

Δομική βιολογία

Διάλεξη 3η :

Μεθοδολογία :

Ηλεκτρονική μικροσκοπία : τρισδιάστατη επανασύσταση,
NMR : εισαγωγή στο βιολογικό NMR, μορφή αποτελεσμάτων,
PDB : η μοναδική πρωτοταγής βάση δεδομένων της δομικής βιολογίας.

Ηλεκτρονική μικροσκοπία : Αρχή λειτουργίας

Η αρχή της λειτουργίας του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου βρίσκεται στην θεωρία de Broglie για την κυματική φύση ταχέως κινουμένων σωματιδίων :

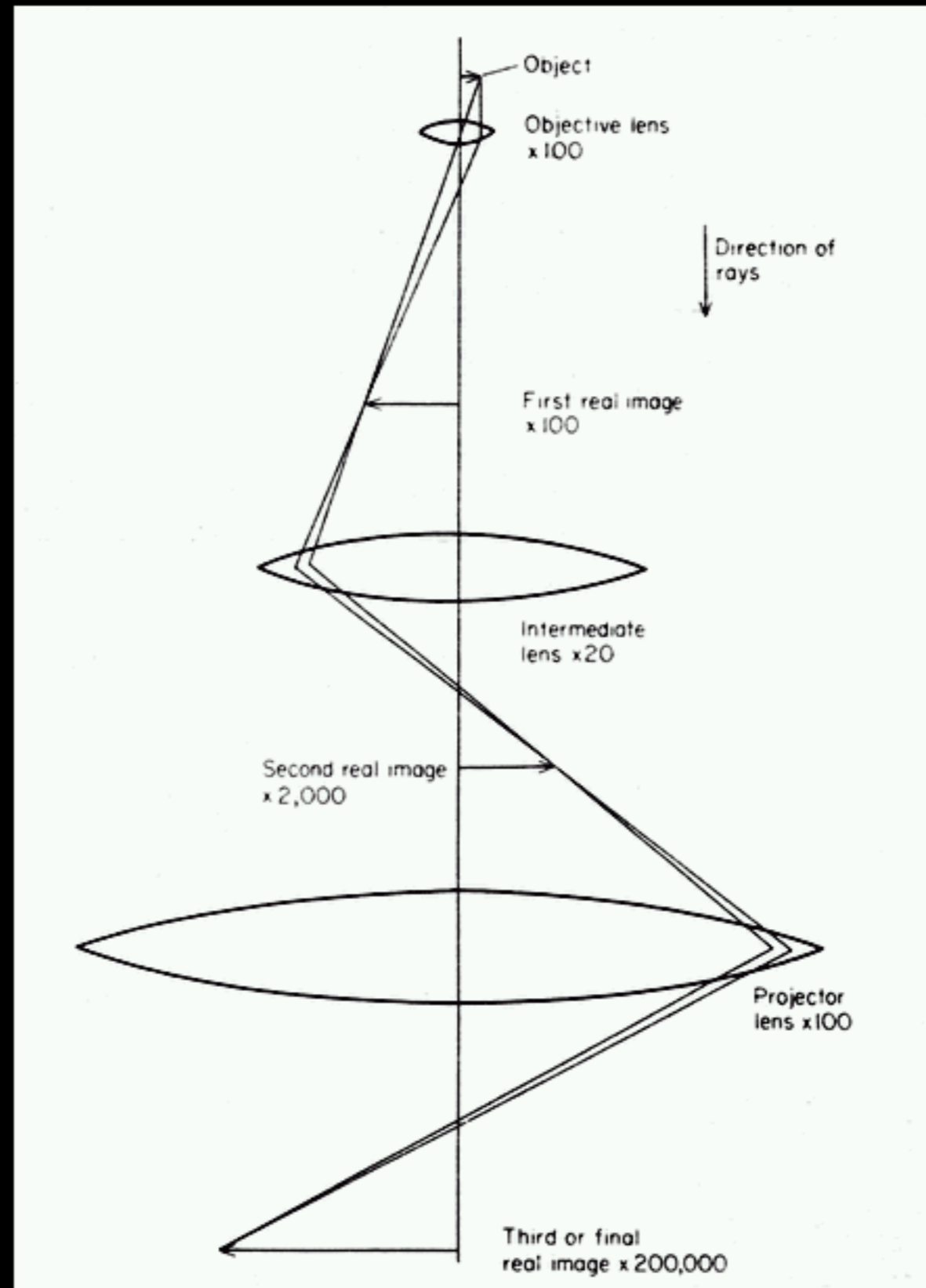
$$\lambda = h / (m \cdot u)$$

όπου λ είναι το ισοδύναμο μήκος κύματος των σωματιδίων, h είναι η σταθερά του Planck, m είναι η μάζα ηρεμίας των σωματιδίων και u η ταχύτητα τους. Για τα συνηθισμένα ηλεκτρονικά μικροσκόπια (100 KV) το ισοδύναμο μήκος κύματος των ταχέως κινουμένων ηλεκτρονίων είναι 0.037Å.

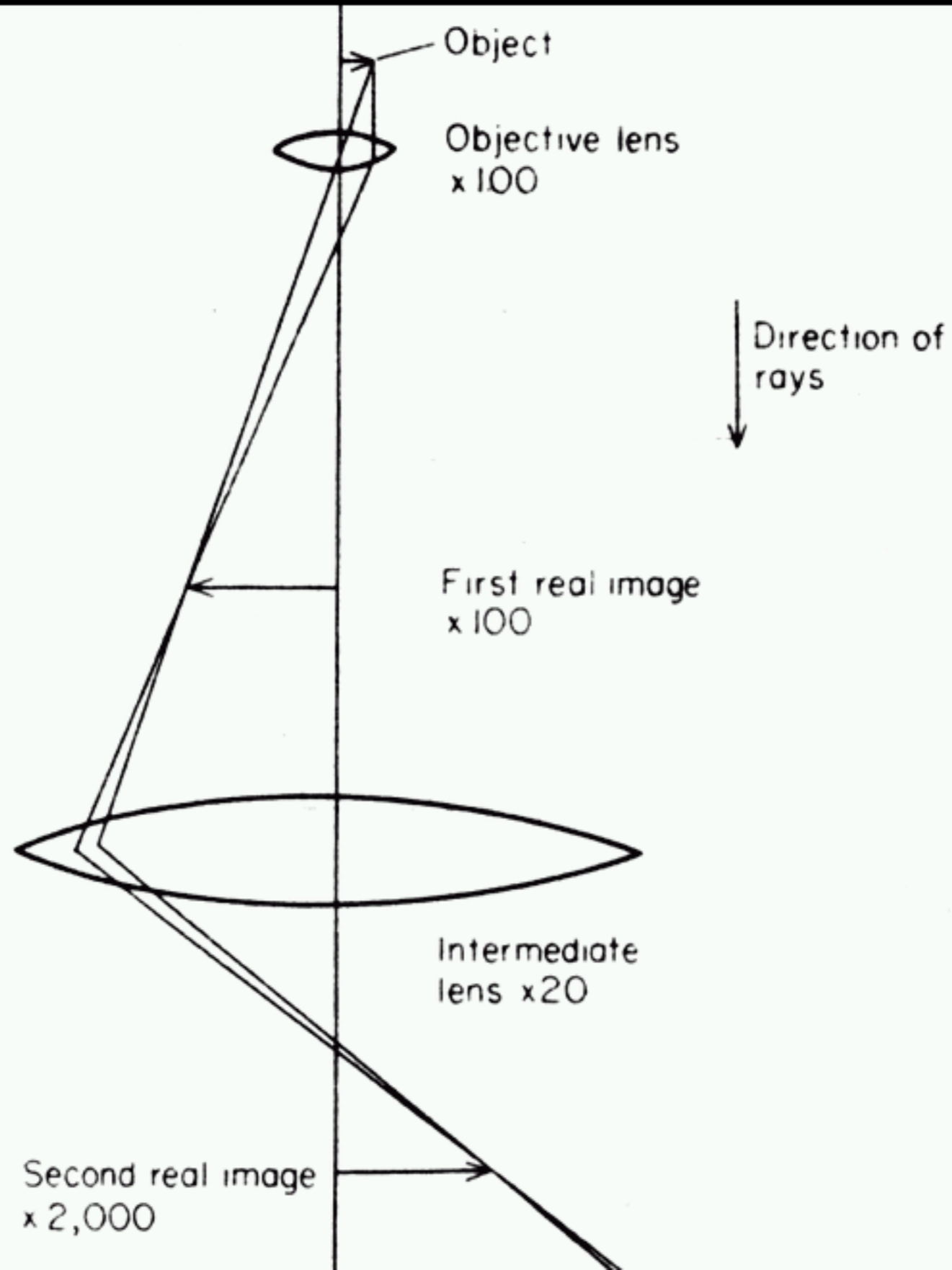
Δομή ΗΜ

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι δομικά ανάλογο με ένα οπτικό μικροσκόπιο με τη διαφορά ότι αντί για ορατή ακτινοβολία χρησιμοποιούνται ταχέως κινούμενα ηλεκτρόνια, οι φακοί είναι στην πραγματικότητα μαγνητικά πεδία παραγόμενα από ηλεκτρομαγνήτες, και ότι ολόκληρο το σύστημα βρίσκεται σε υψηλό κενό (της τάξης των 10^{-7} Torr).

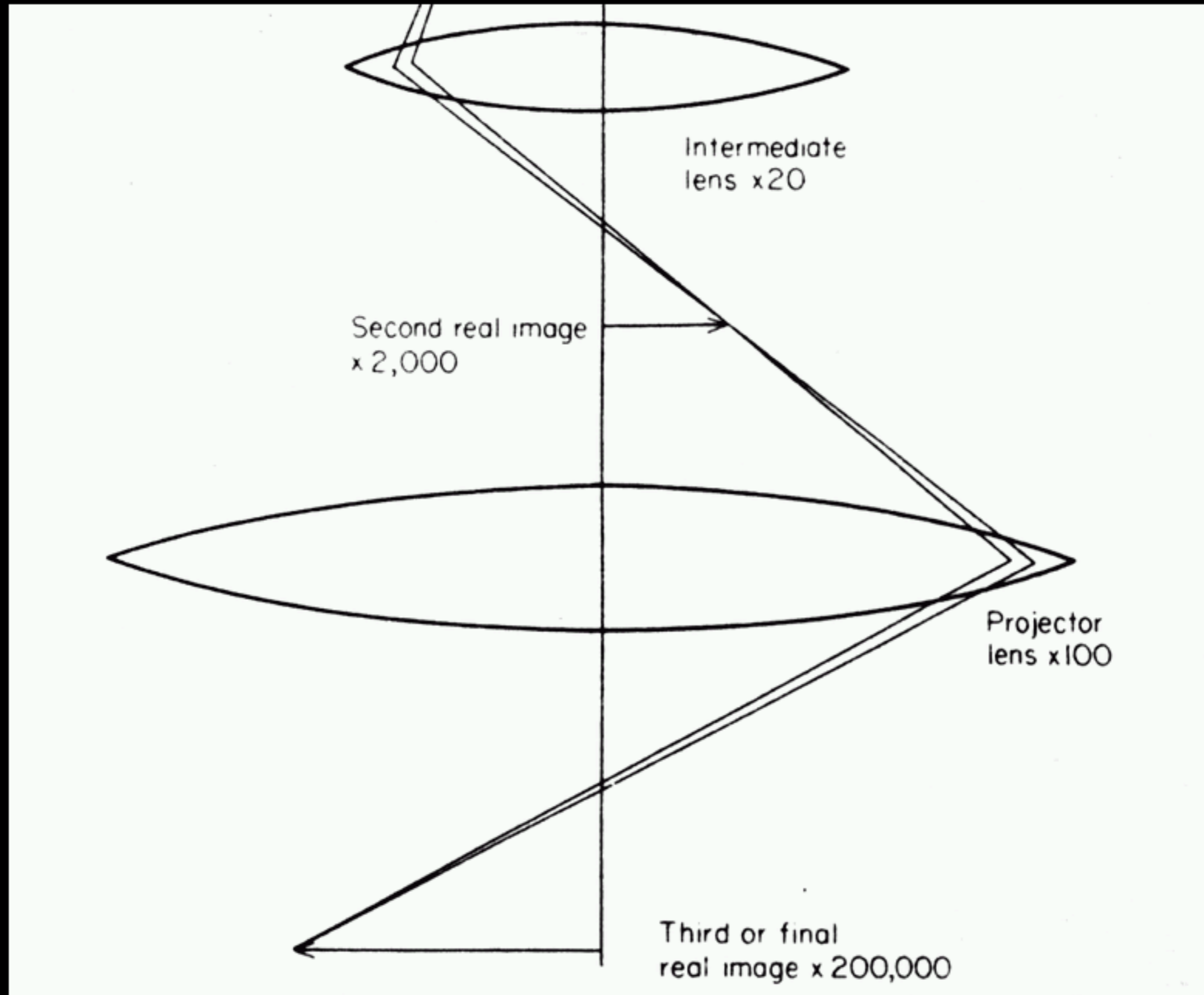
HM : Αναλογία με ΟΠΤΙΚΟ



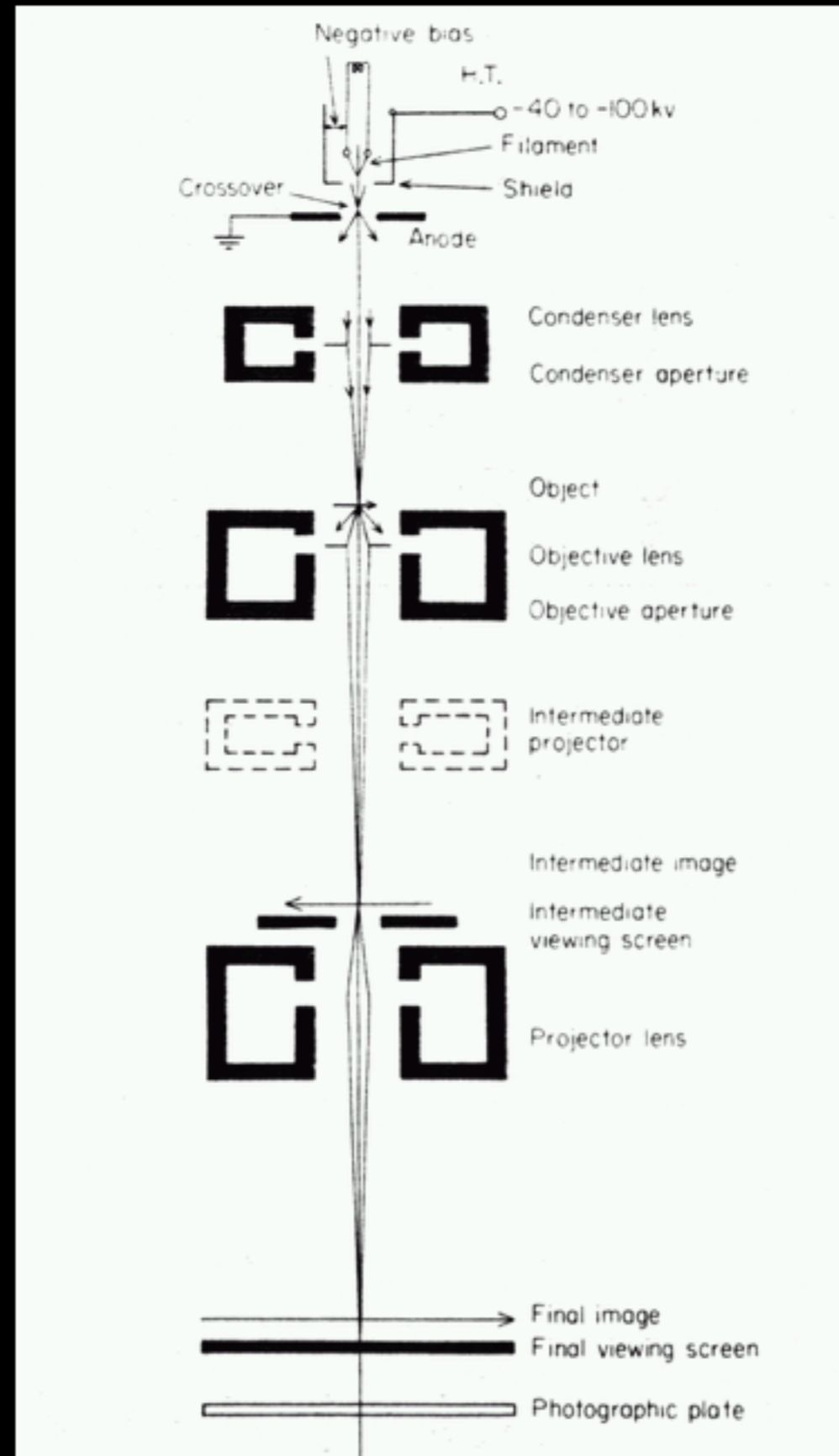
HM : Αναλογία με ΟΠΤΙΚΟ



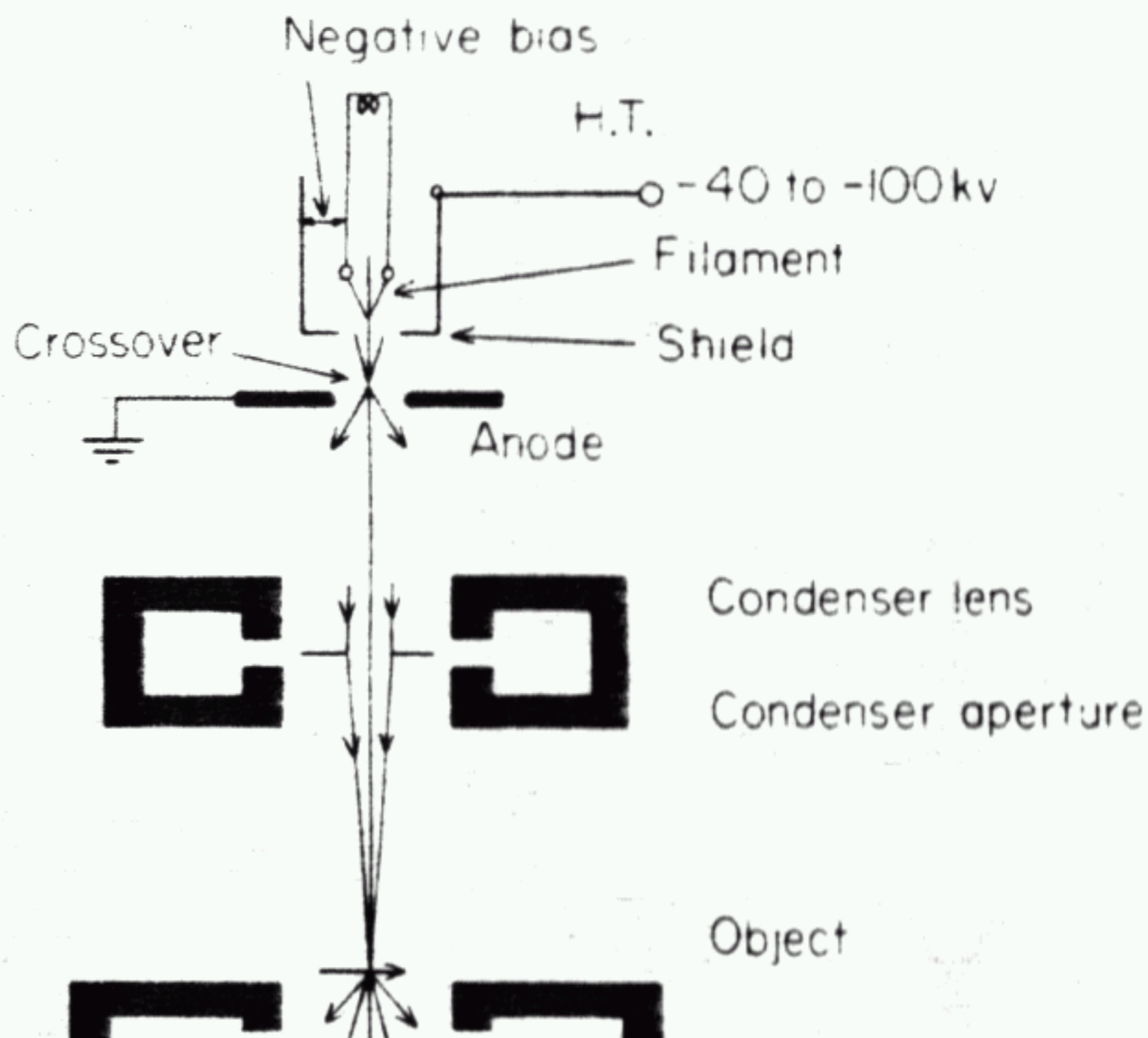
HM : Αναλογία με ΟΠΤΙΚΟ



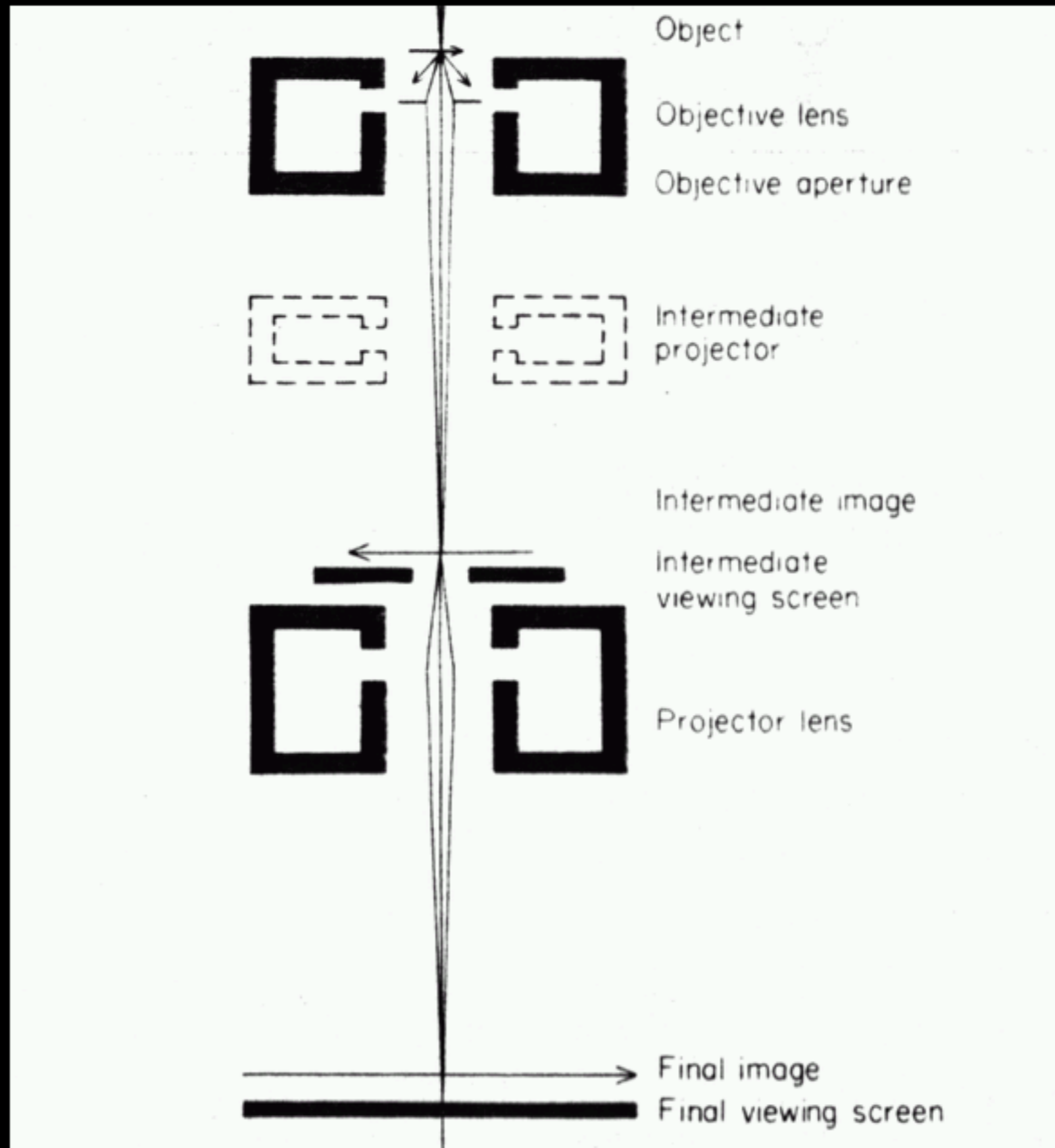
Δομή ΗΜ



Παραγωγή ηλεκτρονίων



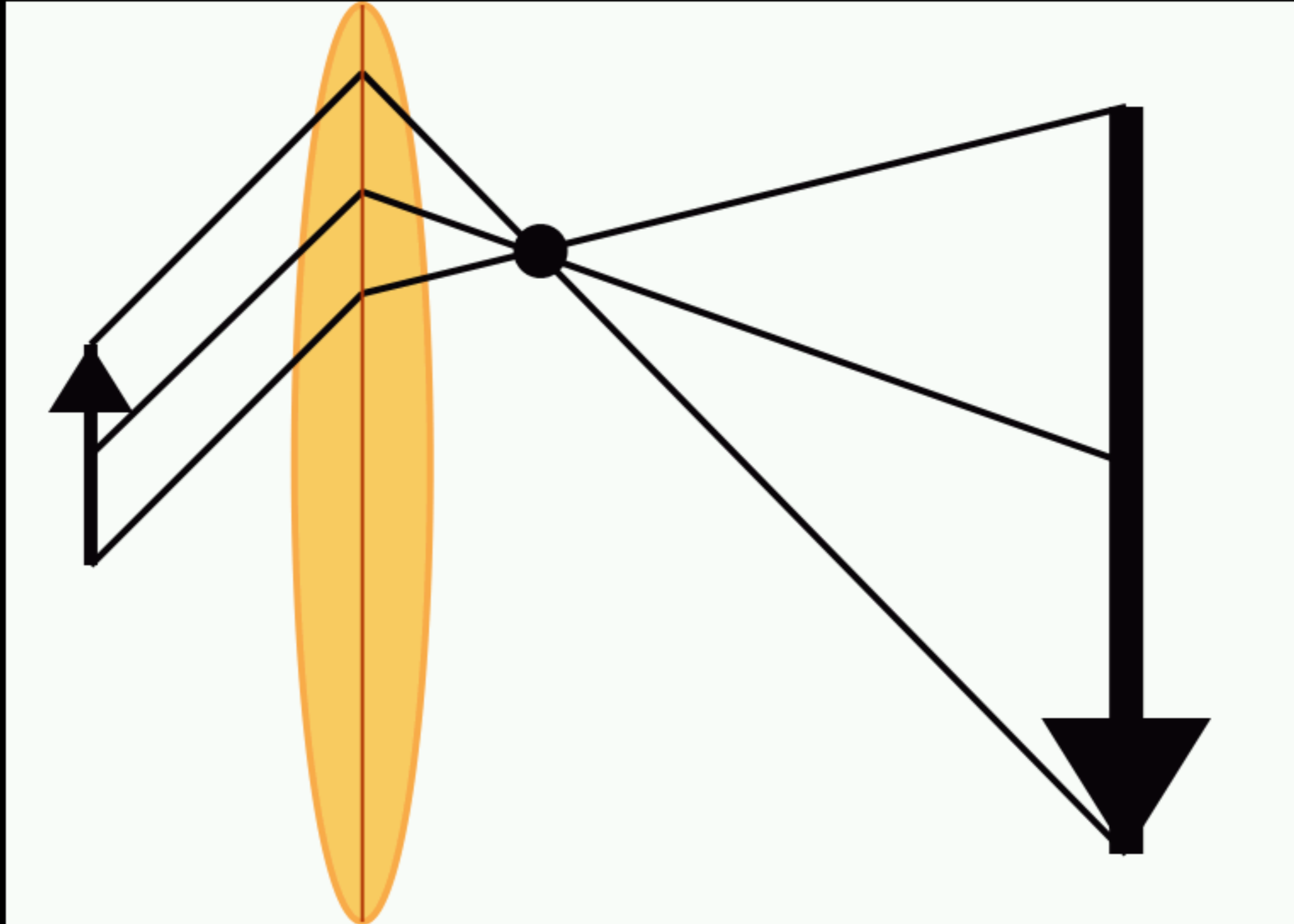
Δημιουργία ειδώλου



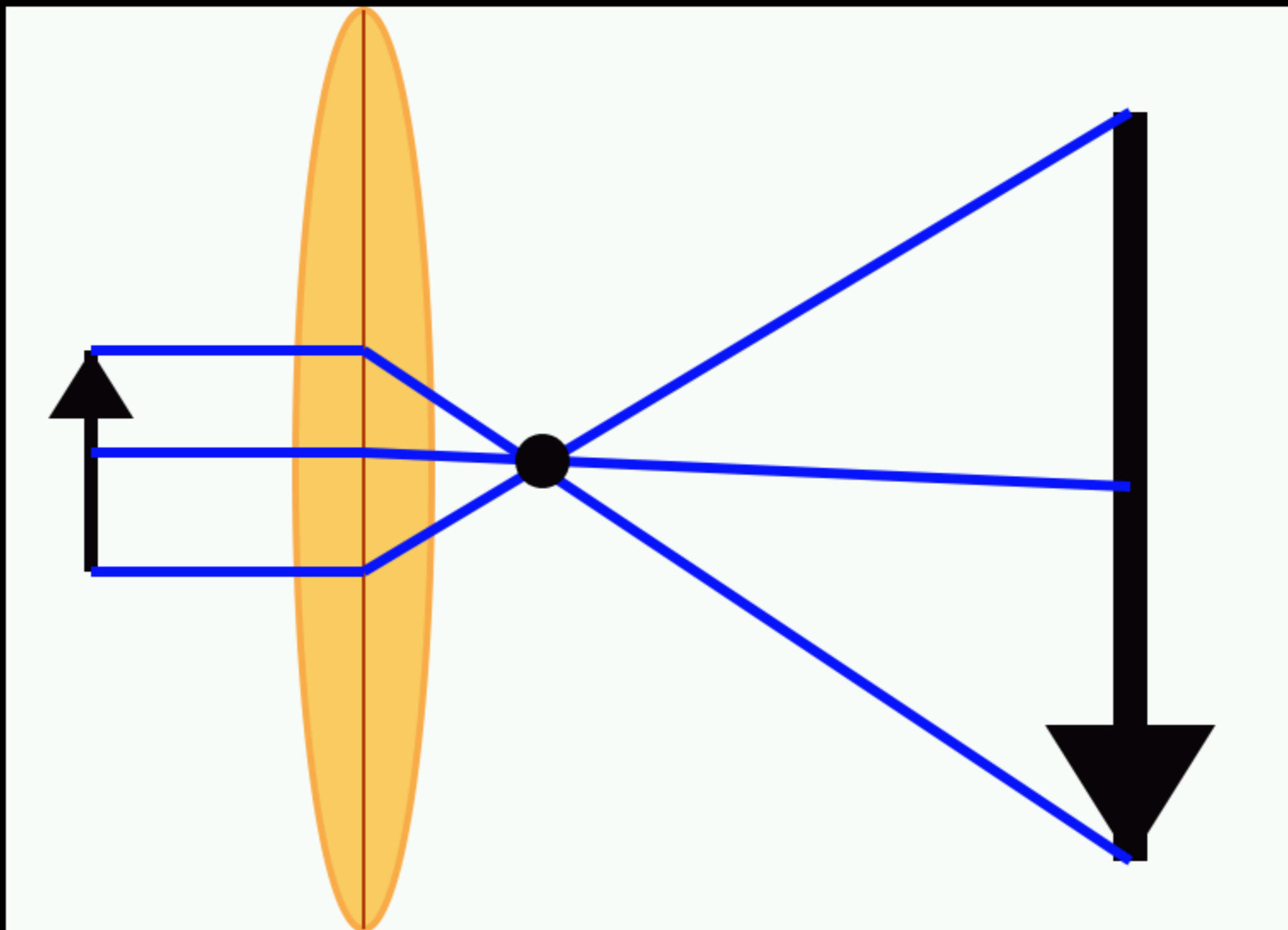
Φάσμα περίθλασης

Το φάσμα περίθλασης (ηλεκτρονίων) του αντικειμένου μπορεί να ανακτηθεί με αυτούσιο τον εξοπλισμό που παρέχει το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Ο λόγος είναι ότι το φάσμα περίθλασης ενός αντικειμένου είναι ένα εγγενές τμήμα της διαδικασίας σχηματισμού του ειδώλου του αντικειμένου και αντιστοιχεί στο επίπεδο εκείνο του οπτικού άξονα στο οποίο συγκλίνουν όσες ακτίνες είχαν σκεδαστεί παράλληλα από το αντικείμενο. Προκειμένου να ανακτηθεί το φάσμα περίθλασης αρκεί ο φακός που ακολουθεί τον αντικειμενικό (ο ενδιαμέσος) να εστιαστεί όχι στο επίπεδο του ειδώλου (του αντικειμενικού) αλλά στο επίπεδο περίθλασης.

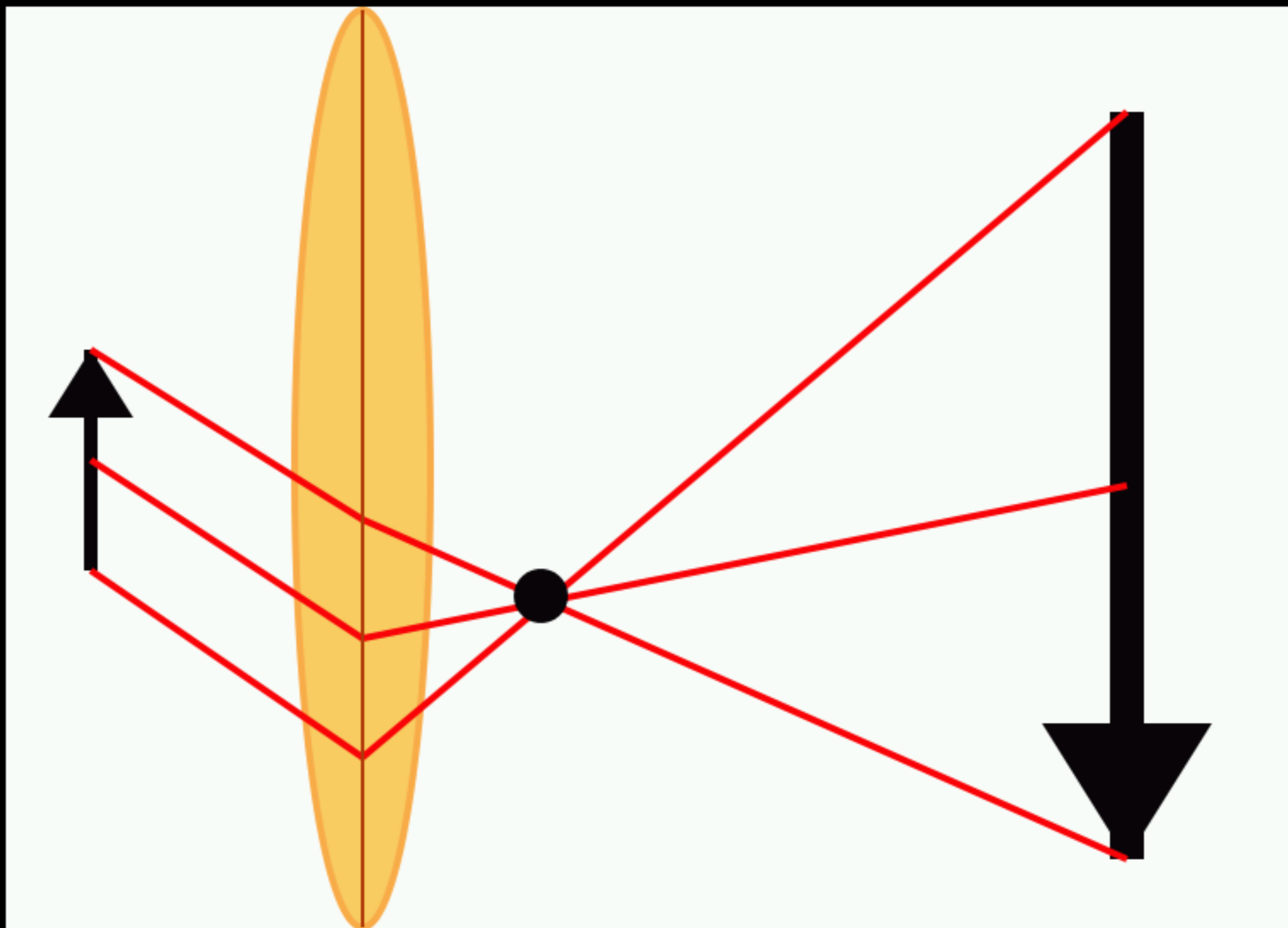
Φάσμα περίθλασης



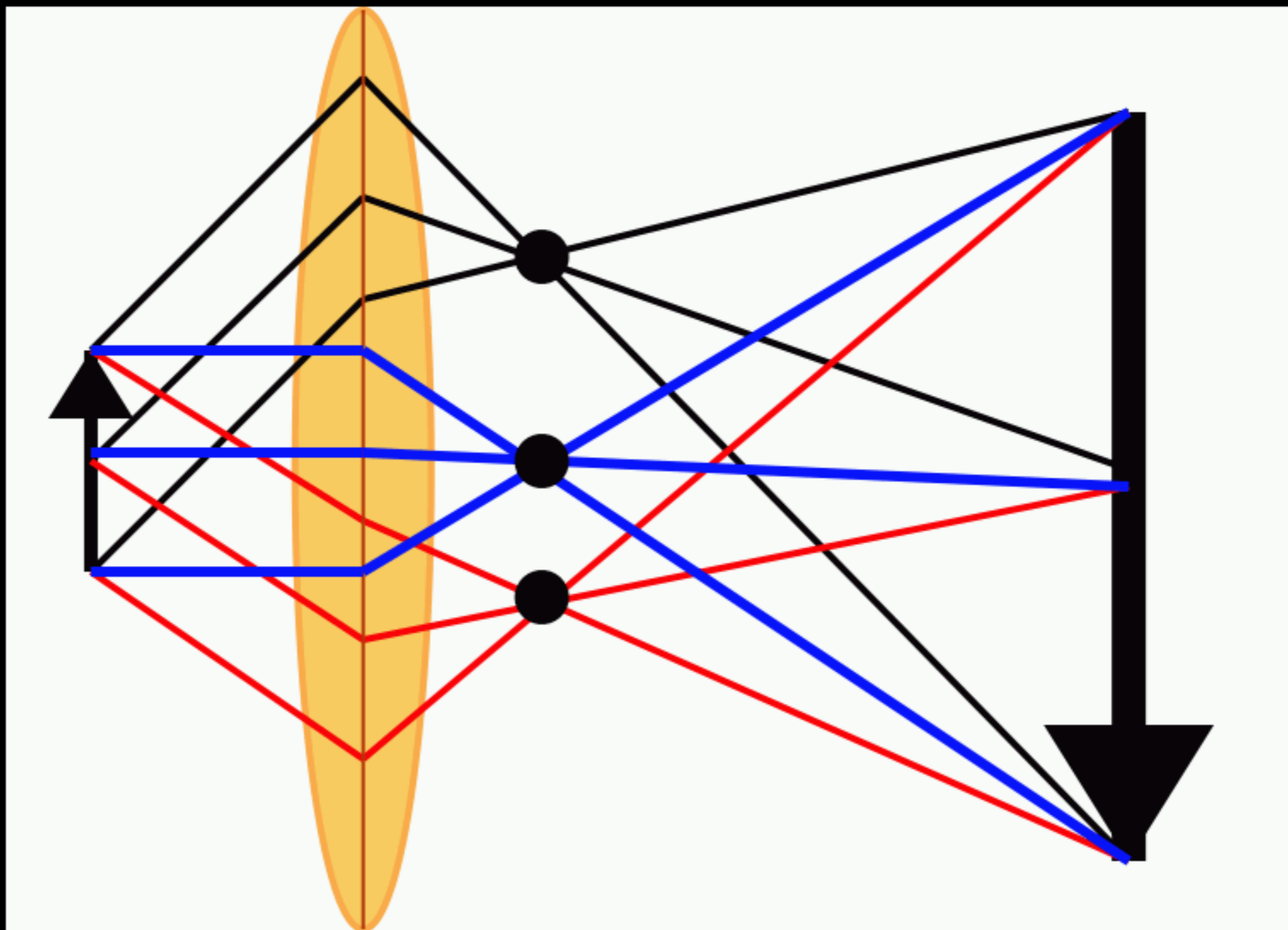
Φάσμα περίθλασης



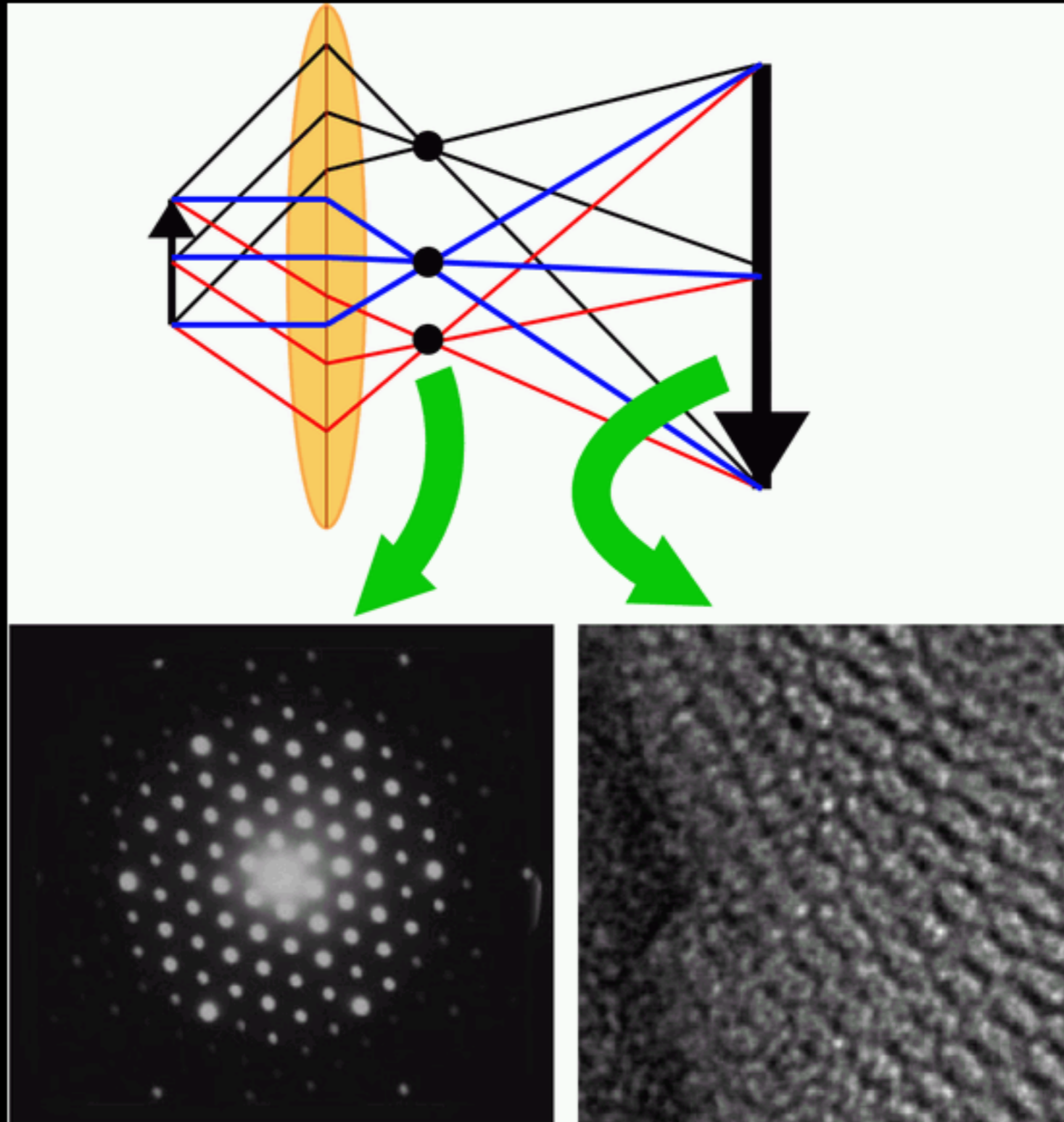
Φάσμα περίθλασης



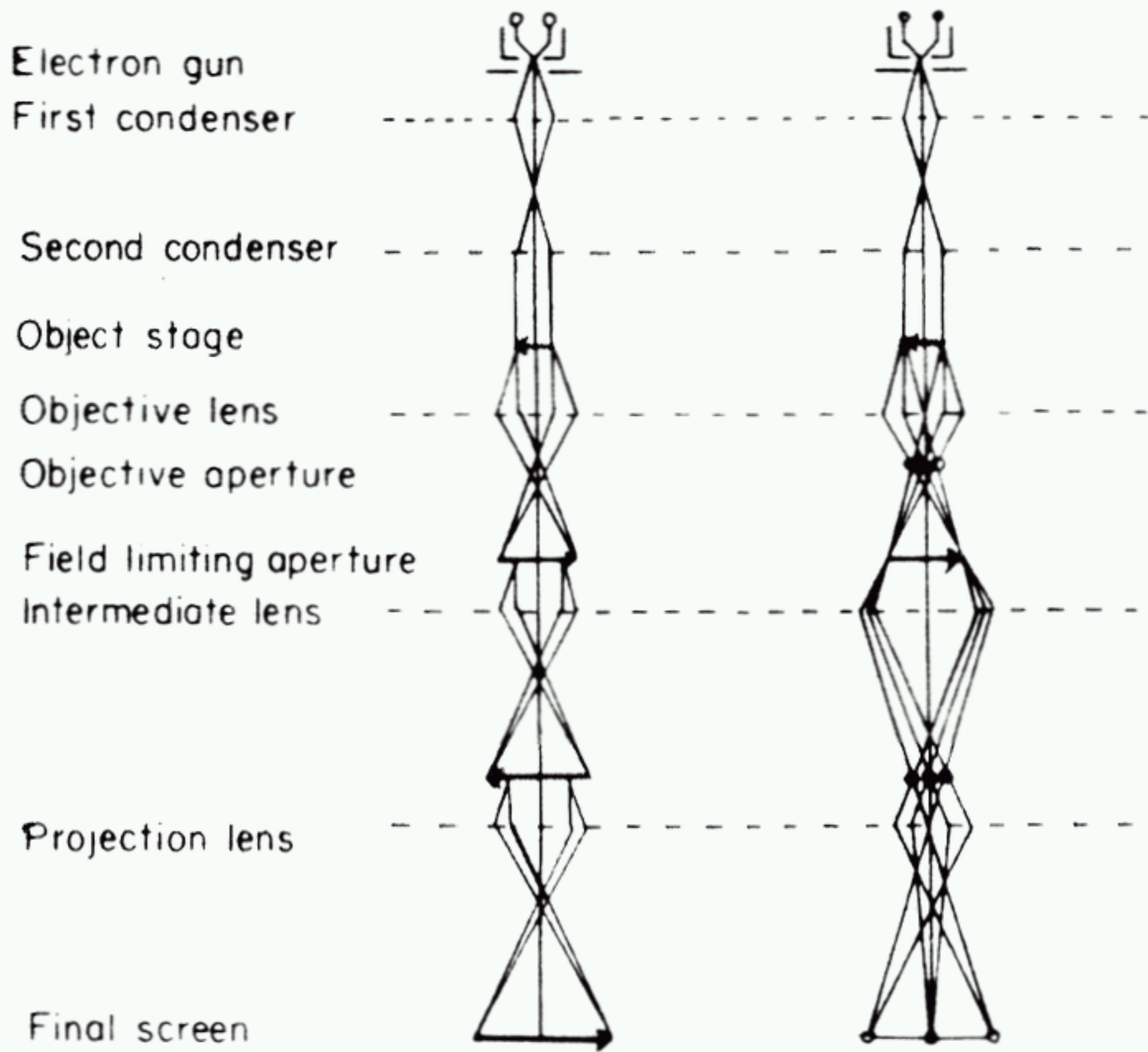
Φάσμα περίθλασης



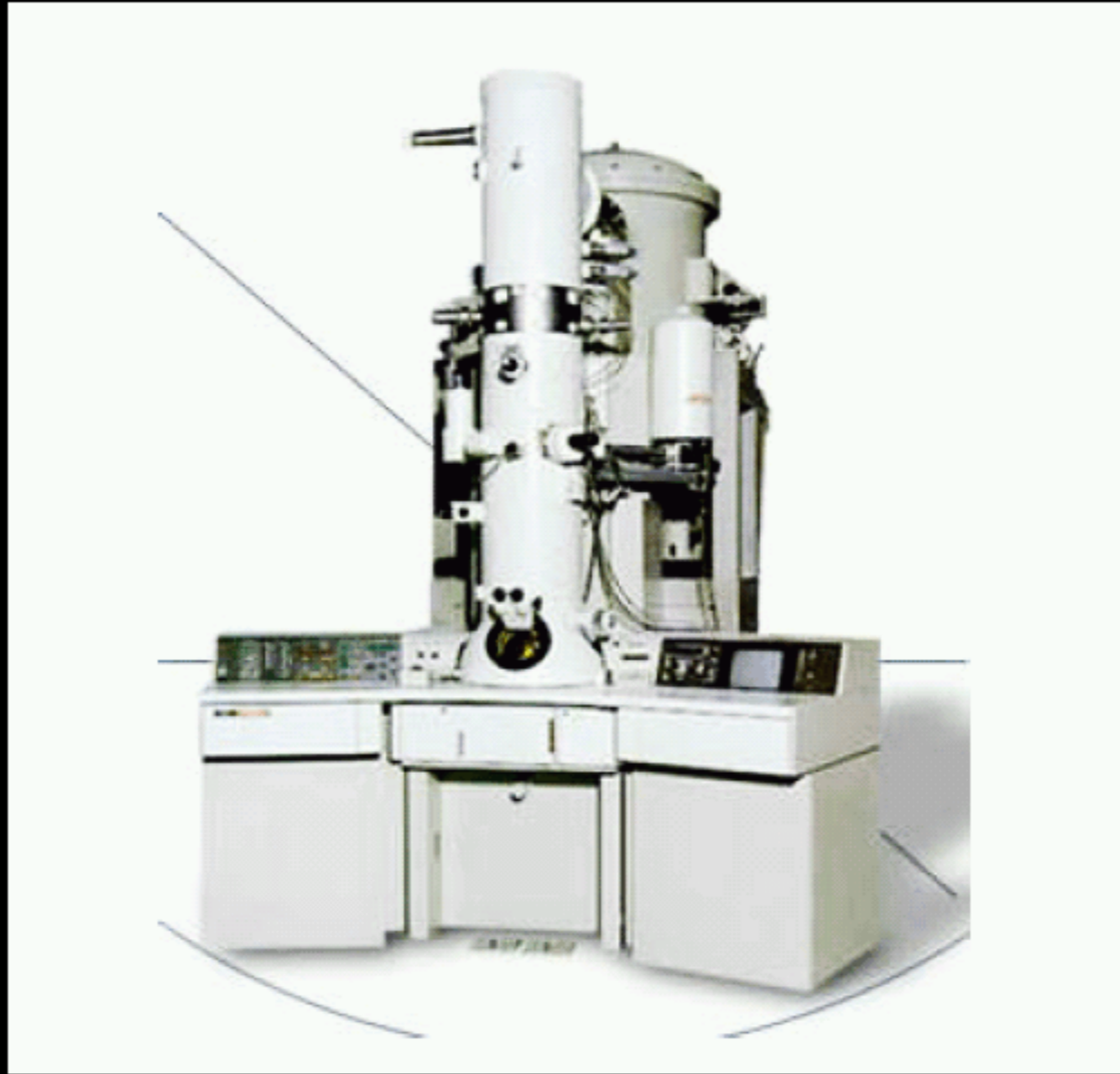
Φάσμα περίθλασης



Φάσμα περίθλασης



Εξοπλισμός ΗΜ.



Αλληλεπίδραση με την ύλη

Τα ηλεκτρόνια αλληλεπιδρούν ισχυρά με την ύλη και κυρίως με τους πυρήνες των ατόμων (για την ακρίβεια με το ηλεκτροστατικό δυναμικό τους).

Λόγω της ισχυρής αλληλεπίδρασης, μόνο πολύ λεπτά δείγματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν, κάνοντας την μέθοδο ιδανική για 'δισδιάστατους' κρυστάλλους (για παράδειγμα κρύσταλλοι διαμεμβρανικών πρωτεϊνών ενσωματωμένων σε λιπιδική διπλοστοιβάδα),

αλλά ...

Εστιακό μήκος & προβολές

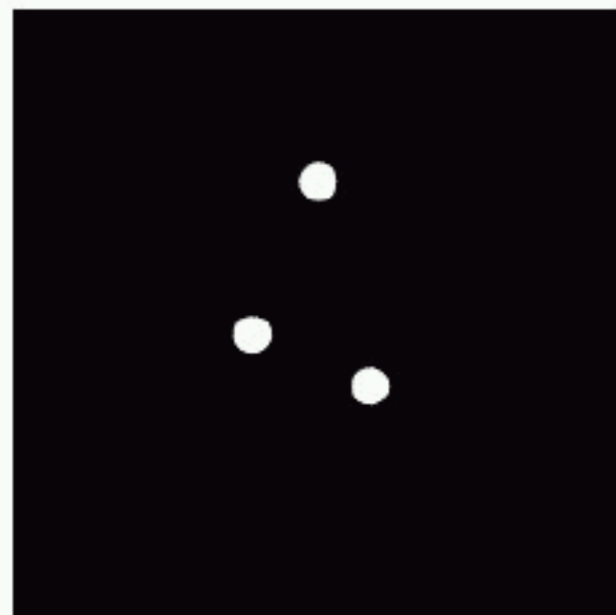
- Επειδή τα δείγματα είναι πολύ λεπτά σε σχέση με το εστιακό βάθος των φακών, είναι αδύνατο να εστιάσουμε σε διαφορετικά επίπεδα του αντικειμένου.
- Το αποτέλεσμα είναι ότι το είδωλο του αντικειμένου είναι η προβολή του αντικειμένου σε ένα επίπεδο κάθετο στον οπτικό άξονα του μικροσκοπίου.
- Αυτό σημαίνει ότι στο είδωλο του αντικειμένου η πληροφορία για την κατανομή της ύλης συμπιέζεται από τις τρεις διαστάσεις, σε δύο (η πληροφορία για το βάθος χάνεται).

Εστιακό μήκος & προβολές

Ένα από τα βασικά προβλήματα του προσδιορισμού δομών βιολογικών μακρομορίων με τη χρήση ΗΜ είναι λοιπόν η επανάκτηση της τρισδιάστατης δομής από τις δισδιάστατες προβολές της. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται τρισδιάστατη επανασύσταση.

Η αρχή στην οποία στηρίζεται η διαδικασία είναι το θεώρημα των προβολών (projection theorem), το οποίο προκύπτει άμεσα από τη θεωρία των μετασχηματισμών Fourier. Η θεωρία των μετασχηματισμών Fourier θα αναπτυχθεί στα πλαίσια των ειδικών κεφαλαίων της δομικής βιολογίας. Εδώ θα περιοριστούμε σε μια εικονογραφημένη επεξήγηση της μεθόδου.

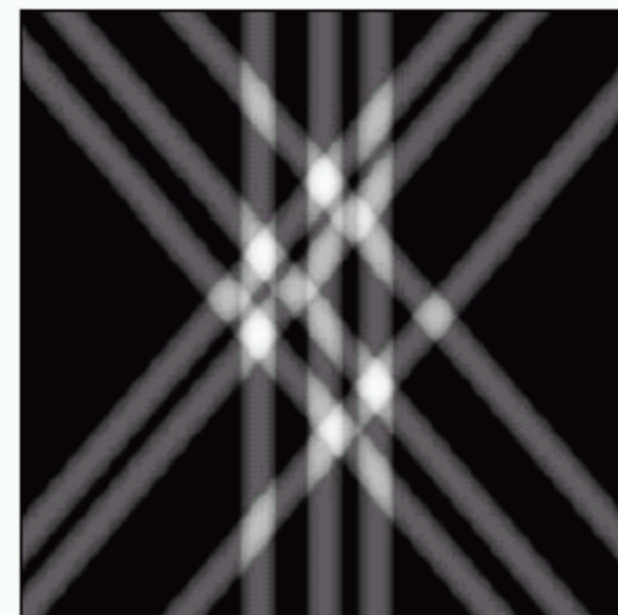
Θεώρημα προβολών



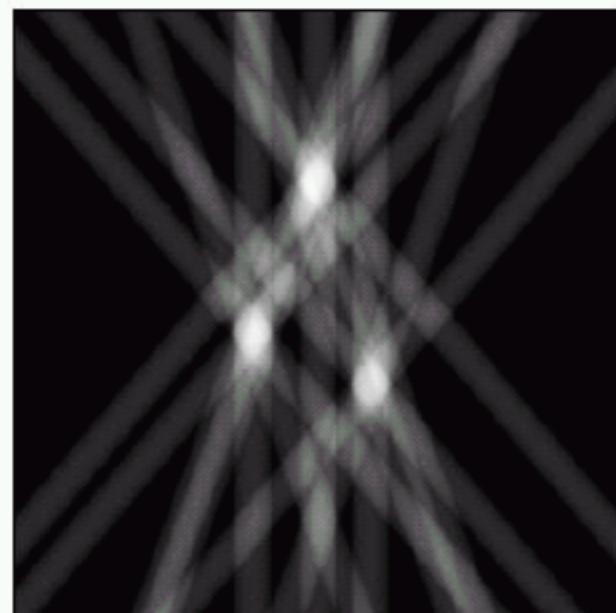
Object



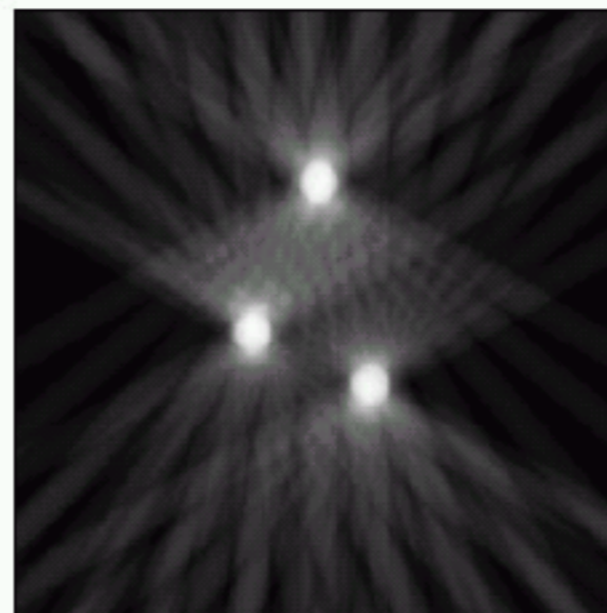
1 Proj.



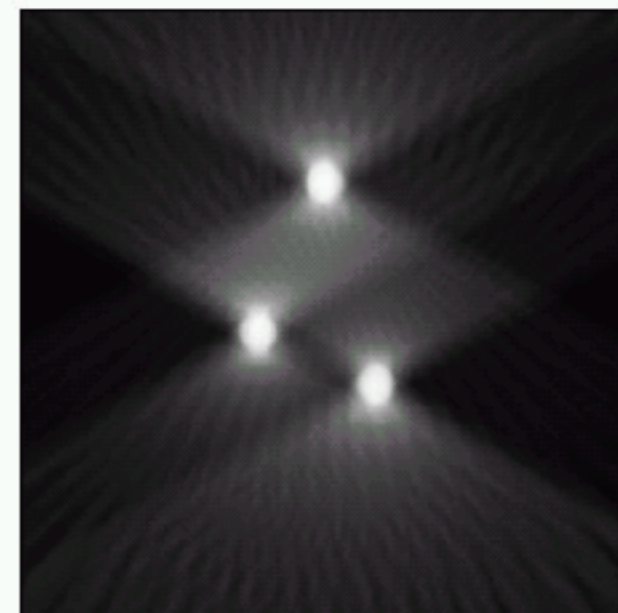
3 Proj./40 deg.



5 Proj./20 deg.



13 Proj./10 deg.



25 Proj./5 deg.

Τρισδιάστατη επανασύσταση

Ανάλογα με τον τύπο του δείγματος που χρησιμοποιείται για την ανάλυση, διακρίνονται τρεις περιπτώσεις :

- Επανασύσταση από μεμονωμένα σωμάτια (single particle averaging).
- Επανασύσταση από ινίδια και σωληνίσκους με ελικοειδή συμμετρία.
- Επανασύσταση από δισδιάστατους κρυστάλλους (για την ακρίβεια, κρυστάλλους με πάχος μίας μόνο στοιχειώδους κυψελίδας).

Επανασύσταση: απλά σωμάτια.

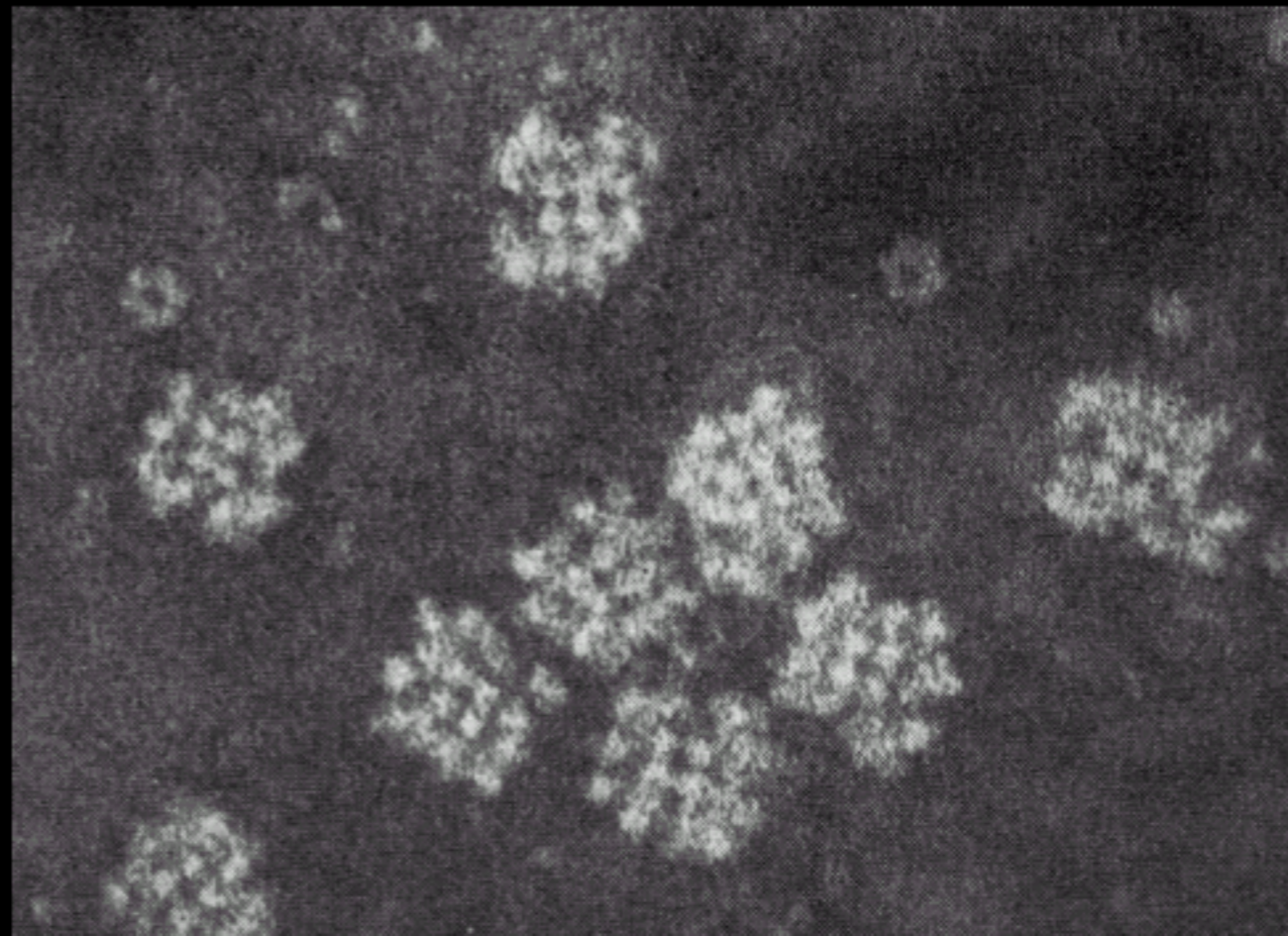
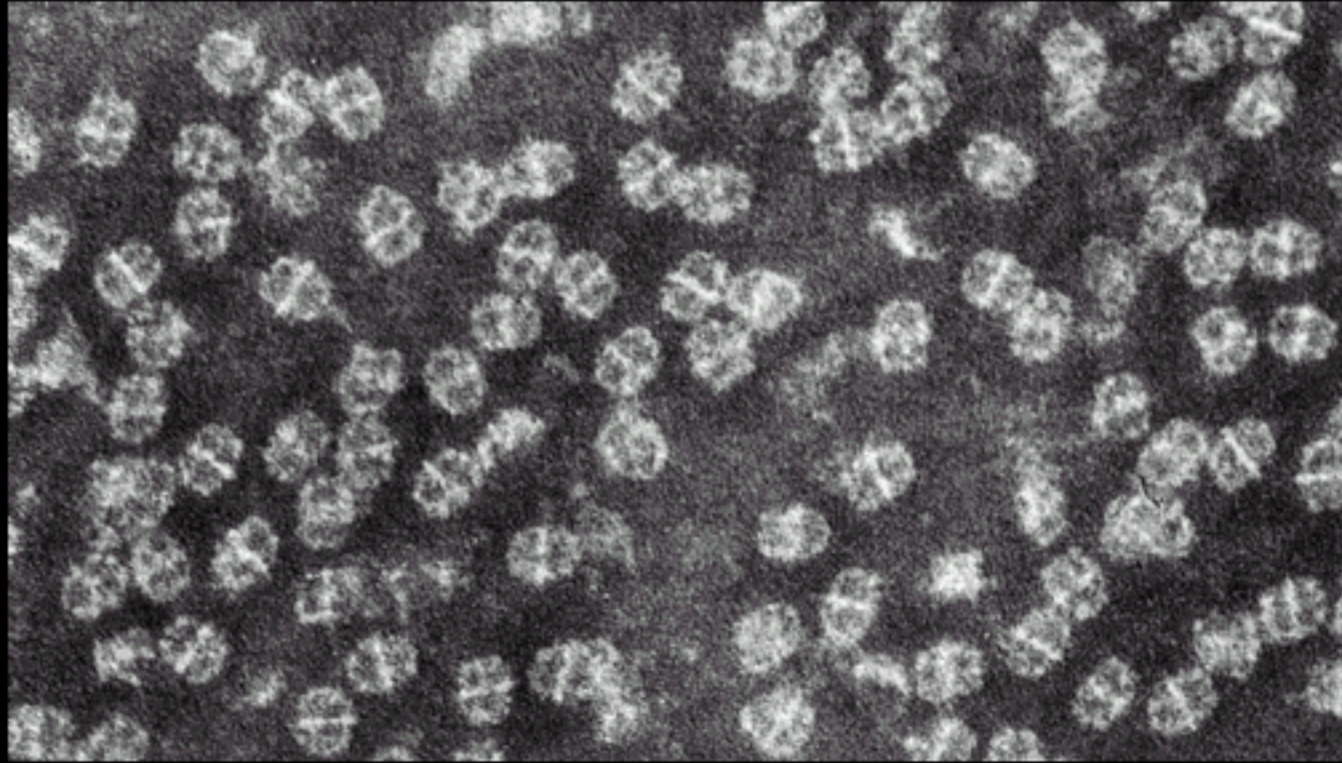
Από την άποψη προετοιμασίας του δείγματος, αυτή είναι η πλέον απλή μέθοδος (που στην περίπτωση της κρύο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας το μόνο που απαιτεί είναι ένα διάλυμα του μορίου ή συμπλόκου). Η μέθοδος στηρίζεται στο ότι σε ένα είδωλο του αντικειμένου (δηλ. μεμονωμένων μορίων) διαφορετικά μόρια θα έχουν τυχαίους (και συνεπώς διαφορετικούς) προσανατολισμούς. Από τους διαφορετικούς προσανατολισμούς προσδιορίζονται διαφορετικές προβολές του μορίου, οι οποίες συνδυάζονται μεταξύ τους προκειμένου να επανασυσταθεί η τρισδιάστατη δομή.

Επανάσταση: απλά σωμάτια.

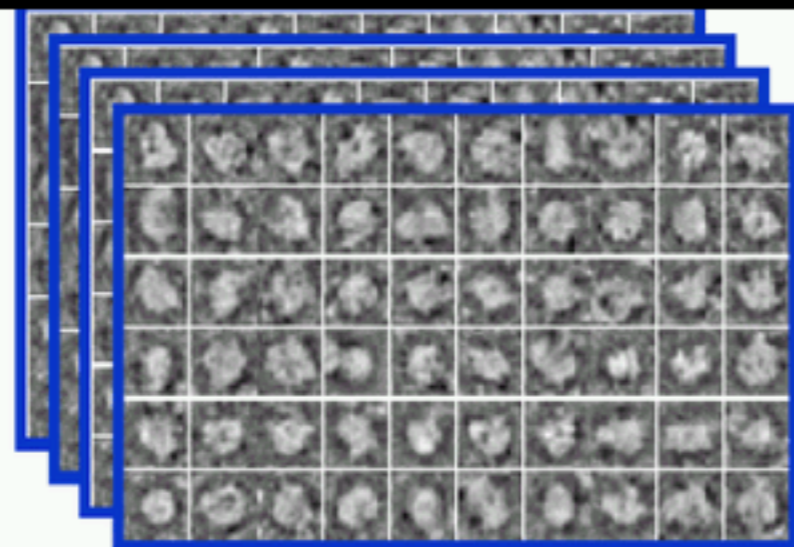
Η ευκολία προετοιμασίας του δείγματος αντισταθμίζεται από τα προβλήματα επεξεργασίας των δεδομένων και τη σχετικά χαμηλή διακριτικότητα (7A) που είναι εφικτή με αυτή τη μέθοδο. Τα βασικότερα προβλήματα είναι :

- Ο μεγάλος αριθμός σωματιδίων που πρέπει να αναλυθούν.
- Χαμηλή αντίθεση (και συνεπώς αυξημένος θόρυβος) στην περίπτωση της κρύο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.
- Επειδή δεν επιλέγεται (μέσω κρυστάλλωσης) ένας μόνο πληθυσμός μορίων, η μέθοδος είναι στο έλεος τυχόν φαινομένων ανομοιογένειας, πολυμορφισμού και συσσωμάτωσης των μορίων του δείγματος.

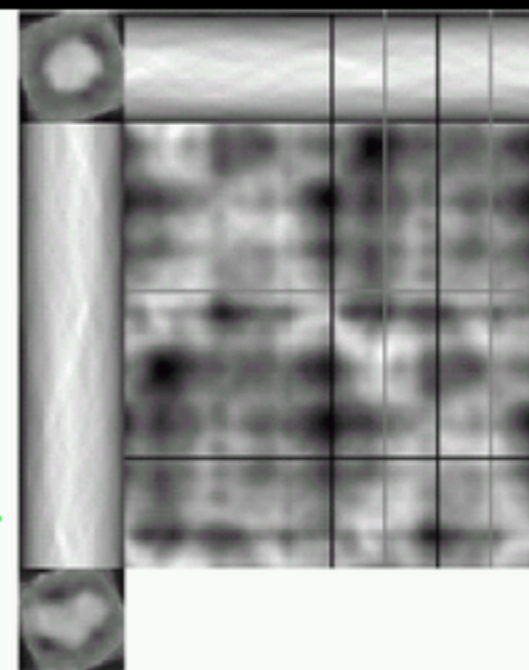
Επανάσταση: απλά σωμάτια.



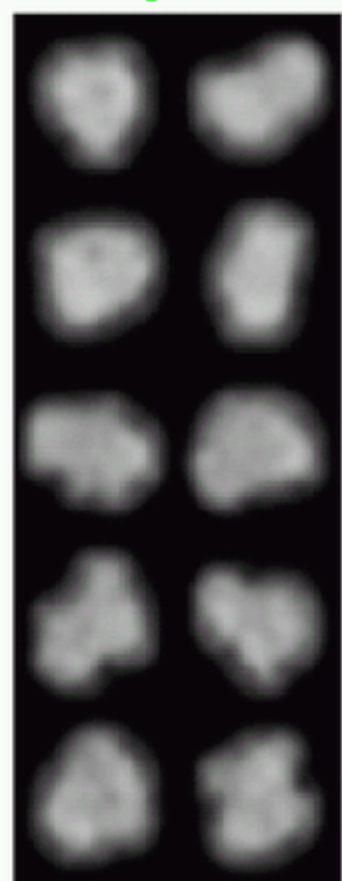
Επανασύσταση: απλά σωμάτια.



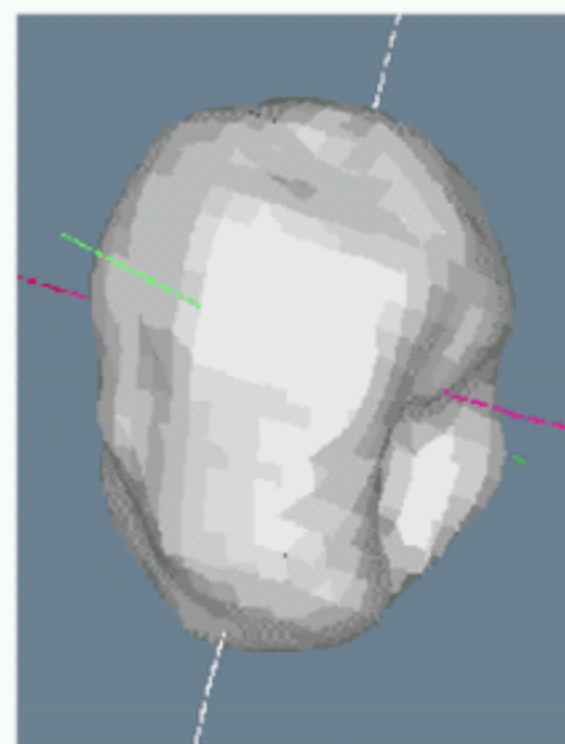
Ομαδοποίηση



Εύρεση γωνίας προβολής



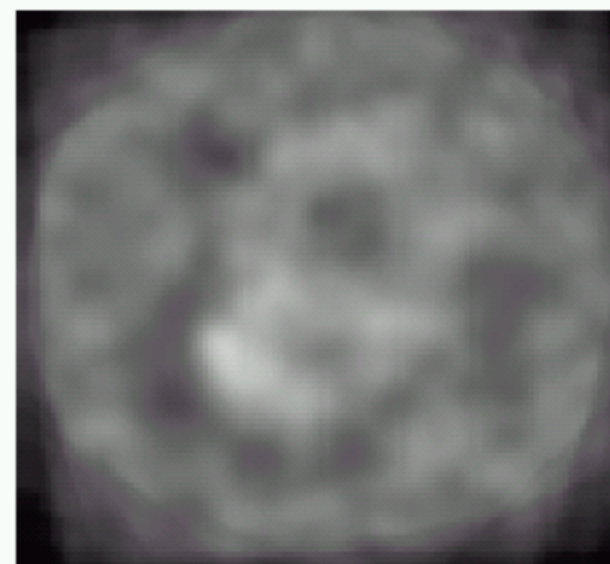
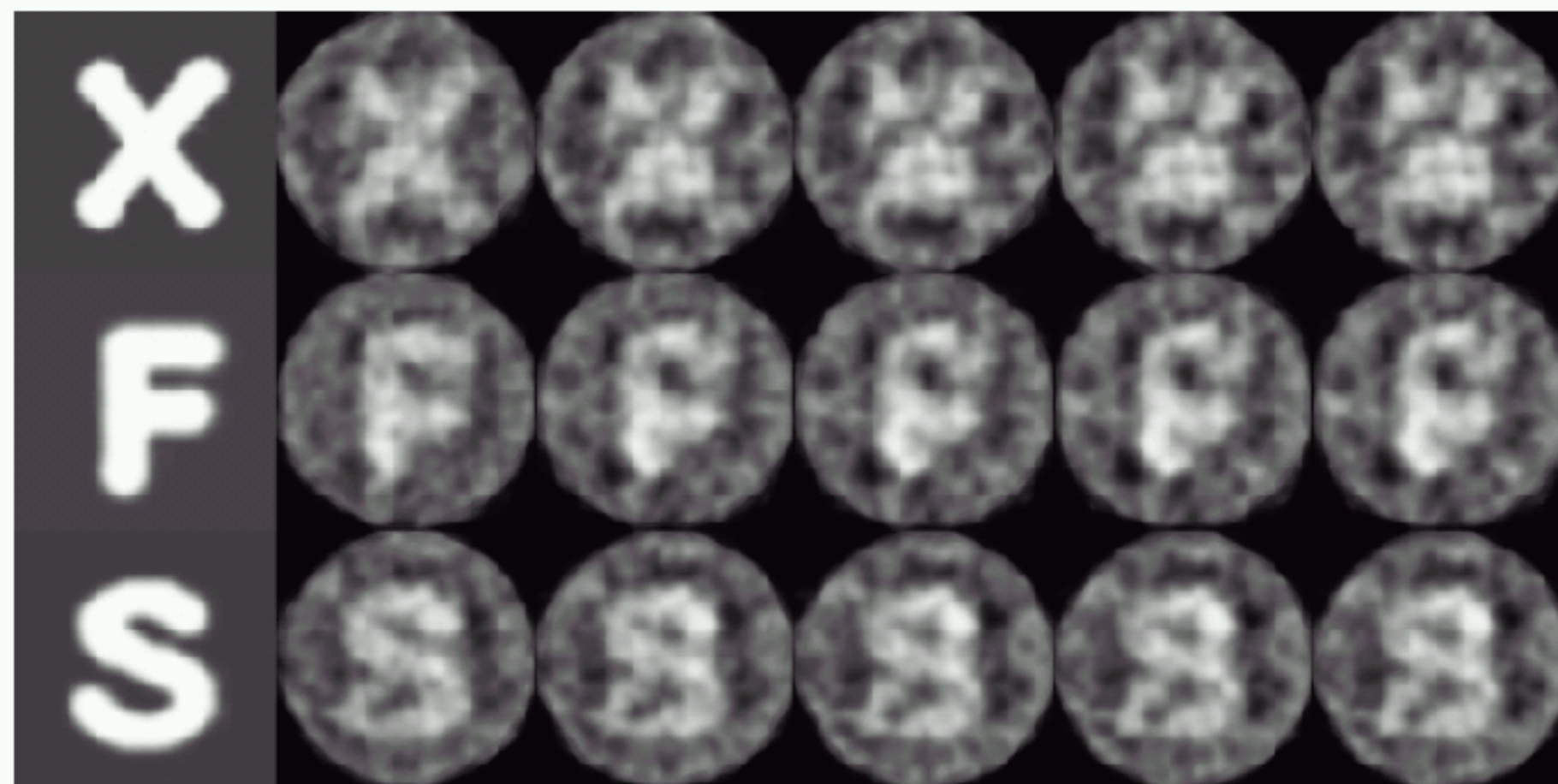
Επανασύσταση



Επανάσταση: απλά σωμάτια.

Σωματίδια αναφοράς και προβλήματα.

Προκειμένου να γίνει η ομαδοποίηση των διάφορων προβολών, πολλοί αλγόριθμοι απαιτούν την ύπαρξη ενός σωματιδίου αναφοράς. Η επιλογή του σωματιδίου αναφοράς μπορεί να εισαγάγει συστηματικά σφάλματα στην επανάσταση.



Επανάσταση: απλά σωμάτια.

Η μέθοδος των τυχαίων κωνικών περιστροφών.

Εάν τα σωμάτια λόγω της δομής τους έχουν έναν προτιμώμενο προσανατολισμό, η μέθοδος των τυχαίων κωνικών περιστροφών (random conical tilts) επιτρέπει τον προσδιορισμό και άλλων προβολών της δομής.



Ελικοειδής επανασύσταση

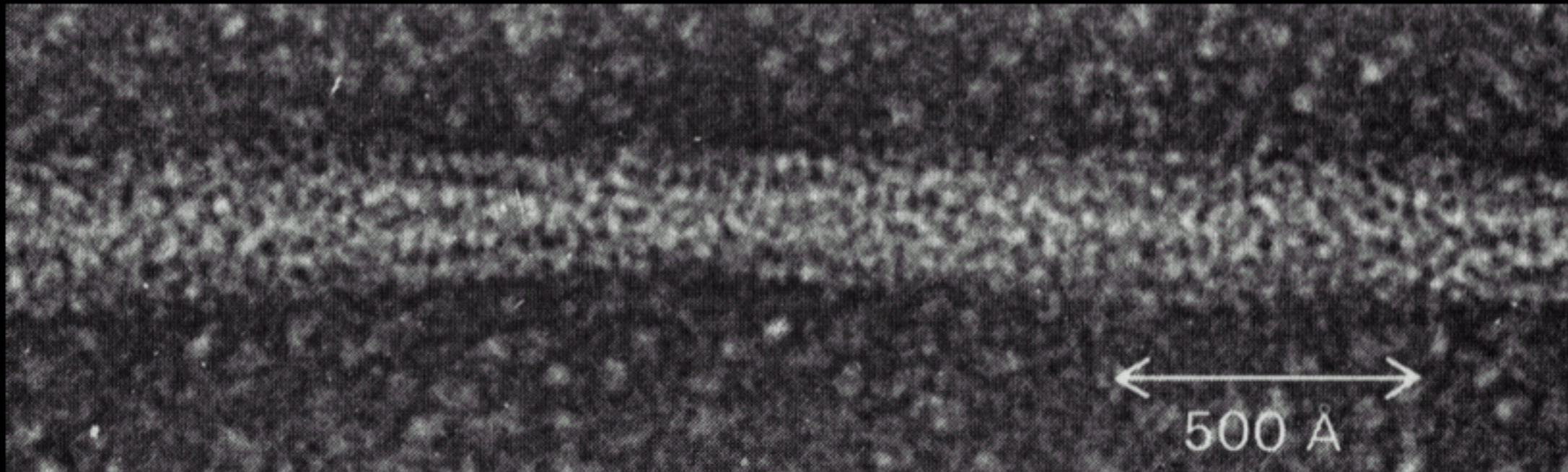
Η ελικοειδής συμμετρία είναι από τις συνηθέστερες στη βιολογία. Το γεγονός μπορεί να αποδοθεί στην αρχή της φειδωλότητας : το προϊόν ενός μόνο γονιδίου αρκεί (μέσω της απλής επανάληψης του) για την δημιουργία μίας υπερδομής. Στην περίπτωση της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, δεν είναι μόνο οι εγγενώς ελικοειδείς δομές που μελετούνται : σε πολλές περιπτώσεις απόπειρες για τη δημιουργία δισδιάστατων κρυστάλλων οδηγούν (απρόσμενα συνήθως) σε ελικοειδείς δομές.

Ελικοειδής επανασύσταση

Για επανασύσταση από ηλεκτρονιοφωτογραφίες συνήθως χρησιμοποιούνται δυο κατηγορίες ελικοειδών δομών : ινίδια και σωληνίσκοι. Η διαφορά τους είναι ότι στην περίπτωση των σωληνίσκων τα μακρομόρια διευθετούνται στην επιφάνεια ενός εσωτερικά κενού κυλίνδρου (ο χώρος που δημιουργείται στο εσωτερικό του κυλίνδρου μπορεί κάλλιστα να έχει βιολογική σημασία, π.χ. ελικοειδείς ιοί).

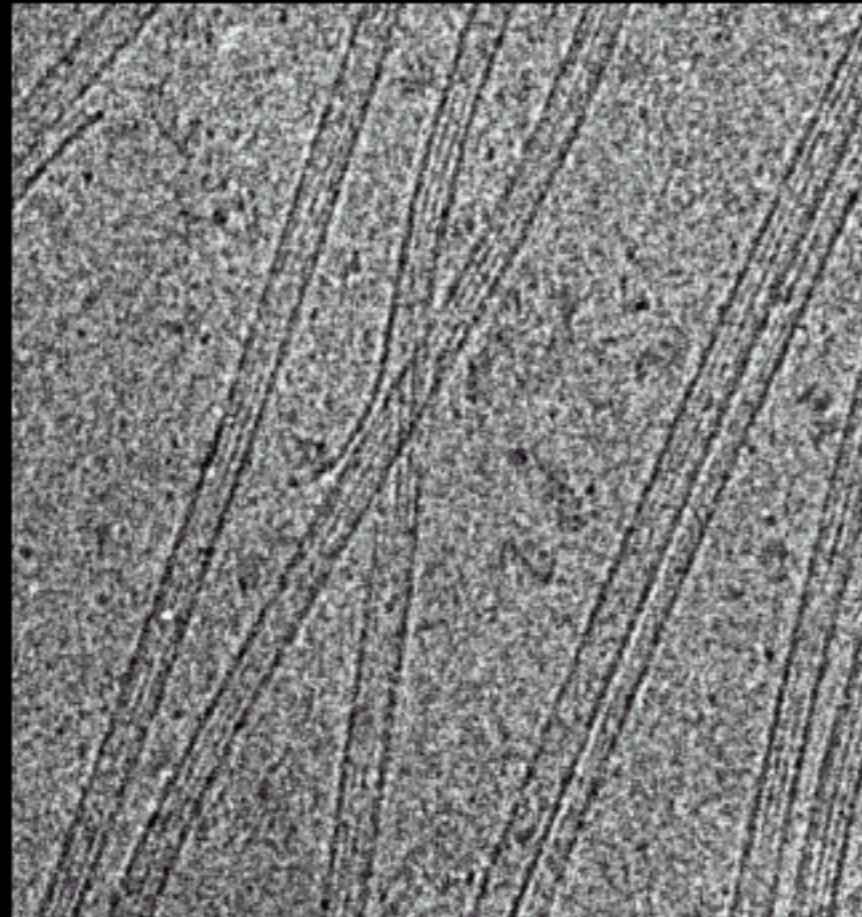
Ελικοειδής επανασύσταση

Ινίδια



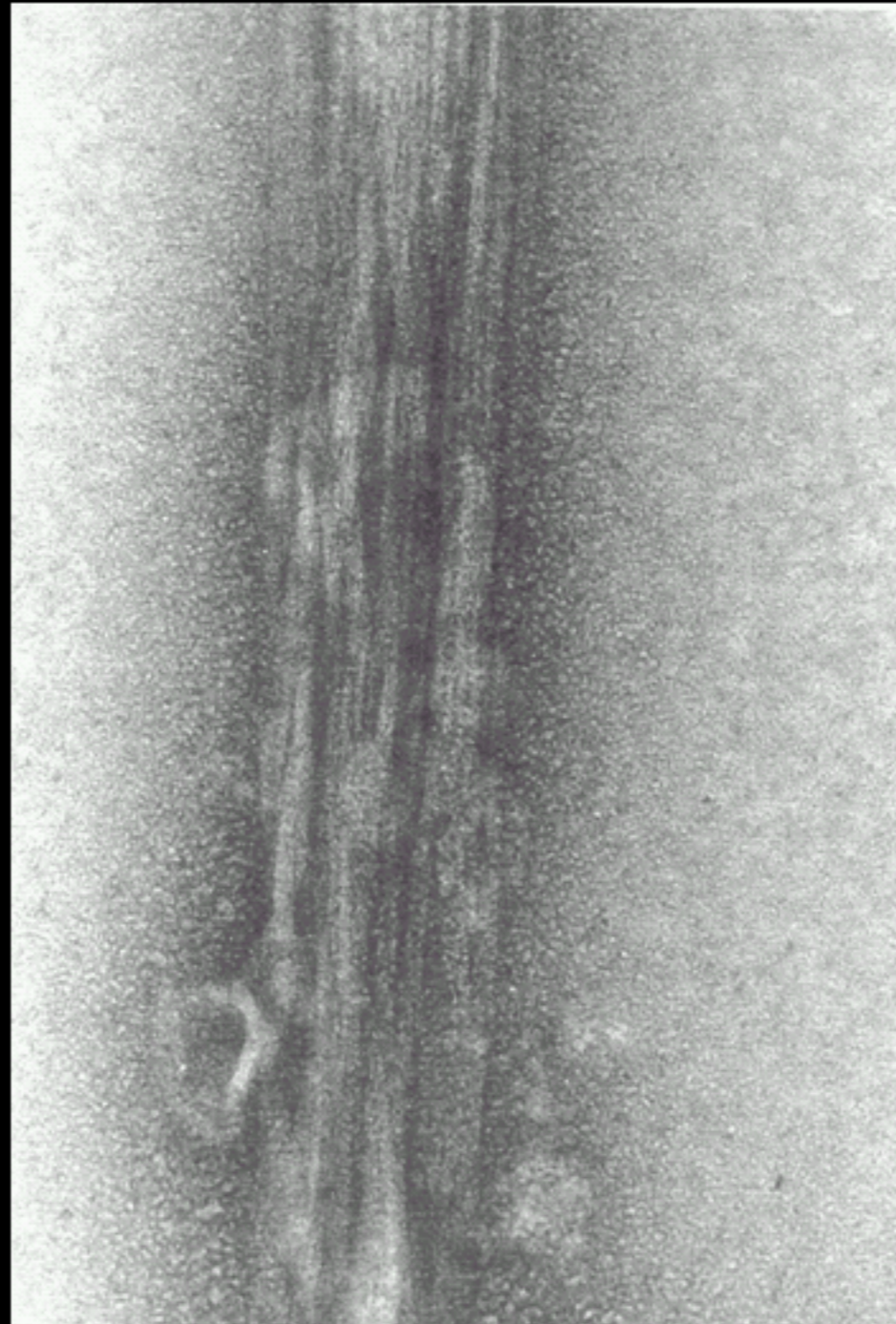
Ελικοειδής επανασύσταση

Ινίδια



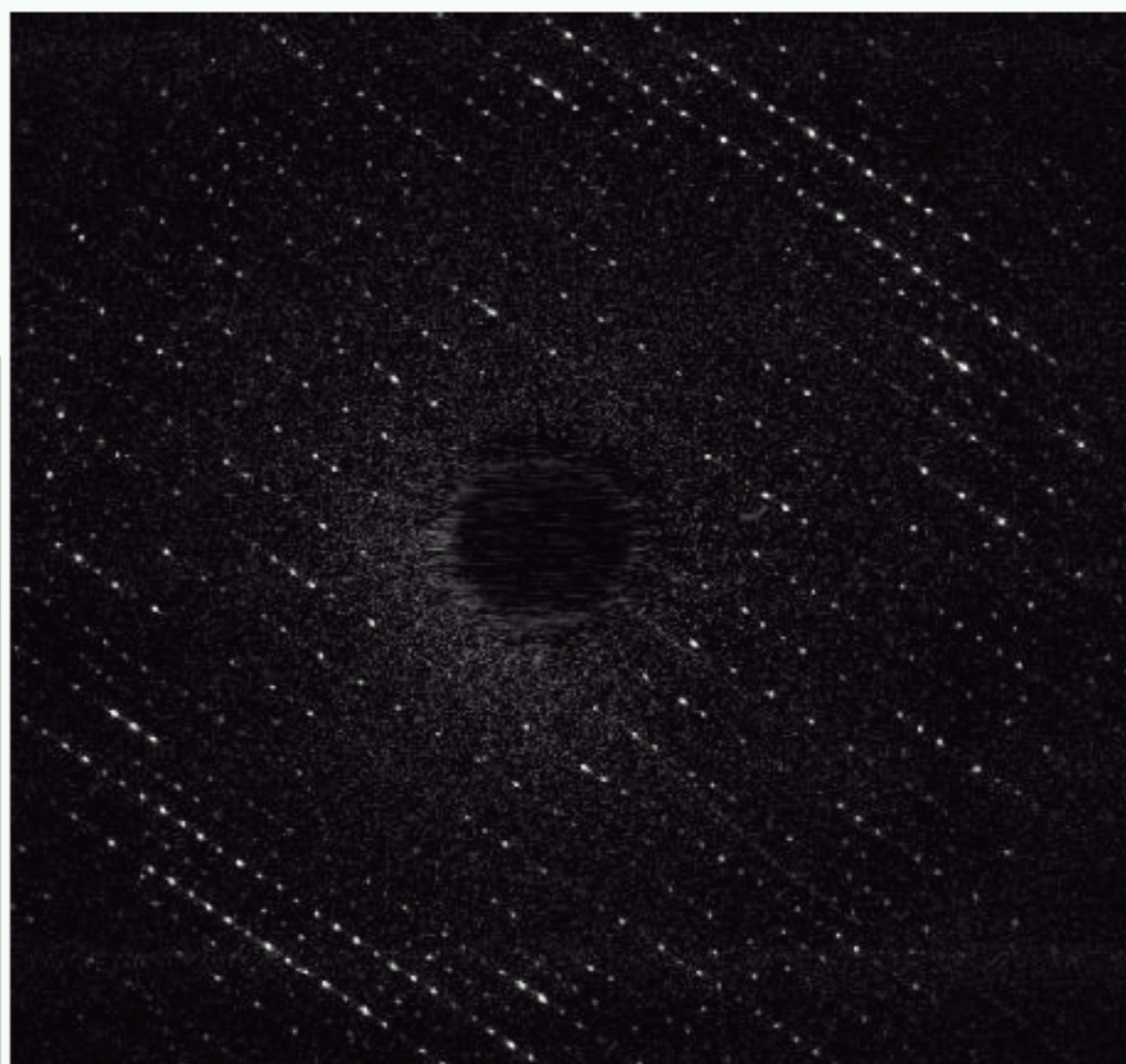
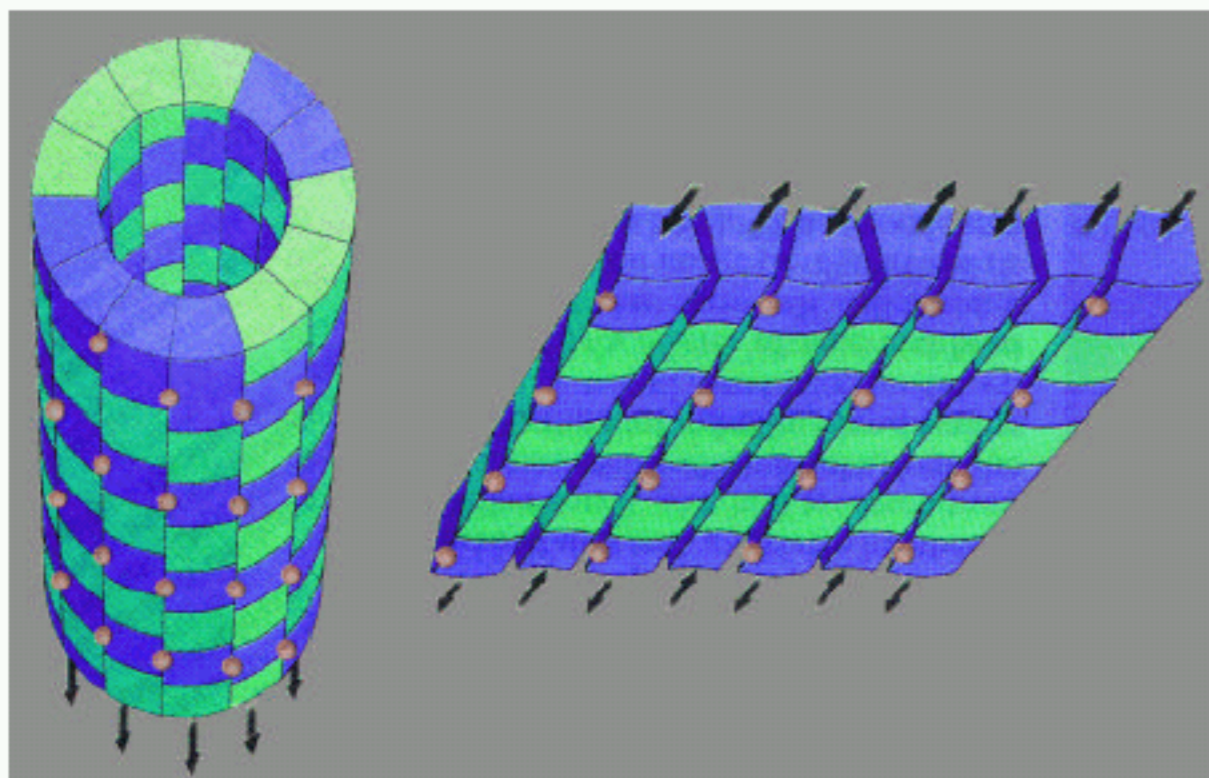
Ελικοειδής επανασύσταση

Ινίδια



Ελικοειδής επανασύσταση

Σωληνίσκοι και μετατροπή τους σε 2D κρυστάλλους



Ελικοειδής επανασύσταση

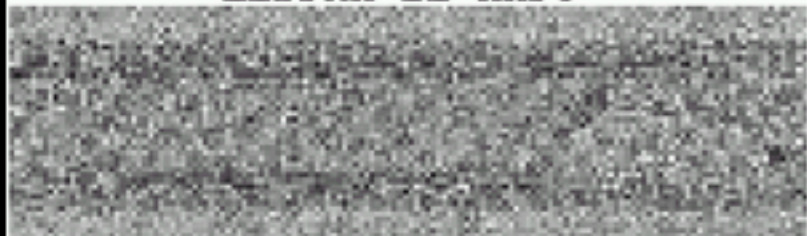
Η διαδικασία της επανασύστασης από ελικοειδείς δομές γίνεται μέσω του φάσματος περίθλασης τους. Η θεωρία της περίθλασης από ελικοειδείς δομές αναπτύχθηκε από τον F.H.C.Crick (και ήταν αυτή που του επέτρεψε να προσδιορίσει την δομή του DNA).

Η ανάπτυξη της θεωρίας προϋποθέτει μια οικειότητα με τους μετασχηματισμούς Fourier και συνεπώς η παρουσίαση της θα γίνει στα πλαίσια των ειδικών κεφαλαίων της δομικής.

Ελικοειδής επανασύσταση

Σωληνίσκοι και διάγραμμα περίθλασης

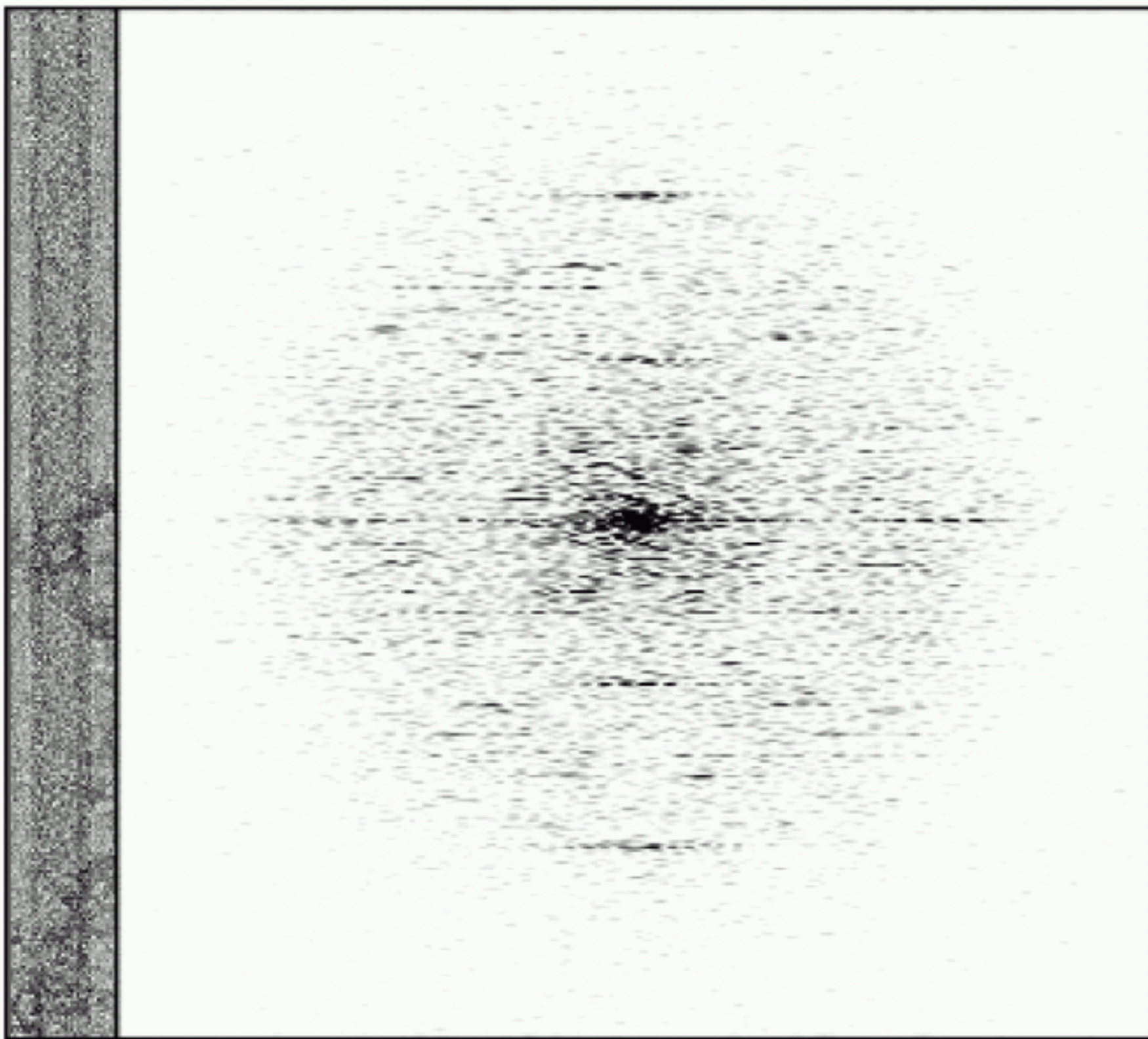
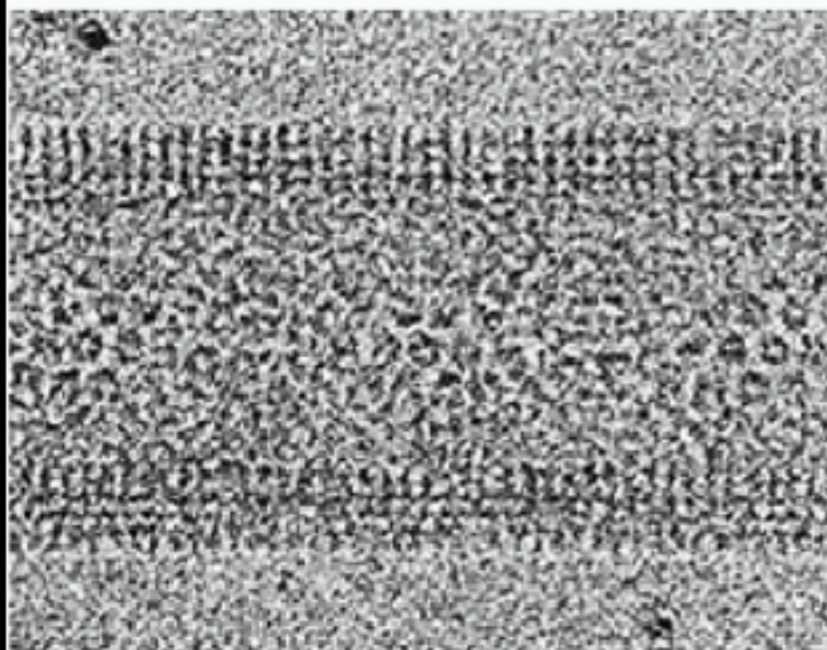
ΔΕΙΓΜΑ ΣΕ ΠΑΓΟ



ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΧΡΩΣΗ



ΣΚΙΑΣΗ



Ελικοειδής επανασύσταση

Τα κυρίως πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δίδει ισότροπα δεδομένα (σε αντίθεση με την επανασύσταση από κρυστάλλους). Αυτό σημαίνει ότι τα δεδομένα (ηλεκτρονιοφωτογραφίες) περιέχουν πληροφορία για όλες τις προβολές του μορίου.

Μειονεκτήματα :

- Λόγω των αδύναμων δεδομένων, της αλληλοεπικάλυψης των μορίων και των διορθώσεων που απαιτούνται για τυχόν παραμορφώσεις των σωληνίσκων, η διακριτικότητα είναι σχετικά χαμηλή (~8Å).

Επανασύσταση: κρύσταλλοι

Καλά οργανωμένοι δισδιάστατοι κρύσταλλοι είναι το ιδανικό δείγμα για τον προσδιορισμό δομών με ηλεκτρονική μικροσκοπία. Η επανασύσταση βασίζεται στην περίθλαση από περιοδικές δομές (τους δισδιάστατους κρυστάλλους) για την ανάκτηση του ειδώλου των διαφόρων προβολών, και στην χρήση του θεωρήματος των προβολών για την ανάκτηση της τρισδιάστατης δομής από τις προβολές της.

Υπάρχουν δύο βασικές διαδικασίες επανασύστασης ανάλογα με το εάν χρησιμοποιείται αρνητική χρώση (πειράματα χαμηλής διακριτικότητας) ή κρύο-ηλεκτρονική μικροσκοπία (υψηλή διακριτικότητα).

Επανάσταση: κρύσταλλοι

Κρύο-ηλεκτρονική μικροσκοπία

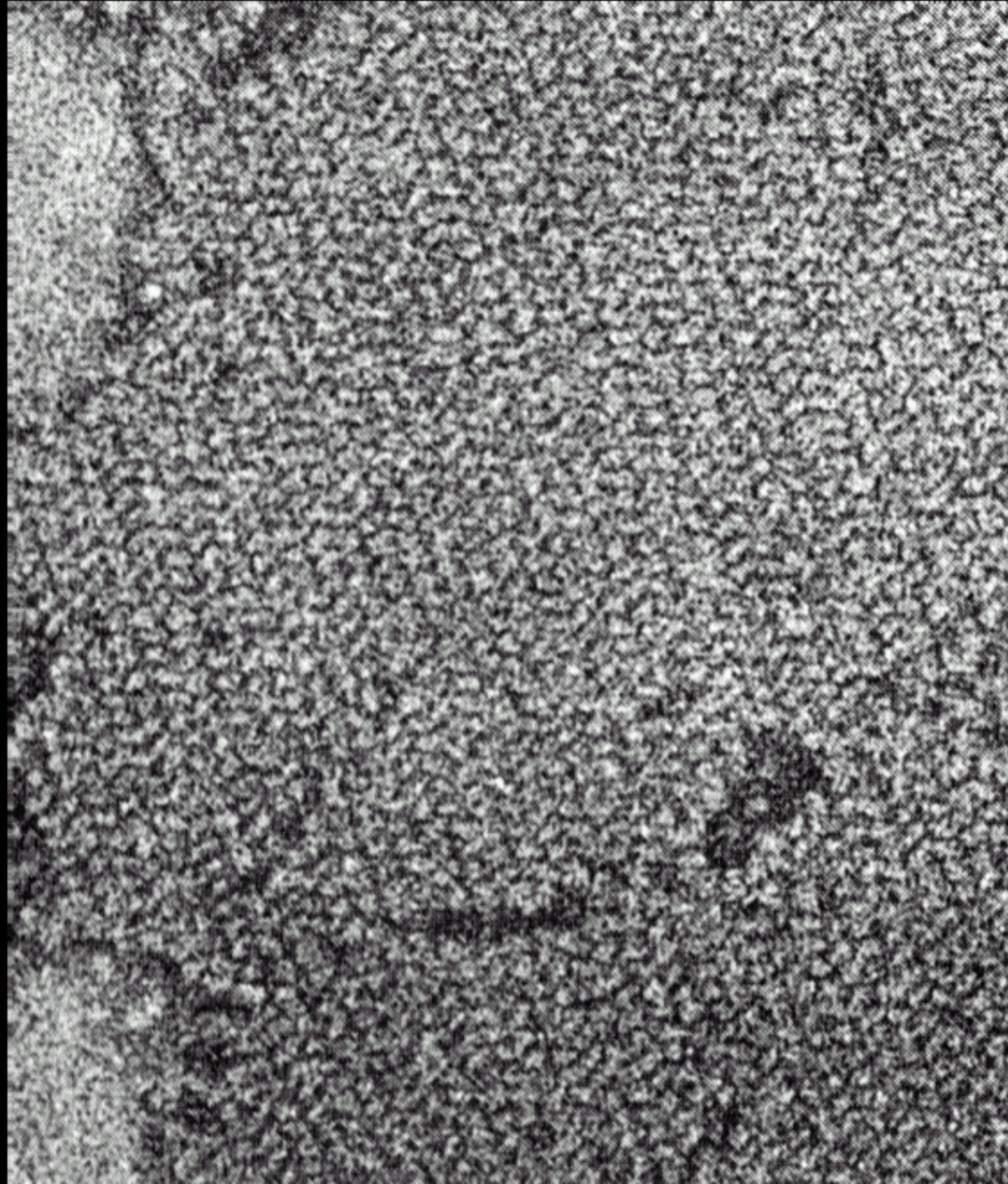
Σε αυτή την περίπτωση ο προσδιορισμός των πλατών των περιθλώμενων κυμάτων γίνεται μέσω ενός πειράματος περίθλασης ηλεκτρονίων ακριβώς όπως παρουσιάστηκε στην προηγούμενη διάλεξη. Για τον προσδιορισμό των φάσεων, καταγράφεται ένα είδωλο των κρυστάλλων, από αυτό το είδωλο προσδιορίζονται (υπολογιστικά) οι φάσεις των περιθλώμενων κυμάτων, και τέλος, τα πλάτη (από το πείραμα περίθλασης) και οι φάσεις (από το είδωλο) συνδυάζονται για την ανάκτηση ενός ειδώλου υψηλότερης ποιότητας απ'ότι θα ήταν εφικτό από το είδωλο μόνο του.

Επανάσταση: κρύσταλλοι

Αρνητική χρώση

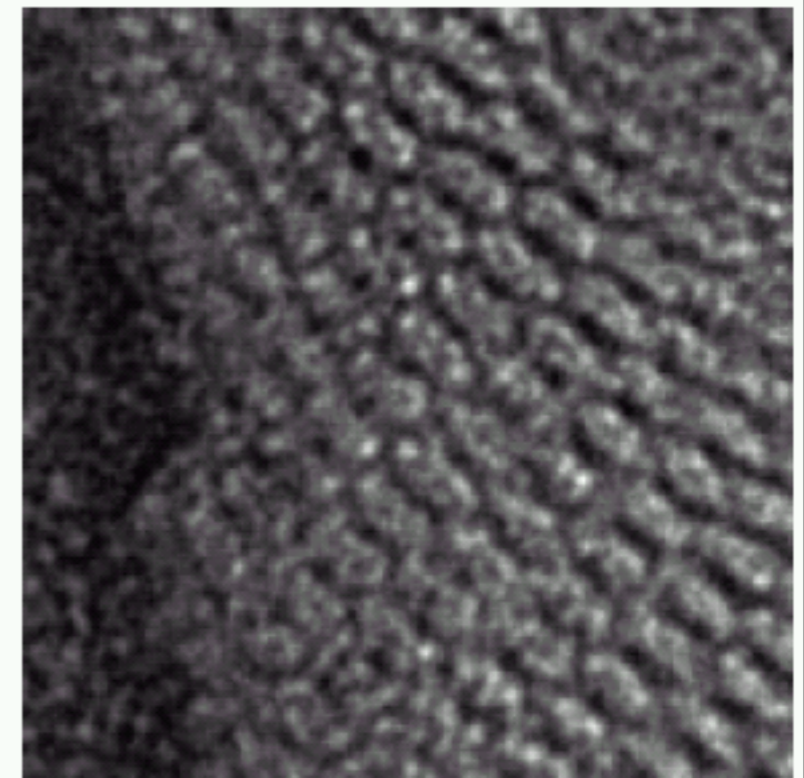
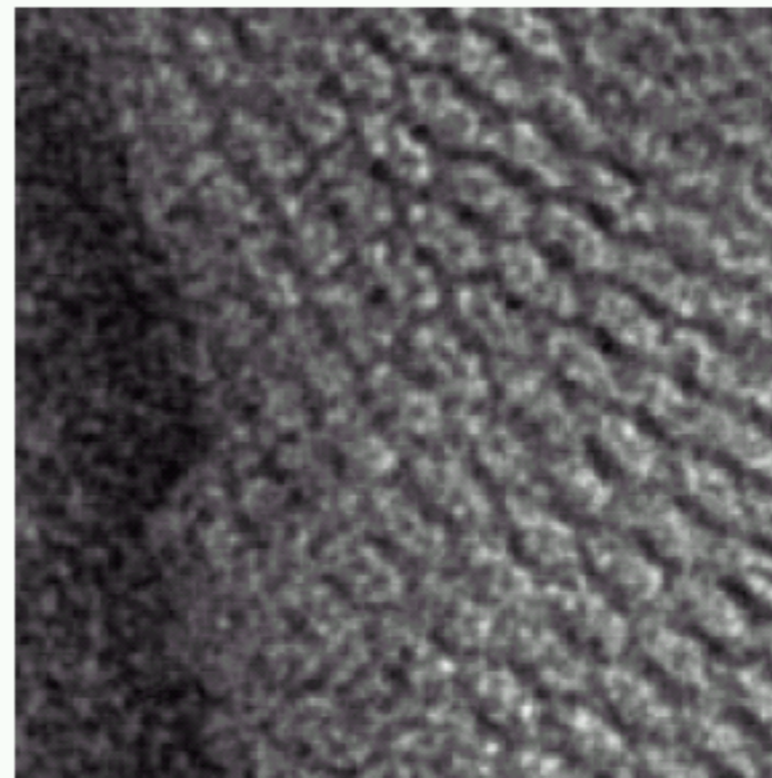
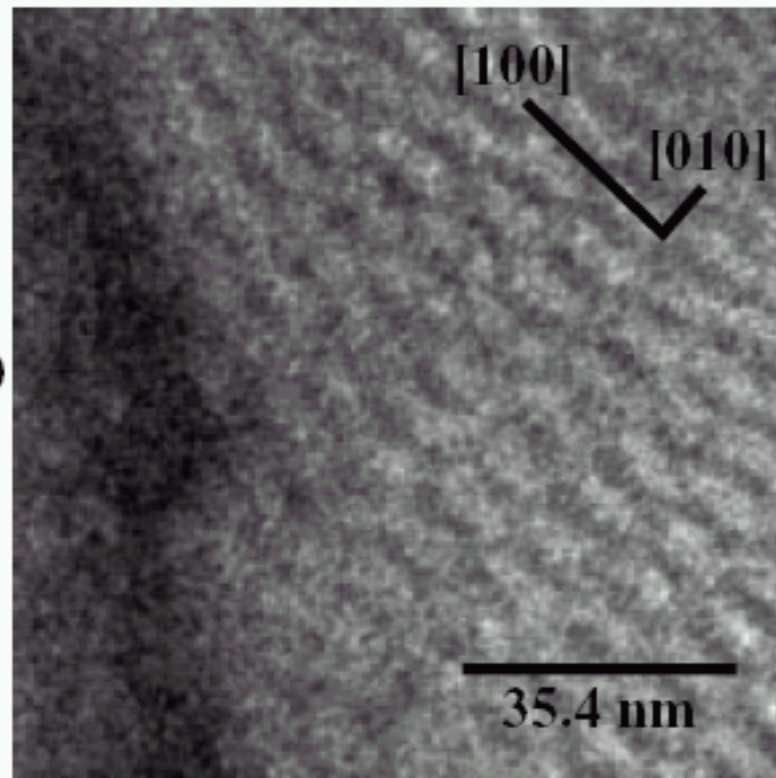
Σε αυτή την περίπτωση η περίθλαση χρησιμοποιείται ως μέσο ενίσχυσης του σήματος. Η βασική αρχή είναι ότι ο τυχαίος θόρυβος είναι (ταυτολογικά) μη περιοδικός, και συνεπώς σε ένα φάσμα περίθλασης συνεισφέρει ομοιόμορφα σε όλη την έκταση του φάσματος. Αντίθετα, το περιοδικό σήμα συνεισφέρει μόνο σε συγκεκριμένα σημεία του φάσματος. Επιλέγοντας μόνο την πληροφορία που περιέχεται στο περιοδικό τμήμα του φάσματος αυξάνει σημαντικά το λόγο σήματος/θορύβου στο τελικό είδωλο.

Επανάσταση: κρύσταλλοι

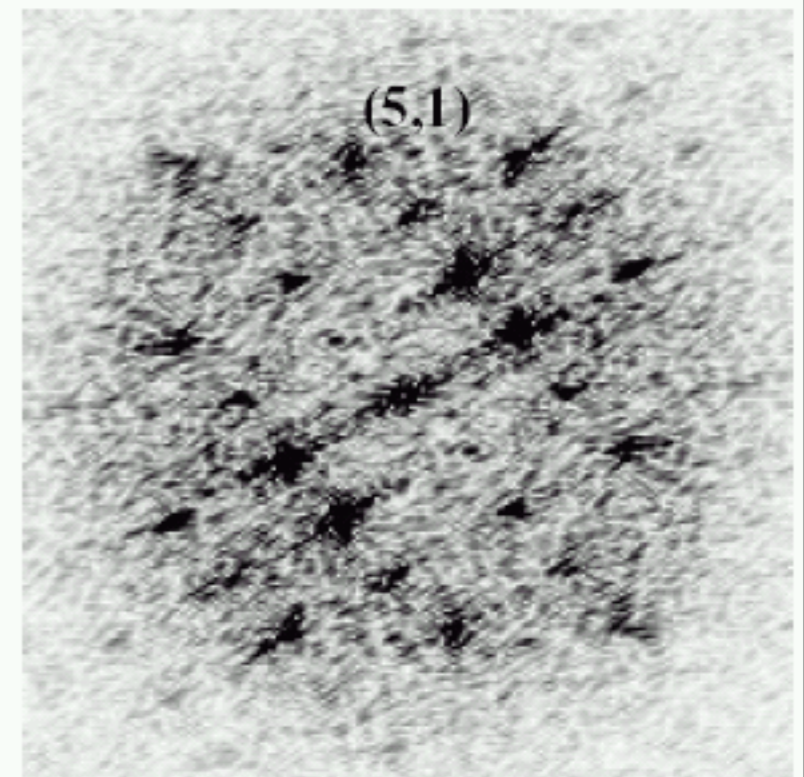
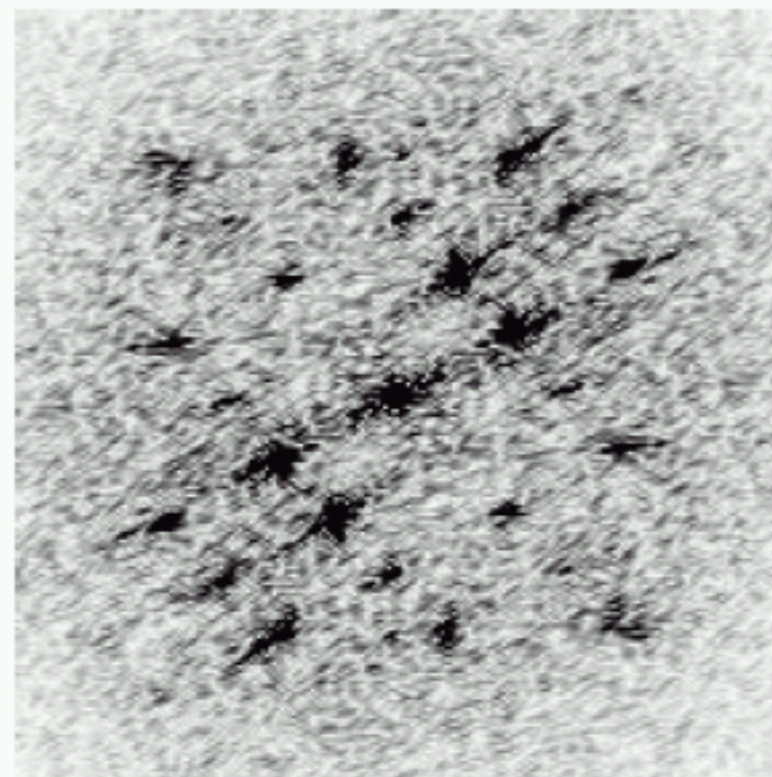
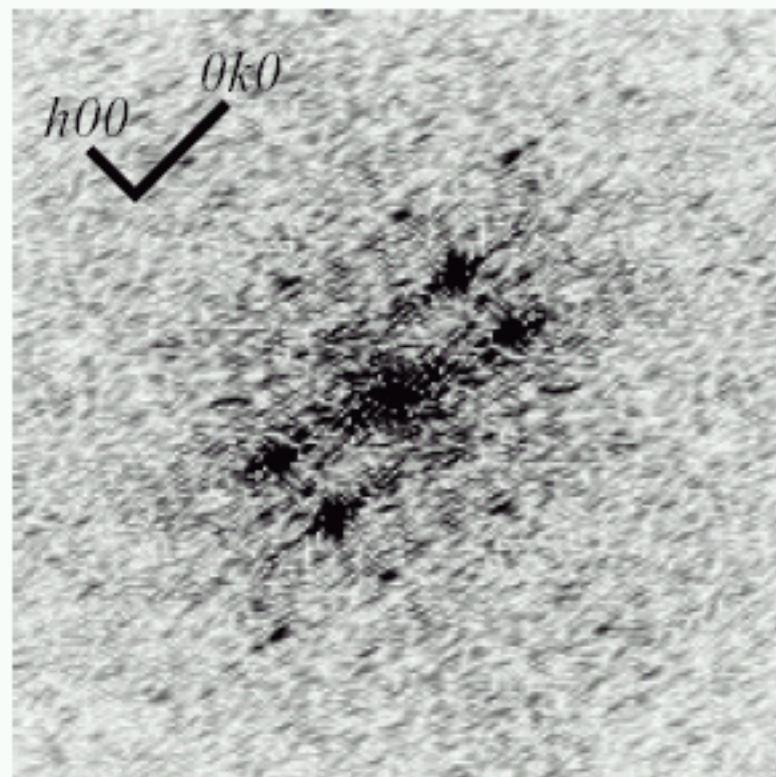


Επανάσταση: κρύσταλλοι

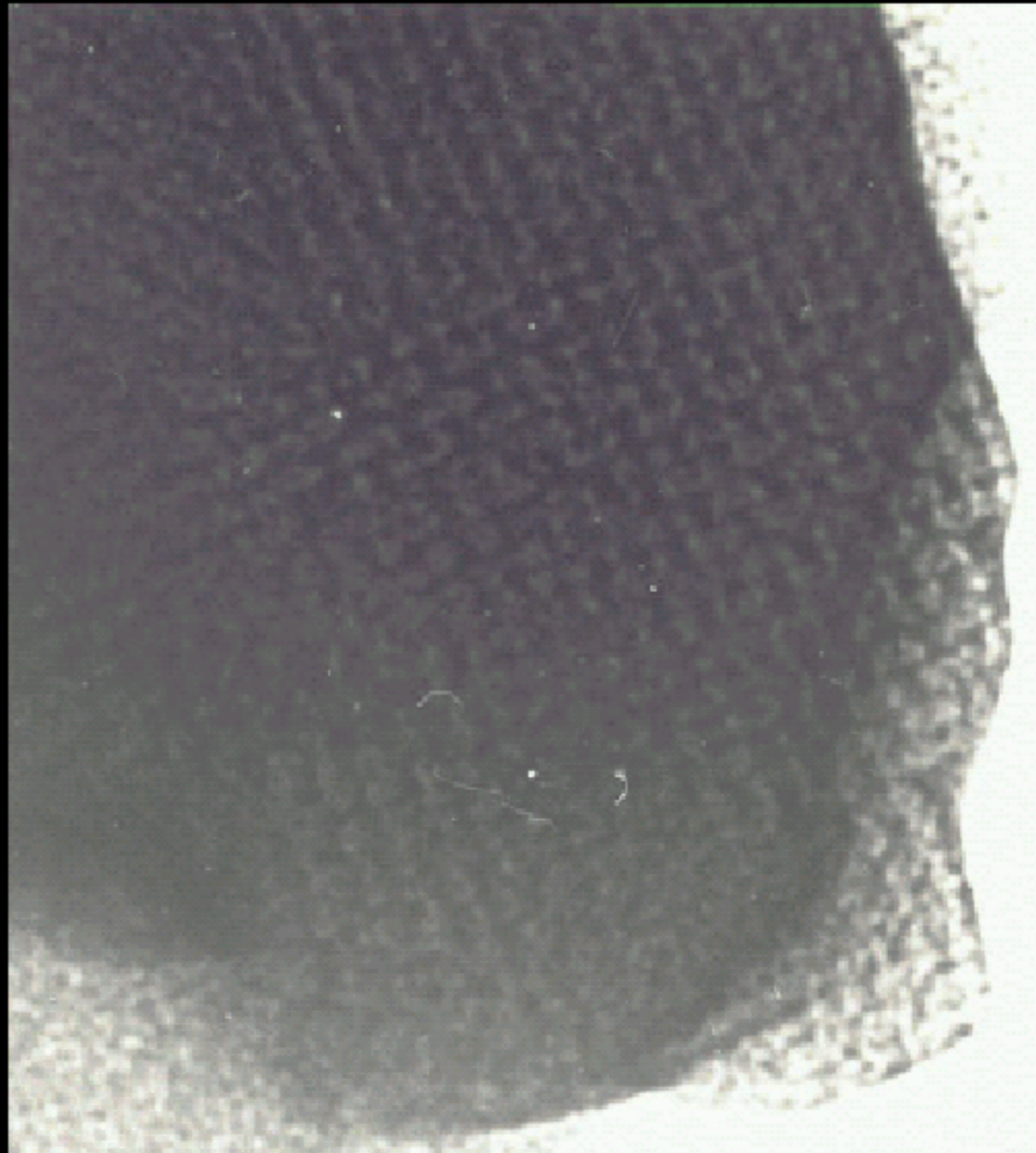
Images



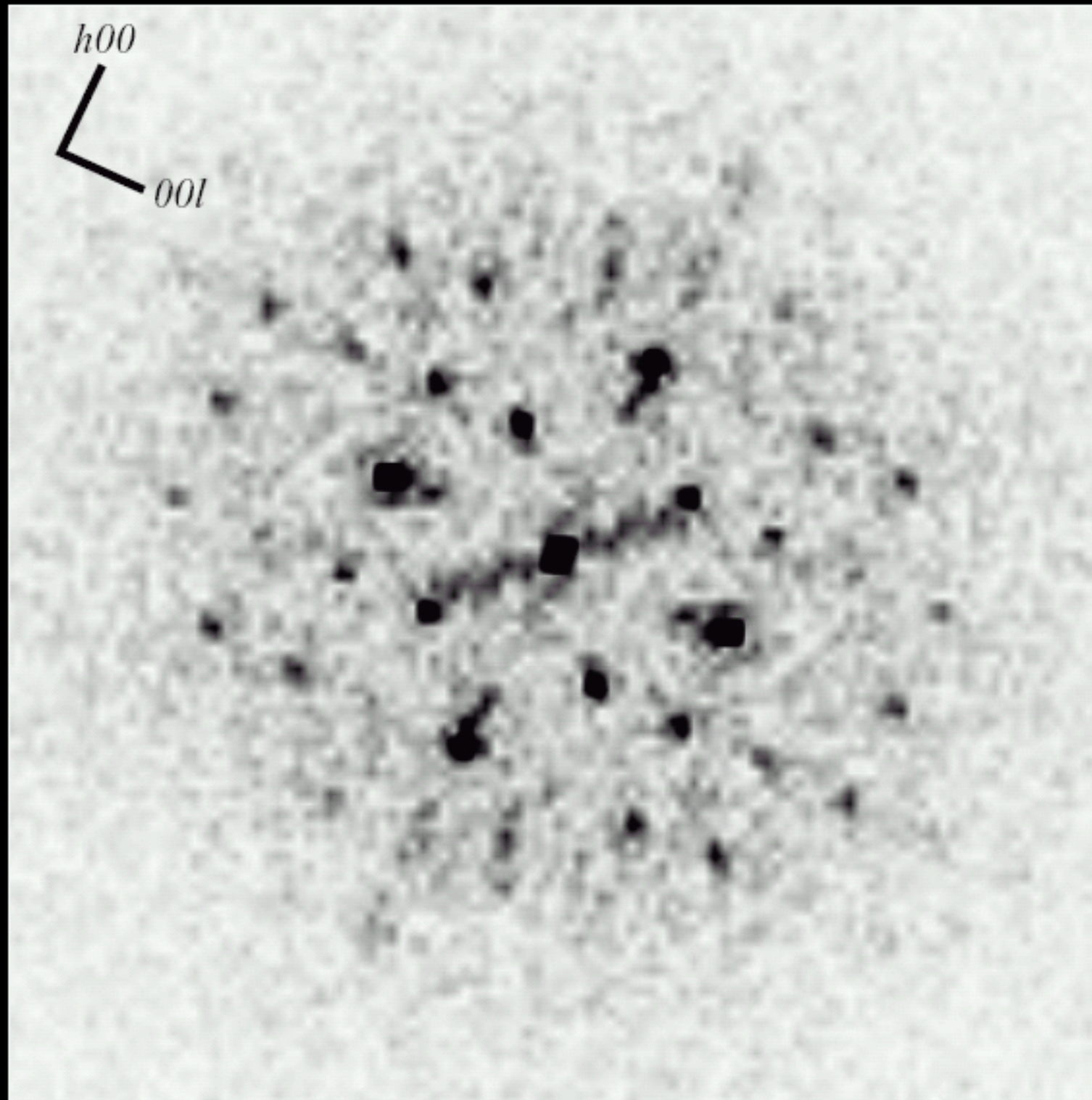
Fourier transforms



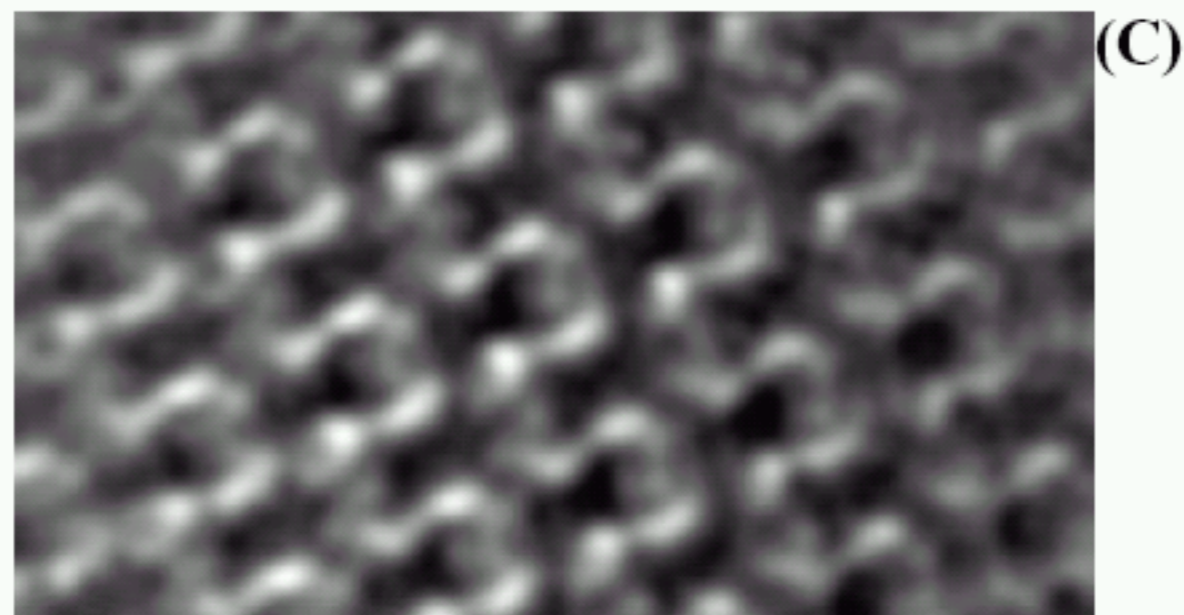
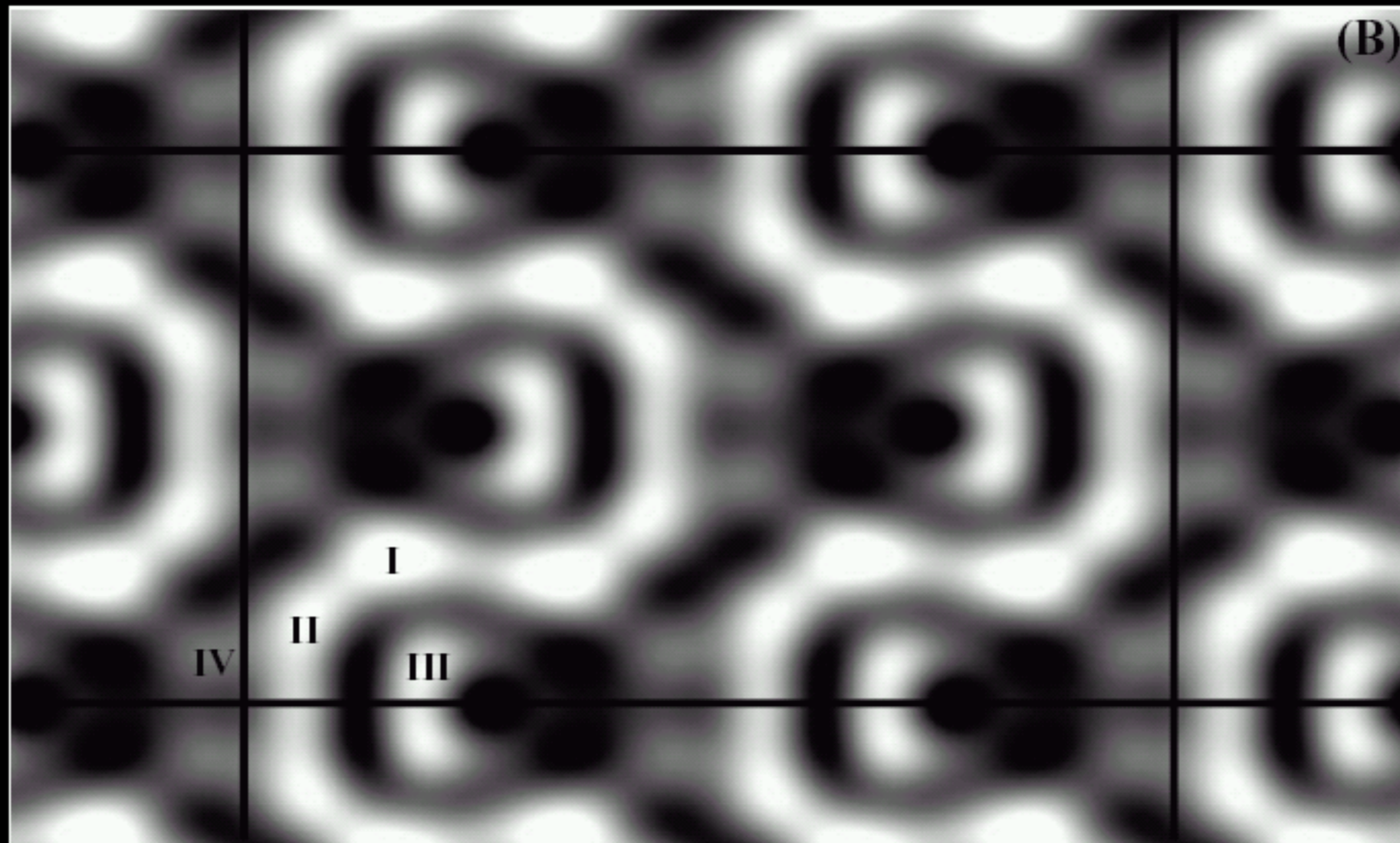
Επανάσταση: κρύσταλλοι



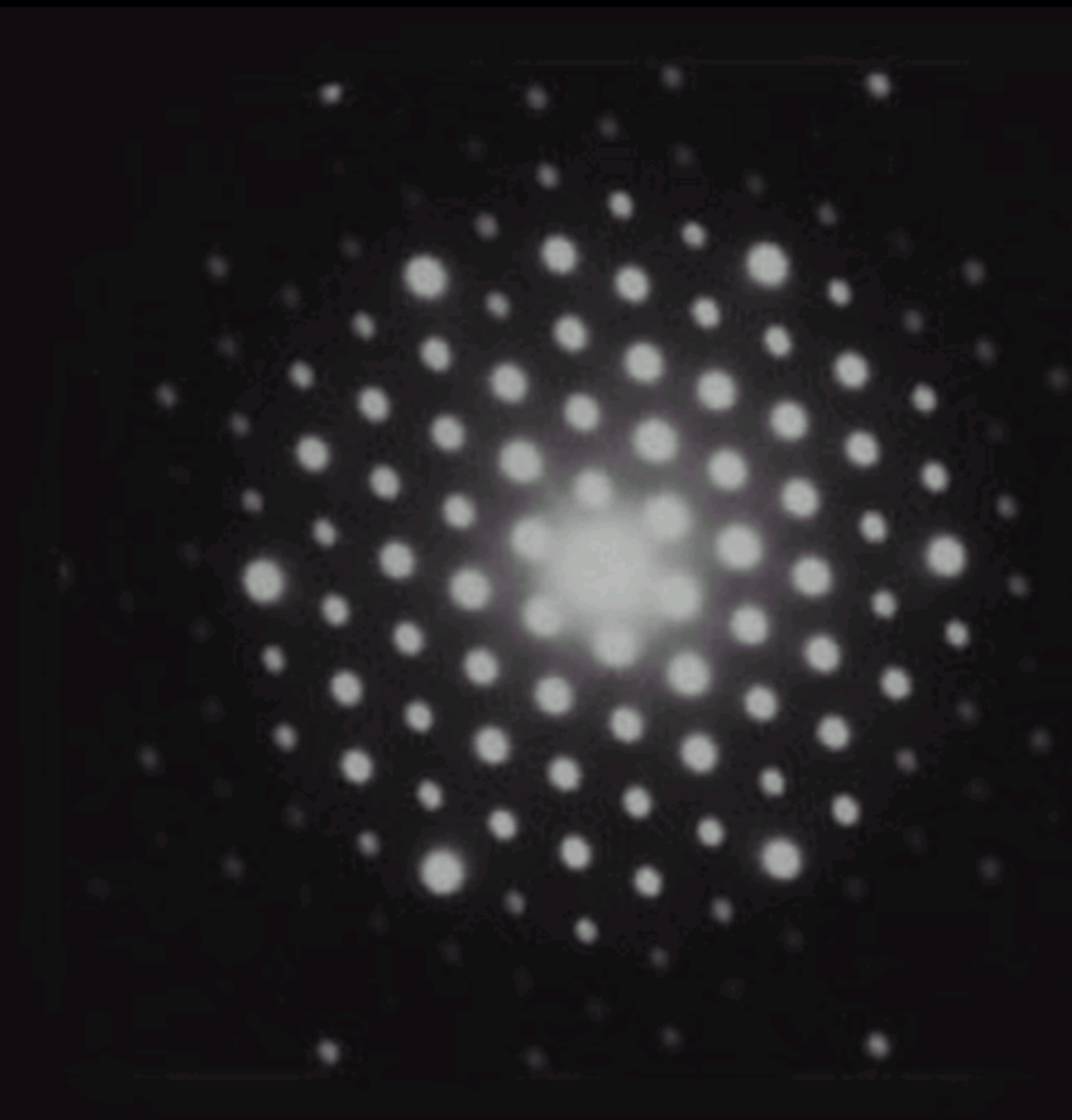
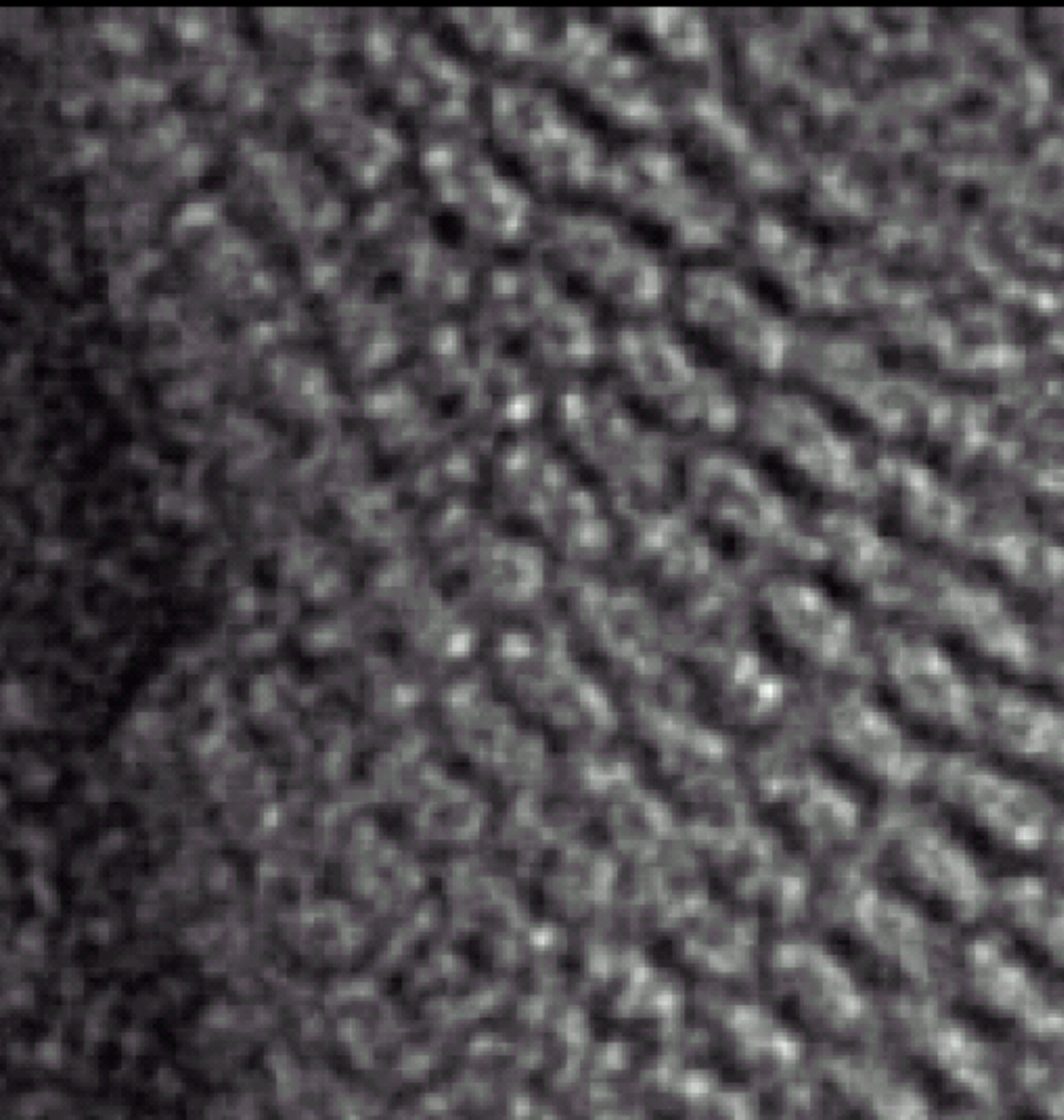
Επανάσταση: κρύσταλλοι



Επανάσταση: κρύσταλλοι



Επανάσταση: κρύσταλλοι



Επανάσταση: κρύσταλλοι

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνητικά υψηλότερη διακριτικότητα που προσφέρει σε σχέση με τις άλλες μεθόδους (μέχρι $\sim 3A$). Αυτό είναι συνέπεια της ύπαρξης ισχυρότερων και ακριβέστερων δεδομένων (λόγω περίθλασης).

Τα βασικά μειονεκτήματα είναι :

- Η απαίτηση για καλά οργανωμένους δισδιάστατους κρυστάλλους.
- Η ανισοτροπία των δεδομένων λόγω του 'τυφλού' κώνου δεδομένων.

NMR : γενικά

Το NMR (σε αντίθεση με τις μεθόδους της κρυσταλλογραφίας και της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας) δεν παράγει -μα ούτε και εμπεριέχει στην ανάλυση του- την έννοια του 'ειδώλου' ή της 'εικόνας' του μορίου. Η τρισδιάστατη δομή βιομακρομορίων προκύπτει με υπολογιστικές μεθόδους μέσω των περιορισμών (σε αποστάσεις και γωνίες δεσμών) που προκύπτουν από την καθ'αυτή μέθοδο.

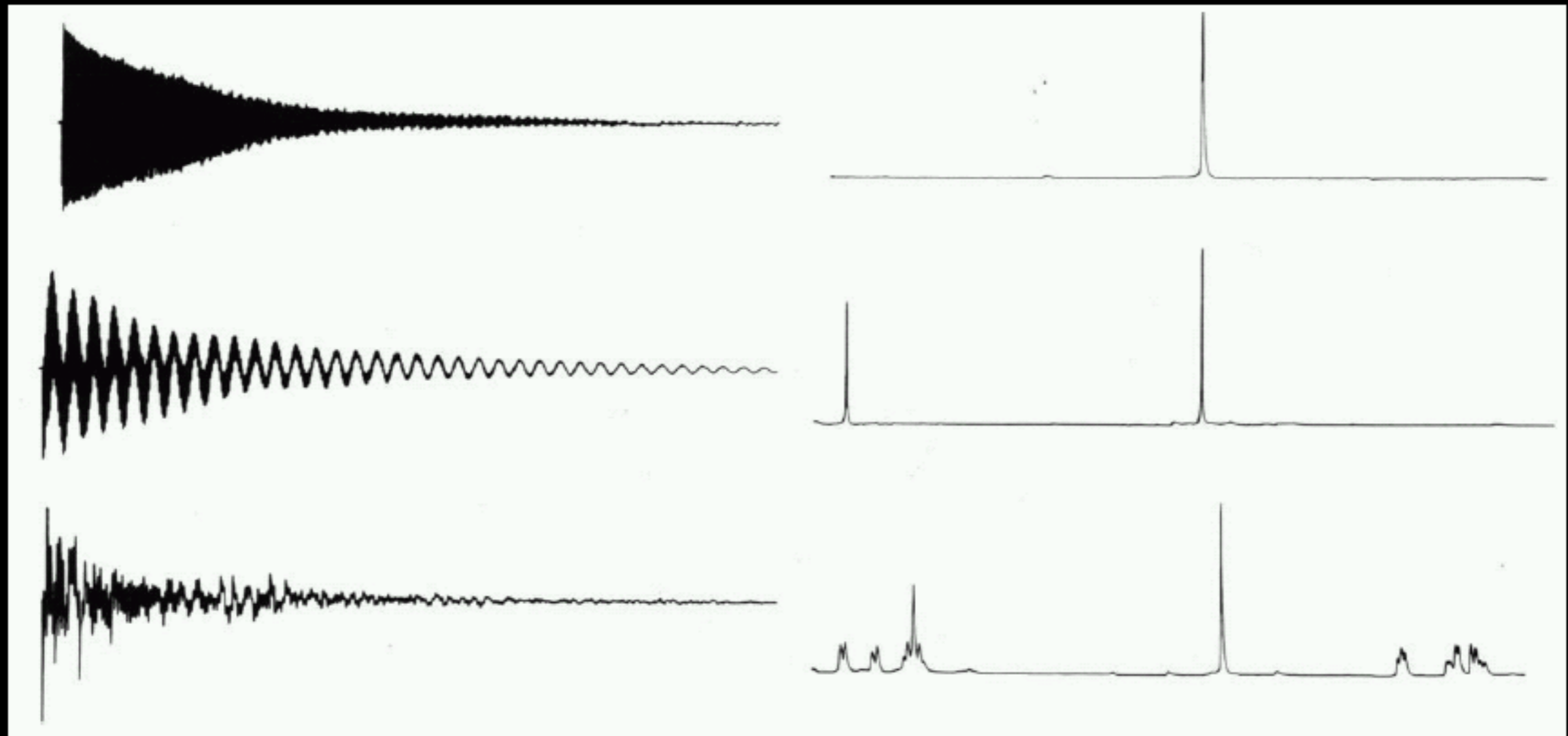
NMR : φυσικές αρχές

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια του μαθήματος της οργανικής χημείας. Συνοπτικά, η φυσική της βάση βρίσκεται στην ιδιοπεριστροφή των πυρήνων. Για πυρήνες περιττού ατομικού αριθμού, αυτό οδηγεί στην δημιουργία ενός μαγνητικού διπόλου (spin) το οποίο παρουσία ενός ισχυρού εξωτερικού μαγνητικού πεδίου μπορεί να προσανατολιστεί με δύο μόνο τρόπους (παράλληλα ή αντιπαράλληλα). Οι δύο προσανατολισμοί διαφέρουν ενεργειακά και κατά συνέπεια οι πληθυσμοί των πυρήνων που ανήκουν σε αυτούς επίσης διαφέρουν (κατά πολύ λίγο: μερικά ppm για τα ^1H πρωτόνια).

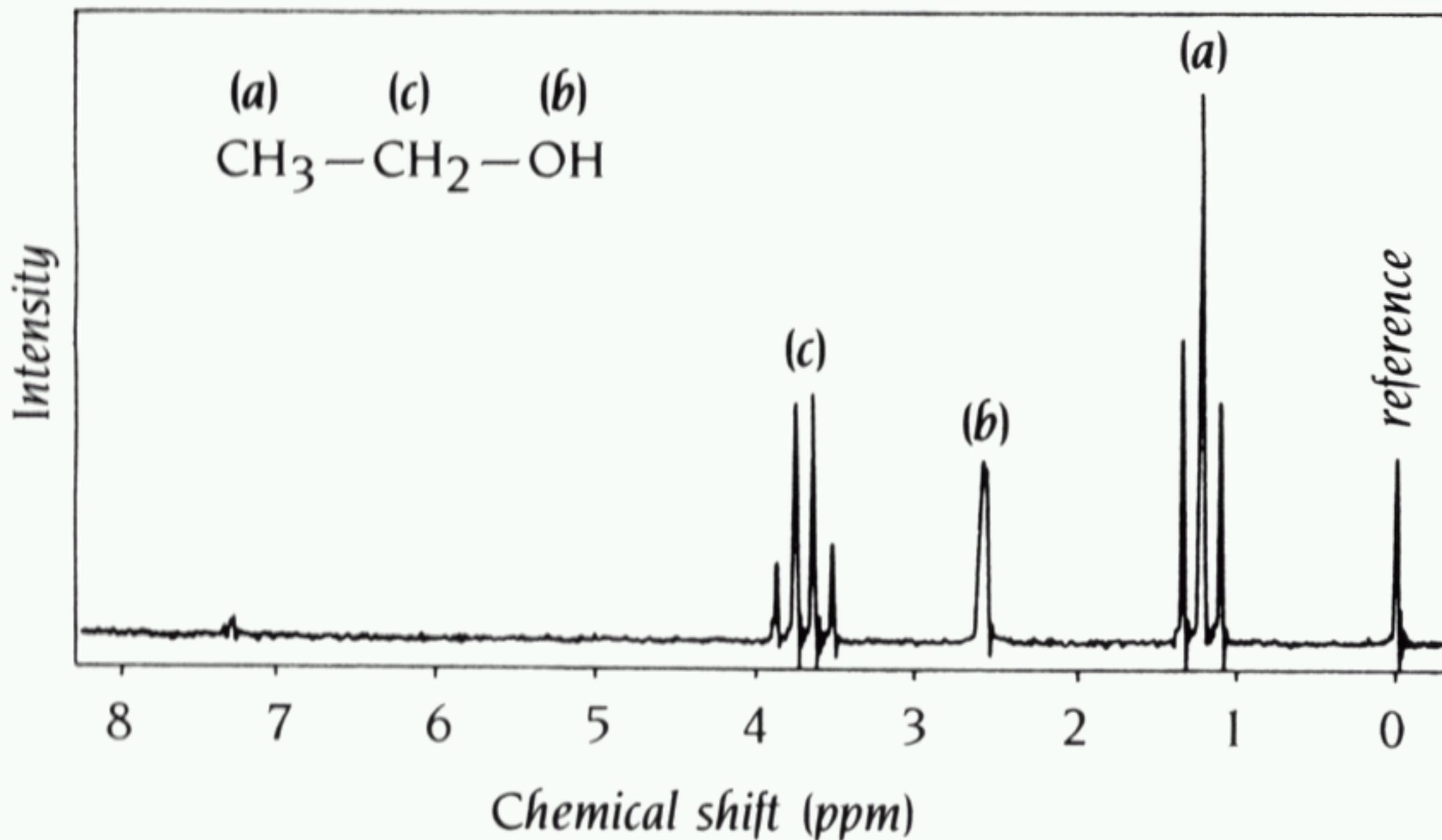
NMR : φυσικές αρχές

Συντονισμός της συχνότητας ιδιοπεριστροφής των πυρήνων με ένα δεύτερο εξωτερικό εναλλασσόμενο μαγνητικό πεδίο (με τη μορφή ραδιοσυχνοτήτων) οδηγεί στη μετάπτωση των πυρήνων από την μία ενεργειακή στάθμη στην άλλη. Η επακόλουθη αποδιέγερση τους συνοδεύεται από την εκπομπή ανιχνεύσιμης ακτινοβολίας, ο μετασχηματισμός Fourier της οποίας δίνει το συνηθισμένα (1D) NMR φάσματα. Η συχνότητα στην οποία εκπέμπουν οι πυρήνες εξαρτάται από το χημικό περιβάλλον τους και συνεπώς από τη δομή (και δυναμική) του μορίου.

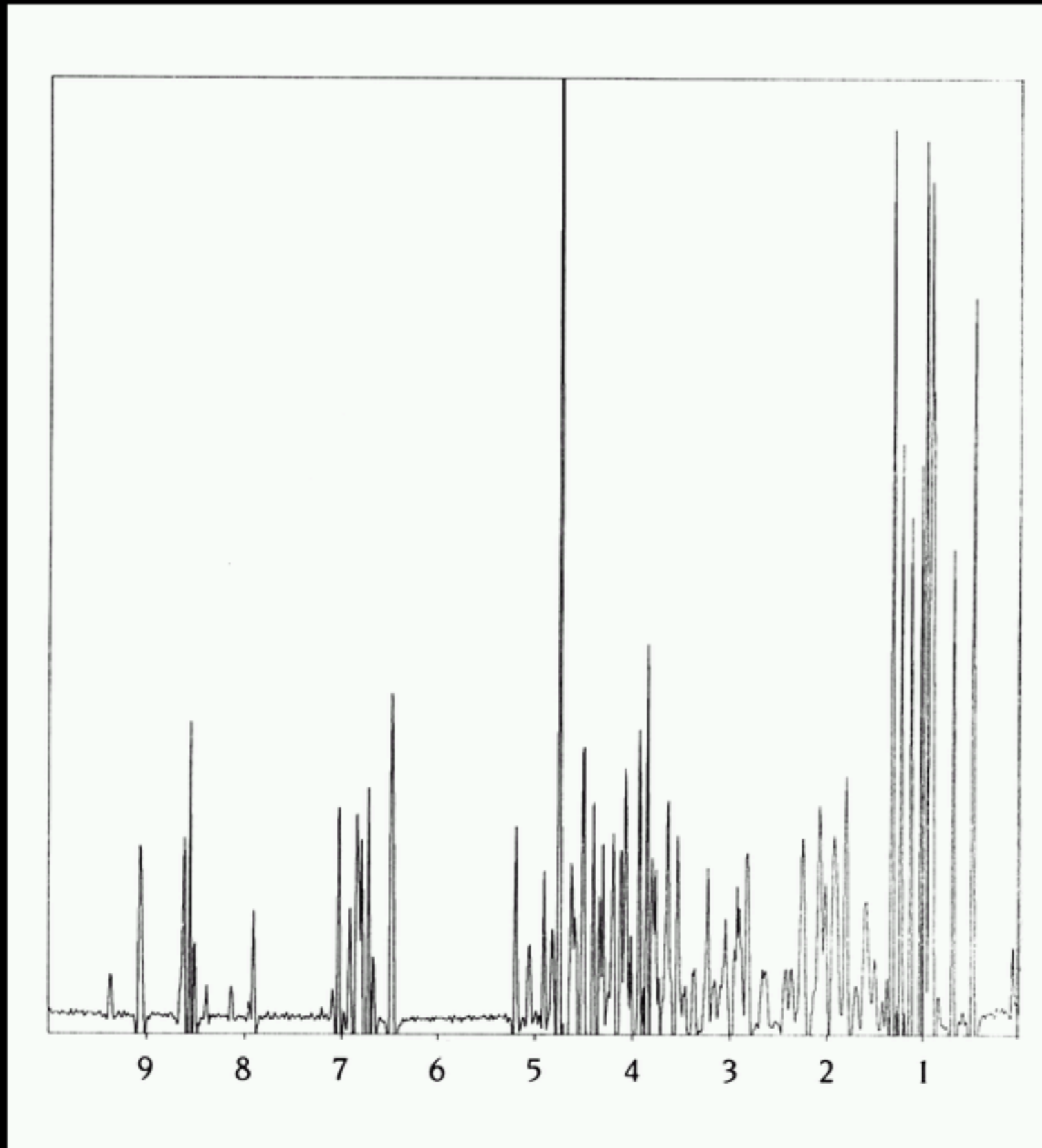
NMR : και εδώ ο κ.Fourier



NMR : απλά 1D φάσματα



NMR : μακρομοριακά φάσματα

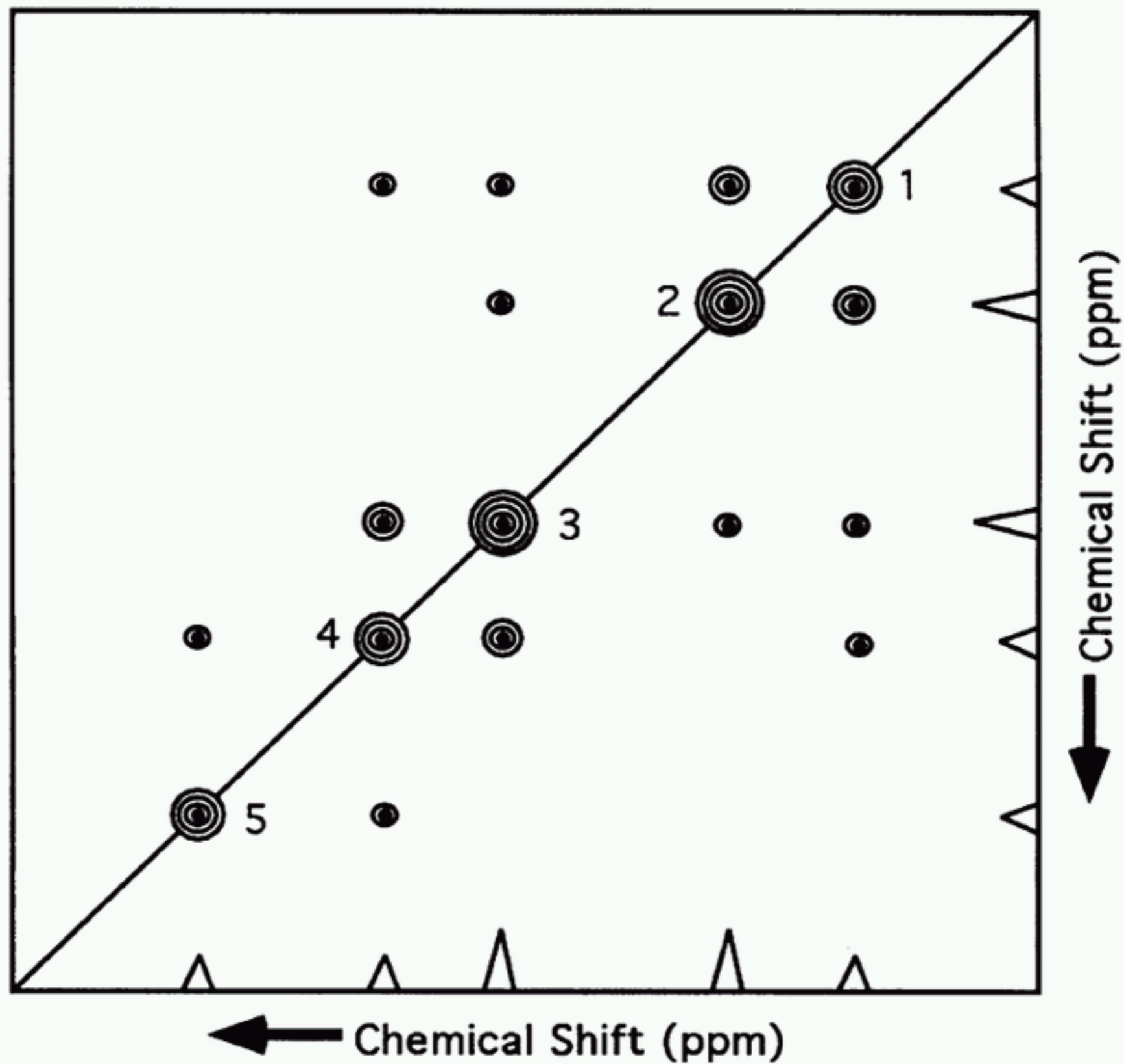


NMR : μακρομοριακά φάσματα

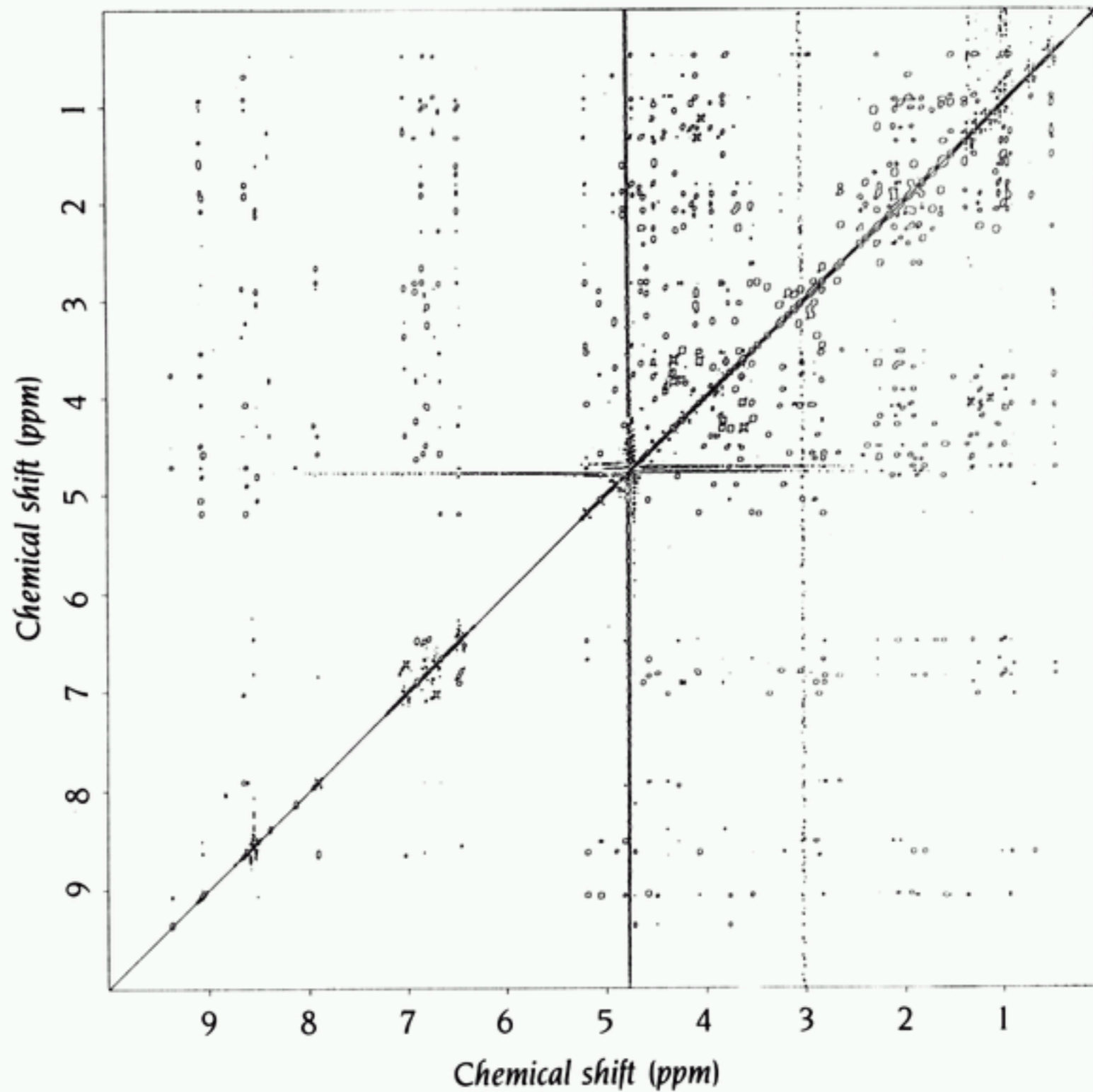
Η πολυπλοκότητα και αλληλοεπικάλυψη των μακρομοριακών φασμάτων, μαζί με την αδυναμία του προσδιορισμού της ταυτότητας των φασματικών γραμμών ('ποιο πρωτόνιο αντιστοιχεί σε αυτή τη γραμμή ;') λύνεται μέσω των πολυδιάστατων φασμάτων [2D, 3D, 4D(!), ...]. Η φυσική μεθοδολογία και οι φασματοσκοπικές τεχνικές που οδηγούν στα πολυδιάστατα φάσματα ανήκουν στα ειδικά κεφάλαια της δομικής. Εδώ θα αρκεστούμε σε μία 'εξ απαλών ονύχων' περιγραφή της πληροφορίας που περιέχεται σε δύο από αυτά : τα φάσματα COSY & NOESY.

NMR : 2D φάσματα

2D NOE Spectrum



NMR : 2D φάσματα

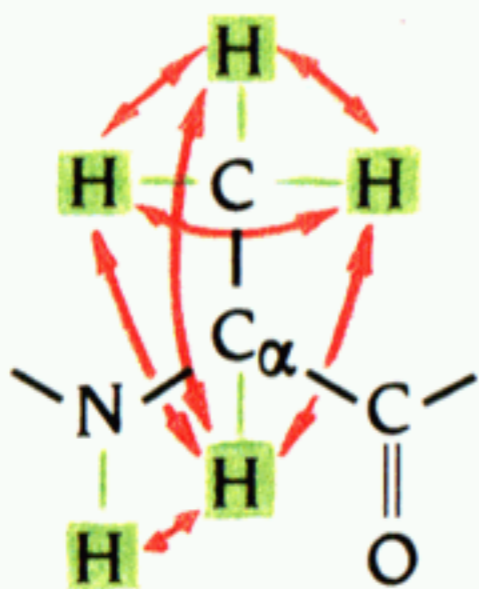


NMR : COSY

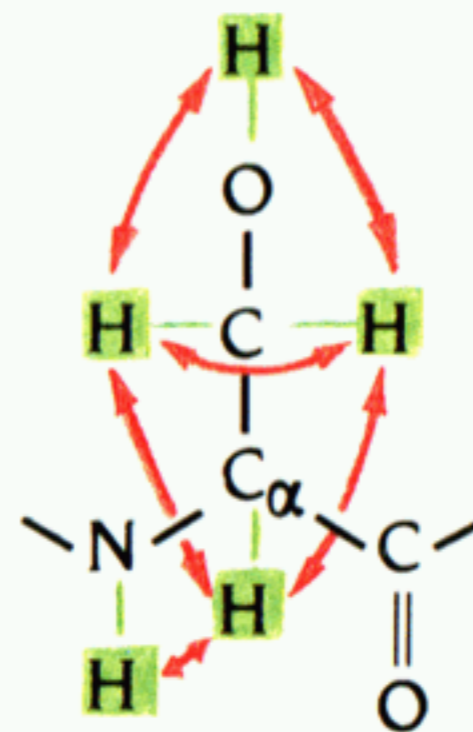
Τα φάσματα COSY (για COrrelation SpectroscopY) περιέχουν πληροφορία για το ποιοι πυρήνες του μορίου είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένοι μέσω δύο ή τριών δεσμών. Επειδή τόσο ο αριθμός όσο και οι ομοιοπολικές συνδέσεις μεταξύ των πρωτονίων διαφέρουν από αμινοξύ σε αμινοξύ, είναι δυνατό από τα φάσματα COSY να ταυτοποιηθούν ποιά πρωτόνια ανήκουν σε ποιους τύπους των αμινοξέων.

Για παράδειγμα, είναι εφικτό να συναχθεί ότι ένα συγκεκριμένο πρωτόνιο είναι το πρωτόνιο του υδροξυλίου μιας σερίνης (αλλά όχι για το εάν πρόκειται π.χ. για την Ser12 ή την Ser112).

NMR : COSY

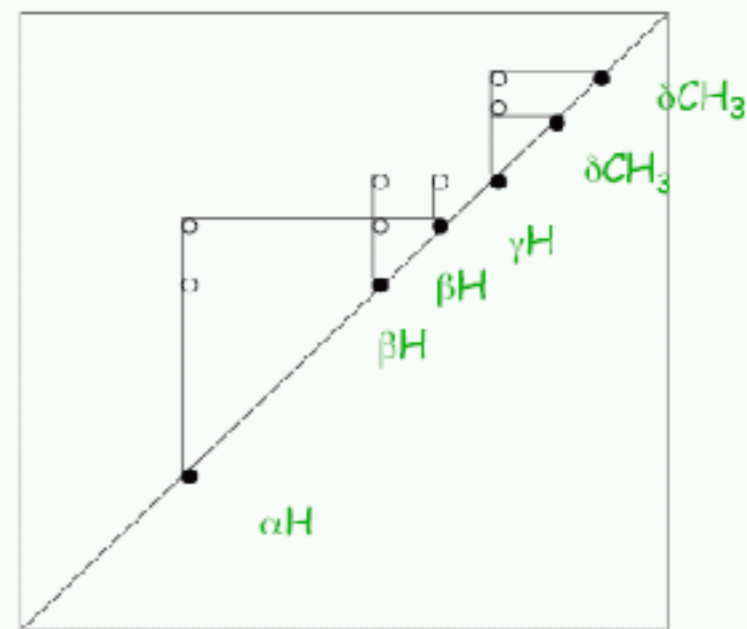
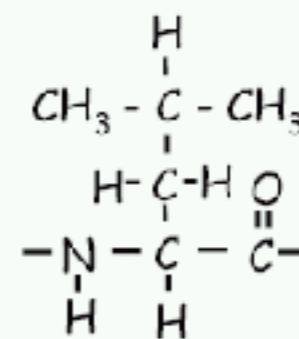
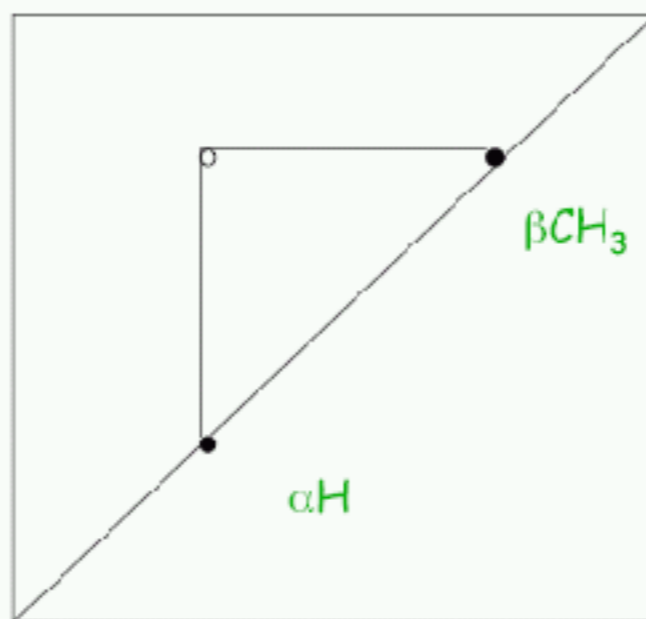
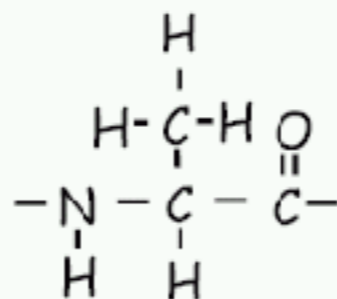
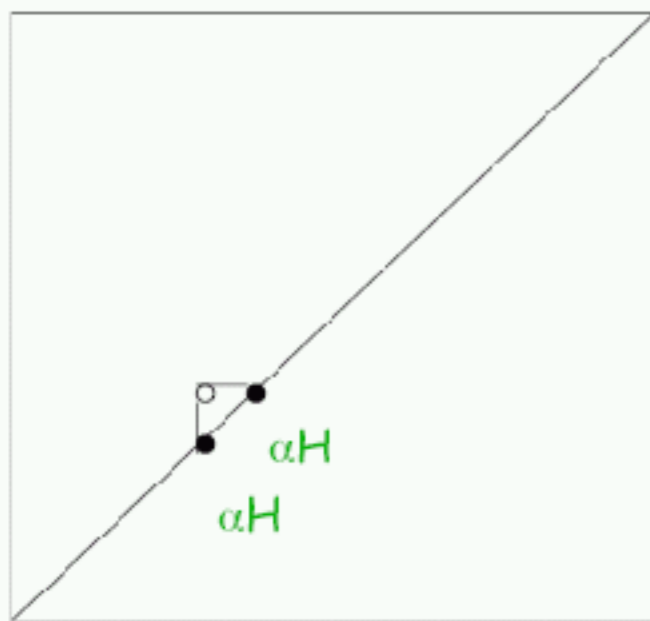
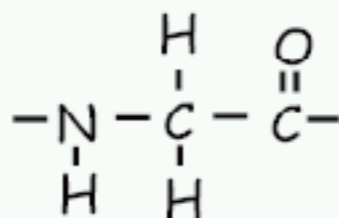


Ala



Ser

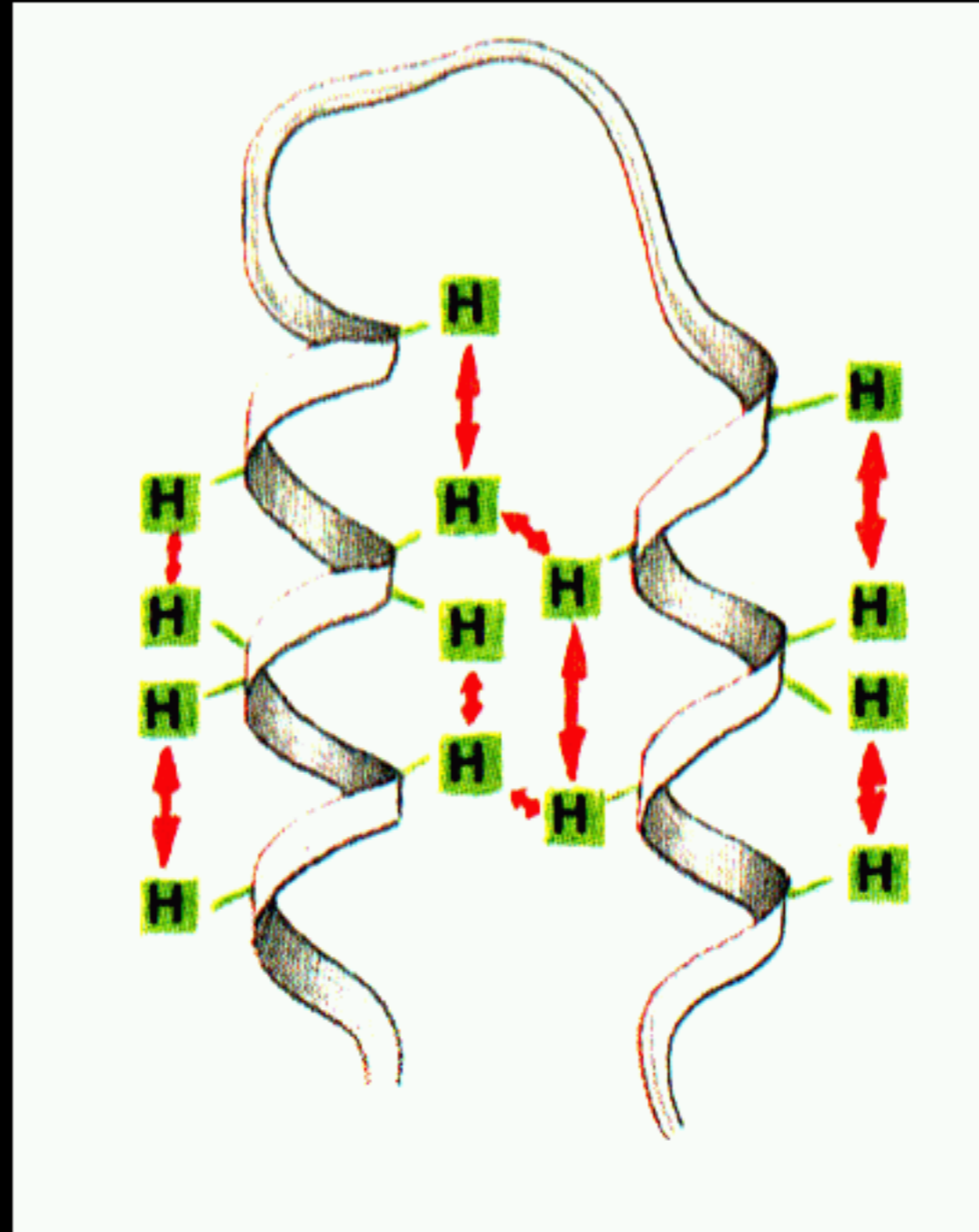
NMR : COSY



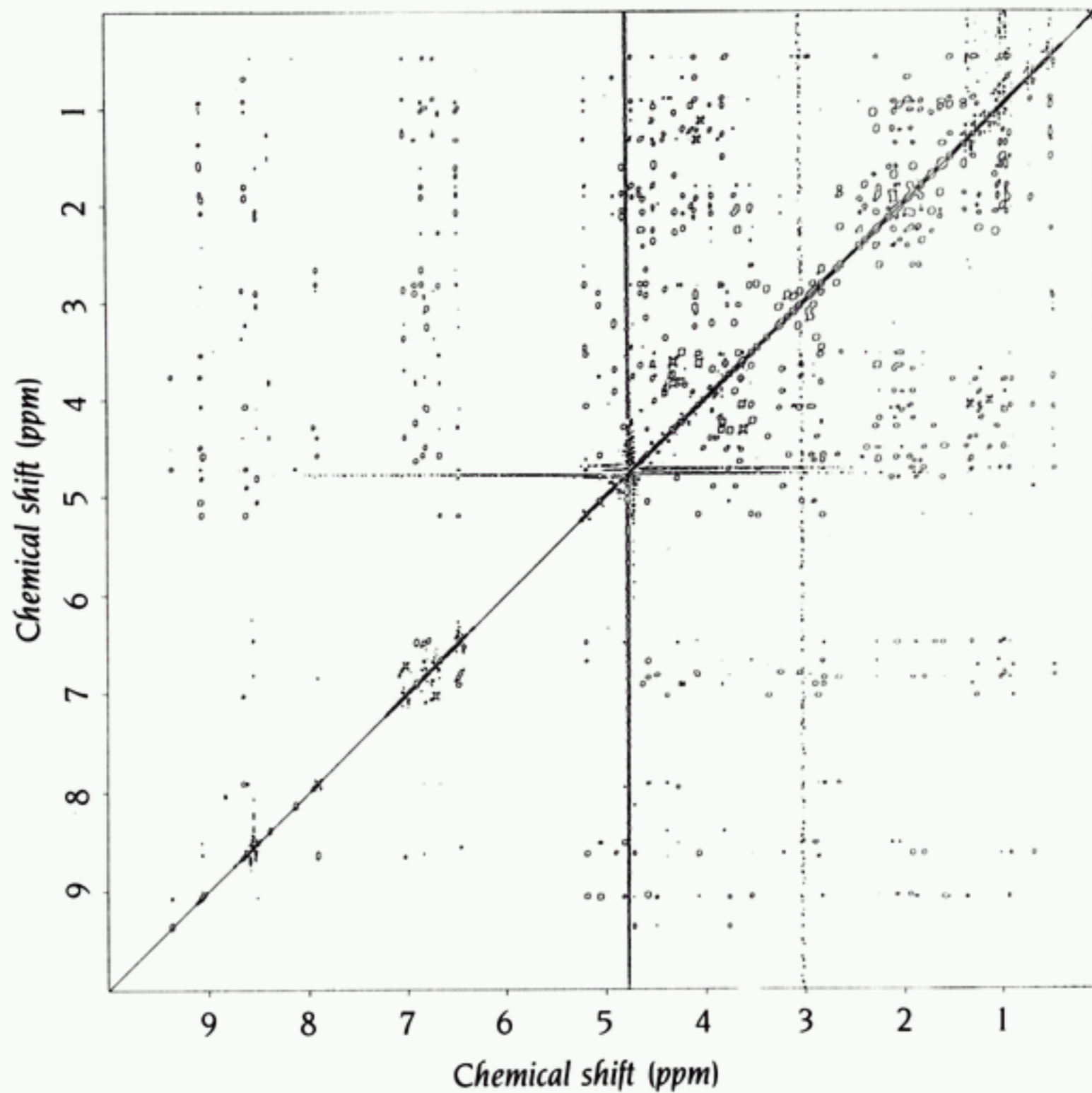
NMR : NOESY

Τα NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) φάσματα περιέχουν πληροφορία για τις αποστάσεις μεταξύ των πυρήνων του μορίου. Οι αποστάσεις αυτές είναι Ευκλείδειες αποστάσεις στον τρισδιάστατο χώρο, χωρίς να έχει σημασία η απόσταση σε επίπεδο αλληλουχίας. Αποστάσεις μέχρι και 5Å μπορούν να ανιχνευθούν από αυτά τα φάσματα, αλλά η αβεβαιότητα για τις ακριβείς τιμές των αποστάσεων είναι μεγάλη: συνήθως οι προκύπτουσες αποστάσεις κατηγοριοποιούνται σε τρεις μόνο ομάδες (π.χ. 1.8-3, 3-4, 4-5Å) και συνεπώς οι μετρήσεις περισσότερο περιορίζουν παρά καθορίζουν τις τιμές των αποστάσεων.

NMR : NOESY



NMR : NOESY



NMR : NOESY & COSY

Επειδή τα NOE φάσματα περιέχουν πληροφορία για αποστάσεις μεταξύ πυρήνων στο χώρο (και όχι μέσω δεσμών), συμπληρώνουν την πληροφορία που προέρχεται από τα COSY και επιτρέπουν την ολοκλήρωση της συσχέτισης μεταξύ φάσματος και αλληλουχίας (δηλ. την εύρεση της απάντησης στο ερώτημα 'ποιο πρωτόνιο αντιστοιχεί σε αυτή τη φασματική γραμμή;'). Ταυτόχρονα, λόγω των χαρακτηριστικών μοτίβων που ακολουθούν οι αποστάσεις πρωτονίων που ανήκουν σε δευτεροταγείς δομές (α-έλικα, β-πτυχωτή) γίνεται εφικτός και ο προσδιορισμός των στοιχείων δευτεροταγούς δομής.

Ναι, αλλά η δομή που είναι ;

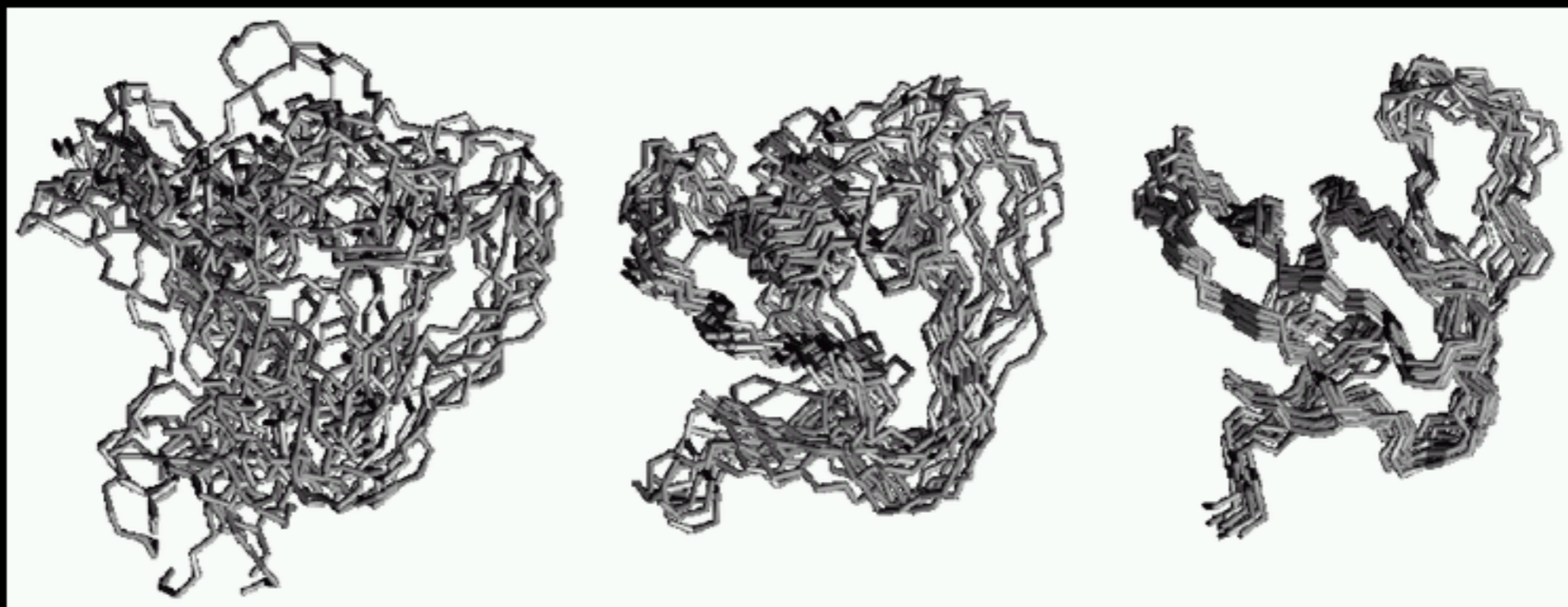
Η γνώση των αποστάσεων μεταξύ των πρωτονίων της δομής, μαζί με τη γνώση της δευτεροταγούς δομής και τους περιορισμούς για μερικές γωνίες, μειώνουν τόσο δραστικά τον αριθμό των πιθανών δομών που μπορούν ταυτόχρονα να ικανοποιούν όλους αυτούς τους περιορισμούς, ώστε η τρισδιάστατη δομή να ορίζεται (για καλά δεδομένα) μονοσήμαντα.

Η ανάπτυξη των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των δομών που είναι συμβατές με τα δεδομένα ανήκουν (αυτοδίκαια) στα ειδικά κεφάλαια της δομικής βιολογίας.

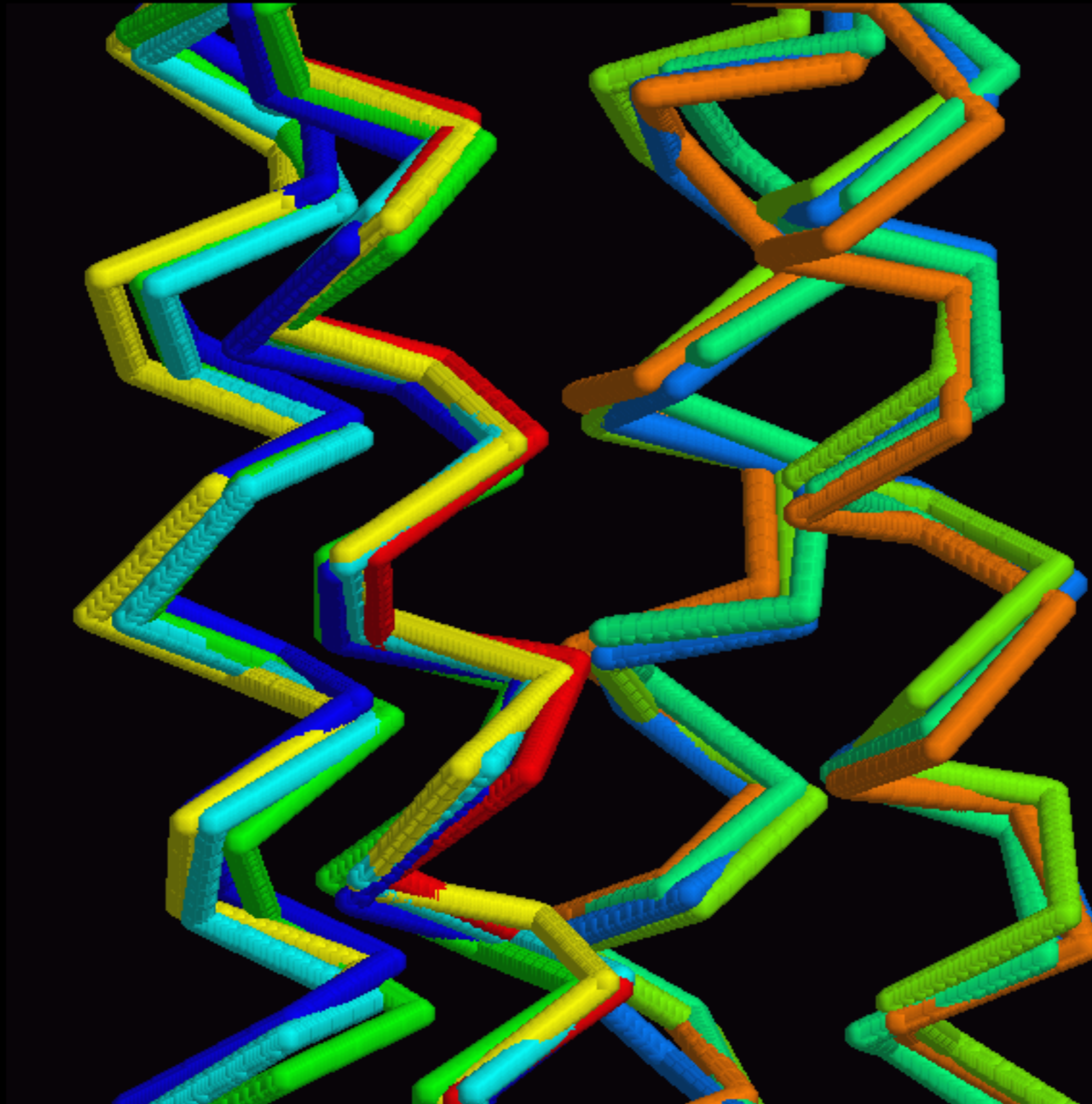
NMR : η σημασία των NOEs

Η παράμετρος που φαίνεται να είναι η πλέον καθοριστικής σημασίας για την 'ποιότητα' (ακρίβεια προσδιορισμού) μιας δομής NMR είναι το πλήθος των NOEs (αποστάσεων) που έχουν προσδιοριστεί.

Ένα παράδειγμα του τι συμβαίνει στις συμβατές (με τα δεδομένα) δομές καθώς ο αριθμός των NOEs αυξάνει, φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί :



NMR : μορφή αποτελεσμάτων



Protein Data Bank (PDB)

Είναι η μοναδική πρωτοταγής βάση δεδομένων της δομικής βιολογίας. Είναι φαινομενικά μια flat-file βάση, αν και στην πραγματικότητα είναι σχεσιακή. Στις επόμενες διαφάνειες θα παρουσιαστεί η μορφή μιας καταχώρησης της.

Η διεύθυνση της βάσης είναι :

<http://www.rcsb.org/pdb/>

PDB : παράδειγμα

```
HEADER      TRANSCRIPTION REGULATION      16-JAN-99      1B6Q
TITLE      ALANINE 31 PROLINE MUTANT OF ROP PROTEIN
COMPND     MOL_ID: 1;
COMPND     2 MOLECULE: ROP;
COMPND     3 CHAIN: NULL;
COMPND     4 SYNONYM: ROM;
COMPND     5 ENGINEERED: YES;
COMPND     6 MUTATION: A31P;
COMPND     7 BIOLOGICAL_UNIT: HOMODIMER
SOURCE     MOL_ID: 1;
SOURCE     2 ORGANISM_SCIENTIFIC: ESCHERICHIA COLI;
SOURCE     3 CELLULAR_LOCATION: CYTOPLASM;
SOURCE     4 PLASMID: COLE1;
SOURCE     5 GENE: ROP;
SOURCE     6 EXPRESSION_SYSTEM: ESCHERICHIA COLI;
SOURCE     7 EXPRESSION_SYSTEM_STRAIN: 71/72 (71/18 PLUS PCI857);
SOURCE     8 EXPRESSION_SYSTEM_PLASMID: PEX43
```


PDB : παράδειγμα

```
REMARK 2 RESOLUTION. 1.80 ANGSTROMS.
REMARK 3
REMARK 3 REFINEMENT.
REMARK 3 PROGRAM : X-PLOR 3.851
REMARK 3 AUTHORS : BRUNGER
REMARK 3
REMARK 3 DATA USED IN REFINEMENT.
REMARK 3 RESOLUTION RANGE HIGH (ANGSTROMS) : 1.80
REMARK 3 RESOLUTION RANGE LOW (ANGSTROMS) : 40.825
REMARK 3 DATA CUTOFF (SIGMA (F)) : 0.0
REMARK 3 DATA CUTOFF HIGH (ABS (F)) : NULL
REMARK 3 DATA CUTOFF LOW (ABS (F)) : NULL
REMARK 3 COMPLETENESS (WORKING+TEST) (%) : 99.9
REMARK 3 NUMBER OF REFLECTIONS : 5103
REMARK 3
REMARK 3 FIT TO DATA USED IN REFINEMENT.
REMARK 3 CROSS-VALIDATION METHOD : THROUGHOUT
REMARK 3 FREE R VALUE TEST SET SELECTION : RANDOM
REMARK 3 R VALUE (WORKING SET) : 0.189
REMARK 3 FREE R VALUE : 0.240
REMARK 3 FREE R VALUE TEST SET SIZE (%) : 5.0
REMARK 3 FREE R VALUE TEST SET COUNT : 286
```

PDB : παράδειγμα

```
REMARK 3 FIT IN THE HIGHEST RESOLUTION BIN.
REMARK 3 TOTAL NUMBER OF BINS USED : 8
REMARK 3 BIN RESOLUTION RANGE HIGH (A) : 1.80
REMARK 3 BIN RESOLUTION RANGE LOW (A) : 1.88
REMARK 3 BIN COMPLETENESS (WORKING+TEST) (%) : 99.9
REMARK 3 REFLECTIONS IN BIN (WORKING SET) : 588
REMARK 3 BIN R VALUE (WORKING SET) : 0.332
REMARK 3 BIN FREE R VALUE : 0.400
REMARK 3 BIN FREE R VALUE TEST SET SIZE (%) : 5.0
REMARK 3 BIN FREE R VALUE TEST SET COUNT : 31
REMARK 3 ESTIMATED ERROR OF BIN FREE R VALUE : NULL
REMARK 3
REMARK 3 NUMBER OF NON-HYDROGEN ATOMS USED IN REFINEMENT.
REMARK 3 PROTEIN ATOMS : 489
REMARK 3 NUCLEIC ACID ATOMS : 0
REMARK 3 HETEROGEN ATOMS : 0
REMARK 3 SOLVENT ATOMS : 56
REMARK 3
```

PDB : παράδειγμα

```
REMARK 3 B VALUES.  
REMARK 3 FROM WILSON PLOT (A**2) : 28.9  
REMARK 3 MEAN B VALUE (OVERALL, A**2) : 26.0  
REMARK 3 OVERALL ANISOTROPIC B VALUE.  
REMARK 3  
REMARK 3 ESTIMATED COORDINATE ERROR.  
REMARK 3 ESD FROM LUZZATI PLOT (A) : 0.23  
REMARK 3 ESD FROM SIGMAA (A) : NULL  
REMARK 3 LOW RESOLUTION CUTOFF (A) : 40.825  
REMARK 3  
REMARK 3 CROSS-VALIDATED ESTIMATED COORDINATE ERROR.  
REMARK 3 ESD FROM C-V LUZZATI PLOT (A) : NULL  
REMARK 3 ESD FROM C-V SIGMAA (A) : NULL  
REMARK 3  
REMARK 3 RMS DEVIATIONS FROM IDEAL VALUES.  
REMARK 3 BOND LENGTHS (A) : 0.007  
REMARK 3 BOND ANGLES (DEGREES) : 0.909  
REMARK 3 DIHEDRAL ANGLES (DEGREES) : NULL  
REMARK 3 IMPROPER ANGLES (DEGREES) : NULL
```


PDB : παράδειγμα

```
REMARK 200 EXPERIMENTAL DETAILS
REMARK 200 EXPERIMENT TYPE           : X-RAY DIFFRACTION
REMARK 200 DATE OF DATA COLLECTION  : NULL
REMARK 200 TEMPERATURE                (KELVIN) : 293
REMARK 200 PH                          : 4.3
REMARK 200 NUMBER OF CRYSTALS USED    : 1
REMARK 200
REMARK 200 SYNCHROTRON                (Y/N)   : N
REMARK 200 RADIATION SOURCE           : NULL
REMARK 200 BEAMLINE                   : NULL
REMARK 200 X-RAY GENERATOR MODEL      : SEALED TUBE
REMARK 200 MONOCHROMATIC OR LAUE      (M/L)   : M
REMARK 200 WAVELENGTH OR RANGE        (A)     : 1.5418
REMARK 200 MONOCHROMATOR              : GRAPHITE MONOCHROMATOR
REMARK 200 OPTICS                     : MONOCHROMATOR
REMARK 200
```

PDB : παράδειγμα

REMARK 200 DETECTOR TYPE : DIFFRACTOMETER
REMARK 200 DETECTOR MANUFACTURER : ENRAF-NONIUS
REMARK 200 INTENSITY-INTEGRATION SOFTWARE : CAD4 SOFTWARE
REMARK 200 DATA SCALING SOFTWARE : CAD4 SOFTWARE
REMARK 200
REMARK 200 NUMBER OF UNIQUE REFLECTIONS : 5103
REMARK 200 RESOLUTION RANGE HIGH (A) : 1.80
REMARK 200 RESOLUTION RANGE LOW (A) : 40.825
REMARK 200 REJECTION CRITERIA (SIGMA(I)) : NONE
REMARK 200

PDB : παράδειγμα

```
REMARK 200 OVERALL .
REMARK 200   COMPLETENESS FOR RANGE           (%) : 99.9
REMARK 200   DATA REDUNDANCY                 : 1.0
REMARK 200   R MERGE                          (I) : NULL
REMARK 200   R SYM                            (I) : NONE
REMARK 200   <I/SIGMA(I)> FOR THE DATA SET   : 12.4
REMARK 200
REMARK 200 IN THE HIGHEST RESOLUTION SHELL .
REMARK 200   HIGHEST RESOLUTION SHELL, RANGE HIGH (A) : 1.80
REMARK 200   HIGHEST RESOLUTION SHELL, RANGE LOW  (A) : 1.86
REMARK 200   COMPLETENESS FOR SHELL           (%) : 99.6
REMARK 200   DATA REDUNDANCY IN SHELL       : 1.0
REMARK 200   R MERGE FOR SHELL               (I) : NULL
REMARK 200   R SYM FOR SHELL                 (I) : NONE
REMARK 200   <I/SIGMA(I)> FOR SHELL          : 2.48
REMARK 200
```

PDB : παράδειγμα

```
REMARK 350 GENERATING THE BIOMOLECULE
REMARK 350 COORDINATES FOR A COMPLETE MULTIMER REPRESENTING THE KNOWN
REMARK 350 BIOLOGICALLY SIGNIFICANT OLIGOMERIZATION STATE OF THE
REMARK 350 MOLECULE CAN BE GENERATED BY APPLYING BIOMT TRANSFORMATIONS
REMARK 350 GIVEN BELOW. BOTH NON-CRYSTALLOGRAPHIC AND
REMARK 350 CRYSTALLOGRAPHIC OPERATIONS ARE GIVEN.
REMARK 350
REMARK 350 APPLY THE FOLLOWING TO CHAINS: NULL
REMARK 350 BIOMT1 1 -1.000000 0.000000 0.000000 0.000000
REMARK 350 BIOMT2 1 0.000000 1.000000 0.000000 0.000000
REMARK 350 BIOMT3 1 0.000000 0.000000 -1.000000 40.70000
```

PDB : παράδειγμα

```
REMARK 999 SEQUENCE
REMARK 999 1B6Q          SWS          P03051          57 -          63 NOT IN ATOMS LIST
DBREF  1B6Q           1          56  SWS          P03051          ROP_ECOLI           1          56
SEQADV 1B6Q  PRO           31  SWS  P03051          ALA           31 ENGINEERED MUTATION
SEQRES  1           63  MET THR LYS GLN GLU LYS THR ALA LEU ASN MET ALA ARG
SEQRES  2           63  PHE ILE ARG SER GLN THR LEU THR LEU LEU GLU LYS LEU
SEQRES  3           63  ASN GLU LEU ASP PRO ASP GLU GLN ALA ASP ILE CYS GLU
SEQRES  4           63  SER LEU HIS ASP HIS ALA ASP GLU LEU TYR ARG SER CYS
SEQRES  5           63  LEU ALA ARG PHE GLY ASP ASP GLY GLU ASN LEU
FORMUL  2  HOH      *56(H2 O1)
HELIX   1     1  LYS           3  GLU           28  1           26
HELIX   2     2  PRO           31  ALA           54  1           24
CRYST1  30.400   42.100   81.400   90.00   90.00   90.00  C 2 2 21           8
ORIGX1      1.000000   0.000000   0.000000           0.000000
ORIGX2      0.000000   1.000000   0.000000           0.000000
ORIGX3      0.000000   0.000000   1.000000           0.000000
SCALE1      0.032895   0.000000   0.000000           0.000000
SCALE2      0.000000   0.023753   0.000000           0.000000
SCALE3      0.000000   0.000000   0.012285           0.000000
```

PDB : παράδειγμα

ATOM	1	N	MET	1	-2.053	13.510	-6.199	1.00	47.14
ATOM	2	CA	MET	1	-1.894	13.110	-4.767	1.00	49.45
ATOM	3	C	MET	1	-0.688	12.186	-4.582	1.00	47.94
ATOM	4	O	MET	1	-0.774	10.982	-4.841	1.00	51.90
ATOM	5	CB	MET	1	-3.163	12.402	-4.276	1.00	51.84
ATOM	6	CG	MET	1	-3.059	11.814	-2.871	1.00	57.35
ATOM	7	SD	MET	1	-4.121	12.669	-1.683	1.00	62.43
ATOM	8	CE	MET	1	-2.938	13.041	-0.373	1.00	61.79
ATOM	9	N	THR	2	0.434	12.748	-4.134	1.00	42.11
ATOM	10	CA	THR	2	1.636	11.954	-3.914	1.00	34.48
ATOM	11	C	THR	2	1.551	11.168	-2.615	1.00	32.97
ATOM	12	O	THR	2	0.726	11.447	-1.749	1.00	32.39