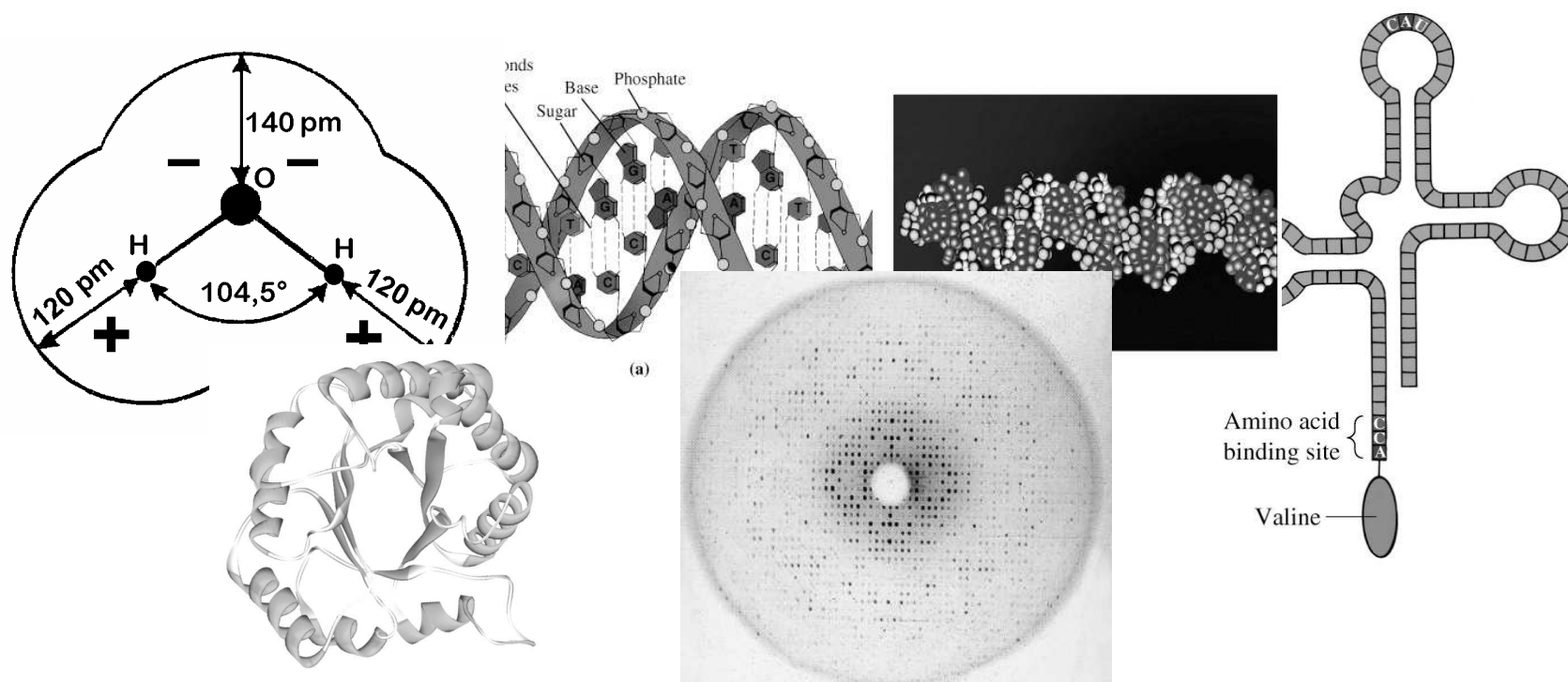


Přednášky z lékařské biofyziky

Masarykova univerzita v Brně - Biofyzikální centrum



Úvod do molekulární biofyziky II

Struktura biopolymerů

- Studium struktury biopolymerů a jejich komplexů např. umožňuje pochopit:
 - Specificitu enzymatických a imunologických reakcí
 - Účinky některých léčiv (cytostatik) na molekulární úrovni.
 - Mechanismy transportních procesů
 - Buněčný pohyb
 -

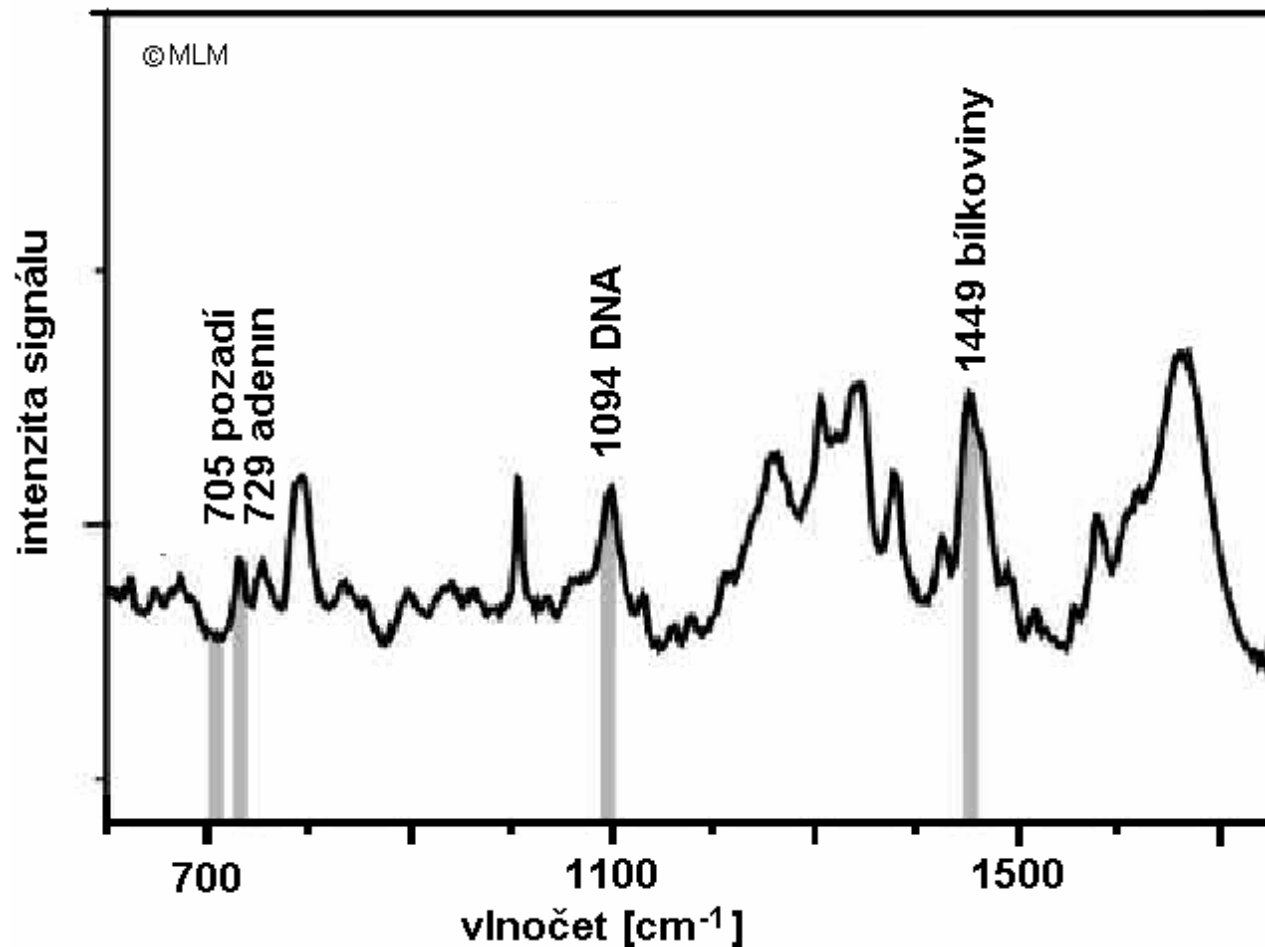
A) Metody založené na měření mechanických vlastností

- Velikost a tvar makromolekul lze studovat měřením:
 - osmotického tlaku
 - difuzního koeficientu
 - viskozity (tvaru molekul)
- Zjištění poloměru částic:
 - Měření rychlosti sedimentace
- Zjištění velikosti a částečně i tvaru:
 - TEM
 - chromatografie - molekulově-síťový efekt (gelová permeační chromatografie)
 - elektroforetická pohyblivost bílkovin (dodecylsulfát sodný se definovaně váže k bílkovině a eliminuje její vlastní elektrický náboj, přičemž nese jeden náboj záporný).

B) Metody založené na měření interakce s elektromagnetickým zářením

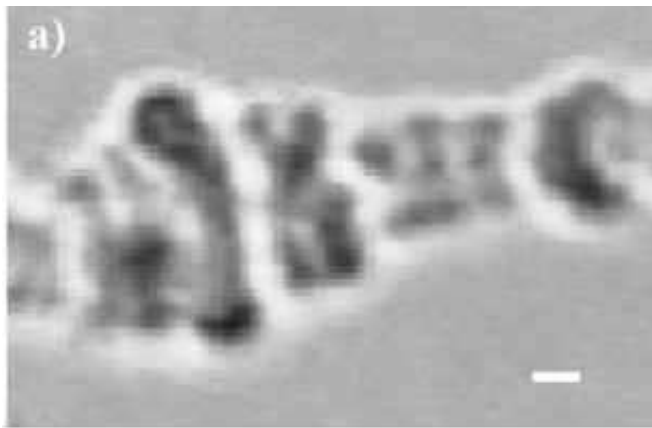
- Měření (Rayleighova) rozptylu světla. Interakce fotonů s dipóly molekul. Intenzita rozptýleného světla závisí na mol. hmotnosti a na úhlu rozptylu, čehož lze využít i pro odhady tvaru makromolekul.
- Ramanova spektrometrie. Při rozptylu světla dochází k malé změně vlnové délky rozptýleného světla, způsobené malým pohlcením či zvýšením energie rozptylovaných fotonů při přechodech mezi vibračními a rotačními stavy molekul. Ty se mění při změnách struktury molekul - změny Ramanových spekter proto odrážejí změny struktury molekul.

Ramanova spektrometrie



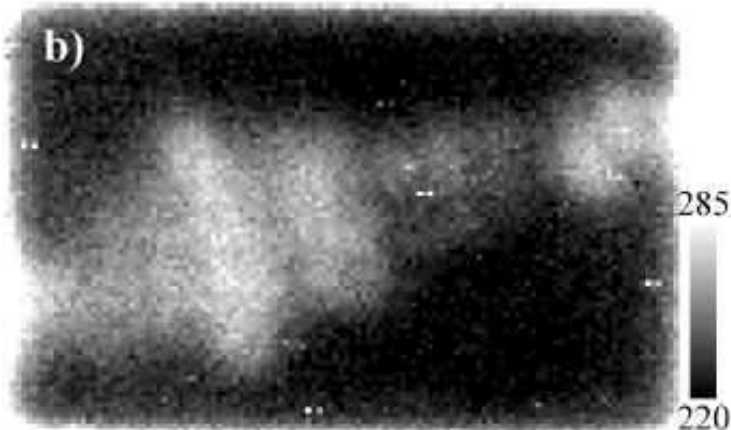
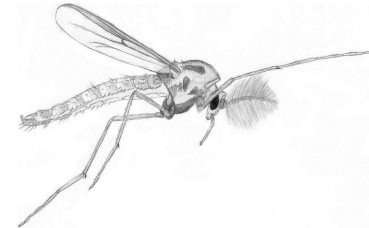
Ramanovo spektrum polytenního chromosomu rodu *Chironomus*. Při vybraných vlnočtech lze s výhodou realizovat Ramanovu mikroskopii. Vybuzeño laserovým světlem o vlnové délce 647.1 nm

•Podle:
<http://www.ijvs.com/volume2/edition3/section4.htm>

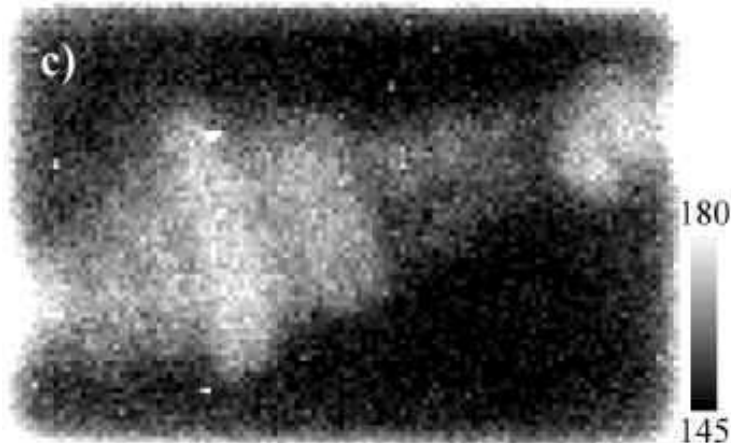


- Mikroskopický snímek v normálním bílém světle

- (chromosom *Chironomus Thummi* Thummi)



Konfokální ramanovský snímek zobrazující páteř DNA (vibrace při 1094 cm^{-1})

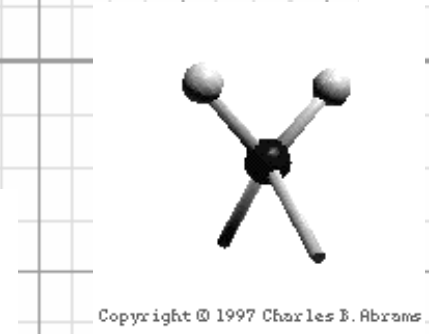
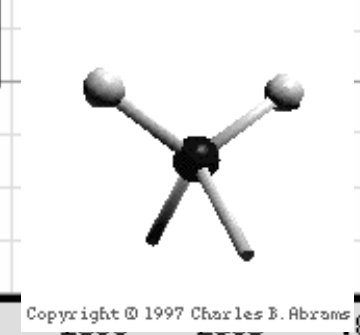
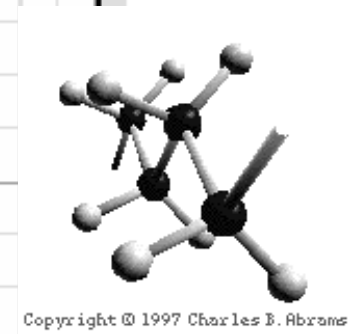
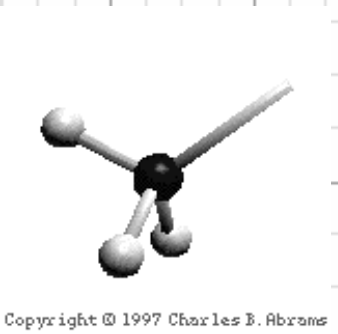
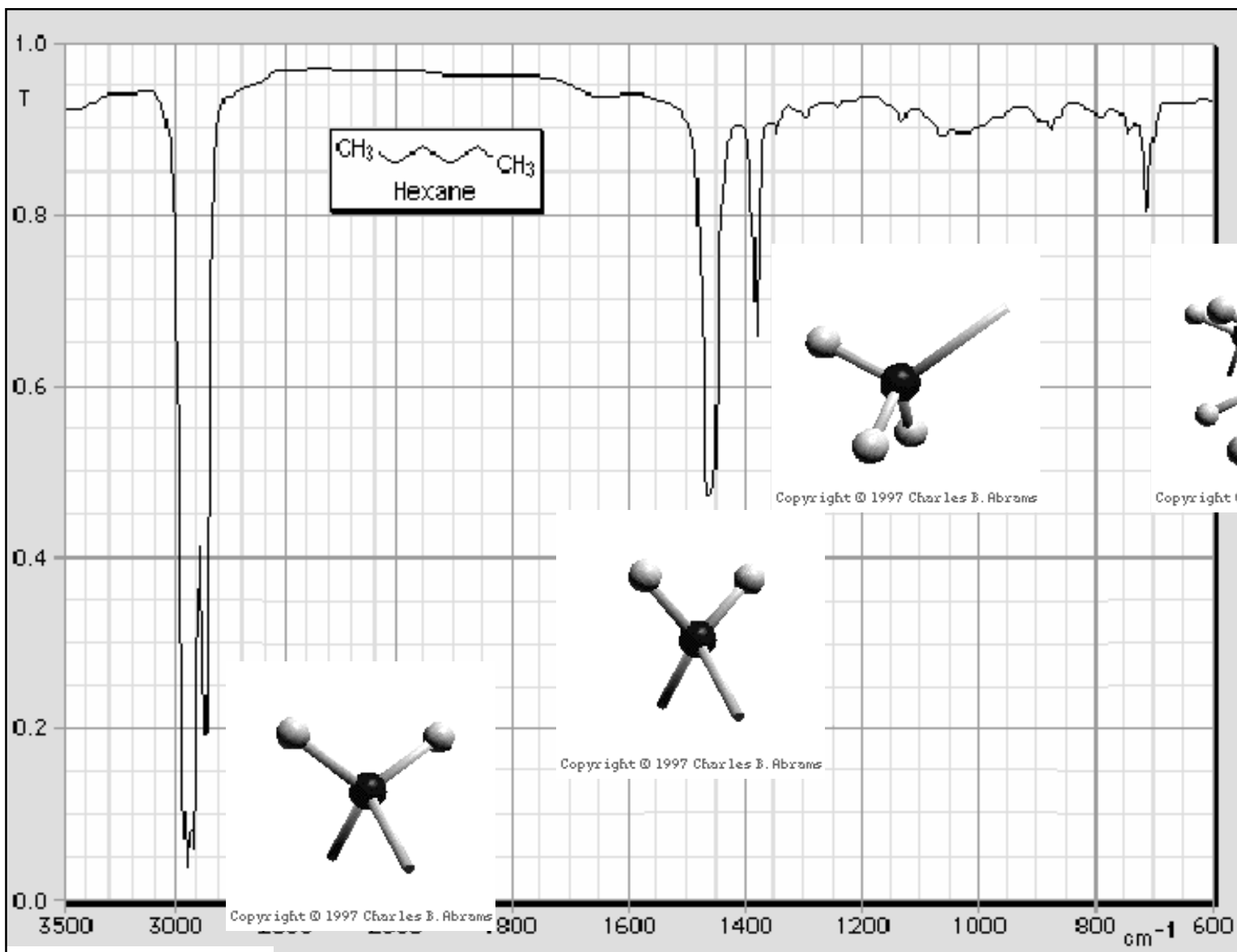


- Konfokální ramanovský snímek zobrazující přítomnost alifatických řetězců v bílkovinách chromosomu při 1449 cm^{-1}

- Zdroj jako předchozí

B) Metody založené na měření interakce s elektromagnetickým zářením

- Lze využít studium infračervených spekter molekul.



Infračervené vibrační spektrum hexanu

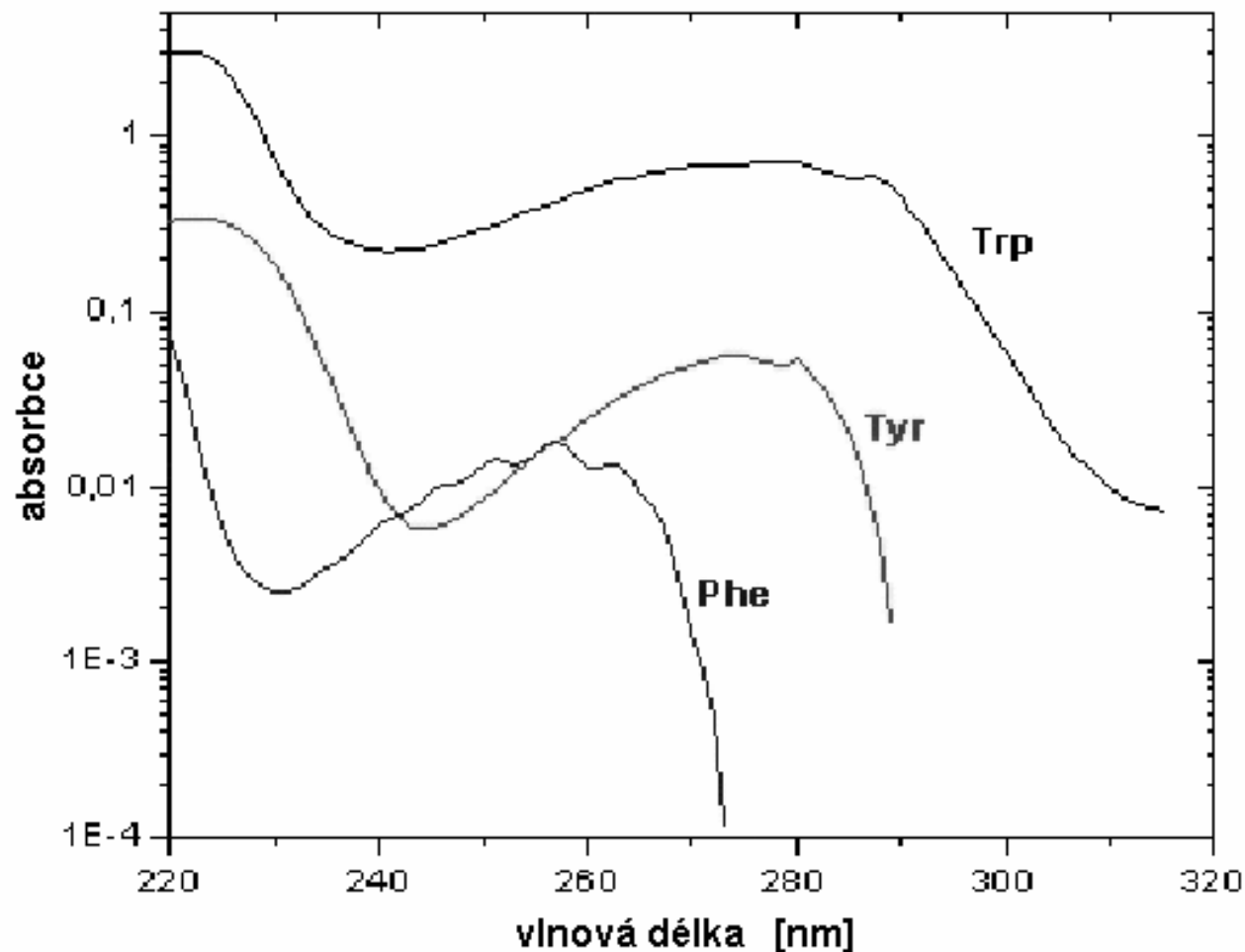
<http://www.columbia.edu/cu/chemistry/edison/IRTutor.html>



Další optické metody

- Absorpční spektrofotometrie v UV oblasti.
 - Tryptofan a tyrosin mají absorpční maximum kolem 280 nm. Fenylalanin při 255 nm.
 - Nukleotidy (dusíkaté báze) - absorpční maxima při 260 - 270 nm.
 - Chromofory - jejich absorpční vlastnosti se mění v závislosti na chemickém okolí.

Absorpční spektra aminokyselin

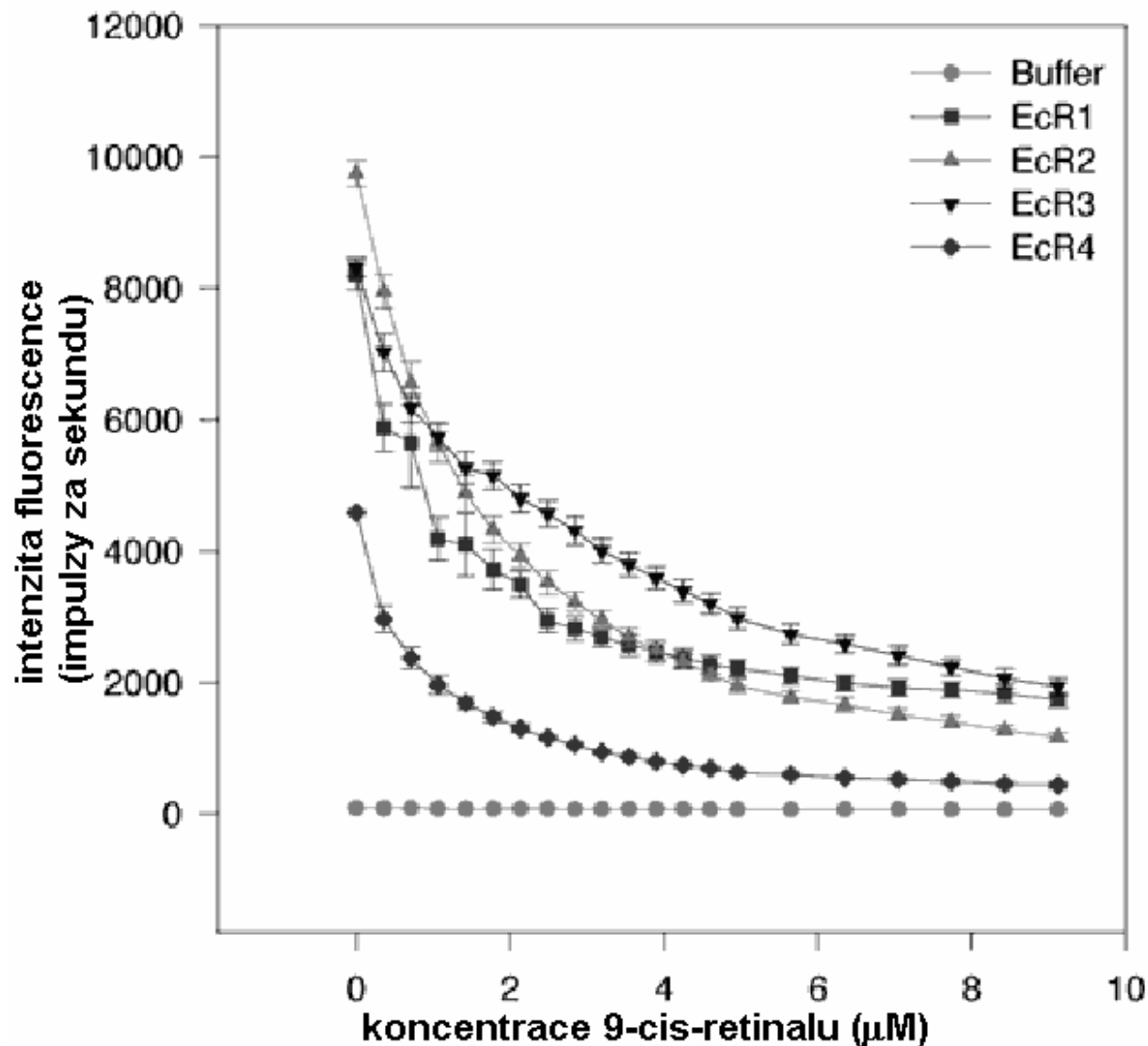


•Podle:

<http://www.gwdg.de/~pdittri/bilder/absorption.jpg>

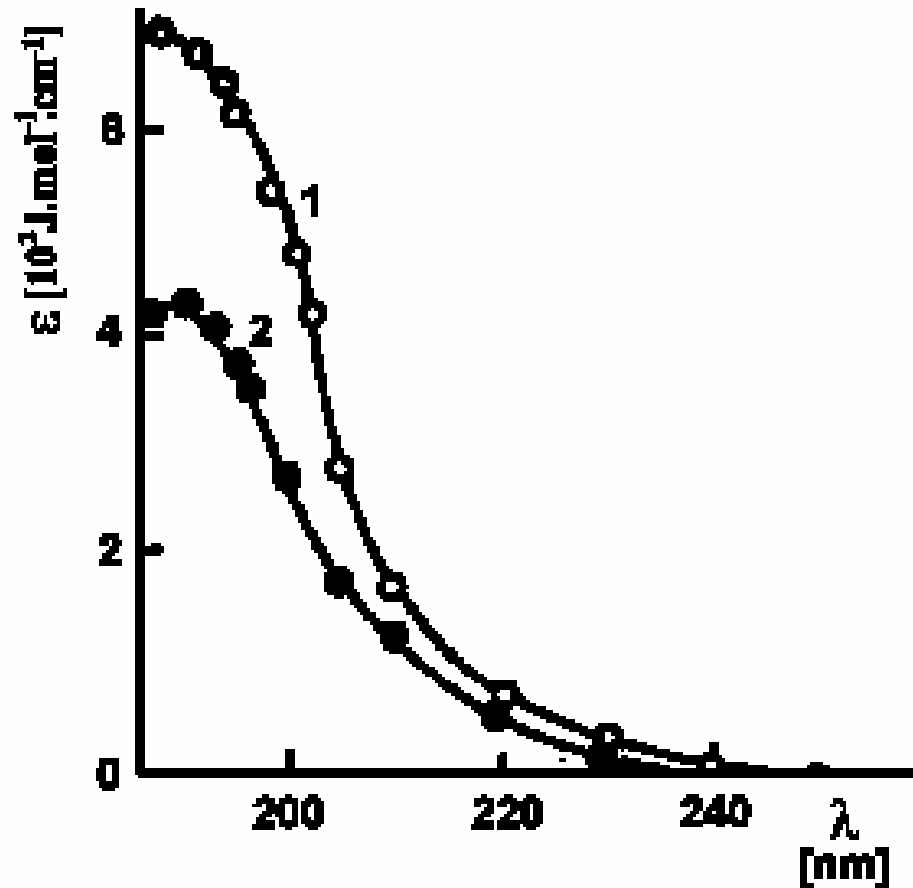
Tryptofan je přirozeným chromoforem – obr. ukazuje zhášení jeho fluorescence v závislosti na koncentraci 9-cis-retinalu. Jde o vliv této látky na bílkovinu potřebnou k regeneraci rodopsinu.

<http://www.molvis.org/molvis/v4/a33/nickerson-fig2.html>



Hypochromní efekt (HE).

- Absorpce světla ovlivňována dipólovým momentem vazeb, se kterými interaguje. Jsou-li dipóly paralelní, vzájemně se ovlivňují a snižuje se poněkud jejich schopnost absorbovat energii fotonů. U bílkovin se HE projevuje u peptidových vazeb, které mají absorpční maximum v UV kolem 190 nm. Jsou-li dipólové momenty těchto vazeb náhodně uspořádané (denaturovaná bílkovina), absorbují světlo lépe než ve stavu s pravidelnými strukturami.
- Helicita - poměrné zastoupení uspořádaných částí makromolekuly. Dvoušroubovice DNA absorbuje UV méně než neuspořádaná (denaturovaná) molekula.



Hypochromní efekt u kyseliny polyglutamové. Při pH 7 vytváří statistické klubko (1), při pH 4 má šroubovicovou strukturu (2). Absorpční maximum peptidových vazeb je pak sníženo vlivem jejich prostorového uspořádání. ϵ je molární absorpční koeficient a λ je vlnová délka UV záření. Dle Kalouse a Pavlíčka, (1980).

Optická rotační disperze

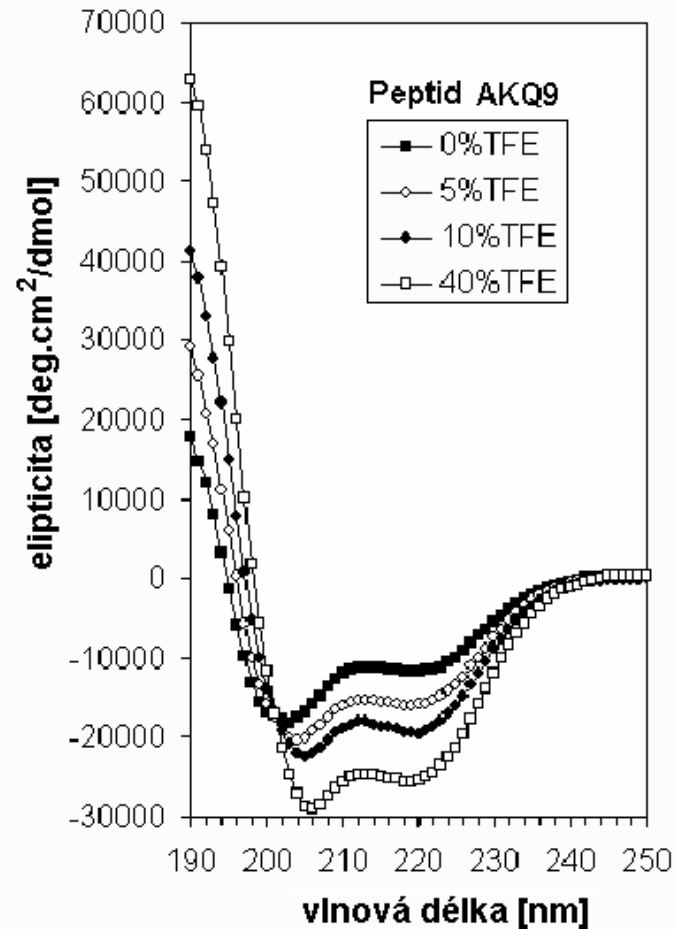
- Měření optické aktivity i absorpce polarizovaného světla. Při konformačních změnách molekul se mění stavba molekul, což lze polarimetricky sledovat
- Přesnější: Optická rotační disperze (ORD) - závislost optické otáčivosti na vlnové délce světla. Lze získat údaje o zastoupení α -šroubovic či poměrném zastoupení α -šroubovic a β -struktur.
- Nakonec byla tato metoda nahrazena citlivější metodou cirkulárního dichroismu (CD)

Cirkulární dichroismus

Obdobné informace: metoda cirkulárního dichroismu (CD) - porovnávána absorbance levotočivě a pravotočivě cirkulárně polarizovaného světla v oblasti absorpčního maxima

Podobné využití mají tyto metody i při studiu struktury NK.

- Obrázek ukazuje změny elipticity syntetického polypeptidu s dlouhými úseky poly-glu po různém přidavku trifluoroetanolu (TFE), který zvyšuje zastoupení α -helixu.
<http://www-structure.llnl.gov/cd/polyq.htm>



$$\theta_r = \frac{2.303}{4} \cdot (A_L - A_R) \cdot [\text{rad}]$$

- Informace o sekundární a terciární struktuře bílkovin či NK poskytují i:
 - metody elektrochemické (studuje se interakce makromolekul s elektrodami)
 - nukleární magnetická resonance (umožňuje určit chemické okolí studovaných atomů),
 - elektronová spinová resonance aj.

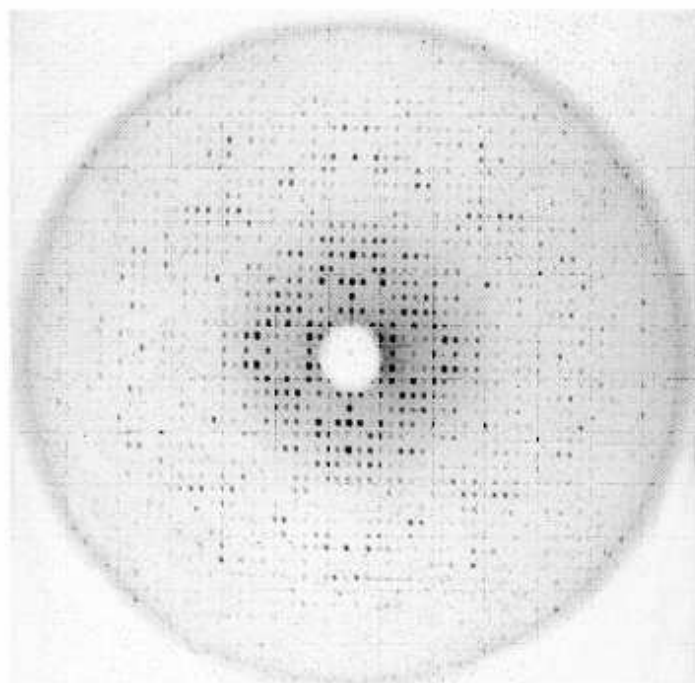
Rentgenstrukturní analýza

- Krystalová mřížka působí na rtg záření jako optická mřížka. Dochází k ohybovým jevům a vzniku interferenčních obrazců. Tyto obrazce lze matematicky analyzovat a získat tak informaci o rozložení elektronů v molekulách tvořících krystal.

(a)

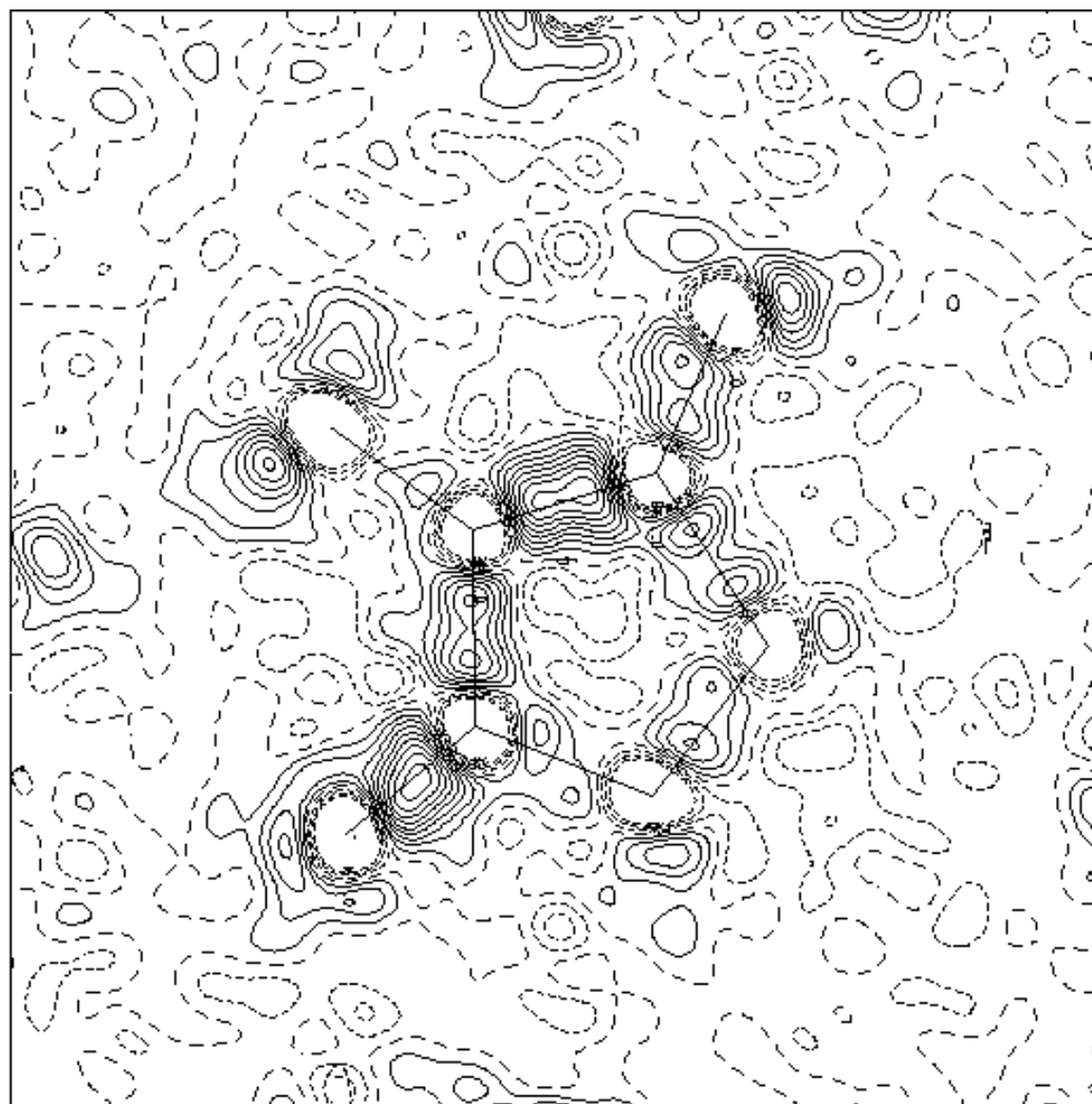


(b)

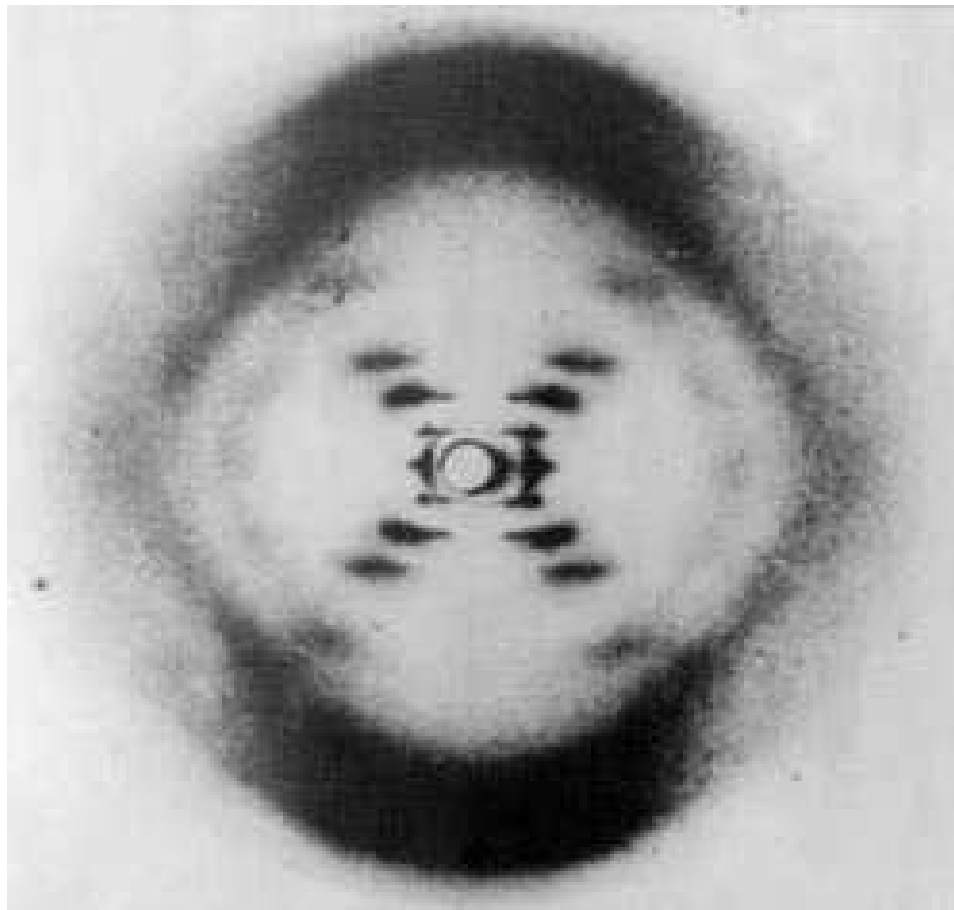


• http://cwx.prenhall.com/horton/media/lib/media_portfolio/text_images/FG04_02aC.JPG

Mapa elektronové hustoty získaná z rentgenového krystalogramu



Krystalogram B-DNA získaný v r. 1952
Rosalindou E. Franklinovou, na základě
kterého předložili Watson a Crick model
dvoušroubovicové struktury DNA



•F



•C



•W

Nové mikroskopické techniky

- optická skanovací mikroskopie v blízkém poli (*near-field optical scanning microscopy*, NFOS - *Near-field Scanning Optical Microscopy*, NSOM, SNOM)

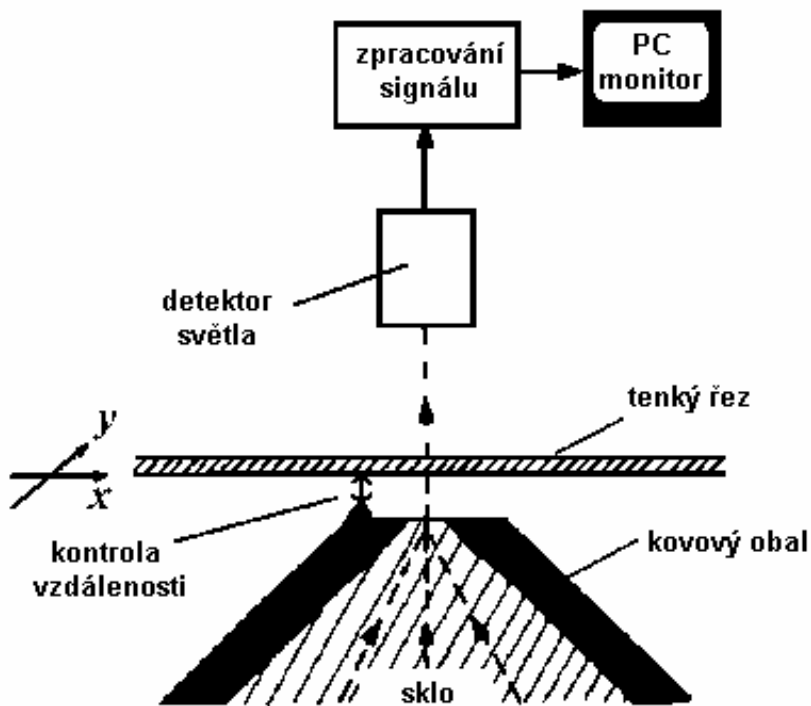
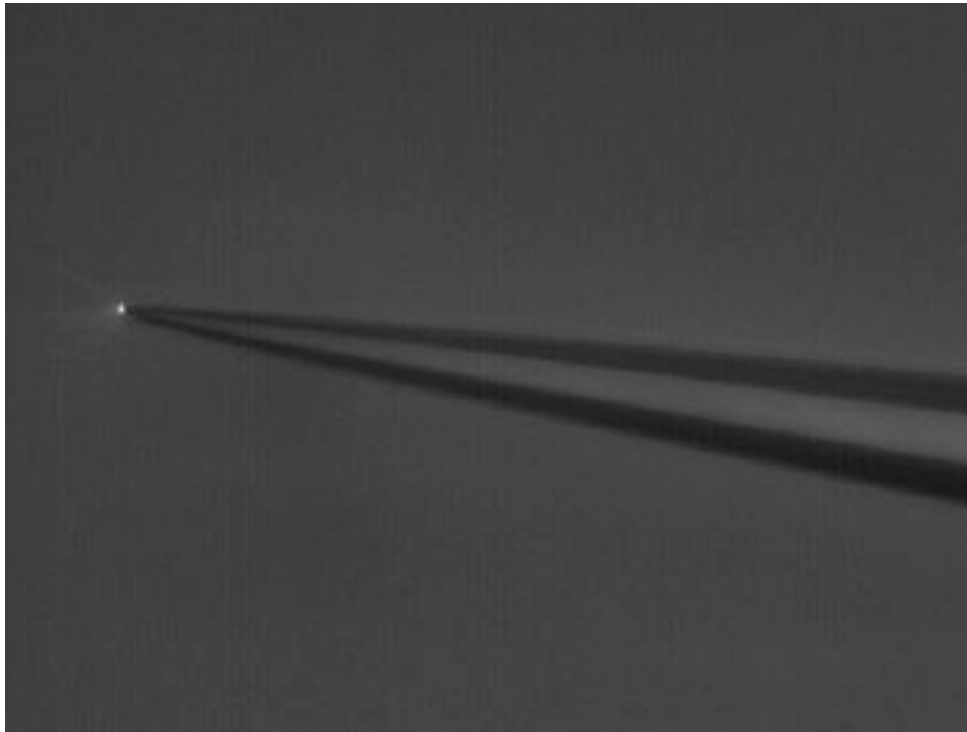


Schéma optického skanovacího mikroskopu pro pozorování v blízkém poli. Otvorem v kovovém obalu skleněného hrotu, který má průměr 5 - 10 nm, prochází úzký paprsek světla argonového laseru. Preparát (tenký řez) se pohybuje nad otvorem. Kontrola vzdálenosti preparátu pomocí tunelového efektu. Zpracováno podle Rontó a Tarjána (1994).



Hrot propouštějící světlo
pozorovaný v normálním
optickém mikroskopu

•<http://physics.nist.gov/Divisions/Div844/facilities/nsom/nsom.html>



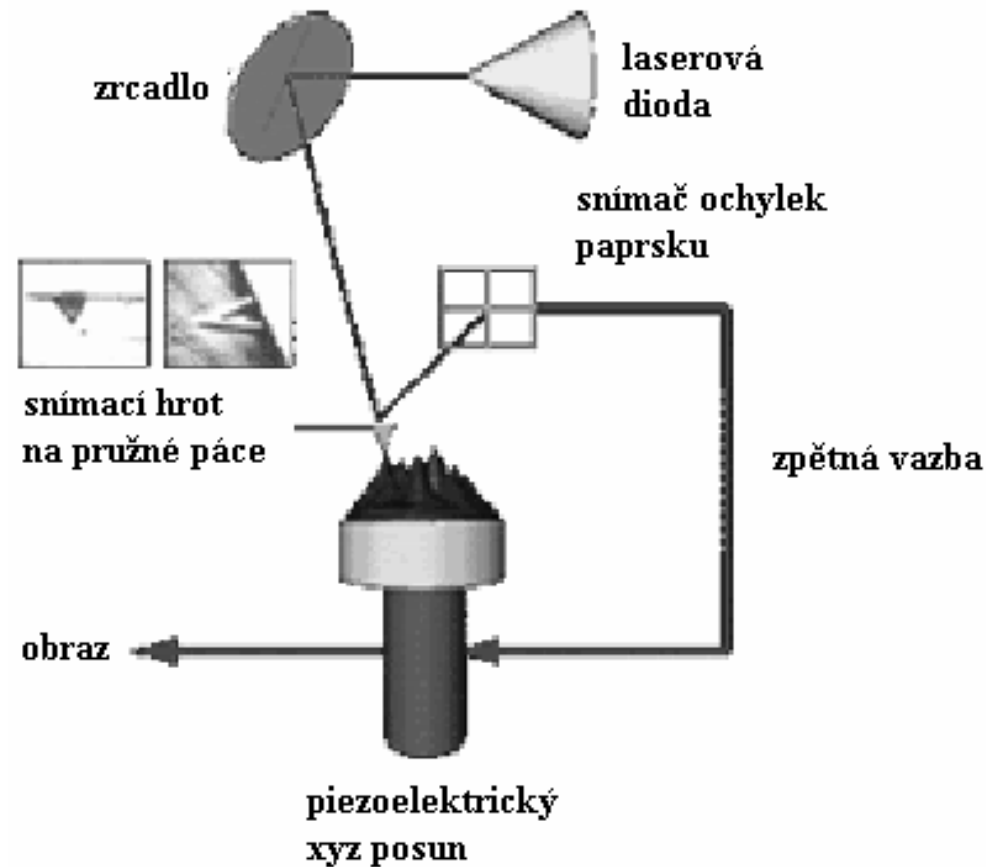
Plasmidová DNA –
10kb

•http://www.snom.omicron.de/examples/twinsnom/x-tsnom_12.html

Nové mikroskopické techniky

- AFM – Atomic force microscopy – jemný hrot sleduje nerovnosti povrchu

- <http://physchem.ox.ac.uk/~rgc/research/afm/afm1.htm>



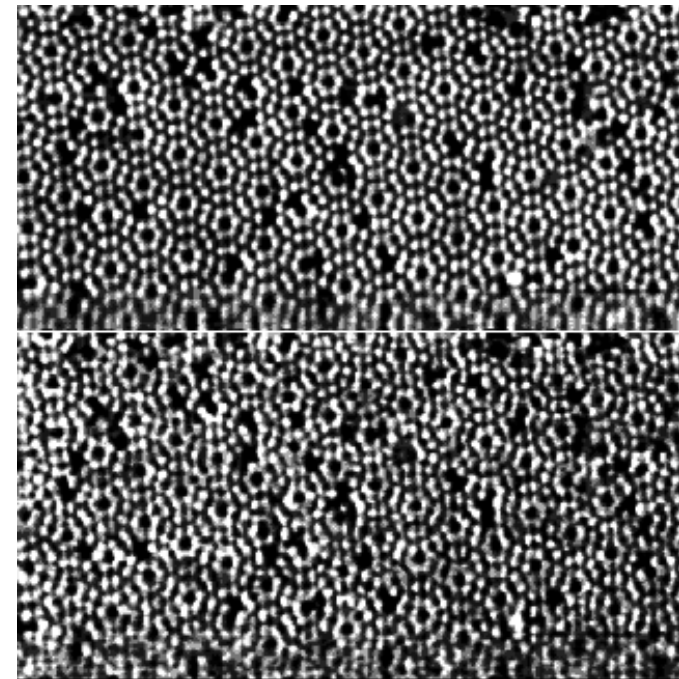
Nové mikroskopické techniky

AFM – Atomic force microscopy



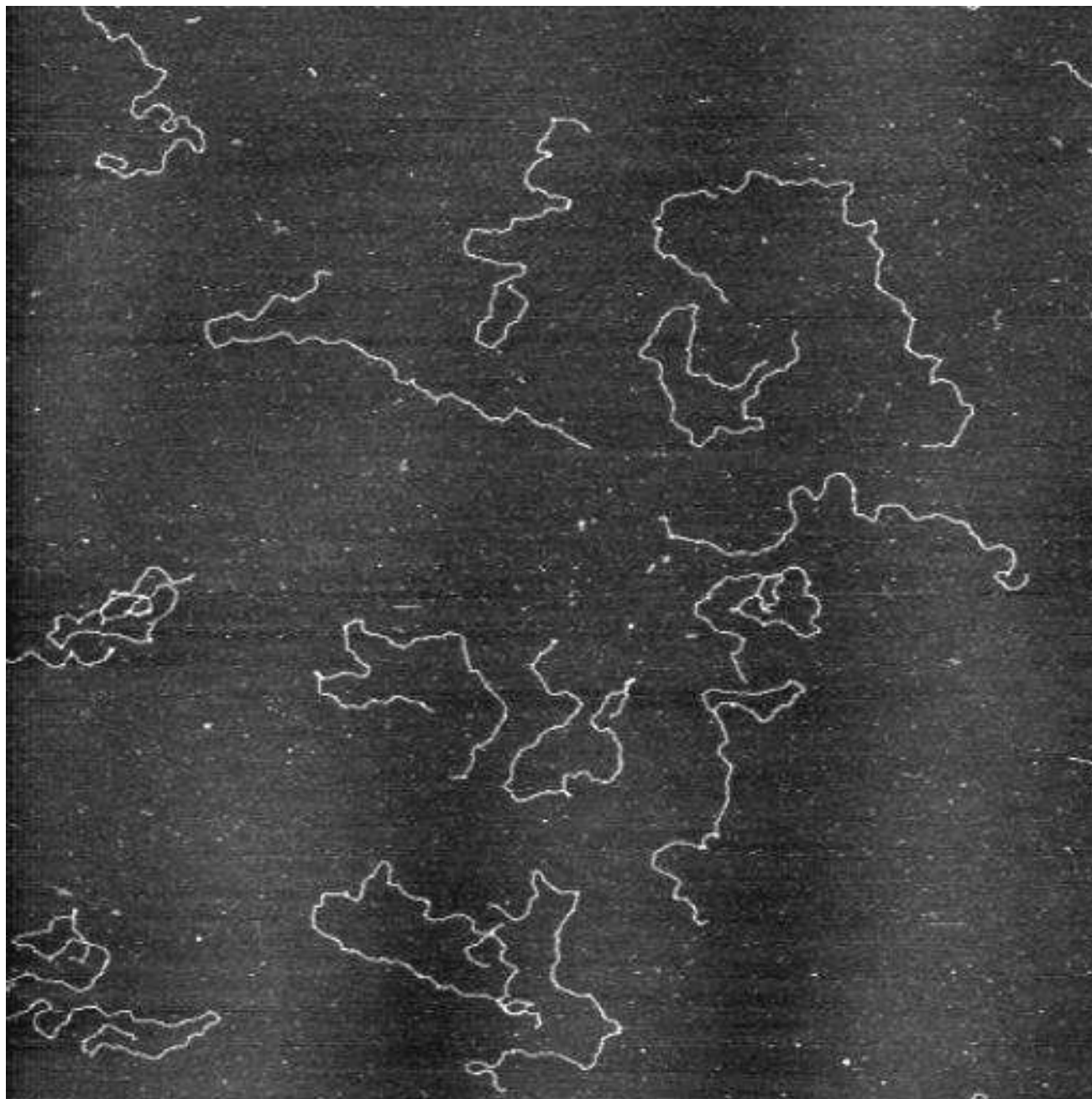
Plazmidová DNA – 10 kb,

•http://www.snom.omicron.de/example_s/twinsnom/x-tsnom_12.html



Krystalická struktura křemíku –
atomové rozlišení

•http://www.omicron-instruments.com/products/afm_stm/r_afmst6.html



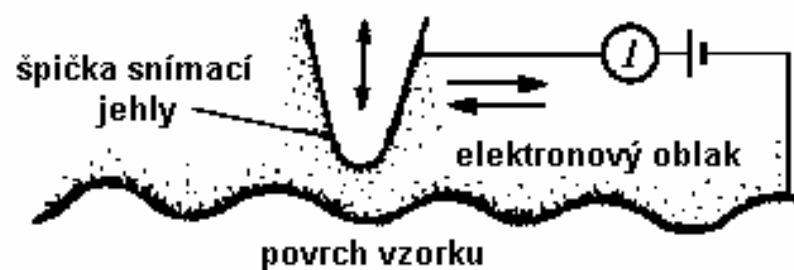
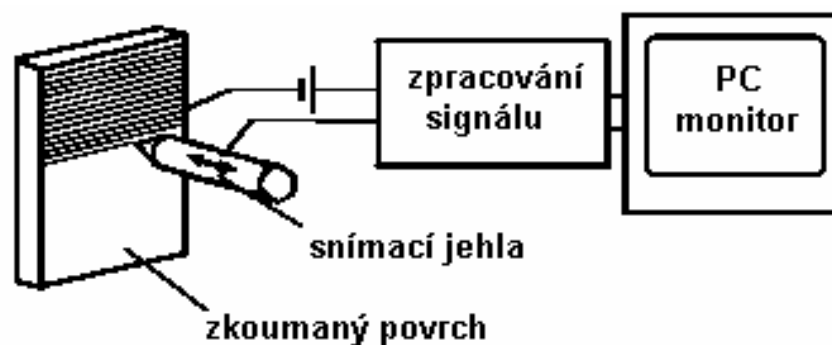
**DNA
zobrazená
pomocí
AFM -**

<http://spm.phy.bris.ac.uk/research/DNA/images/dna2.jpg>

Nové mikroskopické techniky

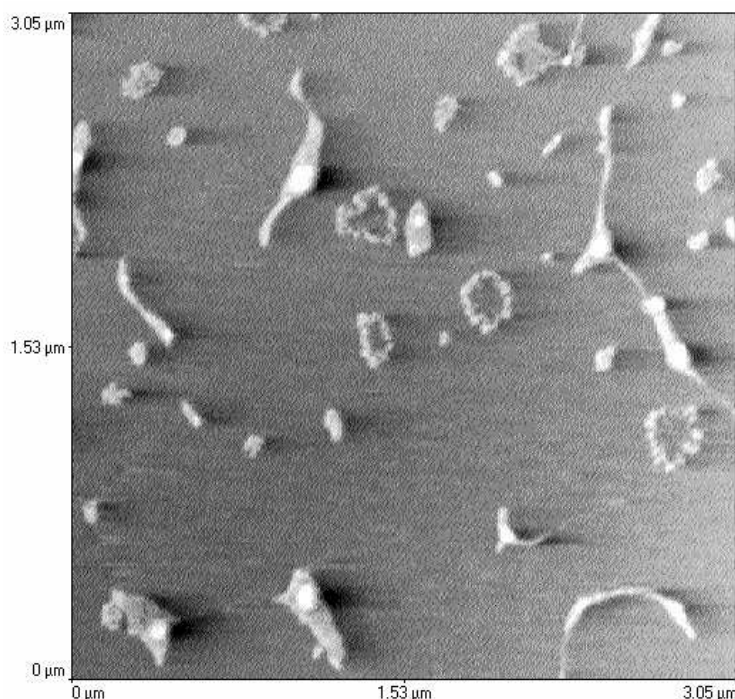
- skanovací tunelová elektronová mikroskopie (*scanning tunnelling electron microscopy, STM*).

Zjednodušené schéma elektronového skanovacího tunelového mikroskopu (STM). Nahoře celkové schéma přístroje, dole detail snímací kovové jehly, která svým pohybem kopíruje povrch vzorku. Jehla je nabitá kladně. Zpracováno podle Rontó a Tarjána (1994).



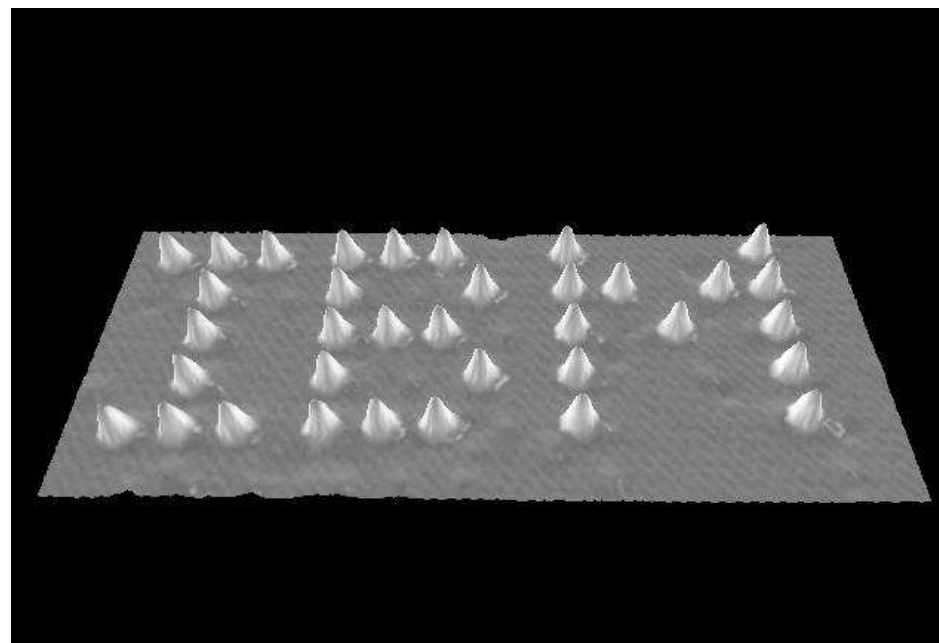
Nové mikroskopické techniky

skanovací tunelová elektronová
mikroskopie - STM.



Rozštěpené a nerozštěpené kruhy
plasmidové DNA

•<http://www.sci.port.ac.uk/spm/overfig5.htm>



Nápis IBM vytvořený z atomů
xenonu na niklové podložce

<http://www.almaden.ibm.com/vis/stm/images/stm10.jpg>

Problém

- **Nelze** obecně předpokládat, že struktura bílkoviny v krystalickém stavu, v roztoku a *in situ* je identická. Bílkoviny jsou někdy aktivní jen jako integrální součásti jiných struktur. Struktura NK bude ovlivňována interakcí s bílkovinami. Lokální změnu struktury DNA vyvolávají i látky, které se mohou vmezeřit (interkalovat) mezi paralelně uspořádané báze v dvoušroubovici.

Metody separace koloidů a hrubých disperzí

Pomíjíme chromatografii a chemické metody.

Dva cíle:

- Separace disperzního prostředí a disperzního podílu.
- Rozdělení (frakcionace) polydisperzních systémů na složky.
- Příklad: analýza krevní plazmy, mozkomíšního moku aj.

a) Ultrafiltrace.

- Membrána propouští jen rozpouštědlo a malé molekuly. Na koloid je nutno působit zvýšeným tlakem, který překonává jeho onkotický tlak a urychluje přestup rozpouštědla na druhou stranu membrány - velmi šetrná metoda.
- Chceme-li z koloidu odstranit pouze nízkomolekulární příměsi, ne však rozpouštědlo, lze použít dialýzu.
- Dialyzační princip se uplatňuje i v umělé ledvině.

Metody separace koloidů a hrubých disperzí

- b) Sedimentace
- K jejímu urychlení se používají centrifugy (ultracentrifugy, až několika set tisíc ot./min, až miliony g).
- Sedimentační rychlost závisí na rozdílu hustot částic a prostředí, na jejich velikosti a tvaru. Hlavně se uplatňují tři síly:
- 1) Vztlková dle Archimedova zákona:

$$F = (\rho - \rho') \cdot V \cdot a = (\rho - \rho') \cdot V \cdot r \cdot \omega^2$$

kde ρ a ρ' jsou hustoty částic a rozpouštědla, V objem částice, a odstředivé zrychlení, r poloměr otáčení, ω úhlová rychlost.

- 2) Odstředivá:

$$F = m_{ef} \cdot r \cdot \omega^2$$

kde m_{ef} je tzv. efektivní hmotnost: $m_{ef} = V(\rho - \rho')$

- 3) Odporu proti pohybu tělesa v kapalině
(Stokesův vzorec)

$$F = 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta \cdot v$$

kde r je poloměr částice, η dynamická viskozita, v rychlost pohybu částice vůči kapalině.

Sedimentaci částic charakterizujeme pomocí **sedimentačního koeficientu s [s]**:

$$s = \frac{v}{\omega^2 \cdot r}$$

Okamžitá rychlost je derivací dráhy podle času, $v = dr/dt$ (částice se pohybuje ve směru r , takže po vynásobení čitatele i jmenovatele ve vzorci výrazem ω^{-2} napíšeme:

$$s = \frac{dr \cdot \omega^{-2}}{dt \cdot r} = \omega^{-2} \cdot \frac{d \ln r}{dt}$$

- Po separaci proměnných a integraci získáváme rovnici:

$$\ln r = s \cdot \omega^2 \cdot t + \text{konst.}$$

s je obsaženo ve směrnici závislosti přirozeného logaritmu r na čase. Tento graf lze získat proměřováním polohy částice r během sedimentace.

- Sedimentační koeficient menších molekul bílkovin - 10^{-13} s.

- Jednotka sedimentačního koeficientu:

$$\text{svedberg S} \quad (= 1 \cdot 10^{-13} \text{ s}).$$

- Zviditelnění sedimentujících látek: měřením absorpce UV záření nebo indexu lomu.

- Sedimentační koeficient s závisí na molekulové hmotnosti M dle Svedbergova vzorce:

$$s = \frac{M \cdot \left(1 - \frac{\rho}{\rho_b}\right)}{f \cdot N_A}$$

kde ρ je hustota prostředí, ρ_b hustota molekul, N_A Avogadrova konstanta a f tzv. frikční neboli hydrodynamický koeficient.

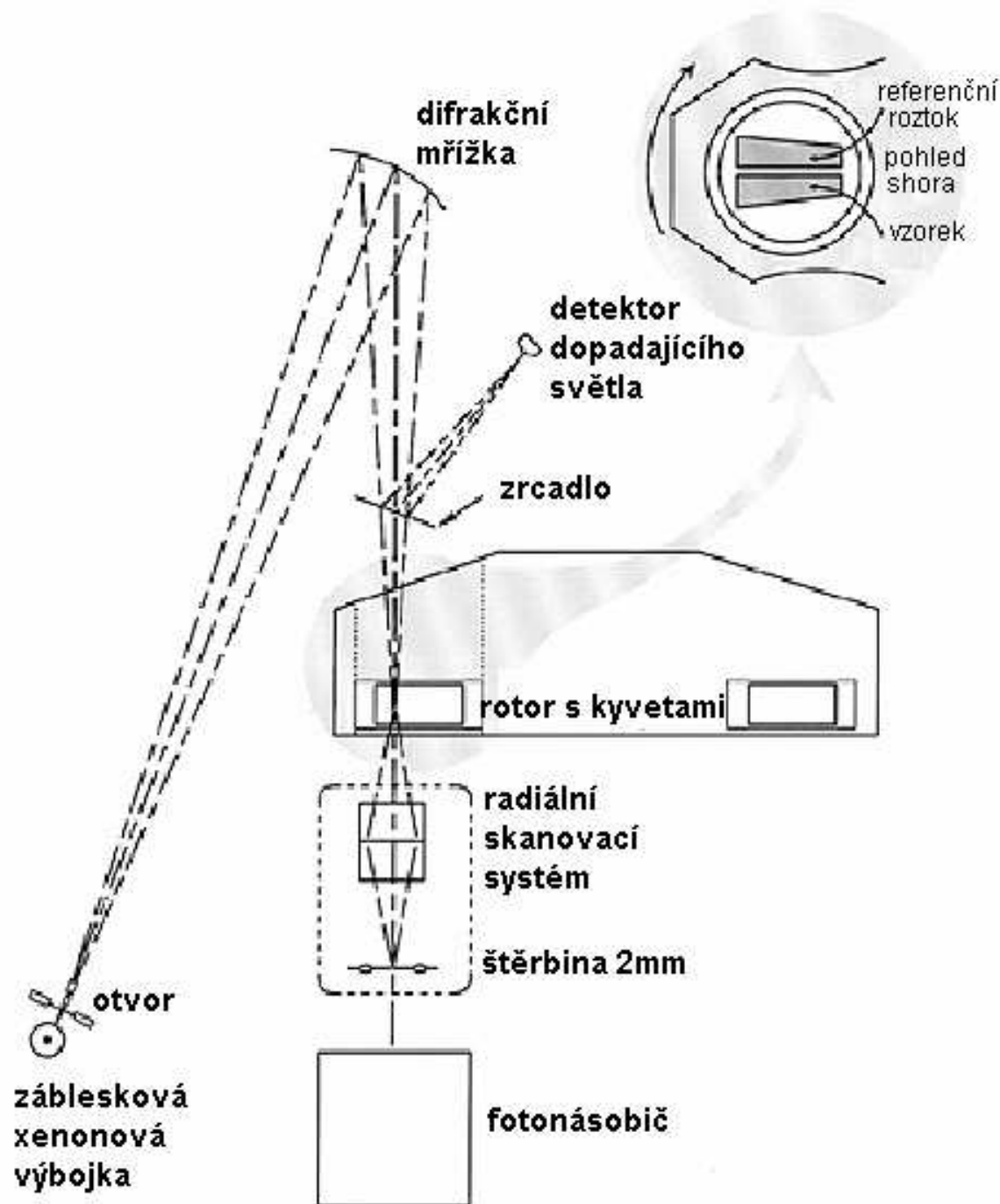
Hustota makromolekul se měří pyknometricky, hydrodynamický koeficient měřením difuze.

Sedimentační analýza

- K rozdělení polydisperzního koloidu dochází vlivem různě rychlého odstředivého pohybu jednotlivých složek (frakcí). Dvě možnosti:
- 1) Analyzovaným koloidem se převrství čisté rozpouštědlo. Po určité době odstředování se zjišťuje poloha jednotlivých složek koloidu v rozpouštědle - zónová sedimentace.
- 2) Sedimentace v hustotním gradientu - v kyvetě se intenzívním odstředováním připraví hustotní gradient vhodné látky (např. CsCl). Pohyb sedimentující složky se zastaví tam, kde vztlaková síla bude stejná jako síla odstředivá.
- Důkaz tzv. semikonzervativního modelu replikace DNA.

Analytická ultra-centrifuga

schéma podle: http://www.embl-heidelberg.de/ExternalInfo/geerlof/draft_frames/flowchart/Characterization/AUC/auc.html#WhyAnalyticalUltracentrifugation



Życzę smacznego!

