

Tajemství molekul DNA a bílkovin

Metody určování jejich atomární struktury

Martin Malý

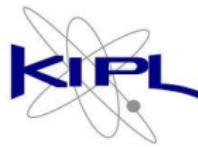
Laboratoř strukturní biologie

Katedra inženýrství pevných látek FJFI ČVUT v Praze, ČR

Laboratoř struktury a funkce biomolekul

Biotechnologický ústav AV ČR, BIOCEV, Vestec u Prahy, ČR

21.4.2020 – U3V na Jaderce



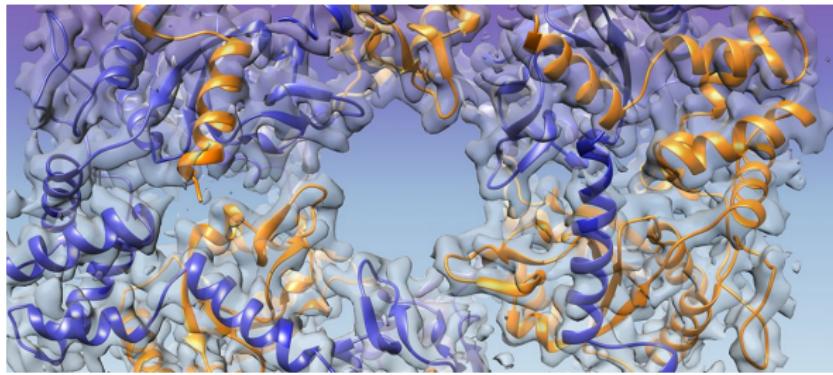
BIOCEV



Akademie věd
České republiky

Struktura dnešního povídání

- ① Biologické makromolekuly
 - Nukleové kyseliny
 - Bílkoviny
- ② Metody určování jejich struktury
 - Kryogenní elektronová mikroskopie (Cryo-EM)
 - Nukleární magnetická rezonance (NMR)
 - **Makromolekulární krystalografie (MX)**
- ③ Určené struktury významných makromolekul
 - Určení struktury enzymu PETasy, DNA a ribozomu
 - **Struktura viru SARS-CoV-2 a jeho proteasy (Cryo-EM, MX)**



Biologické makromolekuly

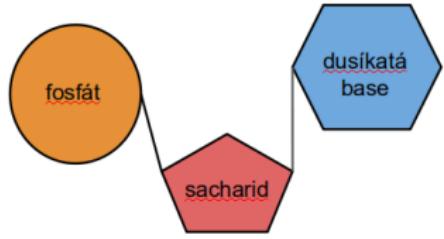
nukleové kyseliny a bílkoviny



Nukleové kyseliny

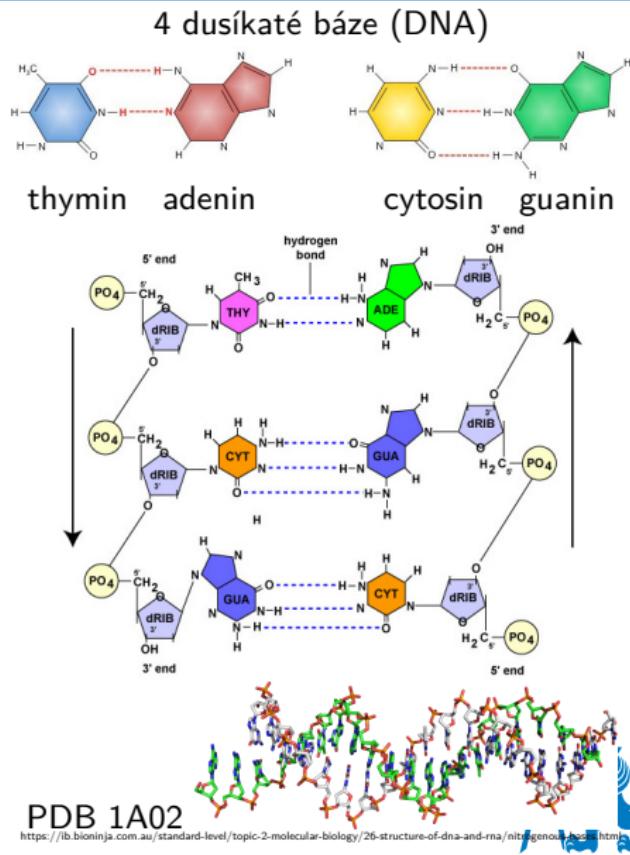
DNA – deoxyribonukleová kys.

- Největší makromolekula v buňce
- Obsahuje veškeré informace nutné k syntéze všech biomolekul v buňce
- Dvoujítá šroubovice



RNA – ribonukleová kys.

- Různé typy (tRNA, mRNA...)
(většinou jednovláknová)
- Uracil místo thyminu

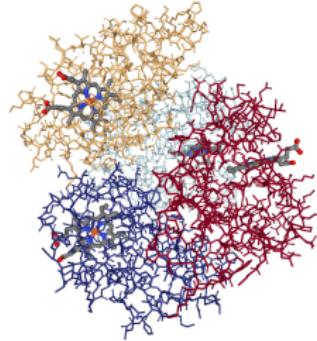


PDB 1A02

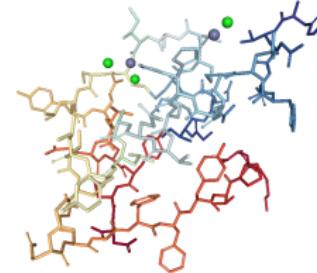
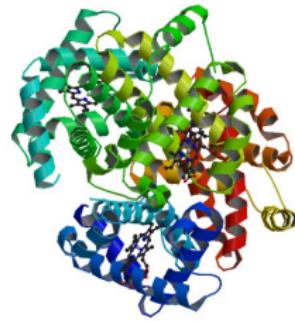
<https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-2-molecular-biology/26-structure-of-dna-and-rna/nitrogenous-bases.html>

Bílkoviny = proteiny

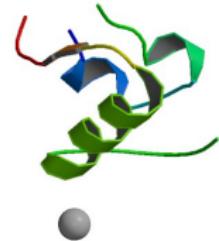
- Obrovské molekuly – tisíce atomů
- Základní **stavební** a **funkční** složka organismů
- Některé umožňují průběh konkrétních chemických reakcí (tzv. **enzymy**)
- Např. hemoglobin, insulin, imunoglobulin, ribozom
- Biopolymery – složeny z 20 základních aminokyselin
- **Prostorovou strukturu nelze spolehlivě předpovědět**
- Aplikace: medicína, farmaceutický průmysl, biotechnologie



hemoglobin (PDB 5WOG)

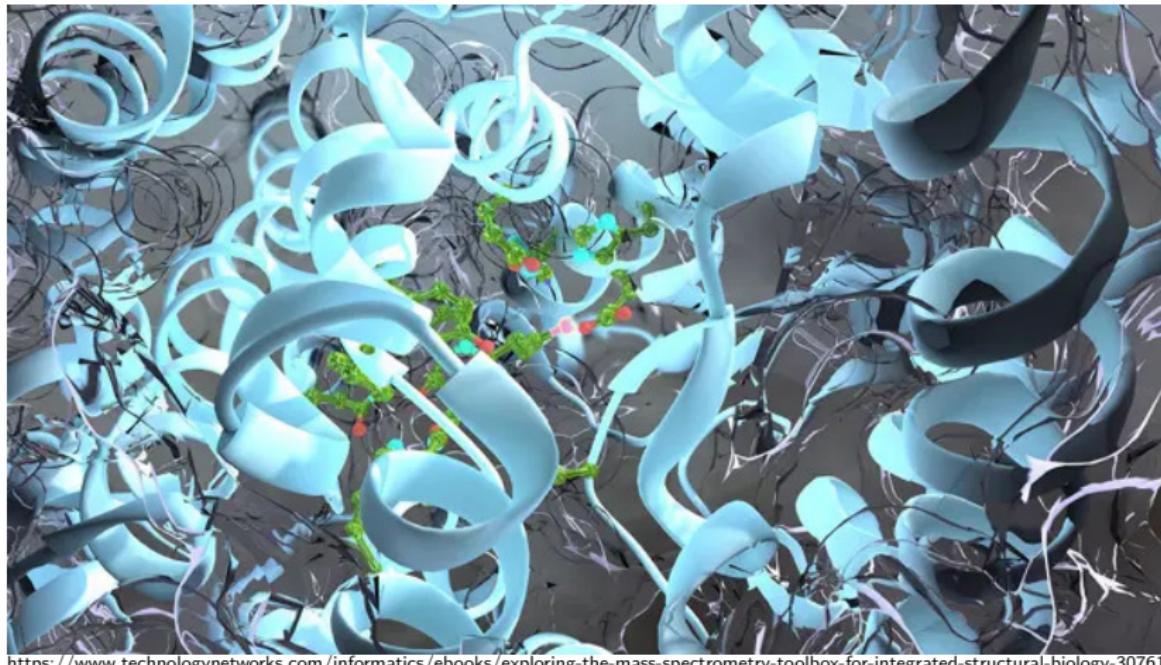


insulin (PDB 1ZNI)



Znalost struktury a funkce biomolekul

- Pochopení buněčných procesů (např. metabolických drah)
- Návrh nových léčiv
- Biotechnologie (např. proteinové inženýrství)
- ...



<https://www.technologynetworks.com/informatics/ebooks/exploring-the-mass-spectrometry-toolbox-for-integrated-structural-biology-307610>



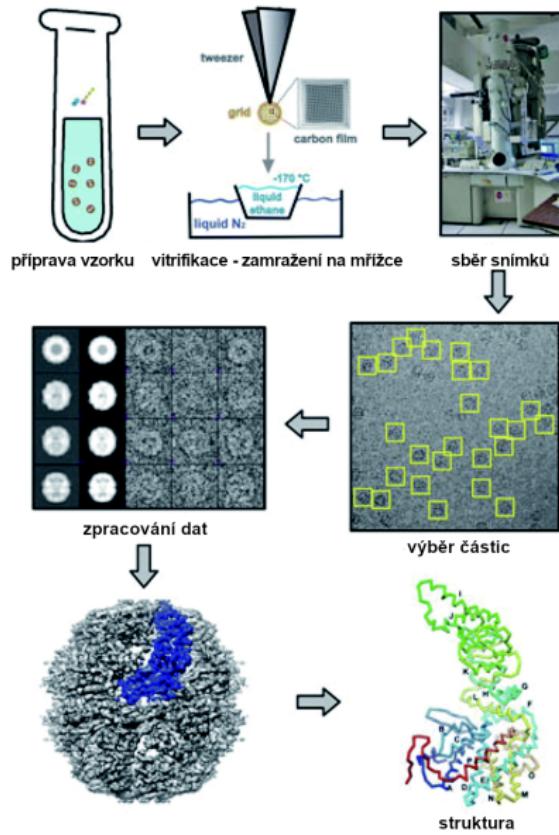
Metody studia struktury makromolekul



Kryogenní elektronová mikroskopie (CryoEM)
Nukleární magnetická rezonance (NMR)
Makromolekulární krystalografie (rentg. difrakce)



Kryogenní elektronová mikroskopie (CryoEM)

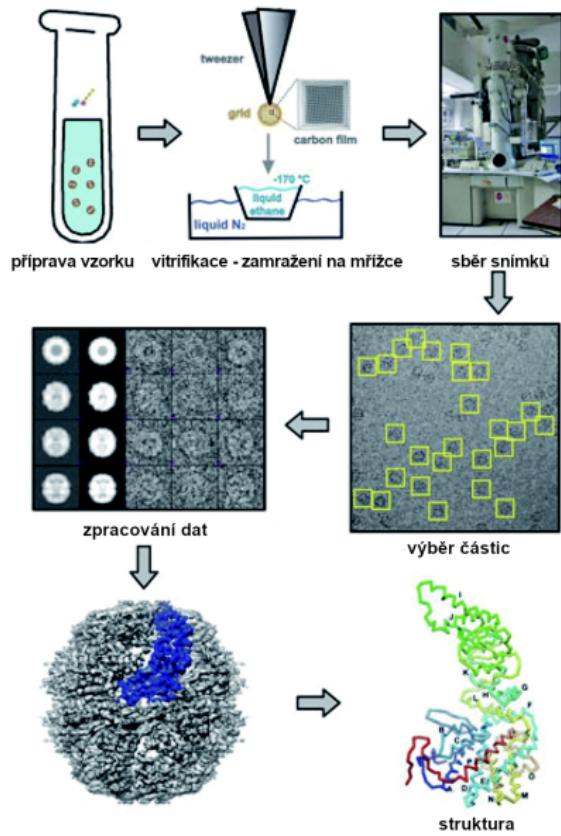


- Poměrně nová metoda, rychlý vývoj
- Vitrifikace vzorku – nalít na podložku a zamrazit na cca -170 °C
- Tisíce snímků – různé orientace

Weissman KJ, *Nat. Prod. Rep.*, (2015), 32:436-453



Kryogenní elektronová mikroskopie (CryoEM)



- Poměrně nová metoda, rychlý vývoj
- Vitrifikace vzorku – nalít na podložku a zamrazit na cca -170 °C
- Tisíce snímků – různé orientace

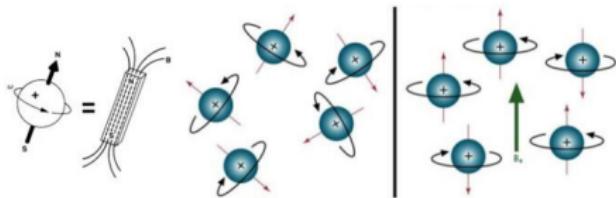
Přednosti a nedostatky metody

- + Není třeba krystalizovat
- Nepříliš dobré rozlišení (ale stále se zlepšuje)
- Nevhodné po studiu dynamiky
- + Vhodné pro opravdu velké molekuly (viry, proteinové komplexy)

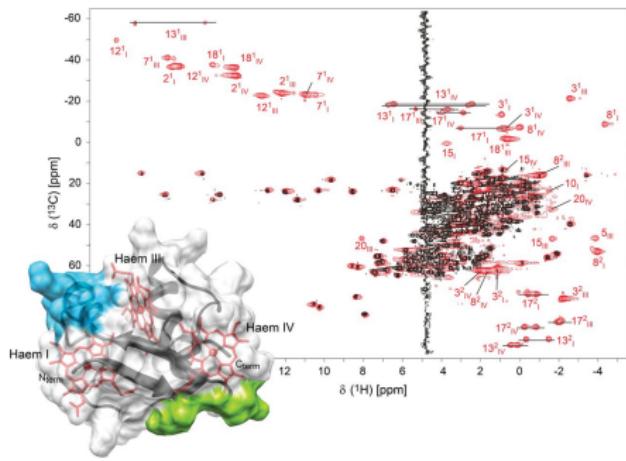
Weissman KJ, *Nat. Prod. Rep.*, (2015), 32:436-453



Nukleární magnetická rezonance (NMR)



https://www.creative-biostructure.com/comparison-of-crystallography-nmr-and-em_6.htm

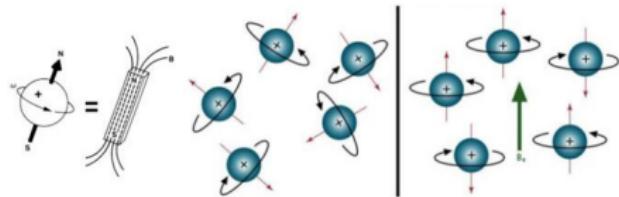


Leonor Morgado et al. (2012) Biochem. Soc. Trans. 40: 1295–1301

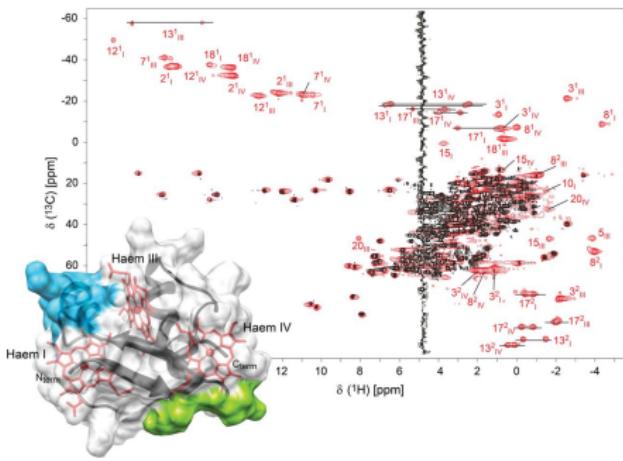
- Atomové jádro – kladně nabité, rychle se točí
⇒ má *magnetický moment*
- Rezonanční frekvence
- Měření v silném magnetickém poli
- Spektra přenosu magn. momentu
- Značení míst v molekule – izotopy



Nukleární magnetická rezonance (NMR)



https://www.creative-biostructure.com/comparison-of-crystallography-nmr-and-em_6.htm



Leonor Morgado et al. (2012) Biochem. Soc. Trans. 40: 1295–1301

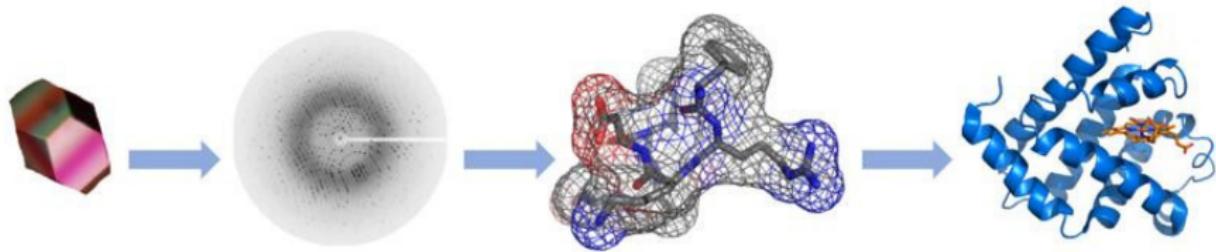
- Atomové jádro – kladně nabité, rychle se točí
⇒ má *magnetický moment*
- Rezonanční frekvence
- Měření v silném magnetickém poli
- Spektra přenosu magn. momentu
- Značení míst v molekule – izotopy

Přednosti a nedostatky metody

- + Není třeba krystalizovat
- + Studium dynamiky
- Vhodné jen pro malé molekuly (peptidy)

Makromolekulární krystalografie

- Trik: použijeme krytal
(tj. periodické a symetrické uspořádání molekul)
⇒ Můžeme použít aparát popisující periodické systémy



monokrystal

difrakční snímek

mapa elektronové hustoty

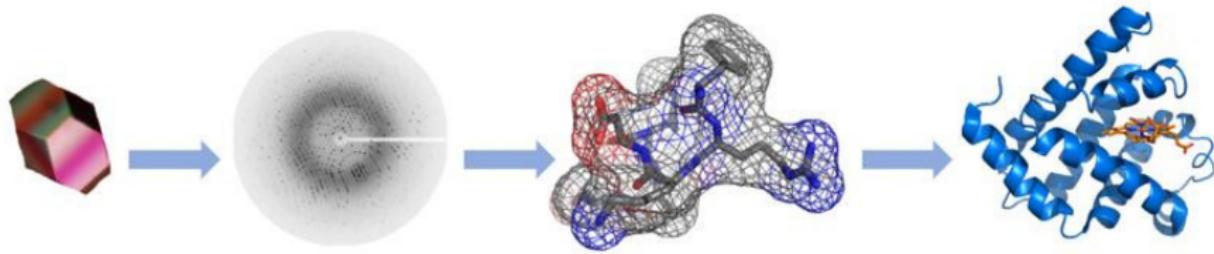
atomární struktura

https://www.creative-biostructure.com/comparison-of-crystallography-nmr-and-em_6.htm



Makromolekulární krystalografie

- Trik: použijeme krytal
(tj. periodické a symetrické uspořádání molekul)
⇒ Můžeme použít aparát popisující periodické systémy



monokrystal

difrakční snímek

mapa elektronové hustoty

atomární struktura

https://www.creative-biostructure.com/comparison-of-crystallography-nmr-and-em_6.htm

Přednosti a nedostatky metody

- + Často opravdu dobré rozlišení
- + Vhodné pro molekuly různých velikostí
- + Poměrně dostupná metoda
- Nutná krystalizace
- Nepříliš vhodné po studiu dynamiky

Metody studia struktury makromolekul



Kryogenní elektronová mikroskopie (CryoEM)

Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Makromolekulární krystalografie (rentg. difrakce)

KROK ZA KROKEM

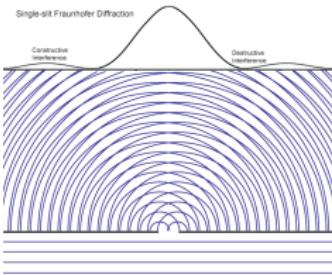


Interference záření – skládání vln

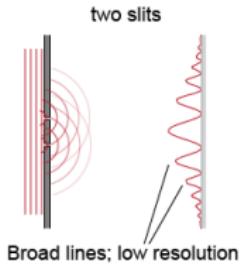
Interferenční jevy – pokud vln. délka je srovnatelná s velikostí štěrbin

Pozorujeme maxima („sečtené vlny“) a minima („odečtené vlny“)

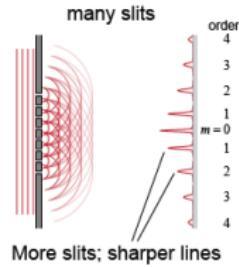
1 štěrbina



2 štěrbiny



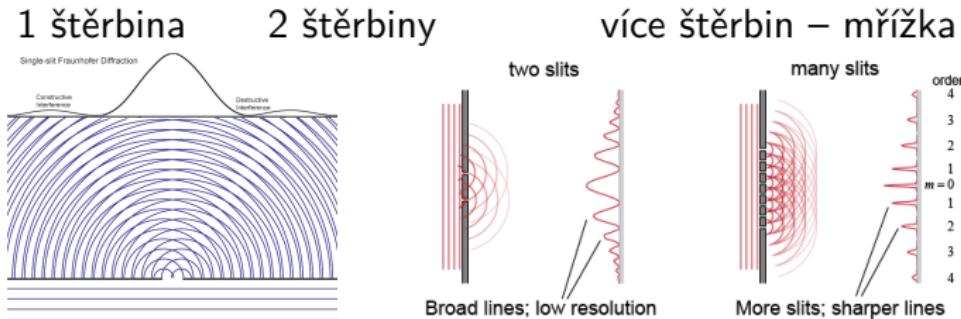
více štěrbin – mřížka



Interference záření – skládání vln

Interferenční jevy – pokud vln. délka je srovnatelná s velikostí štěrbin

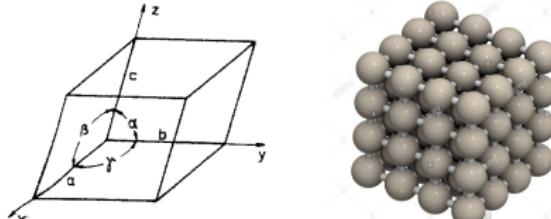
Pozorujeme maxima („sečtené vlny“) a minima („odečtené vlny“)



Použijeme krystal jako mřížku!

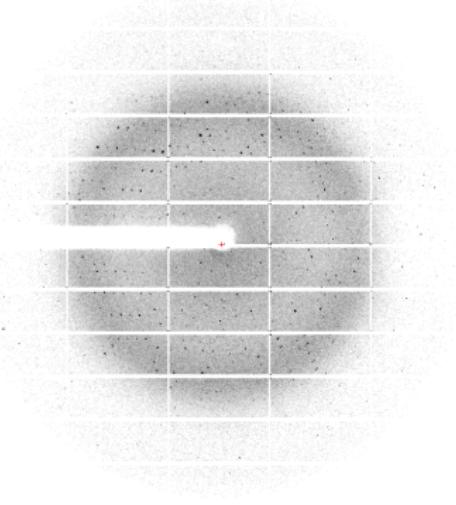
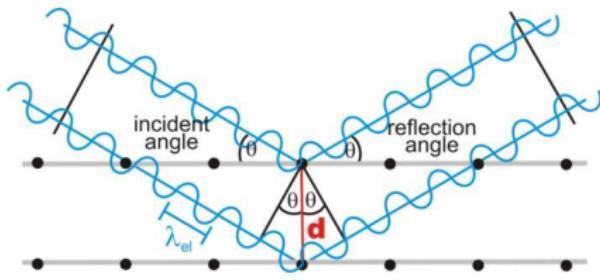
Jeho báze je uspořádána periodicky a s určitou symetrií.

Mřížkové parametry charakterizující základní buňku: \vec{a} , \vec{b} , \vec{c} , α , β , γ



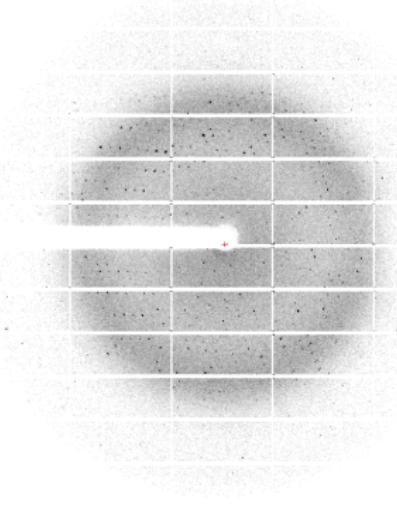
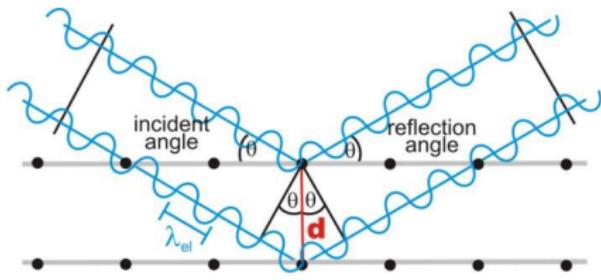
Difrakce záření na krystalu

- Dopadající elektromagnetická vlna
- Vlnová délka srovnatelná se vzdál. mezi atomy
⇒ rentgenové záření (vlnová délka $\lambda \approx 0,1 \text{ nm} = 1 \text{ \AA}$) je nevhodnější
- Rozptyl záření na elektronovém obalu



Difrakce záření na krystalu

- Dopadající elektromagnetická vlna
- Vlnová délka srovnatelná se vzdál. mezi atomy
⇒ rentgenové záření (vlnová délka $\lambda \approx 0,1 \text{ nm} = 1 \text{ \AA}$) je nevhodnější
- Rozptyl záření na elektronovém obalu

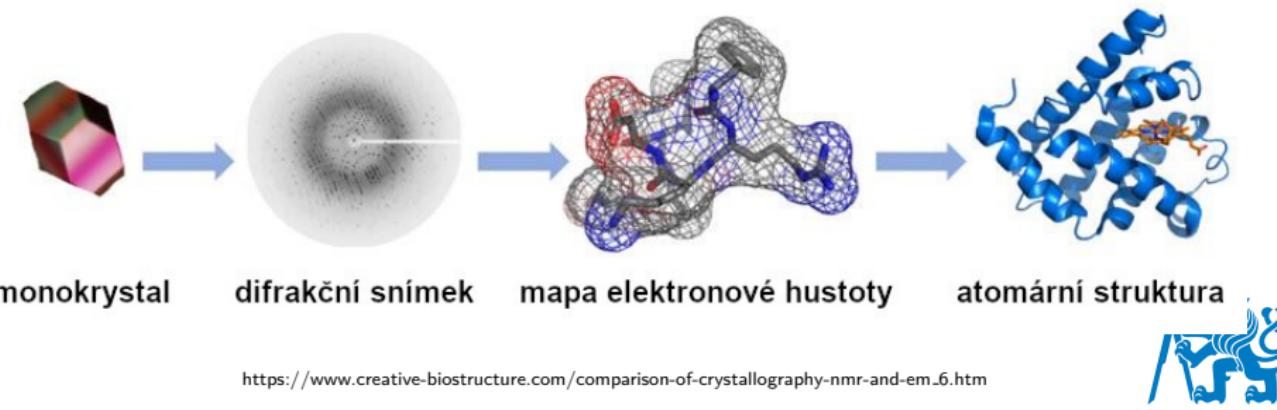


- Difrakce = rozptyl a následná interference
- Difrakční záznam = matematická transformace objektu



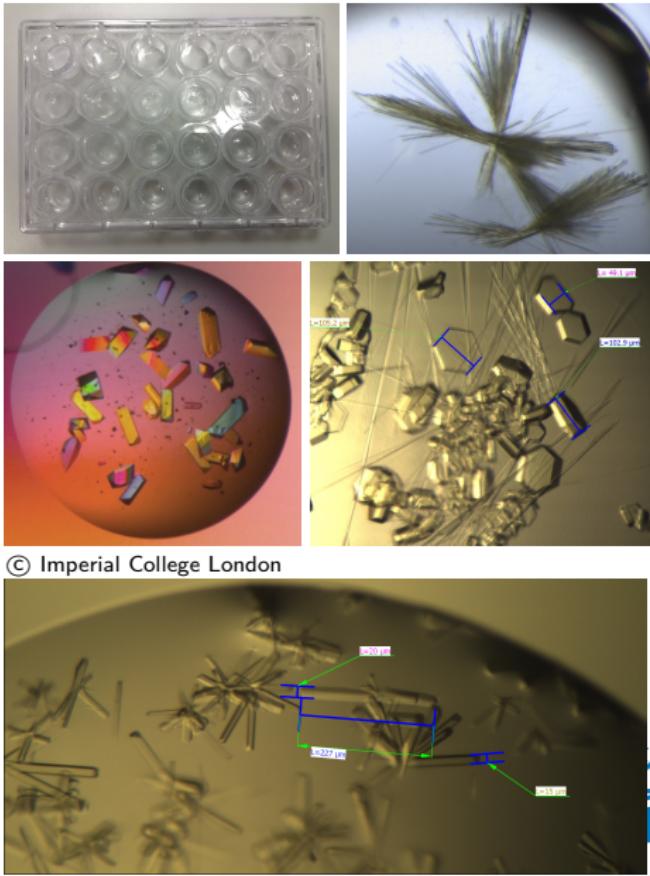
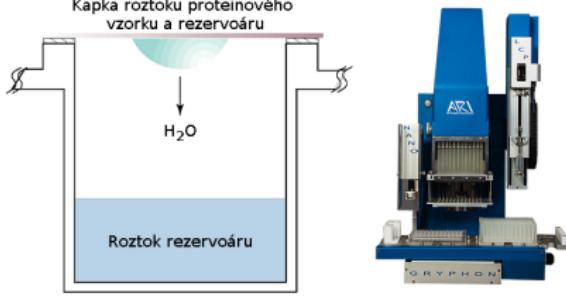
Vítejte v naší laborce!

Připravíme vzorky, naměříme data a
určíme strukturu



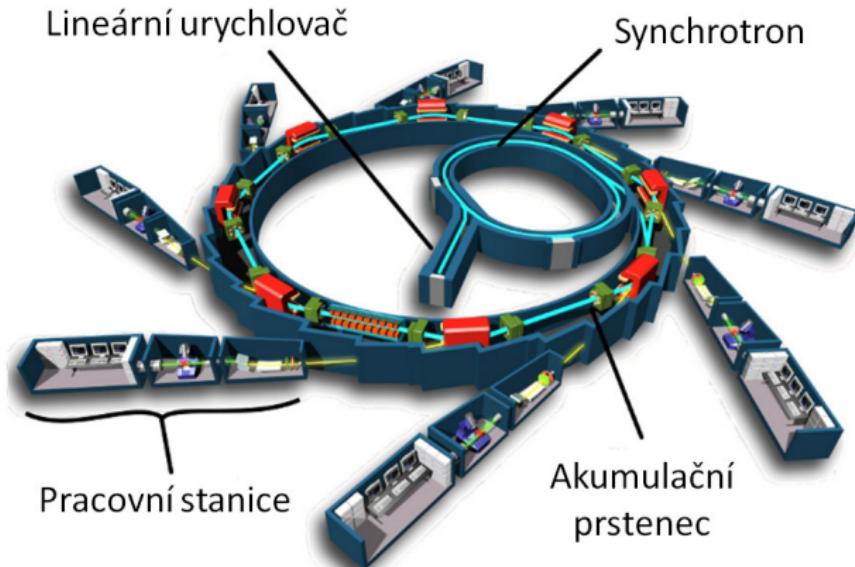
Krystalizace

- Nelze předpovědět kryst. podmínu
- Cíl: vznik jen pár krystalizačních center a následný růst
- Např. metoda difuze par (uspořádání visící nebo sedící kapky)
- Rezervoár (1 ml) – cokoliv, obvykle roztok solí, pufru a precipitantu
- Kapka (1 μ l) – roztok z rezervoáru + vzorek proteinu
- Chirální centra – stáčení polarizovaného světla



Synchrotron

- Kruhový urychlovač částic
- Elektron nebo pozitron pohybující se relativistickou rychlosí po zakřivené dráze způsobené magnetickým polem
- Tečný směr: emise úzkého kuželu elektromagnetického záření (rentgenové, IR)



Synchrotron

BESSY II – Helmholtz Zentrum Berlin



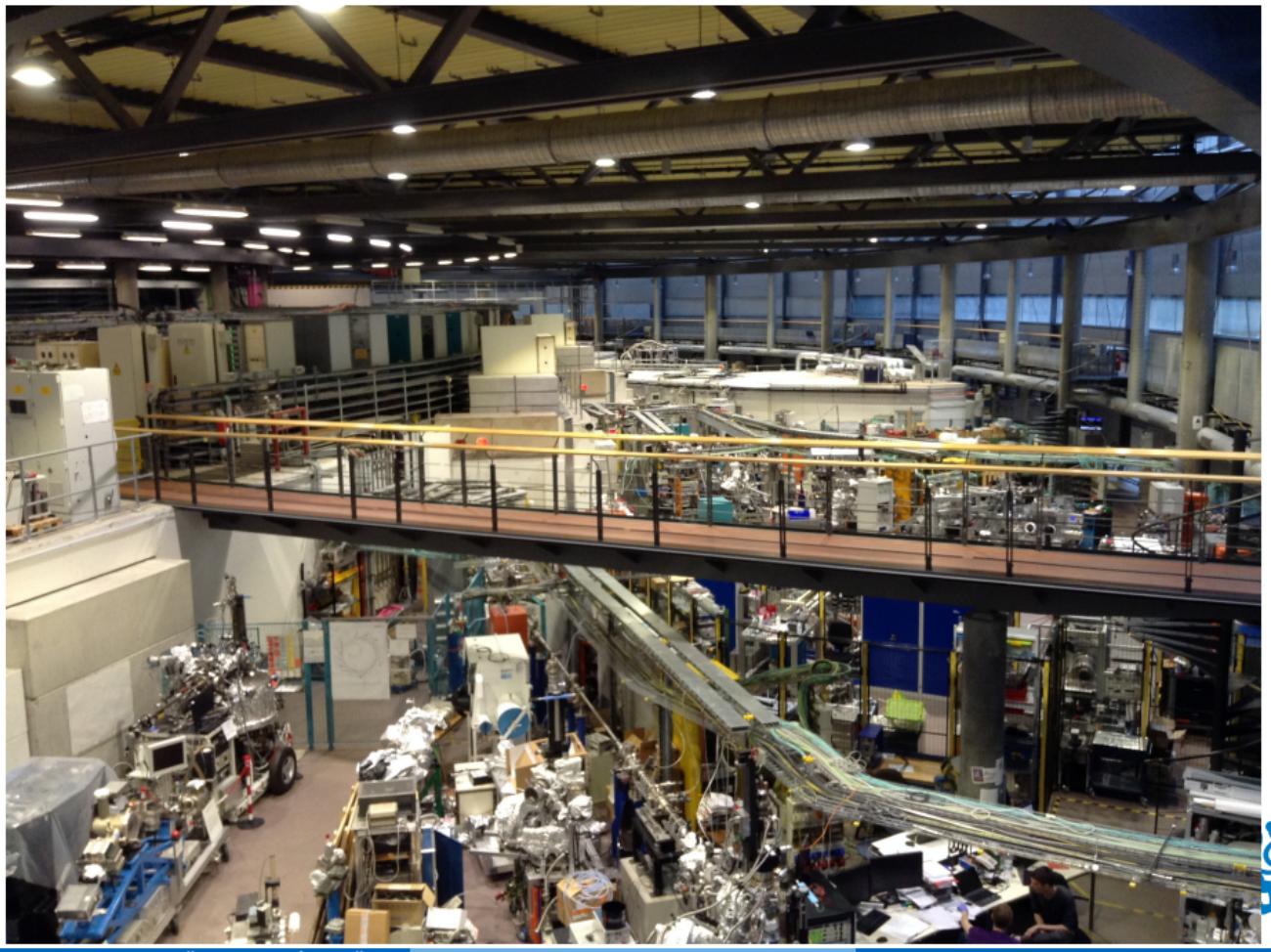
Foto Helmholtz Zentrum Berlin

Diamond Light Source – Londýn

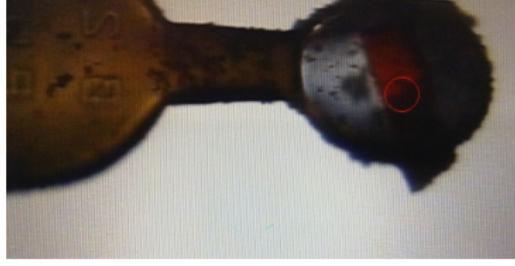
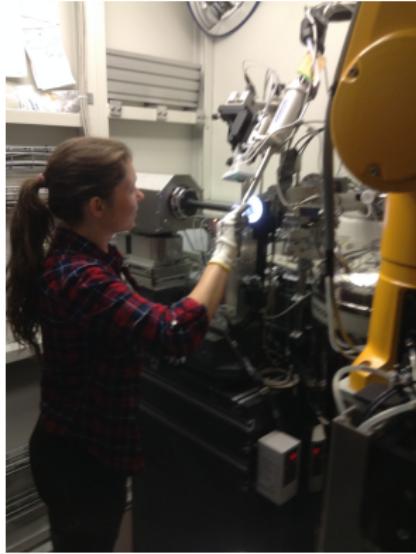
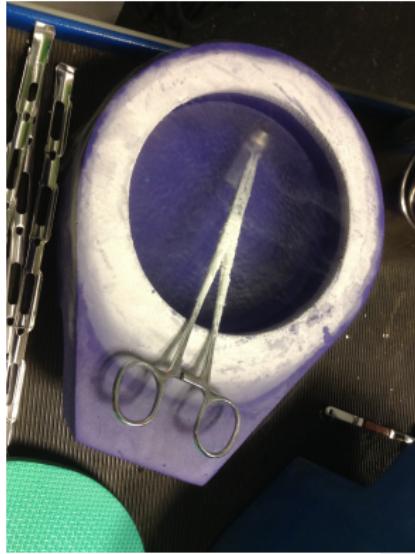


Foto Diamond Light Source

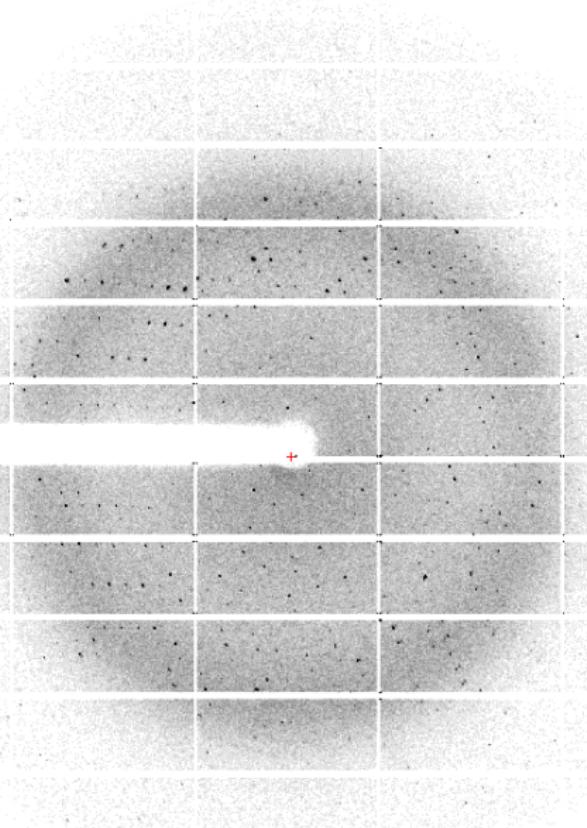
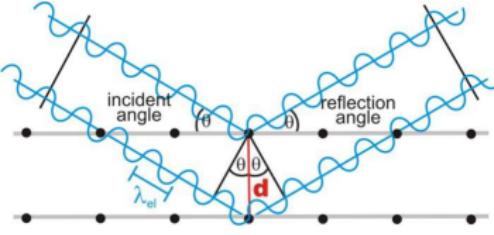
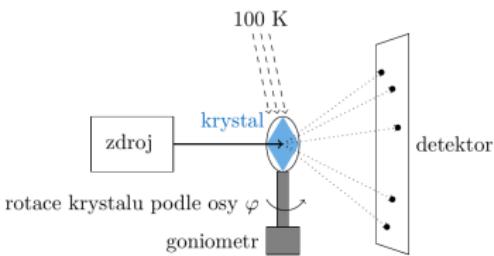




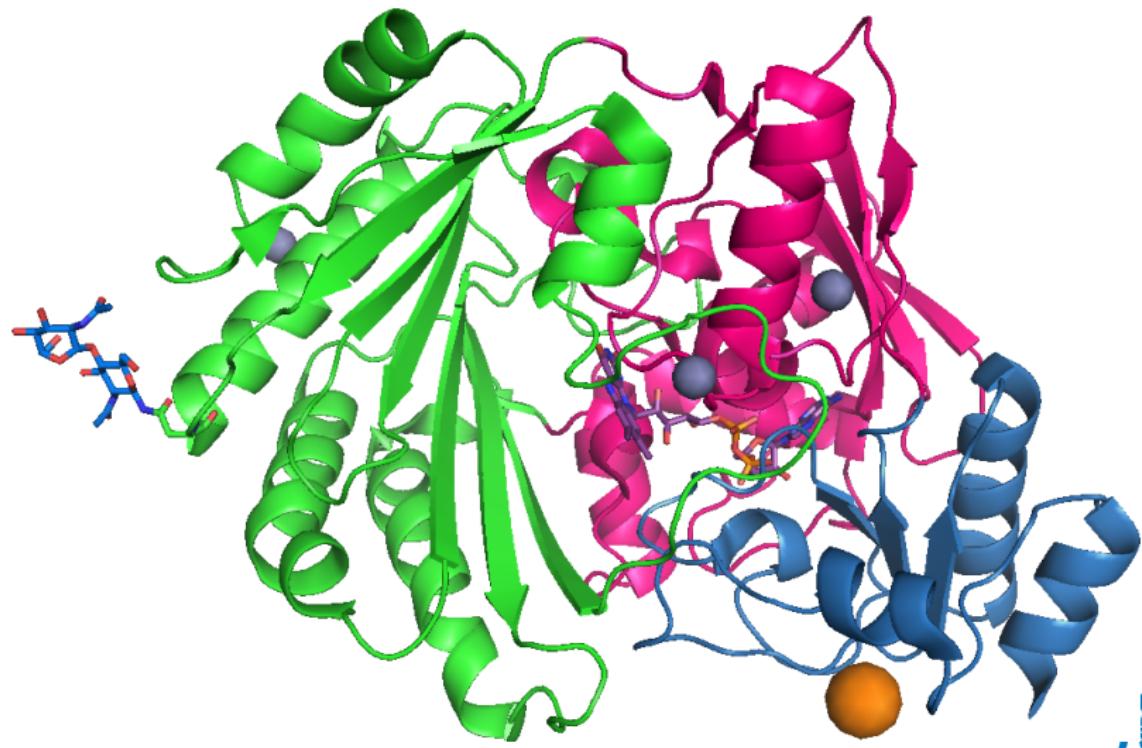
Umístění vzorku na goniometr



Difrakce – rozptyl a interference záření na krystalu



Výsledná struktura proteinu – zde karbohydrátová oxidasa

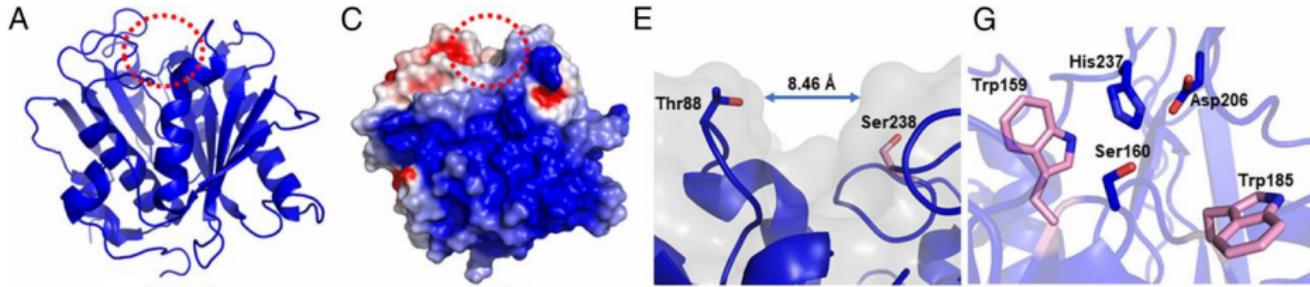


Příklady určených struktur...

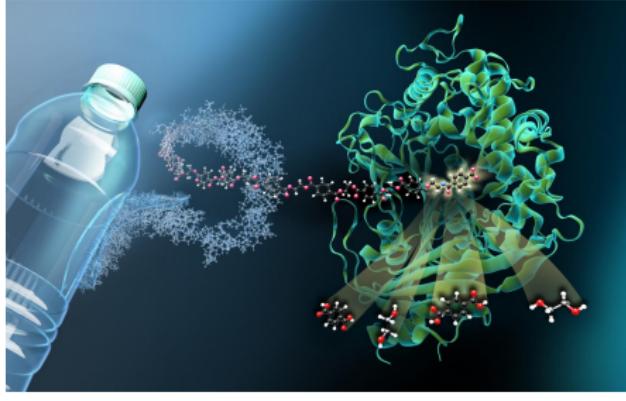
... a spousta udělených Nobelových cen



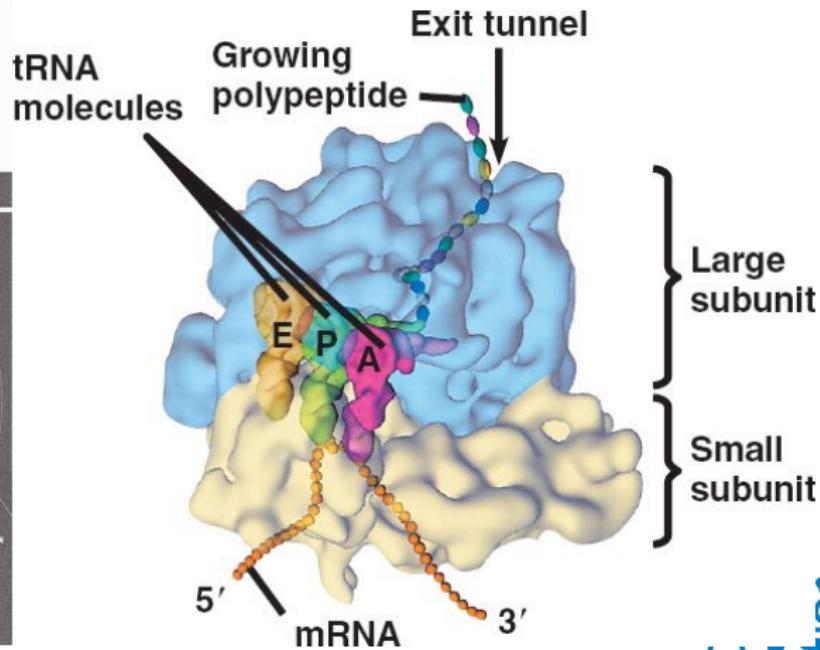
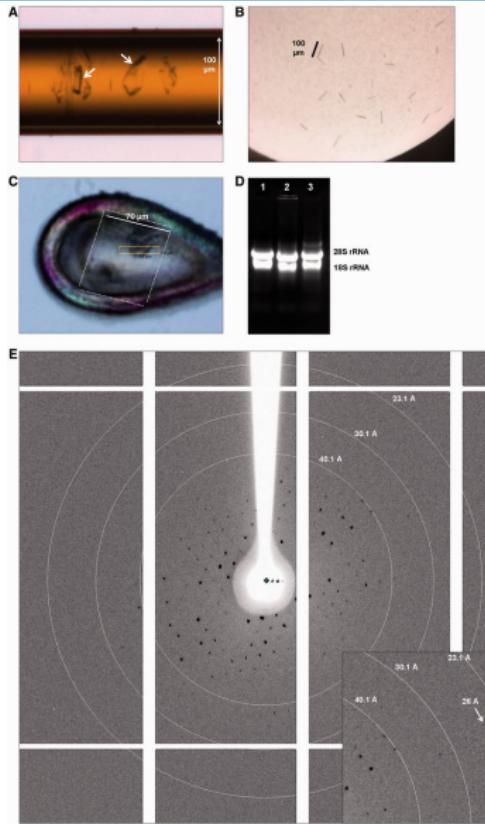
PETasa – enzym rozkládající PET plasty



HP Austin et al. Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. *PNAS* (2018), 115:E4350-E4357



Ribozom – proteinový komplex – přepis genet. informace

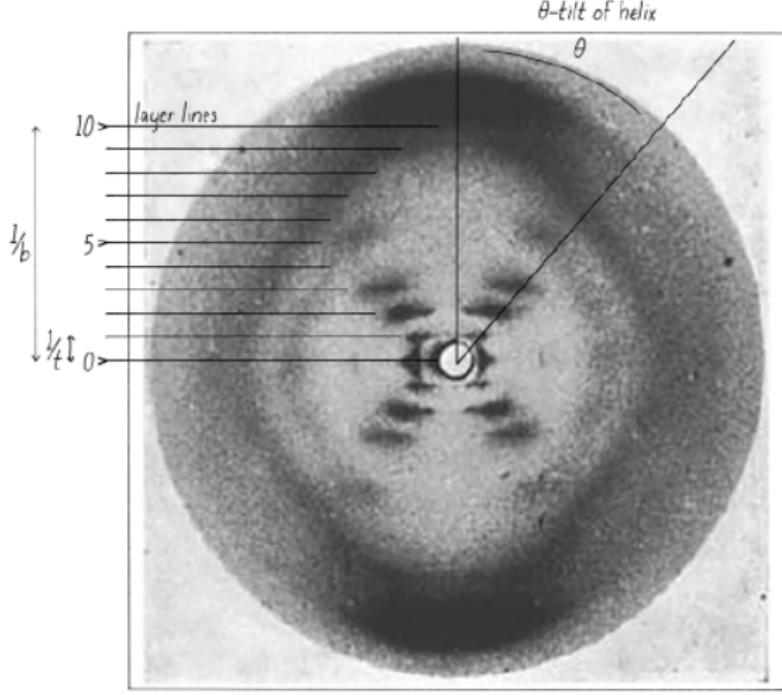


H. Khatter. Purification, characterization and crystallization of the human 80S ribosome. *Nucleic Acids Research* (2014) 42(6)
<http://bio1151.nicerweb.com/Locked/media/ch17/ribosome.html>



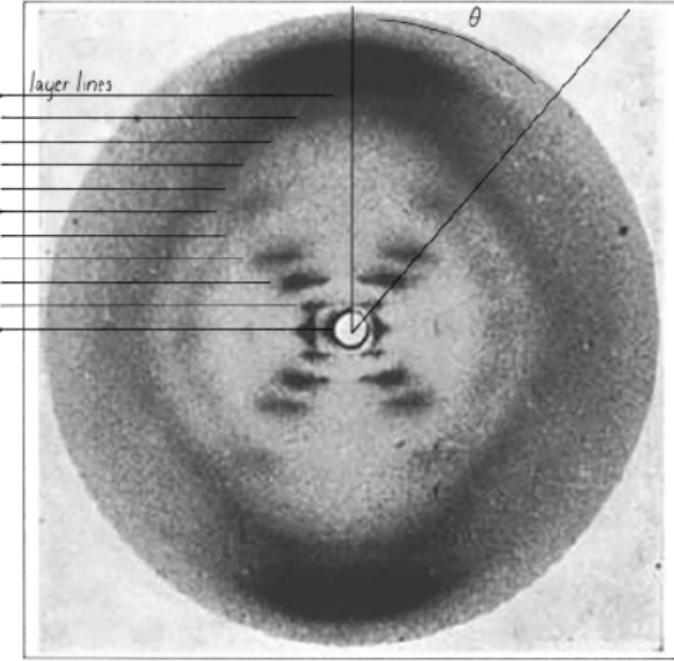
Objev struktury DNA – vláknová difrakce

PHOTOGRAPH 51 BY FRANKLIN



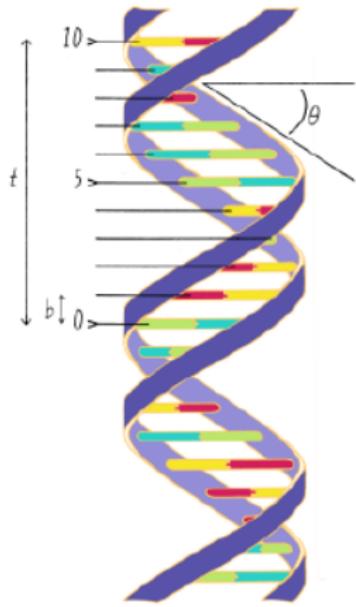
θ -tilt of helix

θ



b -distance between bases

t -distance for one complete turn of helix



Ronald Vale: *The Structure of DNA*



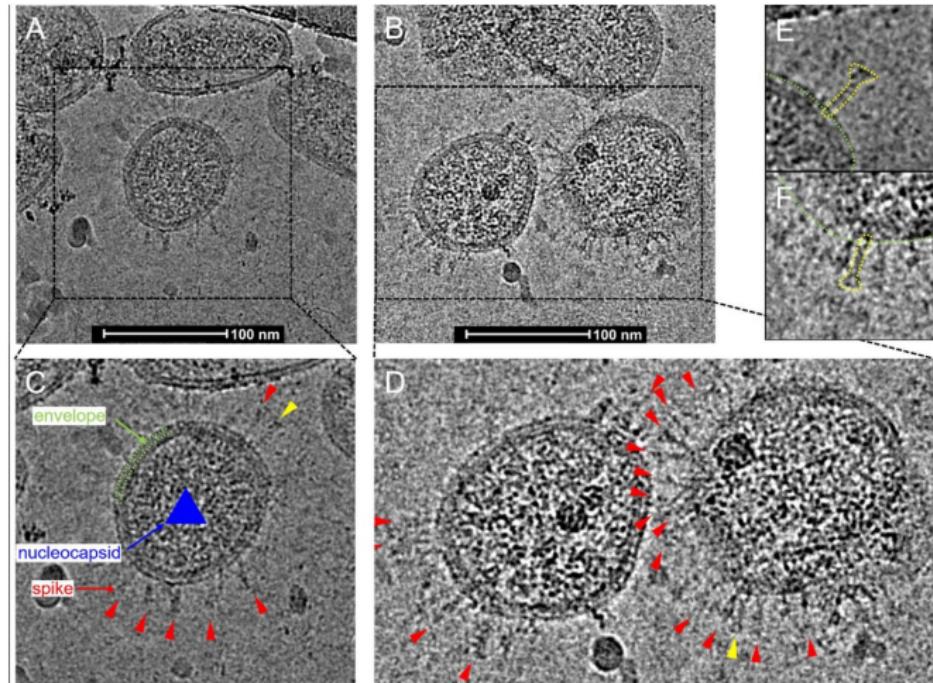
SARS-CoV-2



www.mff.cuni.cz/cs/verejnost/aktuality/uk-poskytuje-kapacitu-vyzkumne-infrastruktury-pro-boj-proti-sars-cov-2-a-covid-19



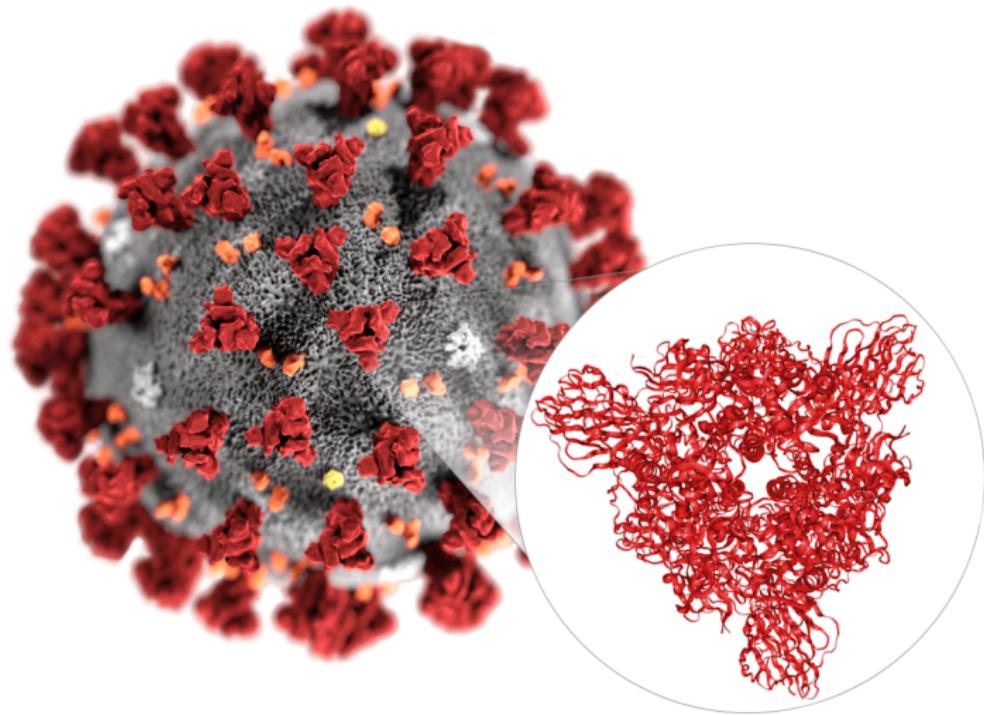
Struktura viru SARS-CoV-2 – Cryo-EM



Cryo-EM results of SARS-CoV-2. (A) and (B). Cryo-EM images of SARS-CoV-2. (C). Zoom-in view of the virion showed in (A). Envelope and nucleocapsid are indicated by green and blue respectively, remarkable spikes are indicated by red triangles. (D). Zoom-in views of the two virions showed in (B), remarkable spikes are indicated by red triangles. (E). Zoom-in view of the spike indicated by yellow triangle in (C). The shape is depicted by yellow dot lines. (F). Zoom-in view of the spike indicated by yellow triangle in (D). The shape is depicted by yellow dot lines.

Chuang Liu et al. Viral Architecture of SARS-CoV-2 with Post-Fusion Spike Revealed by Cryo-EM, *bioRxiv* 2020.03.02.972927

Struktura viru SARS-CoV-2 – Cryo-EM



This illustration, created at the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), reveals ultrastructural morphology exhibited by coronaviruses. Note the spikes that adorn the outer surface of the virus, which impart the look of a corona surrounding the virion, when viewed electron microscopically. (...)

CDC/ Alissa Eckert, MS; Dan Higgins, MAMS

Struktura viru SARS-CoV-2 – Cryo-EM – S protein

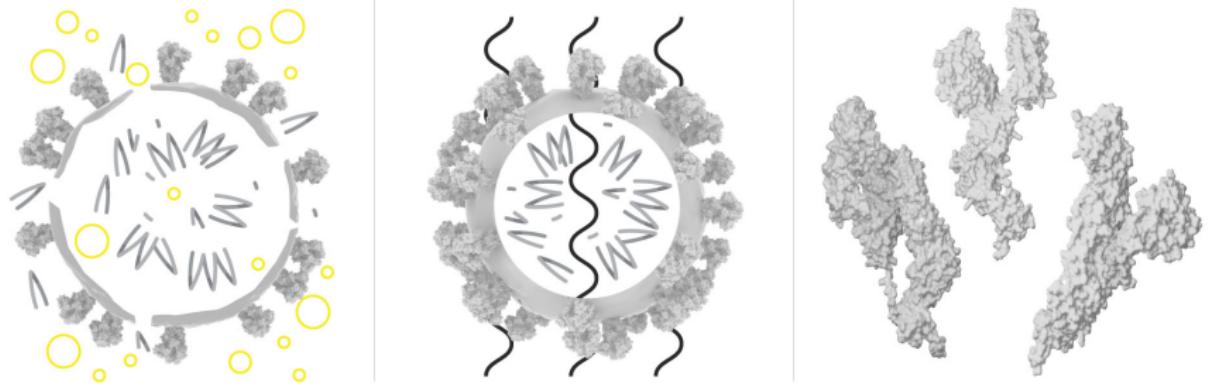
Samotný protomer S proteinu obsahující receptor vázající doménu (RBD)

Cíl vakciny, protilátek a diagnostiky

2 možné konformace: zavřená X otevřená



Struktura viru SARS-CoV-2 a ochranná opatření



Bonnie Berkowitz, Aaron Steckelberg, John Muyskens: What the structure of the coronavirus can tell us.
Washington Post March 23, 2020

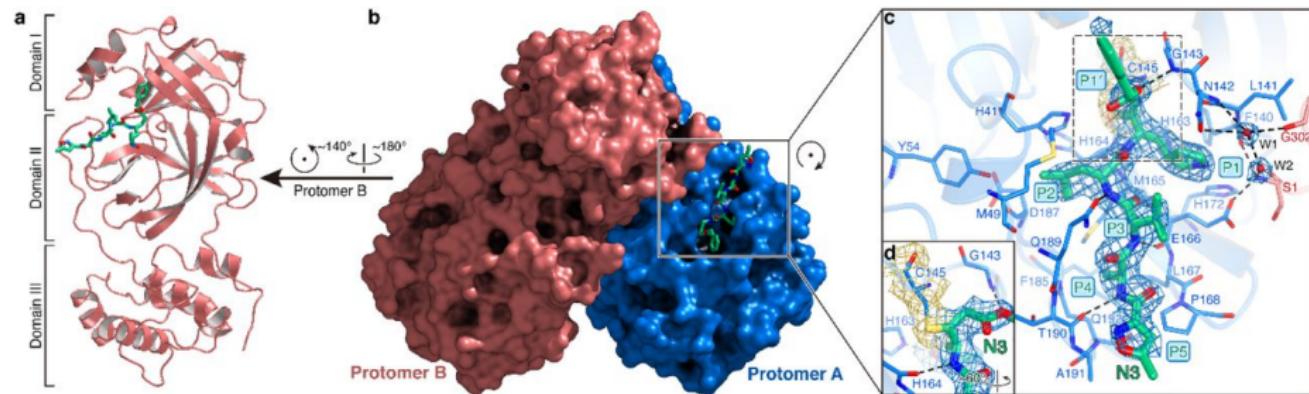
Struktura hlavní proteasy viru SARS-CoV-2

Virus napadne hostitelskou buňku.

Vnutí jejímu reprodukčnímu systému svou genetickou informaci (RNA).

Na jejím základě začne probíhat syntéza polyproteinu viru.

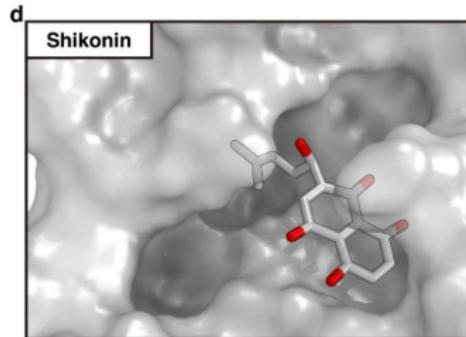
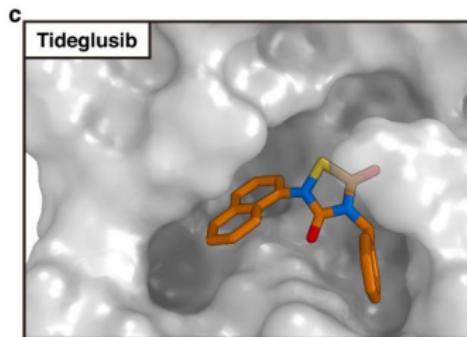
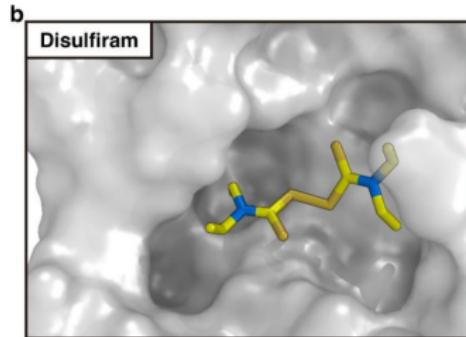
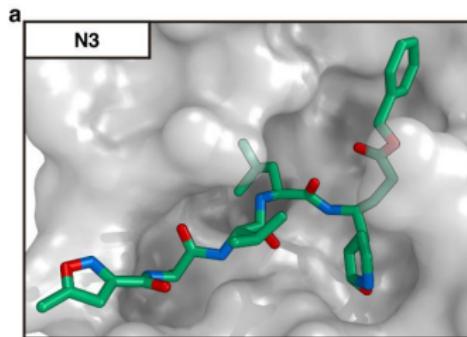
Hlavní proteasa – součást hlavního polyproteinu, štěpí ho.



Proteasa je enzym \Rightarrow hledání vhodného inhibitoru \Rightarrow léčivo

Struktura hlavní proteasy viru SARS-CoV-2

Potenciální léčiva – simulace vazby molekuly v aktivním místě



Poděkování

*Laboratoř strukturní biologie,
Katedra inženýrství pevných látek,
FJFI ČVUT*

Petr Kolenko
Jan Dohnálek
Leona Švecová
Jan Stránský
Aleš Kravík



*Laboratoř struktury a funkce biomolekul,
Biotechnologický ústav AV ČR*

Jan Dohnálek
Jarmila Dušková
Tereza Skálová
Tomáš Koval'
Petr Kolenko
Mária Trundová
Kristýna Adámková
Michal Strnad
Jindřich Hašek



Děkuji za pozornost!



Nyní je čas pro Vaše otázky.

martin.maly@fjfi.cvut.cz

