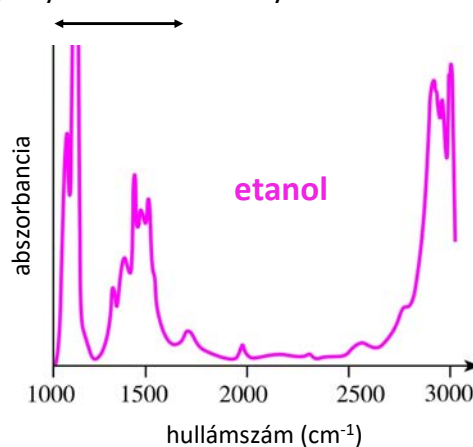
- hullámhossz kombinációt generálunk (Michelson interferométerrel)
- A hullámhossz-kombinációnál mért intenzitásokat átszámoljuk a hullámhossz függvényében megadott intenzitásokká.



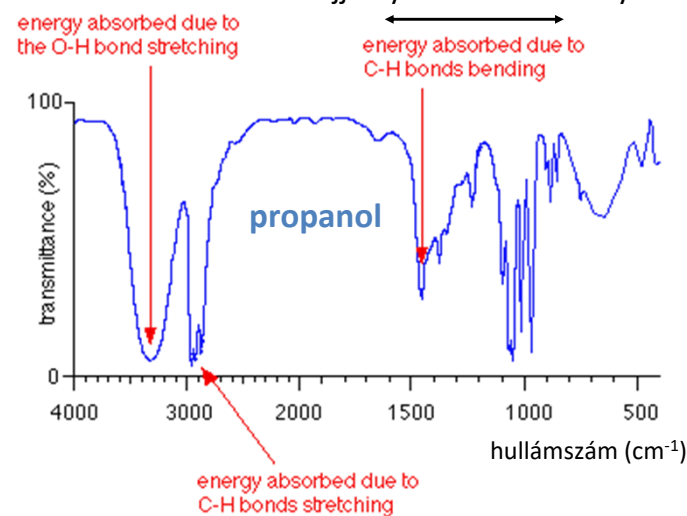
IR spektrum:

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

“Ujjlenyomat” tartomány

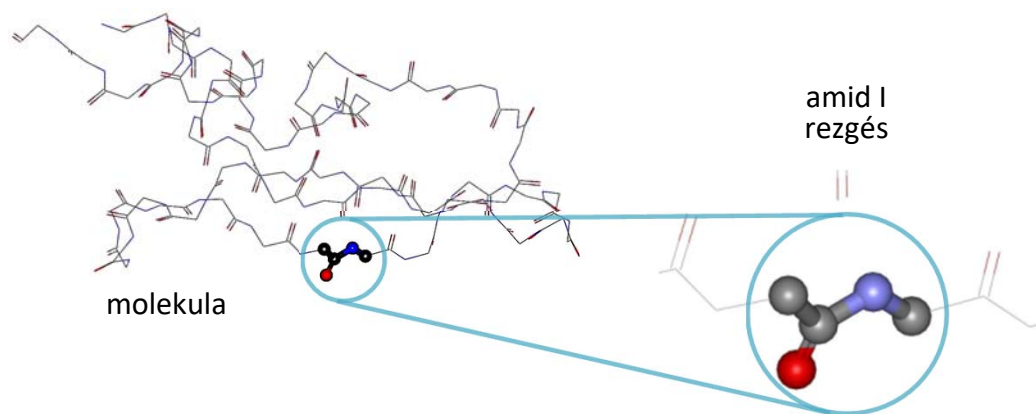
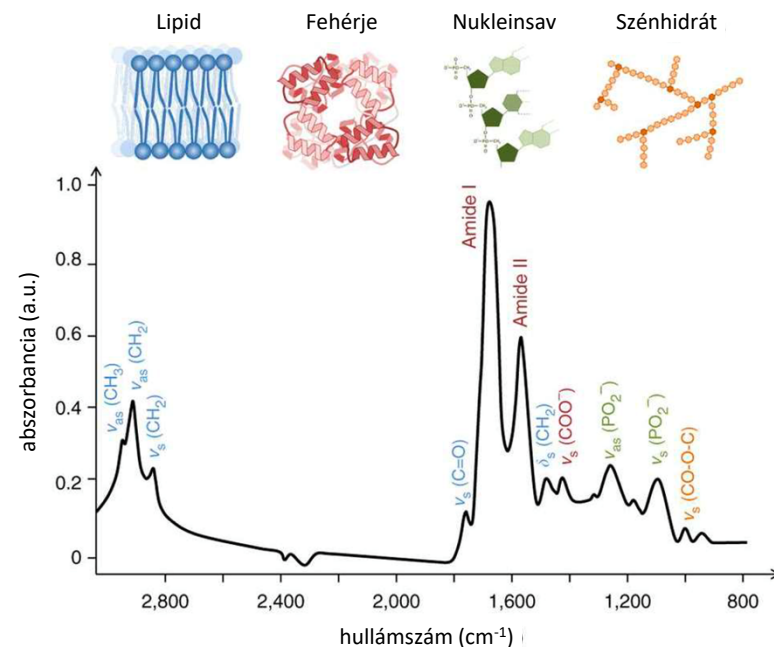


“Ujjlenyomat” tartomány

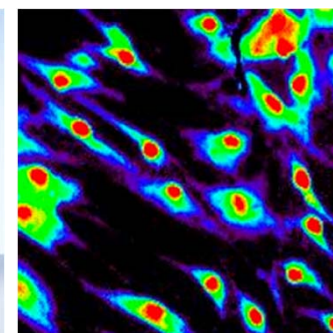


IR spektroszkópiás alkalmazások

- 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.
- N.B.: vizes mintákban, a víz elnyelése miatt, nehéz vizet (D_2O) használhatnak.



FTIR mikroszkópia

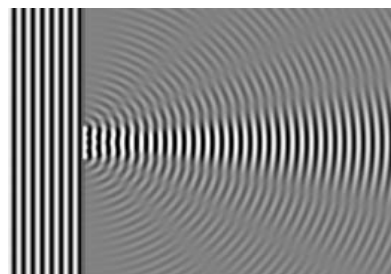
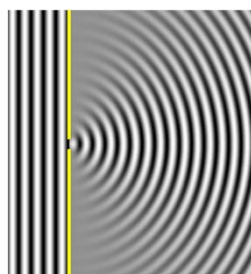
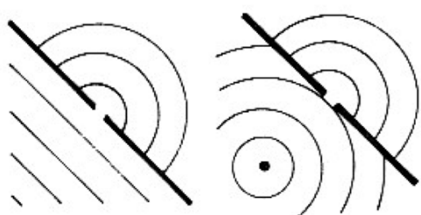


Bőr fibroblasztok, képpalkotás
1224 cm^{-1} hullámszámnál

Röntgen diffrakció, kristallográfia

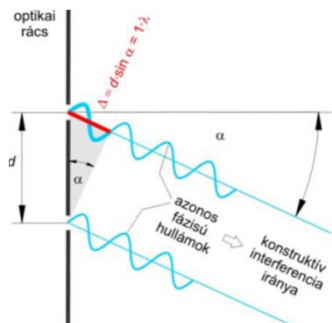
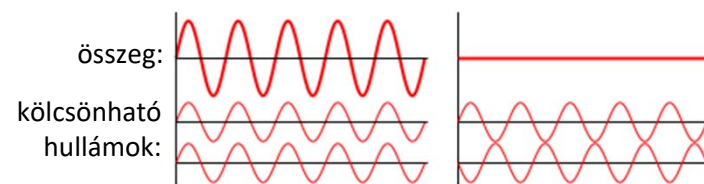
Alapja: hullámelhajlás és interferencia

Hullámhosszal azonos nagyságrendű, vagy a hullámhossznál kisebb méretű rés.



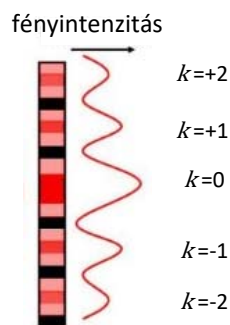
+1
0
-1

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

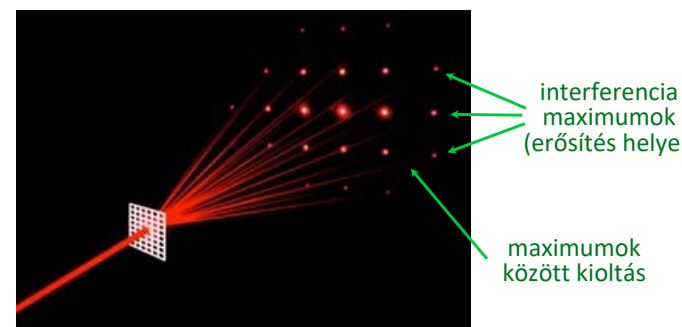


Rácsállandó (d) és hullámhossz (λ) összemérhetők

1D rács interferencia képe



2D rács interferencia képe

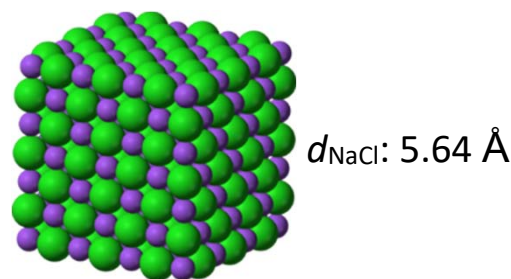
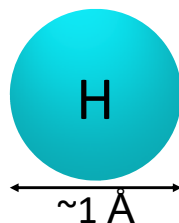


Interferencia maximum feltétele:

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

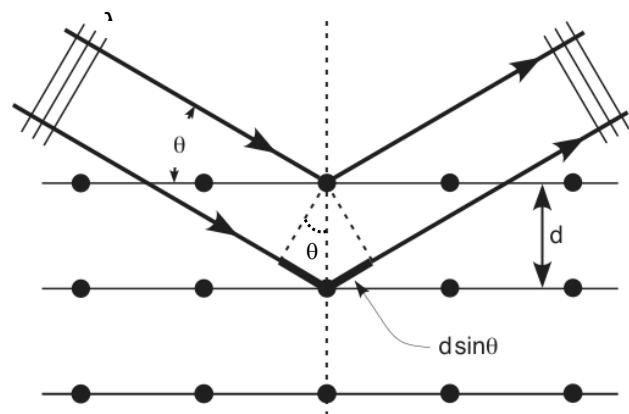
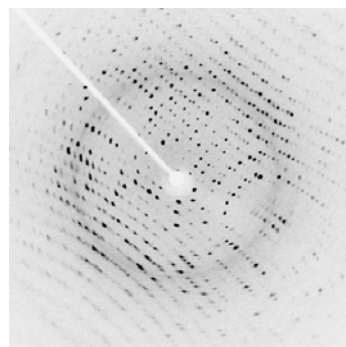
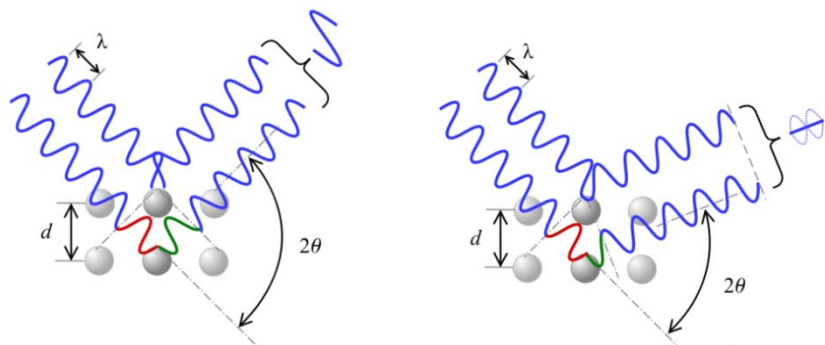
$$d = k \frac{\lambda}{\sin \alpha} \quad k = 0, \pm 1, \pm 2 \dots$$

Molekula térszerkezete



Milyen sugárzáshoz kellene használni egy molekularácshoz?

$\lambda_{\text{rtg}}: 0.01\text{-}10 \text{ nm} = 0.1\text{-}100 \text{ Å}$

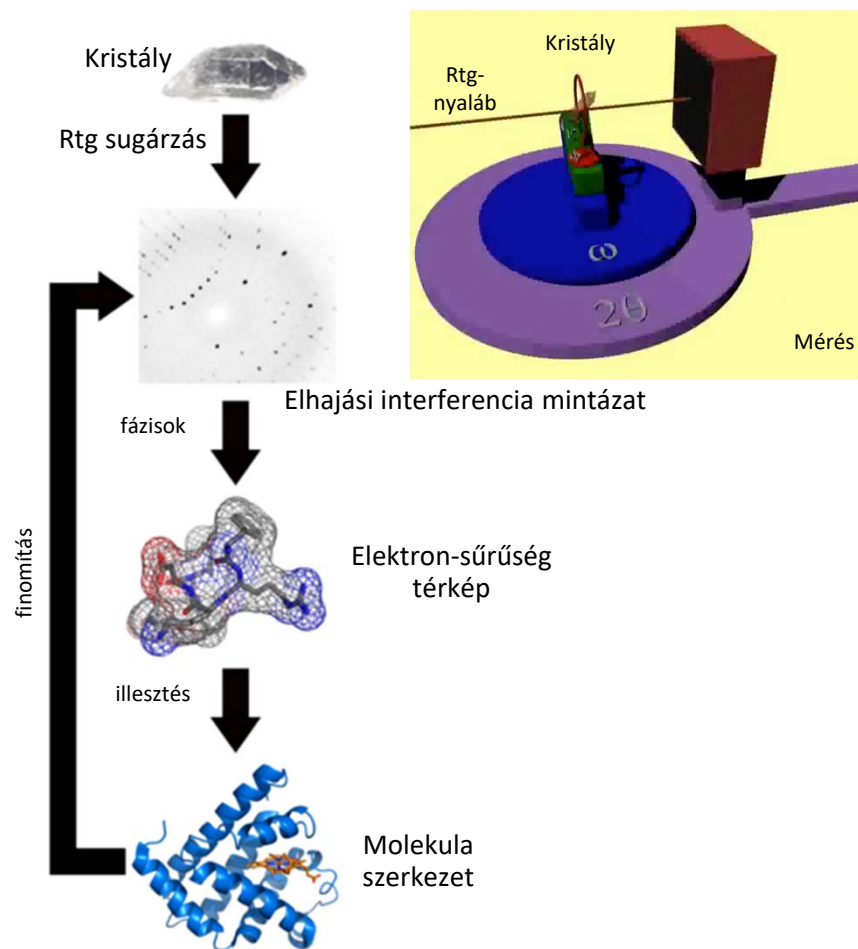


Interferencia maximum feltétele:

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

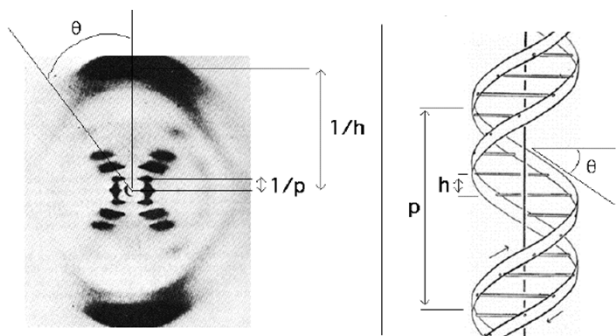
bonyolultabb...

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

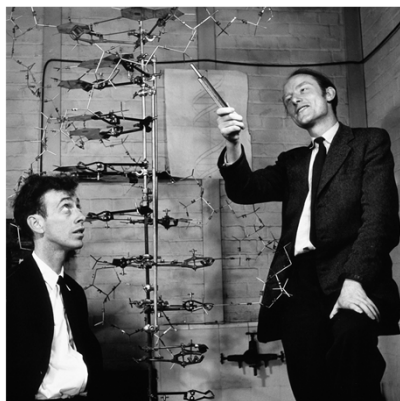


Molekulaszerkezet meghatározása röntgen-krisztallográfiával

dsDNS



θ 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

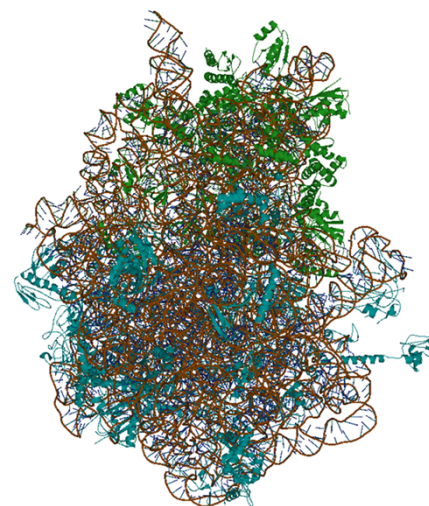


~1200 atom



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

Molekulakomplex:
riboszóma



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

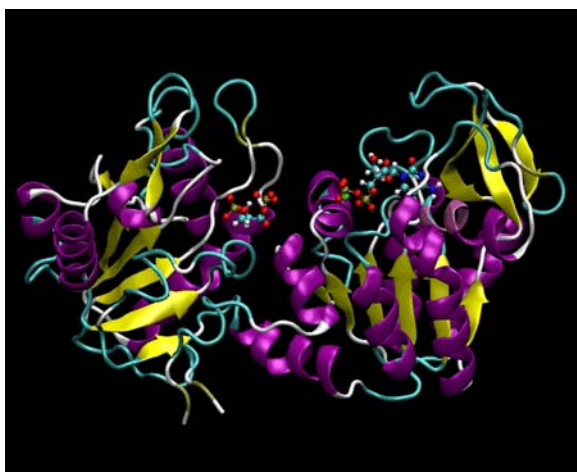


V. Ramakrishnan, T. A. Steitz, A. E. Yonath
Nobel díj 2009

Szerkezet - Funkció

Röntgen kristallográfia:

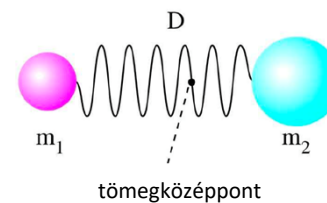
molekula 3D *szerkezete* – statikus kép



atomi koordináták

FTIR:

kötések *rezgése*i



rugóállandók

Melyek a molekula
funkcionális
mozgásai?

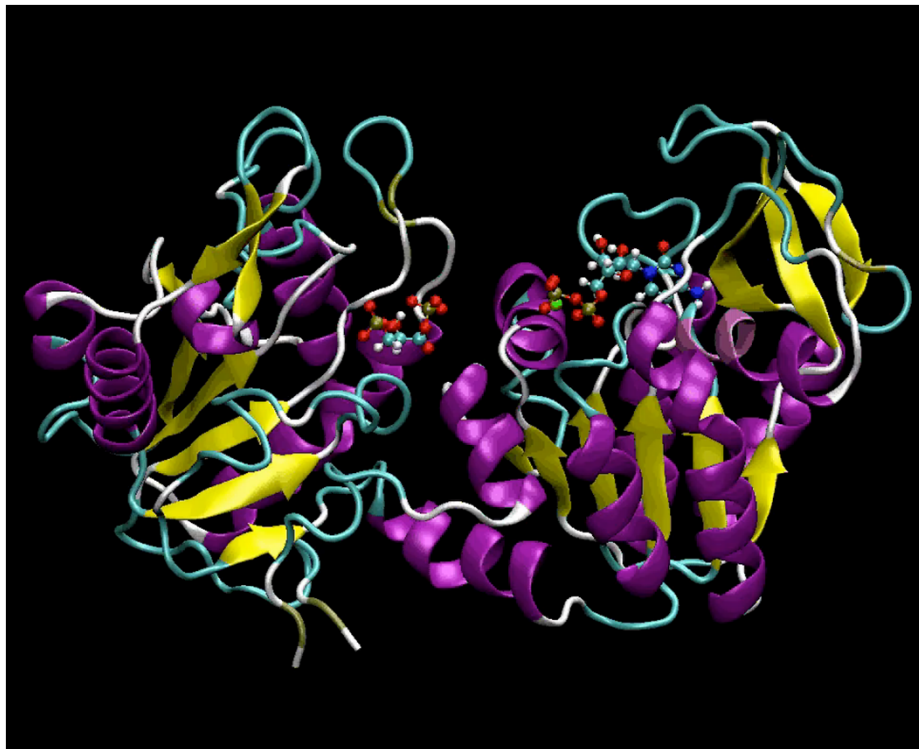
MolekulaDinamikai (MD) szimuláció

fehérjék belső mozgásait számolja

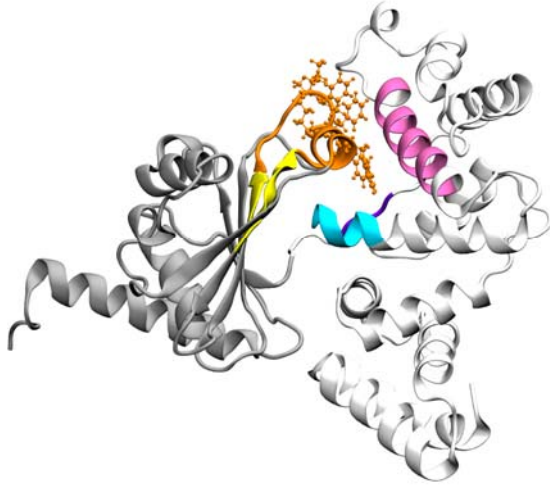
Molekuláris dinamikai szimuláció

Cél:

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



foszfoglicerát kináz (PGK)



RalF:

- légionárius betegséget (súlyos tüdőgyulladás) okozó vírus effektora.

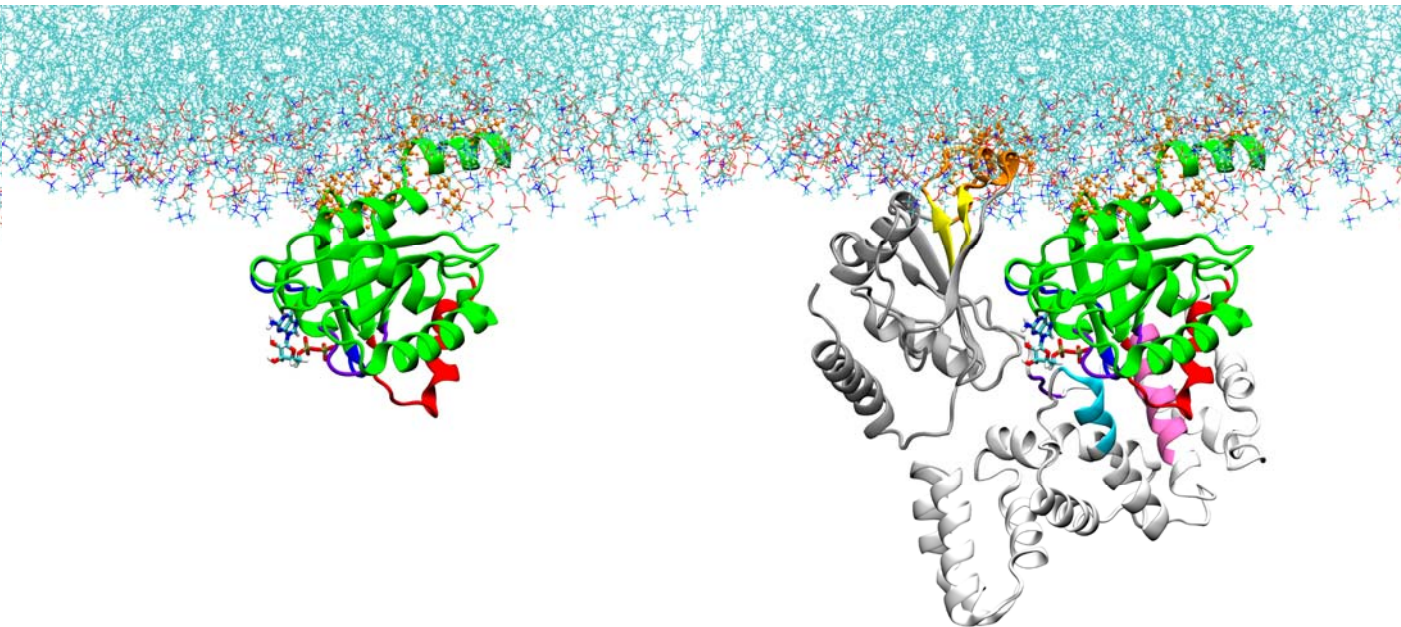
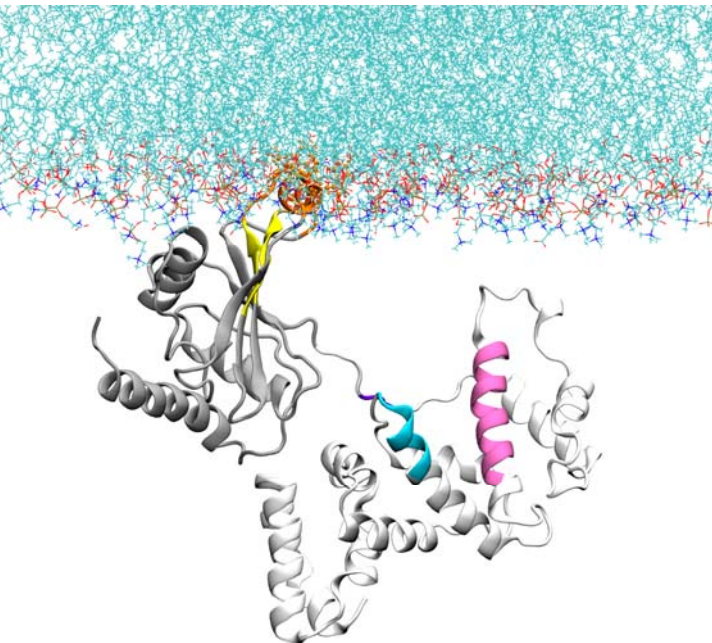
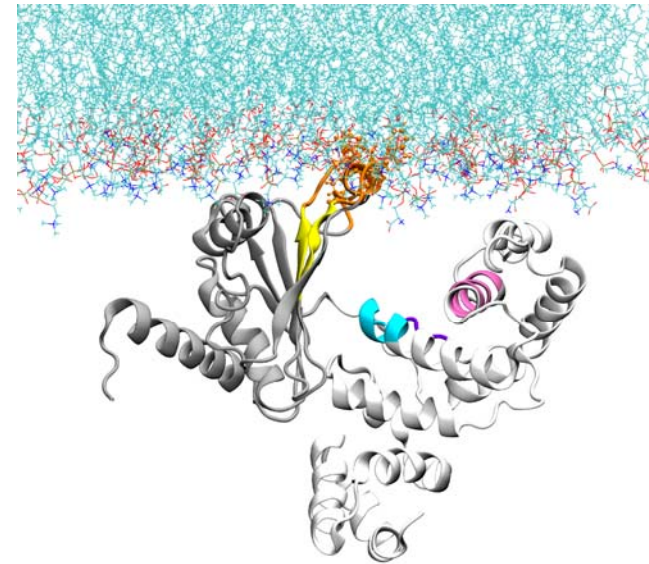
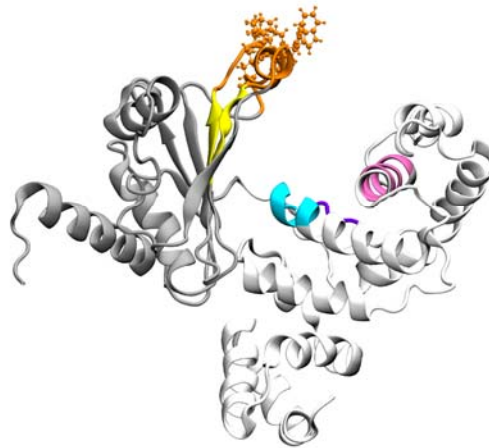
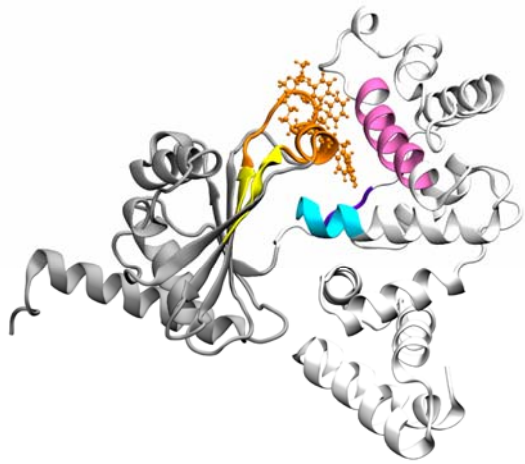
Kísérlet:

- 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