Struktura bílkovin očima elektronové mikroskopie

Roman Kouřil

Katedra Biofyziky (http://biofyzika.upol.cz) Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc

Světelný vs. transmisní elektronový mikroskop (TEM)



Čočky: skleněné Zvětšení: 1 000 – 2 000x Rozlišení: 400 - 200 nm

elektromagnetické až 2 000 000x 1 – 0,05 nm

Rozlišení světelného a elektronového mikroskopu



Rozlišení světelného a elektronového mikroskopu

Světelný mikroskop



Rostlinné buňky s chloroplasty

Skenovací elektronový mikroskop



Octomilka obecná, Tardy et al. (2012) Fly

Transmisní elektronový mikroskop



Řez: thylakoidní membrány



izolovaný fotosystém I ze sinic

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) biologických vzorků

- citlivost biologických vzorků na radiační poškození elektronovým svazkem
- TEM používá nízkou intenzitu elektronového svazku
- nutnost použití citlivých detektorů





Obrazová analýza "zašuměných" projekcí: srovnání projekcí



Obrazová analýza "zašuměných" projekcí: srovnání projekcí



Obrazová analýza "zašuměných" projekcí: průměrování projekcí



Určení 2D/3D struktury proteinů

- nízké rozlišení rozměry/tvar proteinů
- medium (8-25Å) vnitřní strukturní rysy proteinů
- vysoké rozlišení (<8Å) atomární rozlišení

Vzorek

- velké proteinové komplexy
- proteiny nevhodné pro RTG analýzu

Množství a čistota vzorku

- není požadavek na čistou izolaci
- malé objemy (cca. 2-5 µl)

Příprava vzorku pro EM

- pokojová teplota
- kryogenní teplota
- snímkování vzorku

Obrazová analýza projekcí

software pro obrazovou analýzu - 2D/3D

Aplikace TEM ve studiu fotosyntetických proteinů

Aplikace TEM ve studiu fotosyntetických proteinů

Fotosyntetický aparát v thylakoidní membráně chloroplastů



Předmět studia: fotosystém II (PSII) a fotosystém I (PSI)

Elektronová mikroskopie a obrazová analýza PSII

Projekce individuálních molekul PSII – nízký poměr S/N, náhodná orientace

Výběr projekcí – datový soubor > 40,000 projekcí

Srovnání projekcí – translace, rotace

Výpočet průměrné projekce – vyšší poměr S/N



Elektronová mikroskopie a obrazová analýza PSII

Projekce individuálních molekul PSII – nízký poměr S/N, náhodná orientace Výběr projekcí – datový soubor > 40,000 projekcí

Srovnání projekcí – translace, rotace

Výpočet průměrné projekce – vyšší poměr S/N



Výsledná průměrná

Strukturní model PSII superkomplexu

PSII superkomplex s rozlišením 12Å



Caffarri et al. (2009) EMBO J

Přenos excitační energie v PSII superkomplexu



Kouřil et al. (2009) BBA-Bioenergetics

Pseudo-atomární model PSII superkomplexu

- Dimer PSII core komplexu: C2
- Monomerní antény: CP29 CP26 CP24
- Trimery antén (LHCII): typ "S" a "M"

Studium molekul pomocí TEM – nástroj rychlé analýzy



Caffarri et al. (2009) EMBO J

Rychlá detekce různých forem proteinového komplexu



Náhodně rozmístěné PSII

Uspořádaná organizace PSII



Studium interakcí PSII komplexů, hustoty PSII komplexů v membráně za daných fyziologických podmínek

Aklimace rostlin na různou intenzitu světla

Vysoká intenzita světla



800-1100 μ molm⁻²s⁻¹

Nízká intenzita světla



$20 \ \mu molm^{-2}s^{-1}$

Plošná hustota náhodně uspořádaných PSII komplexů





Kouřil et al. (2013) BBA-Bioenergetics

TEM přechodných nebo nestabilních komplexů: PSI-LHCII komplex



Světlo indukuje tvorbu specifického komplexu mezi PSI a anténou LHCII

Strukturní analýza nestabilního a přechodného komplexu PSI-LHCII

TEM solubilizovaných thylakoidních membrán



Identifikace neznámého komplexu



Kouřil et al. (2005) Biochemistry

Pro identifikaci proteinového komplexu využita RTG struktura jednotlivých komponent

Strukturní analýza "vzácných" komplexů

CN-PAGE separace thylakoidních membrán



Strukturní analýza PSI-NDH superkomplexu

Pomocí TEM odhaleny dvě formy PSI-NDH superkomplexu



Studium interakcí v rámci PSI-NDH superkomplexu



Strukturní model pomáhá pochopit funkci PSI-NDH superkomplexu ve fotosyntetickém elektronovém transportu



Kouřil et al. (2014) Plant J

Tvorba komplexu je důležitá pro účinné vychytávání redukovaného Fd NDH komplexem

Strukturní analýza superkomplexů respiračního cyklu v mitochondriích



Jednotlivé komplexy respiračního cyklu vzájemně tvoří superkomplexy

Strukturní analýza superkomplexu III₂-IV_{1,2}

Strukturní analýza odhalila různé projekce superkomplexu III_2 - $IV_{1,4}$



Strukturní analýza superkomplexu III₂-IV_{1,2}

Sestavený atomární model

С

Matrix B D Ε

Heinemeyer et al. (2007) *J Biol Chem* Lehninger - Principles of Biochemistry, *5th edition*

TEM vs. projekce atomárního modelu

Funkční implikace z určeného atomárního modelu



Komplex III₂:

cyt b, cyt c_1 , hinge protein, subunit G, H, and cardiolipin

Komplex IV:

Helixes of COX1, 2, 4, 7, 8

Funkce superkomplexu oxido-redukce cyt *c*

Heinemeyer et al. (2007) J Biol Chem

Princip elektronové tomografie: výpočet 3D struktury z 2D projekcí



Nahrání tomografické série 2D projekcí 3D objektu

3D objekt je vypočítán z 2D projekcí pomocí metody zpětné projekce

Příprava granálních membrán pro kryo-elektronovou tomografii

Granální membrány



Příprava kryo-vzorku Zmrazení vzorku na 77K

> Přenos zmrazeného vzorku do mikroskopu



Kryogenní elektronová tomografie granální membrány

- 1. Nahrání série snímků v rozmezí -66° to +66° (step 2°)
- 2. Srovnání série snímků
- 3. Rekonstrukce tomogramu



Modely granální membrány



Tomografie odhaluje strukturu granální membrány a pozici PSII komplexů

Tomografické řezy granální membrány



- Dvě membrány tvoří 4 membránové vrstvy
- PSII komplexy rozlišeny ve 4 membránových vrstvách
- 3D analýza PSII komplexů \Rightarrow orientace PSII komplexů v membráně

3D analýza PSII komplexů





3D model PSII core complexu – analýza 100 sub-objemů

Tomografická data



Model granální membrány



Shrnutí: elektronová mikroskopie ve studiu fotosyntézy

Single particle EM

Strukturní analýza izolovaných proteinů



EM tylakoidních membrán

2D organizace a interakce PSII komplexů v membráně

Kryo elektronová tomografie

3D organizace tylakoidní membrány a PSII komplexů





Katedra Biofyziky (http://biofyzika.upol.cz)

