Rentgenska kristalografija - difrakcija rentgenskih žarkov na kristalih proteinov

NMR spektroskopija – magnetne lastnosti jeder atomov v proteinu

Krio-elektronska mikroskopija – za večje delce (> 500 kDa)

Ostale tehnike:

spektroskopske metode – CD, intrinzična fluoresenca (Trp, Tyr, Phe)

Tehnike dinamičnega in statičnega sipanja svetlobe – za določanje velikosti

Ozkokotno rentgensko sipanje – velikost in oblika molekul

Namen poskusa je posneti difrakcijski vzorec proteinskega kristala.





Teoretično podlago sipanja rentgenskih žarkov daje Braggov zakon.





Kristal si predstavljamo kot vzporedne ravnine atomov. Žarki, ki se elastično sipajo z ekvivalentnih ravnin, so v fazi. Njihove amplitude se seštejejo.

Molekule v kristalu morajo biti **urejene** in **homogene**.

- 1. Priprava materiala izolacija proteina vzorec mora biti čist in homogen
- 2. Kristalizacija proteina protein velikost 0.1 do 0.5 mm
- 3. Zbiranje podatkov snemanje difrakcijskega vzorca
- 4. Določevanje (reševanje) strukture

Proteini rastejo iz prenasičenih raztopin. Vzorec skoncentriramo in zmešamo s kristalizacijskim pufrom, ki lahko vsebuje soli, organska topila, precipitante (PEG, amonijev sulfat, MPD, ...). Ponavadi moramo preizkusiti več (veliko) pogojev (tipično v formatu plošč z 48 ali 96 luknjicami). Postopki so lahko avtomatizirani (prihranek časa in <u>materiala</u>).

Microbatch crystallisation technique



Proteini rastejo iz prenasičenih raztopin. Vzorec skoncentriramo in zmešamo s kristalizacijskim pufrom, ki lahko vsebuje soli, organska topila, precipitante (PEG, amonijev sulfat, MPD, ...). Ponavadi moramo preizkusiti več (veliko) pogojev (tipično v formatu plošč z 48 ali 96 luknjicami). Postopki so lahko avtomatizirani (prihranek časa in <u>materiala</u>).



Če gre vse po sreči:



Kvaliteta posnetih podatkov je odvisna od:

Izvora rentgenskih žarkov

generator rentgenskih žarkov (npr. z rotirajočo anodo)/sinhrotron, monokromator, kolimator parametri: valovna dolžina, velikost žarka, intenziteta (flux)

<u>Kristala</u>

<u>Detektorja</u>

parametri: velikost, občutljivost, ločljivost, delovna razdalja, ...



CipKeBiP, center odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov (iz uradne brošure)



Bruker Proteum X8

Snemanje podatkov



Elettra Sinhrotron, Trst, XRD1 Beamline

Snemanje podatkov



Elettra Sinhrotron, Trst, XRD1 Beamline

Namen poskusa je posneti difrakcijski vzorec proteinskega kristala.

Za določitev strukture celotnega proteina moramo posneti vseh možne reflekse.

Geometrija kristalne mreže:

Oblika in dimenzije **osnovne celice** (najmanjše ponavljajoče se enote) **Prostorska skupina** (230 možnih iz kombinacije 32 točkovnih skupin (simetrijskih operacij) in 14 Bravaisov mrež; npr. **P** 2₁ 2₁ 2₁)

14 Bravaisovih mrež

Elektronska gostota:

Iz elektronske gostote določimo položaje vseh atomov v osnovni celici.

Da iz difrakcijskega vzorca izračunamo elektronsko gostoto, potrebujemo informacije o valovni dolžini, amplitudah in fazah sipanih žarkov.

Fazni problem: faze sipanih žarkov se spremenijo zaradi interference med sipanimi žarki.

Reševanje faznega problema:

- Derivatizacija proteinskega kristala s težkimi kovinami temelji na primerjavi difrakcijskih vzorcev derivatiziranega in nederivatiziranega kristala
- Anomalno sipanje pri več valovnih dolžinah temelji na absorbciji rentgenskih žarkov na določenih težkih atomih.
- Molekulska zamenjava temelji na faziranju z znano strukturo sorodnega (ali identičnega) proteina.

Interpretacija elektronske gostote:

- 1. <u>Gradnja modela</u> ponavadi na podlagi znane primarne strukture
- 2. <u>Refinement</u> optimizacija geometrije in kristalografskih parametrov

Dele strukture umeščamo v elektronsko gostoto (v obliki mreže) na podlagi znanih stereokemijskih omejitev.

Končni rezultat je model, ki se bolj ali manj ujema z eksperimentalnimi podatki (el. gostoto). **Resolucija** je merilo za kakovost podatkov in določa kako fine detajle strukture lahko vidimo.

4 Å

2,8 Å

2,3 Å

1,8 Å

Končni rezultat je model, ki se bolj ali manj ujema z eksperimentalnimi podatki (el. gostoto). **Resolucija** je merilo za kakovost podatkov in določa kako fine detajle strukture lahko vidimo.

Končni rezultat je model, ki se bolj ali manj ujema z eksperimentalnimi podatki (el. gostoto). **Resolucija** je merilo za kakovost podatkov in določa kako fine detajle strukture lahko vidimo. *Statistika iz PDB:*

Končni rezultat je model, ki se bolj ali manj ujema z eksperimentalnimi podatki (el. gostoto). Ujemanje modela z eksperimentalnimi podatki ocenjujemo s **kristalografskim R faktorjem**, ki lahko zavzame vrednosti od 0 (popolno ujemanje modela s podatki) do 0.6 (naključno porazdeljeni atomi v osnovni celici).

Kot merilo za kakovost modela se je v zadnjih letih uveljavil **prosti R faktor** R_{free} – pri tej metodi določen delež refleksov (5 – 10 %, *testni set*), ločimo od preostalih podatkov (*delovni set*). Model zgradimo z delovnim setom, nato pa izračunamo ujemanje modela s testnim setom = R_{free} .

Statistika R_{free} faktorjev iz PDB:

Imenovan tudi Debye-Wallerjev faktor ali B-faktor. Opisuje nezanesljivost položaja vsakega atoma v kristalu. Pogojen je z resolucijo (pri nižji resoluciji so B faktorji navadno višji) lahko pa služi kot merilo urejenosti strukture v posameznih delih polipeptidne verige. Vrednosti pod 10 označujejo atome, katerih pozicije se med posameznimi molekulami v kristalu le malo razlikujejo. Vrednosti nad 50 označujejo atome, ki so zaradi gibljivosti v elektronski gostoti komaj vidni.

ATOM	135	ΝZ	LYS	А	17	-30.636	-15.590	71.397	1.00	13.24	Ň
ATOM	136	Ν	ASN	А	18	-28.587	-11.409	65.759	1.00	6.69	Ň
ATOM	137	CA	ASN	А	18	-27.915	-10.960	64.556	1.00	6.01	C
ATOM	138	С	ASN	А	18	-26.436	-11.275	64.692	1.00	5.99	C
ATOM	139	0	ASN	А	18	-25.756	-10.707	65.534	1.00	5.03	C
ATOM	140	CB	ASN	А	18	-28.112	-9.461	64.391	1.00	8.05	C
ATOM	141	CG	ASN	А	18	-27.768	-8.983	63.005	1.00	11.19	C
ATOM	142	OD1	ASN	А	18	-27.048	-9.649	62.258	1.00	14.61	C
ATOM	143	ND2	ASN	А	18	-28.291	-7.826	62.645	1.00	10.94	N
ATOM	144	Ν	GLN	А	19	-25.949	-12.186	63.862	1.00	8.23	N
ATOM	145	CA	GLN	А	19	-24.553	-12.607	63.900	1.00	8.93	C
ATOM	146	С	GLN	А	19	-23.585	-11.543	63.396	1.00	10.12	C
ATOM	147	0	GLN	А	19	-22.375	-11.687	63.542	1.00	12.13	C
ATOM	148	CB	GLN	А	19	-24.361	-13.903	63.114	1.00	10.28	C
ATOM	149	CG	GLN	А	19	-24.674	-13.783	61.642	1.00	11.68	C

Temperaturni faktor

Primer: kristalna struktura TY domene človeškega nidogena-1

<u>Primer</u>: Fab fragment lahke verige IgG

Primer: mioglobin

PDB 1MBO

Okupanca označuje v kolikšnem deležu molekul je prisoten nek atom.

ATOM	135	ΝZ	LYS	А	17	-30.636	-15.590	71.397	1.00	13.24	N
ATOM	136	Ν	ASN	А	18	-28.587	-11.409	65.759	1.00	6.69	N
ATOM	137	CA	ASN	А	18	-27.915	-10.960	64.556	1.00	6.01	С
ATOM	138	С	ASN	А	18	-26.436	-11.275	64.692	1.00	5.99	С
ATOM	139	0	ASN	А	18	-25.756	-10.707	65.534	1.00	5.03	0
ATOM	140	СВ	ASN	А	18	-28.112	-9.461	64.391	1.00	8.05	С
ATOM	141	CG	ASN	А	18	-27.768	-8.983	63.005	1.00	11.19	С
ATOM	142	OD1	ASN	А	18	-27.048	-9.649	62.258	1.00	14.61	0
ATOM	143	ND2	ASN	А	18	-28.291	-7.826	62.645	1.00	10.94	N
ATOM	144	Ν	GLN	А	19	-25.949	-12.186	63.862	1.00	8.23	N
ATOM	145	CA	GLN	А	19	-24.553	-12.607	63.900	1.00	8.93	С
ATOM	146	С	GLN	А	19	-23.585	-11.543	63.396	1.00	10.12	С
ATOM	147	0	GLN	А	19	-22.375	-11.687	63.542	1.00	12.13	0
ATOM	148	CB	GLN	А	19	-24.361	-13.903	63.114	1.00	10.28	С
ATOM	149	CG	GLN	А	19	-24.674	-13.783	61.642	1.00	11.68	С

Okupanca za atome proteina je ponavadi 1. Manjša od 1 je lahko v primerih:

- večih konformacij ostanka v proteinu
- liganda, ki je prisoten v večih konformacijah ali ni prisoten v vseh osnovnih celicah.

Okupanca

Okupanca označuje v kolikšnem deležu molekul je prisoten nek atom.

Dva primera alternativnih konformacij ostankov v proteinu.

http://pdb.rcsb.org

Elektronsko gostoto prikazujemo v obliki map. Poznamo več vrst map. Iz banke PDB lahko dobimo mape vrst 2mFo-DFc (statistično najmanj pristranska mapa elektronske gostote) in mFo-DFc (diferenčna mapa, ki prikazuje napake v modelu).

2mFo-DFc – modra

mFo-Fc

zelena – manjkajoča el. gostota v modelu rdeča – odvečna el. gostota v modelu

http://pdb.rcsb.org

Elektronsko gostoto prikazujemo v obliki map. Poznamo več vrst map. Iz banke PDB lahko dobimo mape vrst 2mFo-DFc (statistično najmanj pristranska mapa elektronske gostote) in mFo-DFc (diferenčna mapa, ki prikazuje napake v modelu).

2mFo-DFc – modra

mFo-Fc

zelena – manjkajoča el. gostota v modelu rdeča – odvečna el. gostota v modelu

http://www.phenix-online.org/presentations/latest/pavel_maps.pdf

Pri NMR merimo vpliv magnetnega polja na magnetna jedra atomov z neenakim številom protonov in nevtronov. V magnetnem polju se spini vseh jeder poravnajo v smeri magnetnega polja. Če vzorcec vzbudimo s pulzom radijske frekvence, bodo jedra ob relaksaciji oddala energijo, katere frekvenca bo odvisna od okolja, v katerem se atom nahaja. Položaj teh frekvenc glede na referenčni signal imenujemo **kemijski premik**.

NMR instrumenti

800 MHz NMR Spektrometer

600 MHz NMR Spektrometer

Slovenski NMR center (KI) (slike z uradne spletne strani www.nmr.ki.si)

1D spektri proteinov niso interpretabilni:

Za NMR proteinov se uporabljajo večdimenzionalni spektri:

Vrhovi izven diagonale predstavljajo protone, ki so si prostorsko blizu.

Za *ab initio* določevanje strukture so navadno potrebni še signali drugih atomov kot ¹H. Ker najpogostejši izotopi elementov v proteinih (¹²C, ¹⁴N, ¹⁶O) nimajo spinov, je potrebno proteine za NMR označiti z ustreznimi izotopi (¹³C, ¹⁵N). Zgornja meja velikosti molekul, katerim lahko določimo strukturo z NMR je okoli 30 kDa.

Na podlagi NMR eksperimentov identificiramo:

- Konformacije vezi med vezanimi atomi sekundarna struktura
- Sklopitve med atomi, ki so oddaljeni manj kot 5 Å v prostoru, a niso blizu v primarni strukturi (jedrni Overhauserjev efekt) – 3D struktura
- Rezidualne dipolarne sklopitve posledica vzorca proteinov, ki so le delno enako poravnani – informacija o fleksibilnosti konformacij posameznih delov proteina.

Rezultat eksperimentov je seznam omejitev (torzijskih kotov, razdalj,..), na podlagi katerih zgradimo več modelov, ki zadoščajo eksperimentalnim omejitvam. Rešitve nato ponavadi rangiramo glede na celokupno energijo molekule. Za razliko od kristalnih struktur, tiste rešene z NMR ponavadi vsebujejo več modelov (10-100), ki zadoščajo omejitvam.

<u>Primer</u>: antenapedia protein iz *Drosophile* Rezultat eksperimentov je seznam omejitev (torzijskih kotov, razdalj,..), na podlagi katerih zgradimo več modelov, ki zadoščajo eksperimentalnim omejitvam. Rešitve nato ponavadi rangiramo glede na celokupno energijo molekule. Za razliko od kristalnih struktur, tiste rešene z NMR ponavadi vsebujejo več modelov (10-100), ki zadoščajo omejitvam.

Primer: p41 fragment nevariantne verige MHC razreda II Rezultat eksperimentov je seznam omejitev (torzijskih kotov, razdalj,..), na podlagi katerih zgradimo več modelov, ki zadoščajo eksperimentalnim omejitvam. Rešitve nato ponavadi rangiramo glede na celokupno energijo molekule. Za razliko od kristalnih struktur, tiste rešene z NMR ponavadi vsebujejo več modelov (10-100), ki zadoščajo omejitvam.

<u>Primer</u>: γ **podenodta cGMP fosfodiesteraze** – primer intrinzično neurejene strukture.

Za študije delcev velikosti 100-1500 Å, $M_r 5 \times 10^5$ do 4×10^8 . Zgornja meja resolucije je lahko tudi 3-4 Å. Odlično se obnese v povezavi s kristalnimi strukturami na atomskem nivoju.

Dva načina izvedbe:

- Določanje strukture dvodimenzionalnih kristalov
- Rekonstrukcija struktur tridimenzionalnih delcev iz večih slik delcev v različnih orientacijah

Nekateri proteini tvorijo **dvodimenzionalne kristale**. Na takih kristalih se sipajo elektroni podobno kot rentgenski žarki. Faze se lahko določijo eksperimentalno. 2D kristale spontano tvorijo nekateri membranski proteini, da se pa pripraviti 2D kristale tudi drugih (membranskih) proteinov, ki takih struktur spontano ne tvorijo. S to metodo so leta 1975 določili strukturo bakteriorodopsina.

Baza EM struktur (EMDB) je na voljo na naslovu <u>http://www.ebi.ac.uk/pdbe/emdb</u>.

Primer: bakteriofag T7 v procesu okužbe E. coli

<u>Primer</u>: piruvat-feredoksin oxidoreduktaza katalizira pretvorbo piruvata v acetil-CoA v anaerobnih bakterijah. Encim v *D. vulgaris* je oktamer – njegovo strukturo so določili s cryo-EM do resolucije 17 Å. Nato so na podlagi atomske strukture homologa iz *D. africanus* (69% identičnost) zgradili model oktamera.

<u>Primer</u>: piruvat-feredoksin oxidoreduktaza katalizira pretvorbo piruvata v acetil-CoA v anaerobnih bakterijah. Encim v *D. vulgaris* je oktamer – njegovo strukturo so določili s cryo-EM do resolucije 17 Å. Nato so na podlagi atomske strukture homologa iz *D. africanus* (69% identičnost) zgradili model oktamera.

vsaka veriga ima 1232 AK (cca. 134 kDa)

<u>Primer</u>: piruvat-feredoksin oxidoreduktaza katalizira pretvorbo piruvata v acetil-CoA v anaerobnih bakterijah. Encim v *D. vulgaris* je oktamer – njegovo strukturo so določili s cryo-EM do resolucije 17 Å. Nato so na podlagi atomske strukture homologa iz *D. africanus* (69% identičnost) zgradili model oktamera.

<u>Primer</u>: konformacijske spremembe integrina $\alpha V\beta 3$ ob vezavi fibronektina.

<u>Primer</u>: konformacijske spremembe integrina $\alpha V\beta 3$ ob vezavi fibronektina.

integrin $\alpha V\beta 3$

integrin $\alpha V\beta 3$ + fibronektin

> diferenčna mapa

Adair B D et al. J Cell Biol 2005;168:1109-1118

<u>Primer</u>: konformacijske spremembe integrina $\alpha V\beta 3$ ob vezavi fibronektina.

<u>Primer</u>: konformacijske spremembe integrina $\alpha V\beta 3$ ob vezavi fibronektina.

Adair B D et al. J Cell Biol 2005;168:1109-1118