

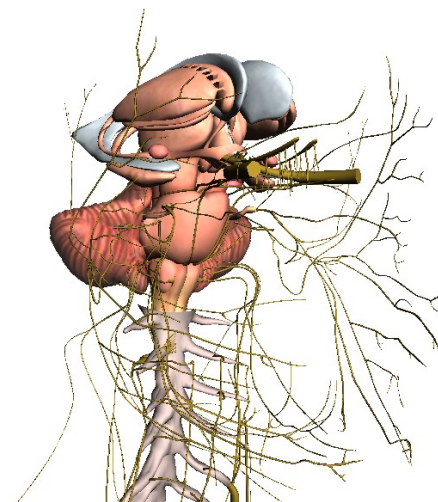
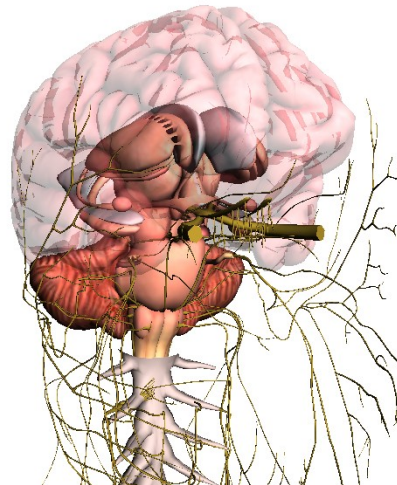
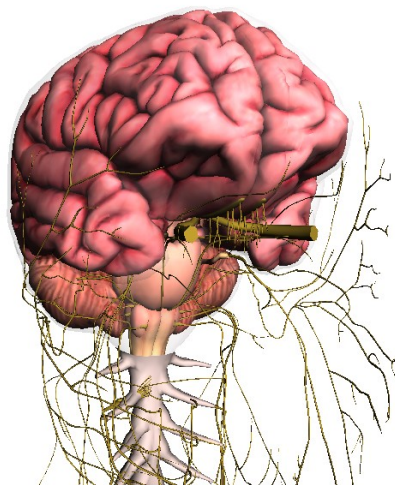
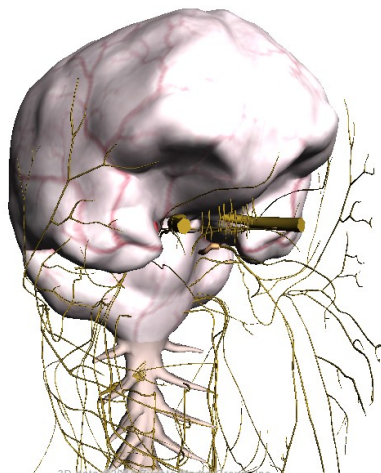
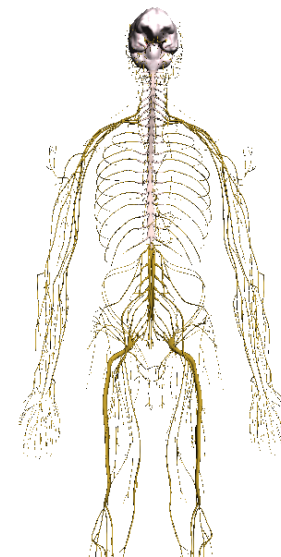
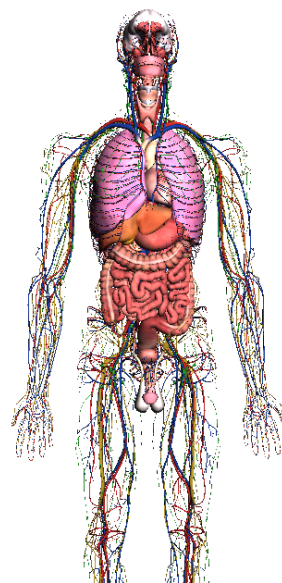
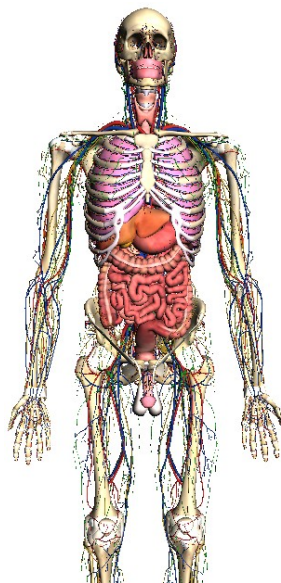
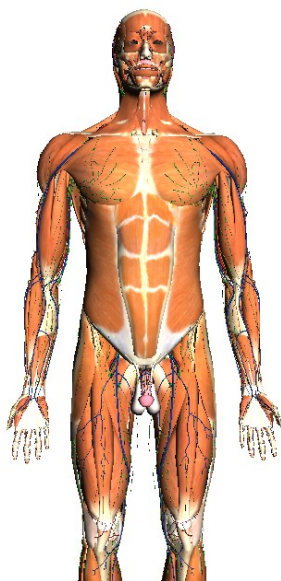
Molekulární biofyzika

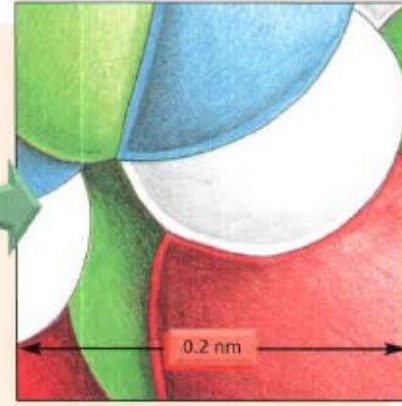
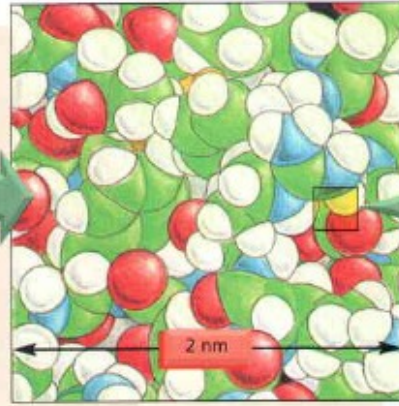
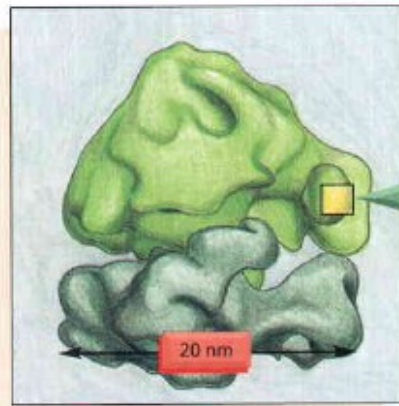
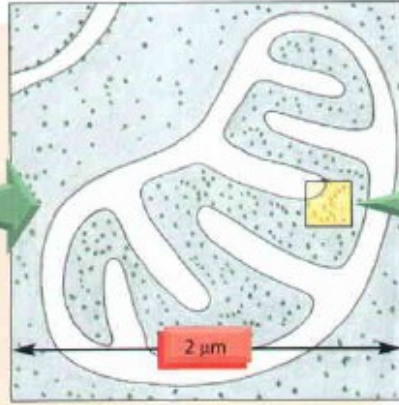
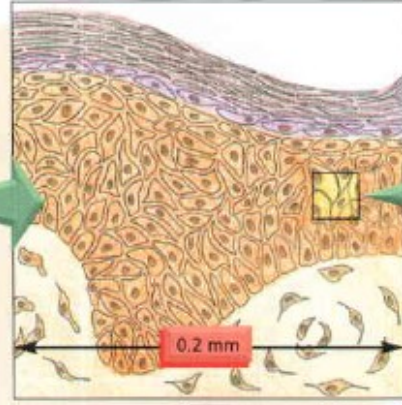
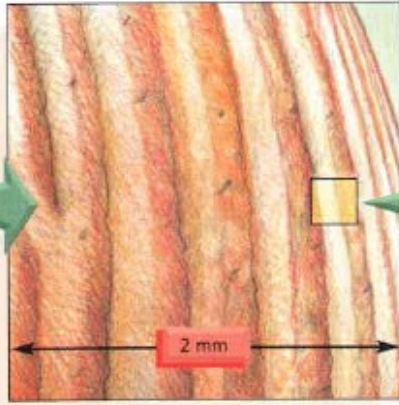
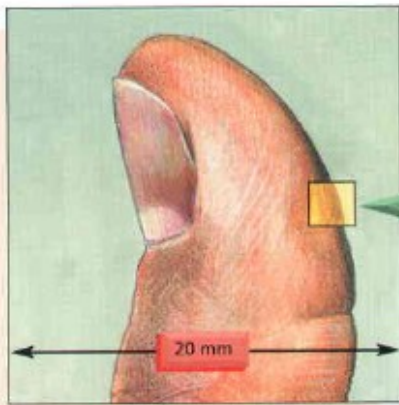
- **Biomolekulární vědy mají klíčový význam pro molekulární medicínu.**
 - Budeme se zabývat zařízeními pro studium struktury, měření koncentrace (*in-vitro* i *in-vivo*), a pro studium vlastností membrán
- Nejběžnější zařízení založená na interakci elektromagnetického záření s makromolekulami
 - VIS, UV a IR spektrofotometry
 - Ramanovy spektrometry
 - Zařízení pro měření cirkulárního dichroismu
 - Zařízení pro rentgenstrukturní analýzu
 - Nukleární magnetickou rezonancí
 - Hmotnostní spektrometrie
 - Fluorescenční techniky
 - Elektronová mikroskopie
- Zařízení založená na jiných vlastnostech biomolekul (např. mechanických a elektrických)
 - Elektroforéza
 - Langmuir-Blodgettové technika
- Zařízení pro měření membránových potenciálů a koncentrace iontů v buňkách

Biofyzika a biomolekulární výzkum

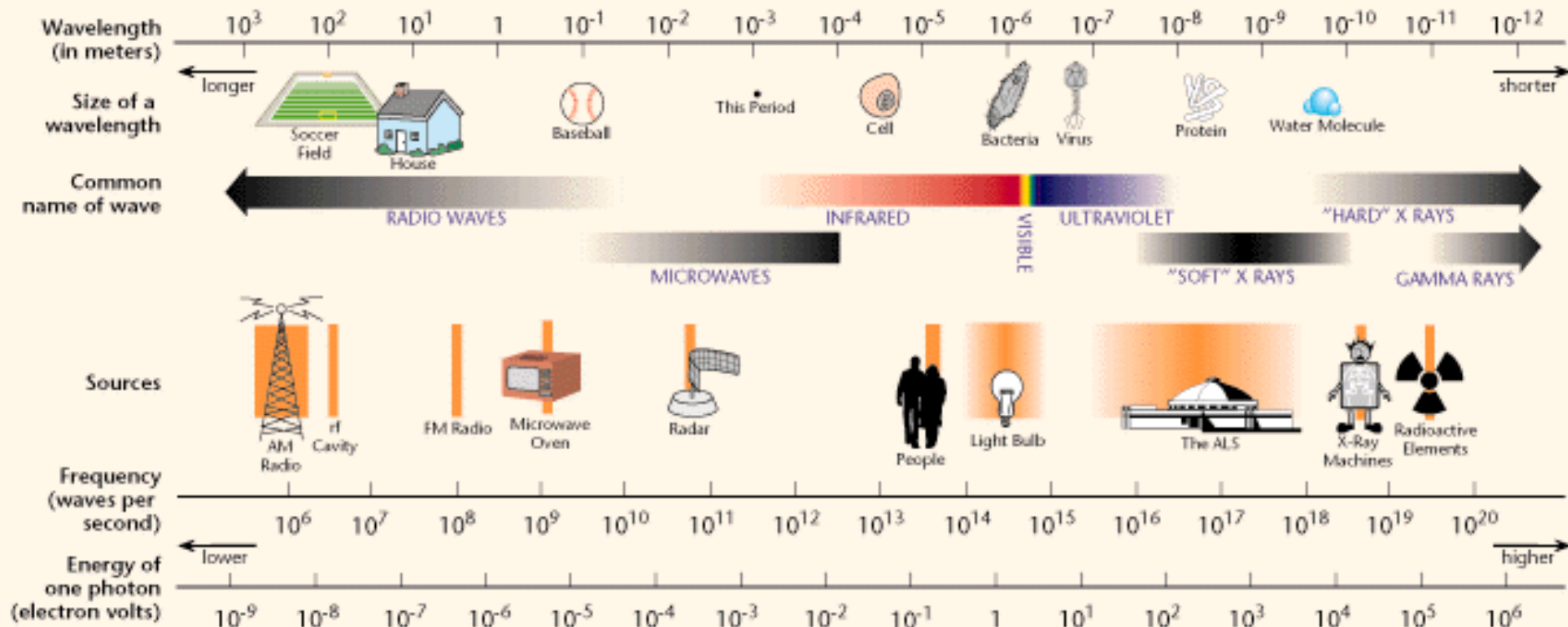
Tento výzkum je orientován zejména na strukturální studie, které umožňují porozumět např.:

- Specifičnosti enzymatických a imunologických reakcí
- Účinkům některých léků (např. cytostatik) na molekulární úrovni.
- Mechanismům pasivního i aktivního transportu
- Buněčnému pohybu
-





THE ELECTROMAGNETIC SPECTRUM



Composition of the Earth's Crust, Seawater, and the Human Body*

Earth's Crust		Seawater		Human Body [†]	
Element	%	Compound	mM	Element	%
O	47	Cl ⁻	548	H	63
Si	28	Na ⁺	470	O	25.5
Al	7.9	Mg ²⁺	54	C	9.5
Fe	4.5	SO ₄ ²⁻	28	N	1.4
Ca	3.5	Ca ²⁺	10	Ca	0.31
Na	2.5	K ⁺	10	P	0.22
K	2.5	HCO ₃ ⁻	2.3	Cl	0.08
Mg	2.2	NO ₃ ⁻	0.01	K	0.06
Ti	0.46	HPO ₄ ²⁻	<0.001	S	0.05
H	0.22			Na	0.03
C	0.19			Mg	0.01

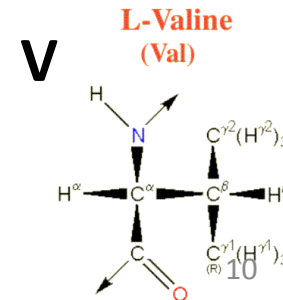
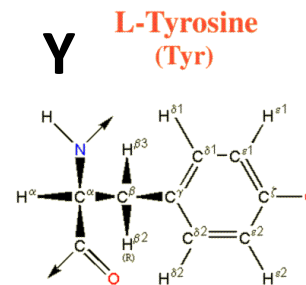
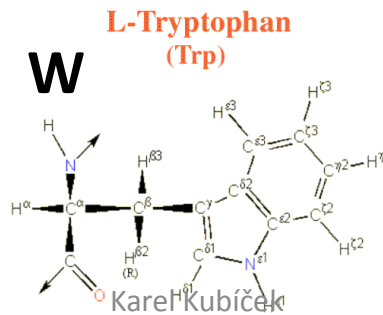
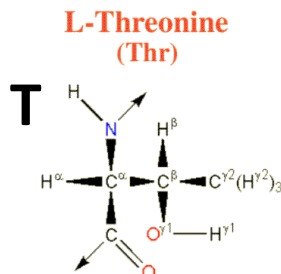
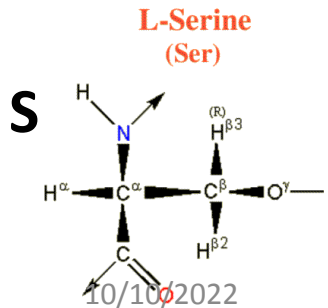
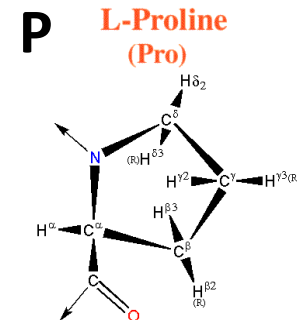
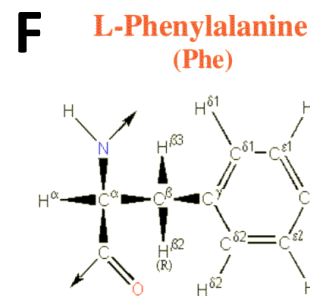
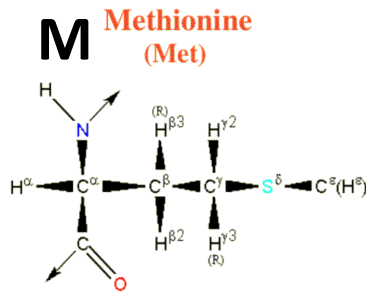
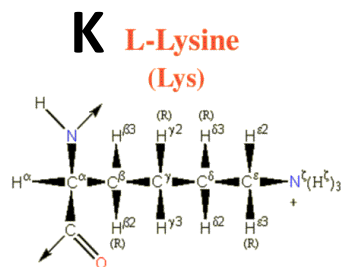
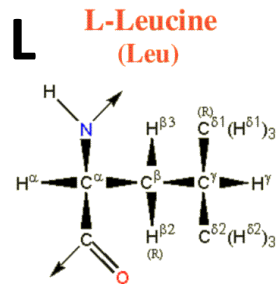
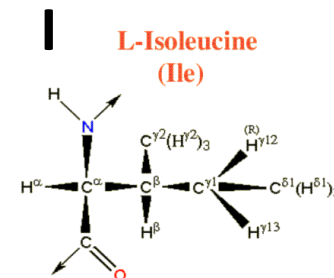
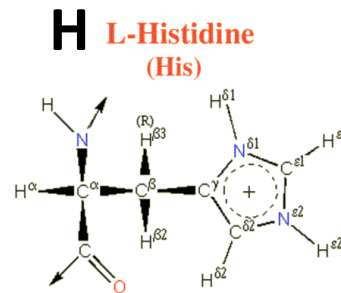
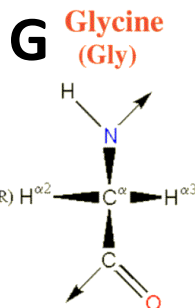
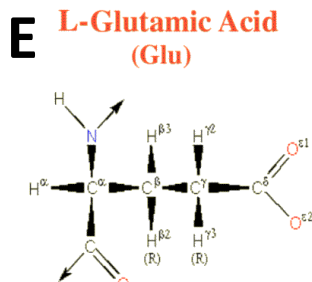
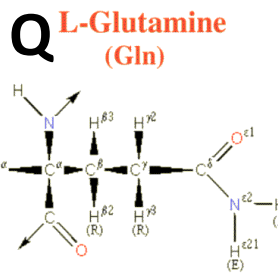
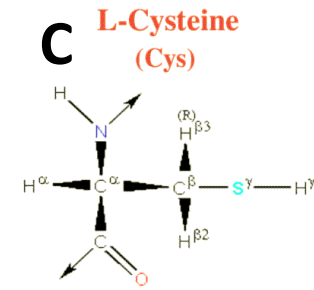
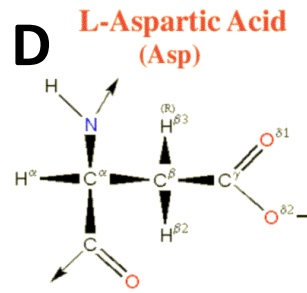
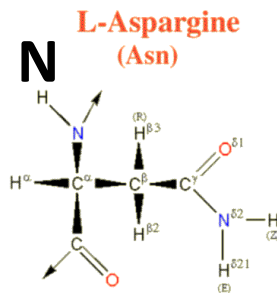
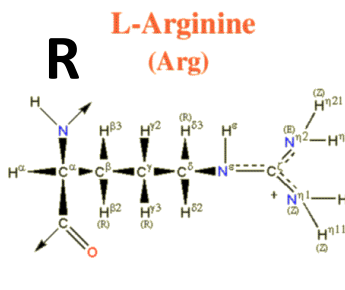
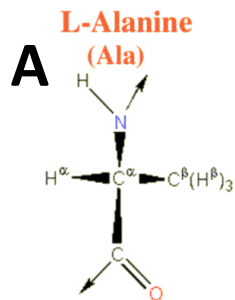
*Figures for the earth's crust and the human body are presented as percentages of the total number of atoms; seawater data are millimoles per liter. Figures for the earth's crust do *not* include water, whereas figures for the human body do.

[†]Trace elements found in the human body serving essential biological functions include Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Mo, I, Ni, and Se.

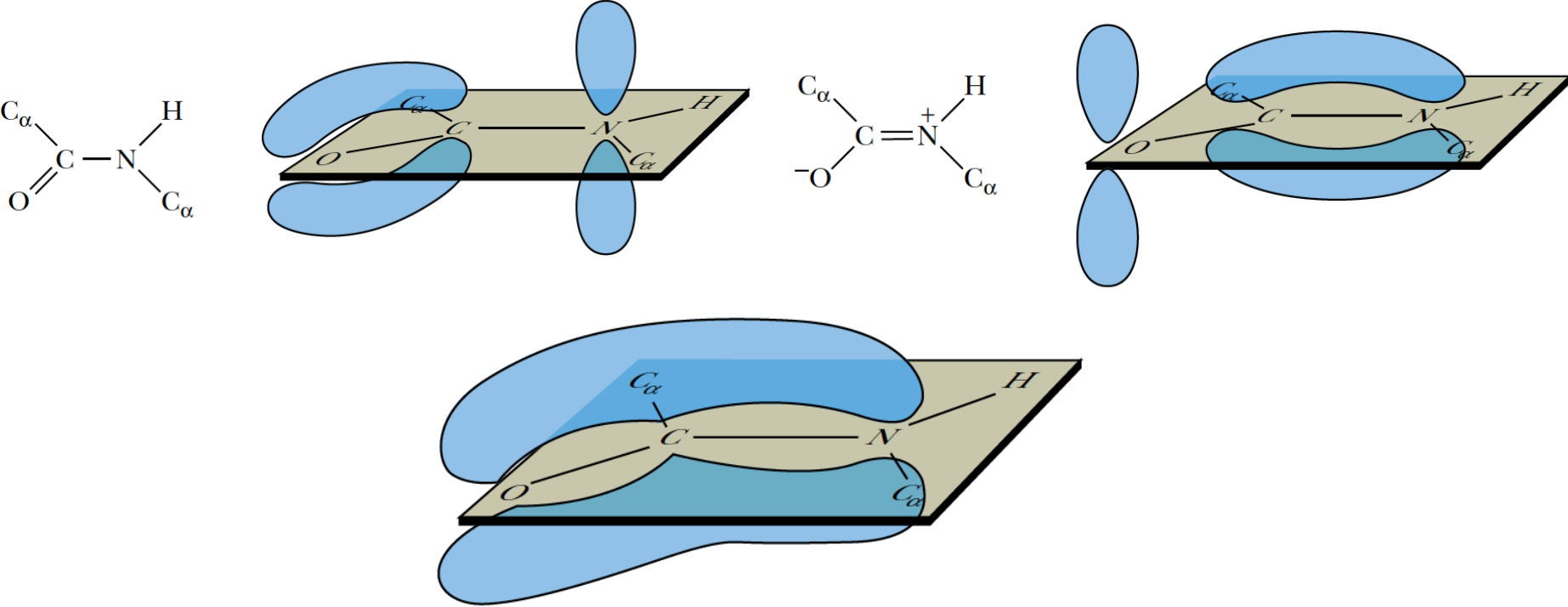
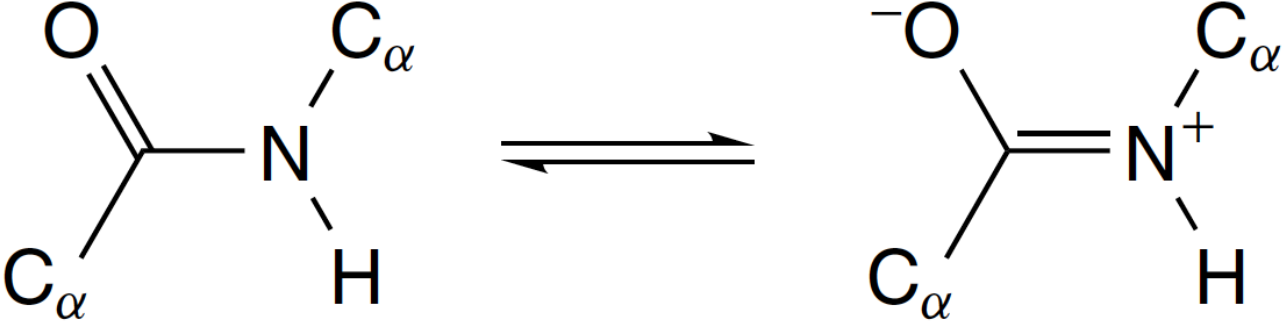
Chemické složení lidského těla

- a. (65 %) Voda
- b. (20 %) Proteiny
- c. (12 %) Lipidy (tuky)
- d. (1.1 %) Nukleové kyseliny
- e. Ionty (Na^+ , K^+ , Cl^- , PO_4^{3-} ...)
- f. Plyny (O_2 , CO_2 , ...), karbohydráty (glukóza), hydroxyapatit (forma vápníku a fosfátu – zuby, kosti), volné radikály, etc.

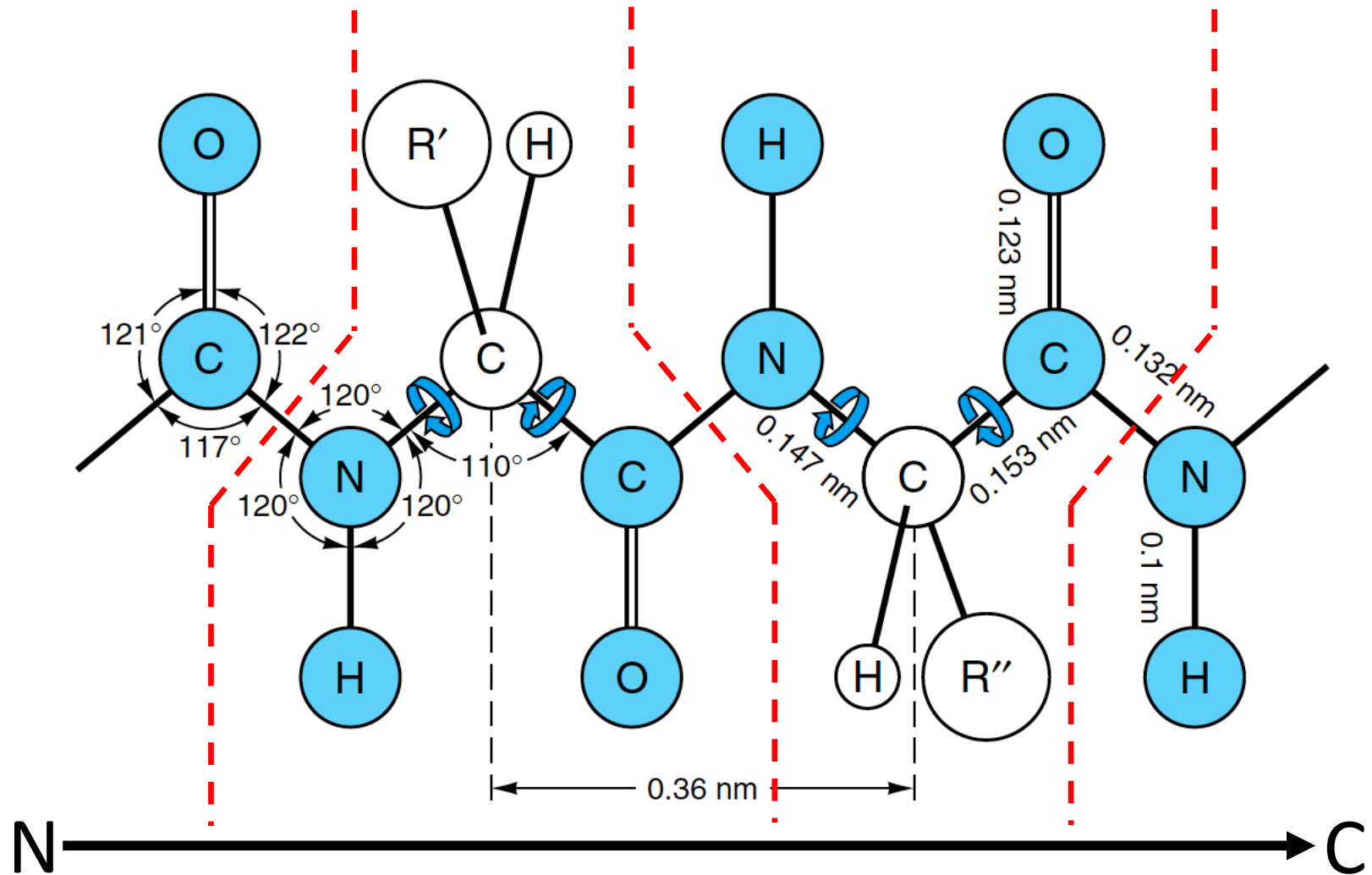
Proteiny

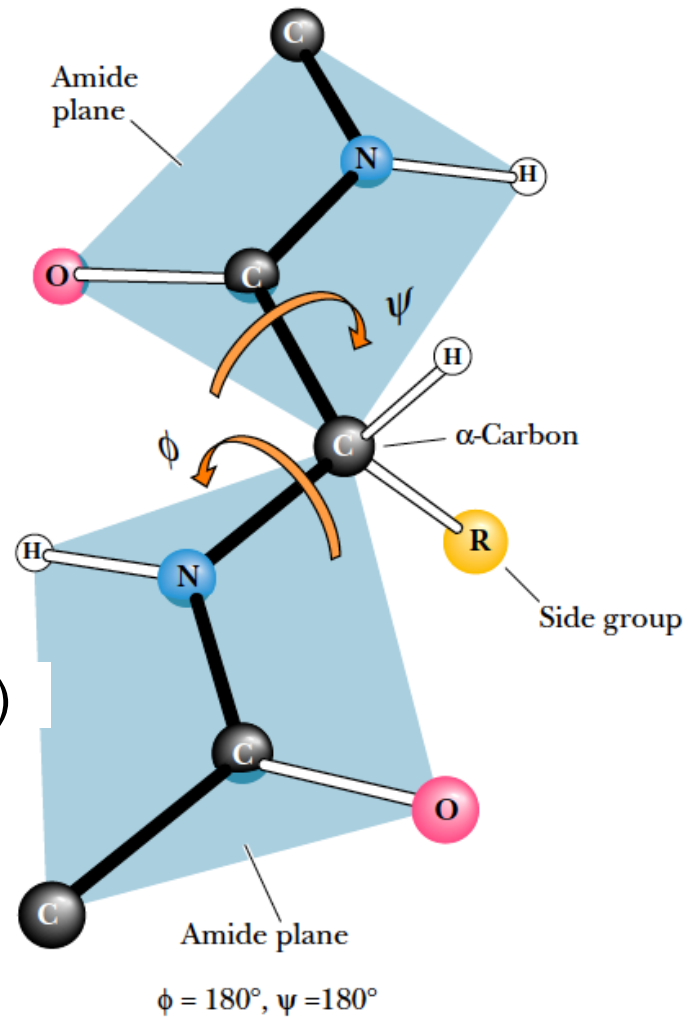
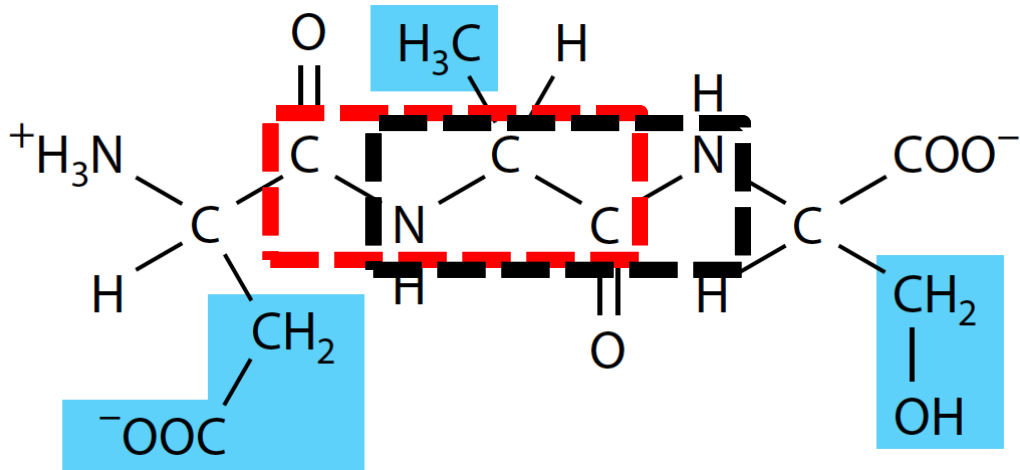
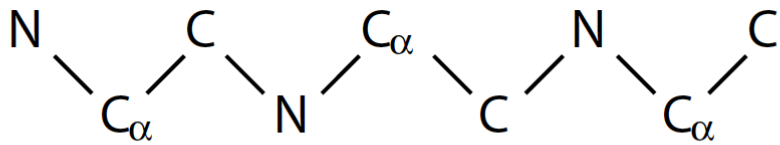


Peptidová vazba – pseudo dvojitá vazba => amidová rovina



Proteinová páteř, primární struktura, číslování od **N**-konce (terminu) směrem k **C**-konci





ϕ – **CO, N, C_α, CO** (CO někdy značeno C')

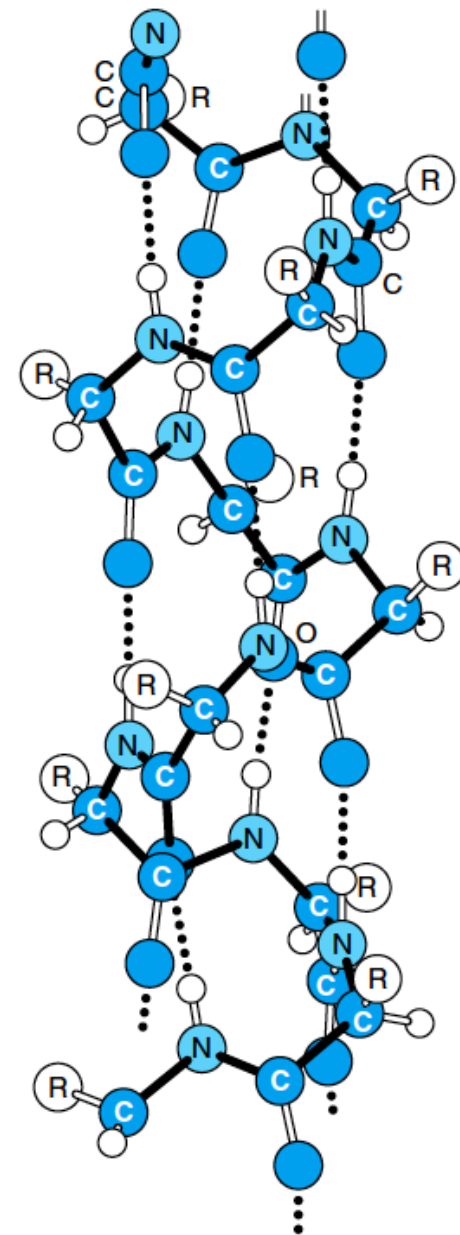
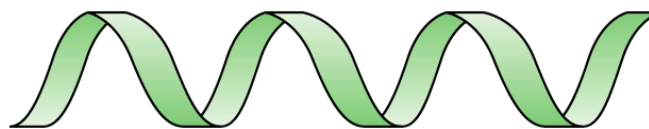
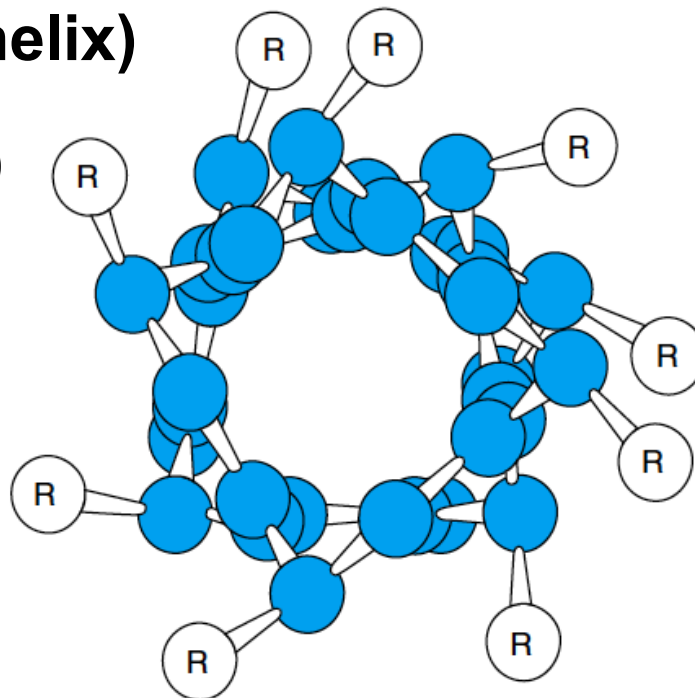
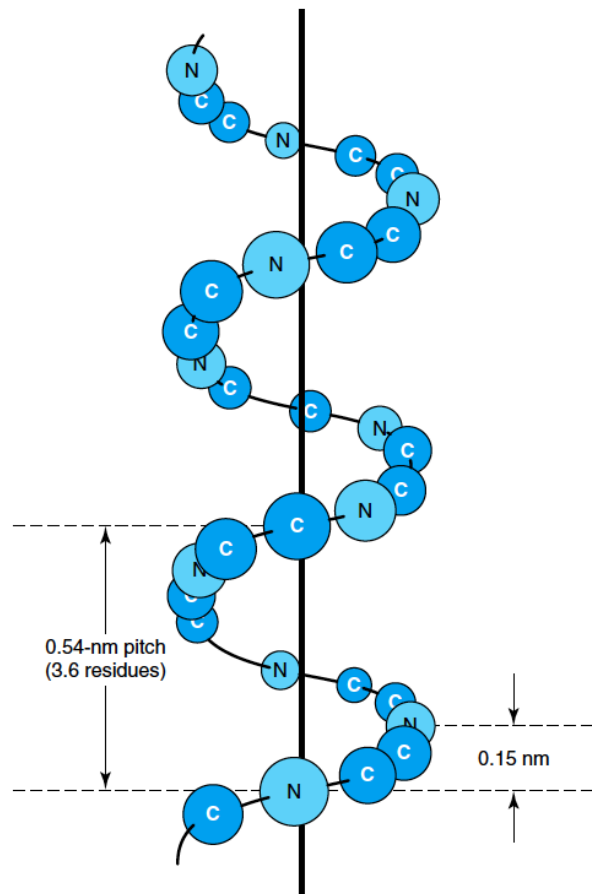
ψ – **N, C_α, CO, N**

Sekundární struktura

1) α -šroubovice (α -helix)

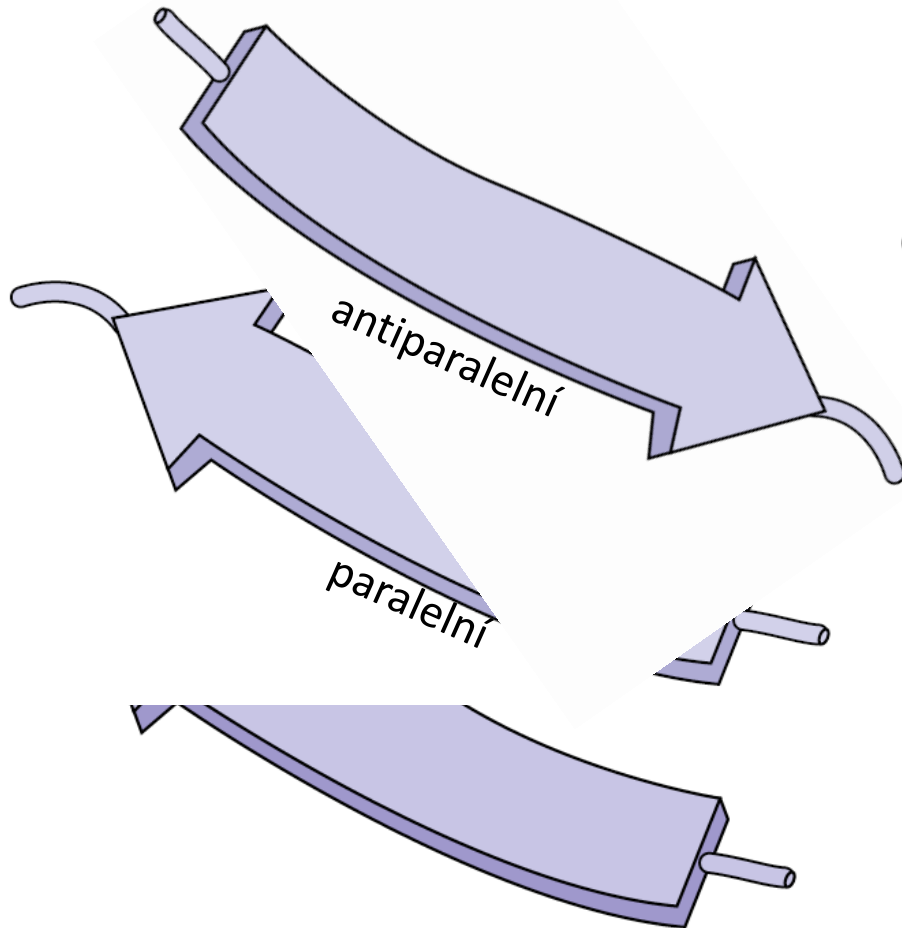
2) β -skládání list (beta-sheet)

3) Ohyb, smyčka (loop/turn)

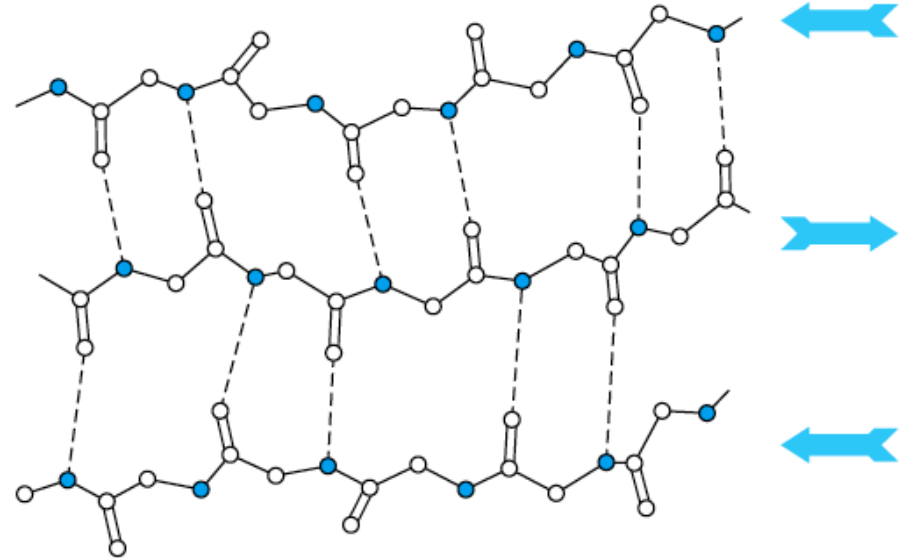


Sekundární struktura

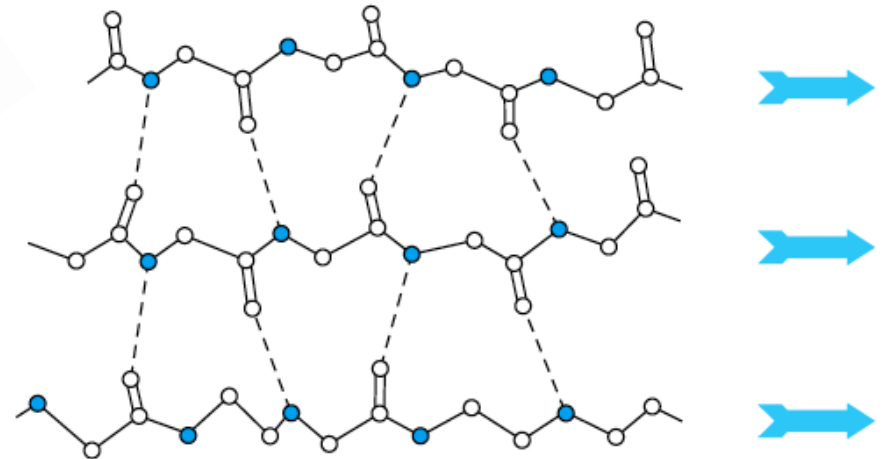
- 1) α -šroubovice (α -helix)
- 2) β -skládky (listy) (β -sheet)
- 3) Ohyb, smyčka (turn)



antiparalelní uspořádání



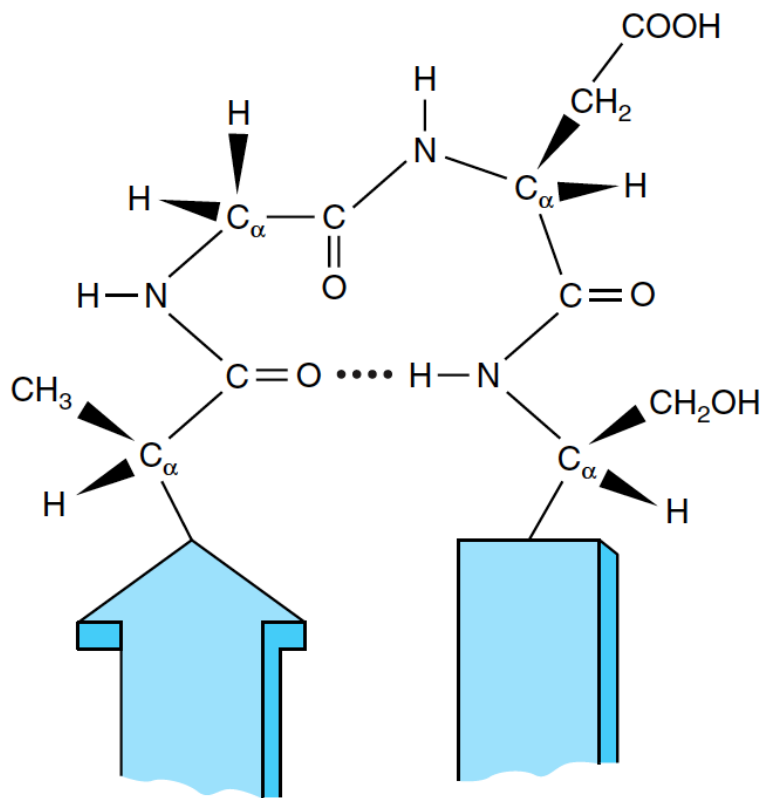
paralelní uspořádání



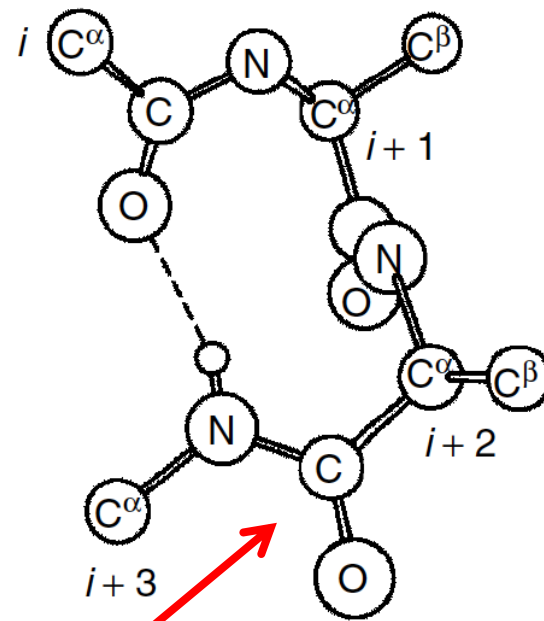
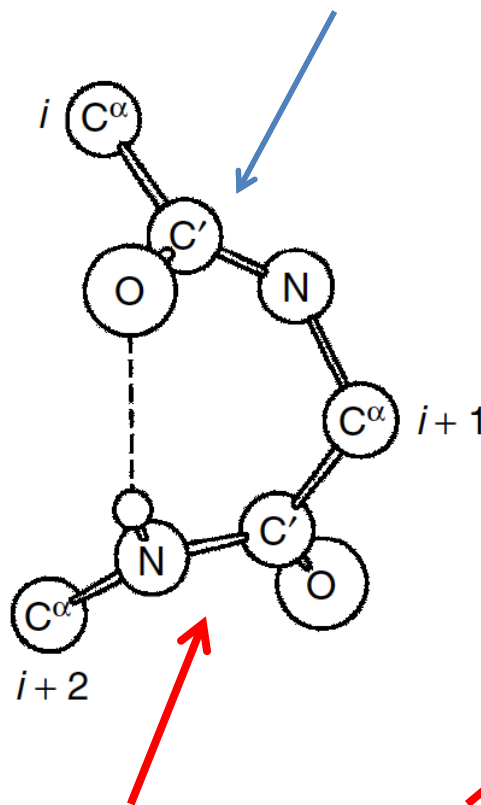
Sekundární struktura

- 1) α -šroubovice (α -helix)
- 2) β -skládání list (β -sheet)

3) Ohyb, smyčka (loop/turn)

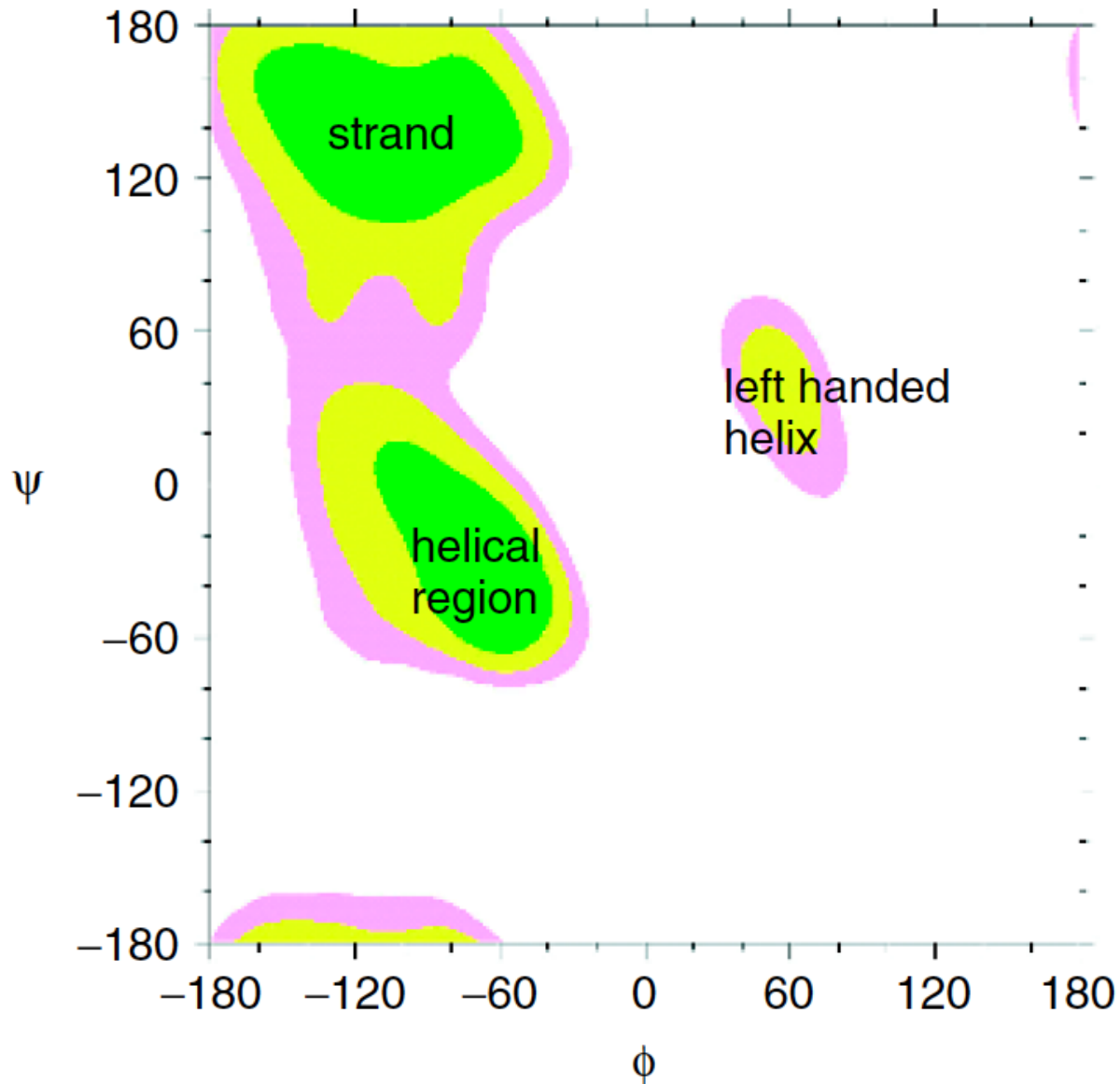


γ -smyčka/ohyb (3 residua)



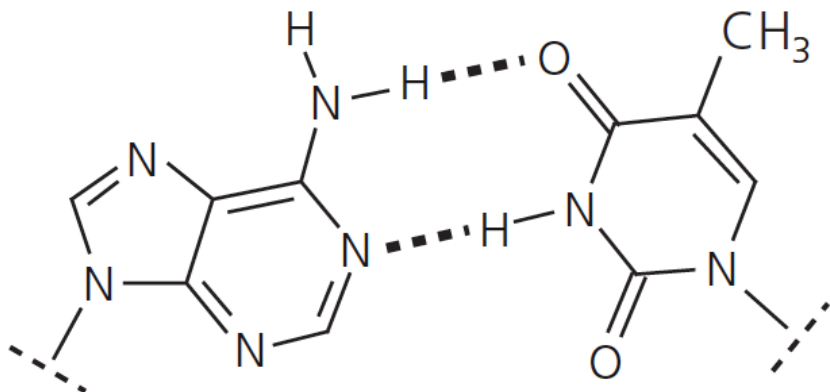
β -smyčka/ohyb (4 residua)

Ramachandranův diagram - zobrazuje energeticky přípustné oblasti dihedrálních úhlů ψ v závislosti na ϕ

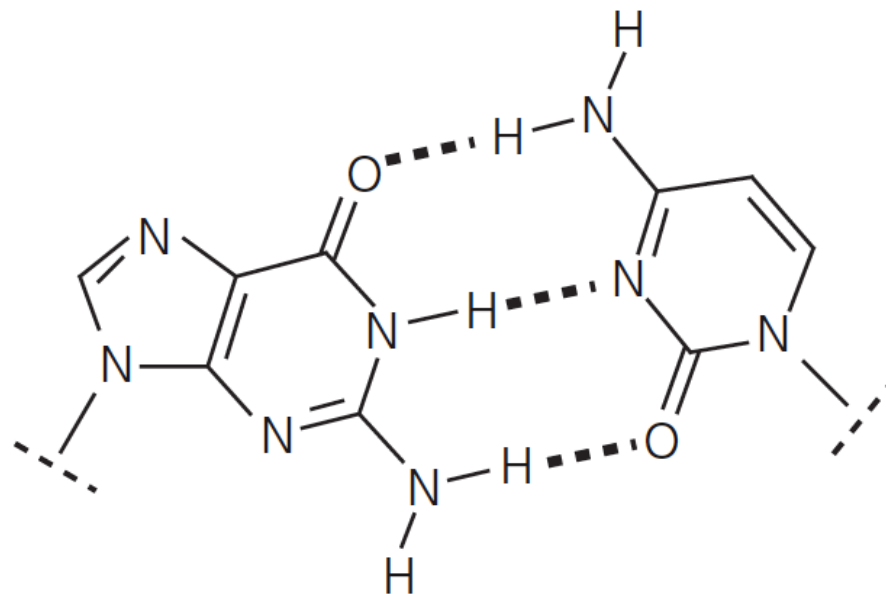


Nukleové kyseliny

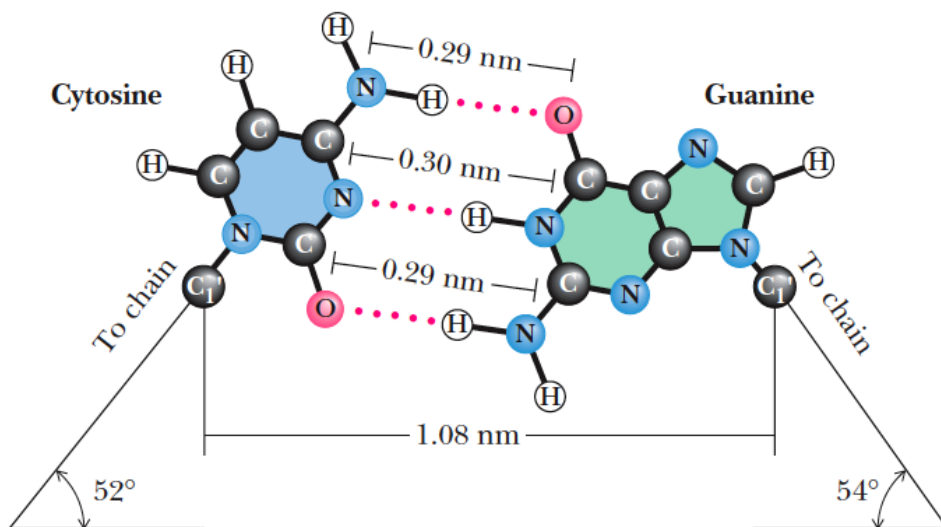
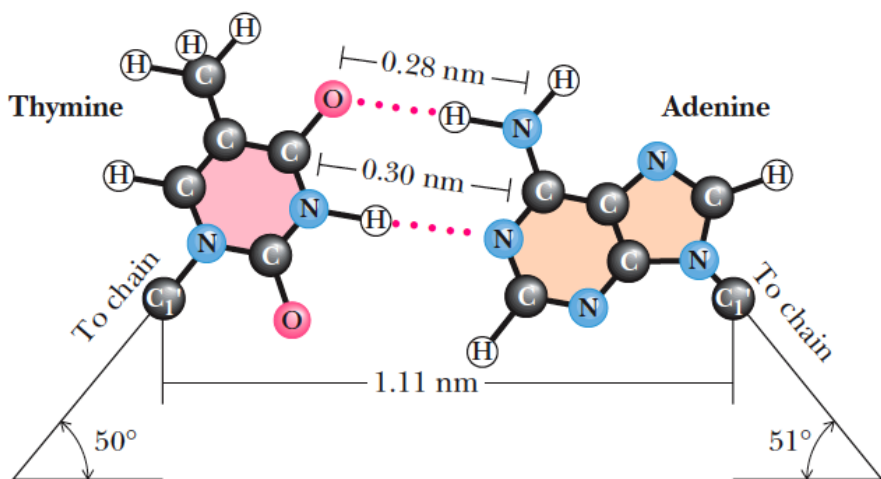
Watson-Crickové párování bází



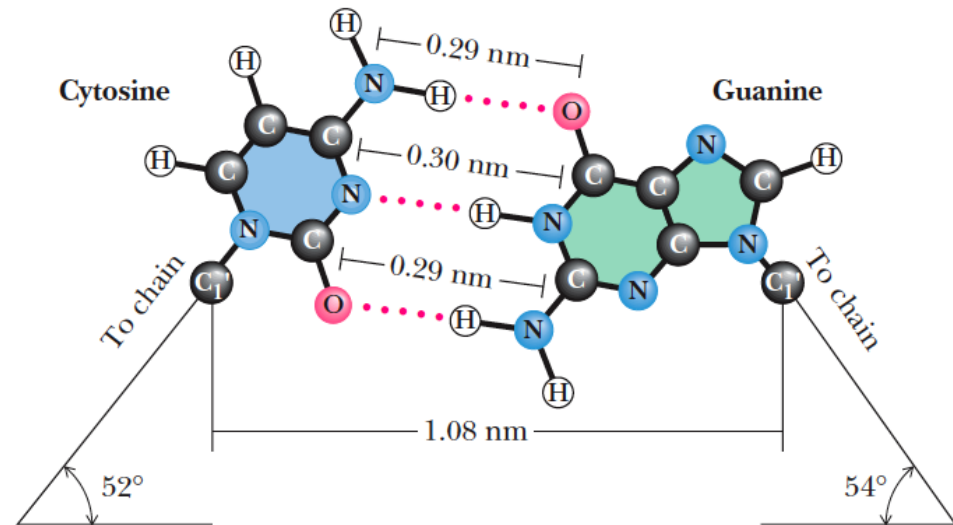
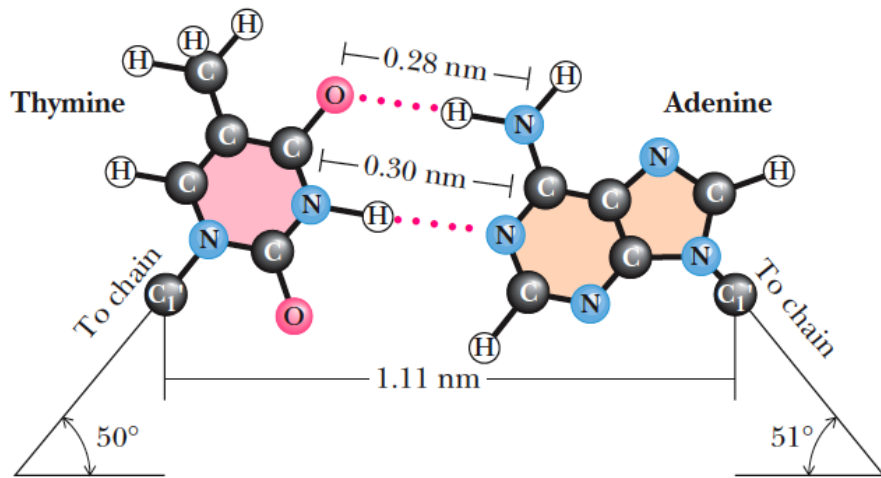
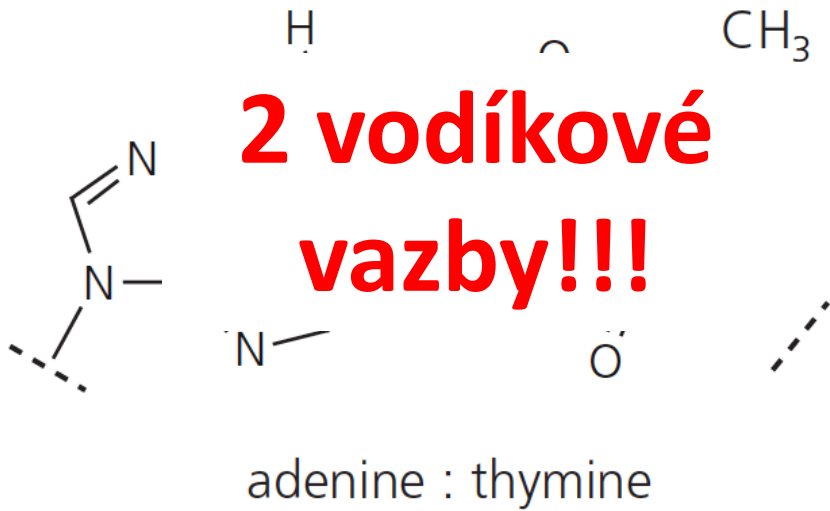
adenine : thymine

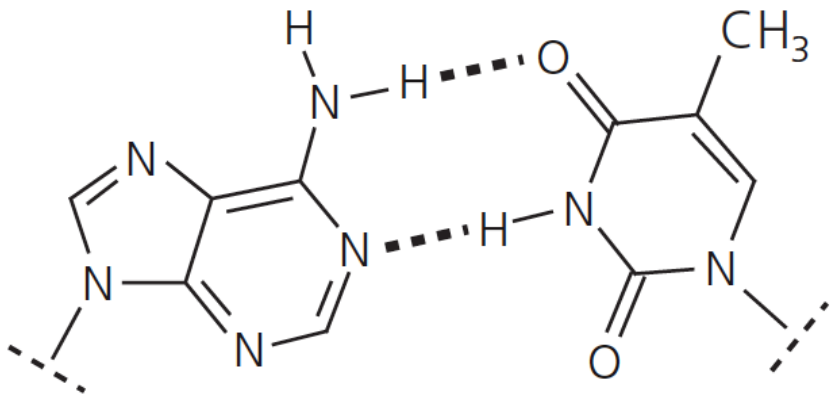


guanine : cytosine

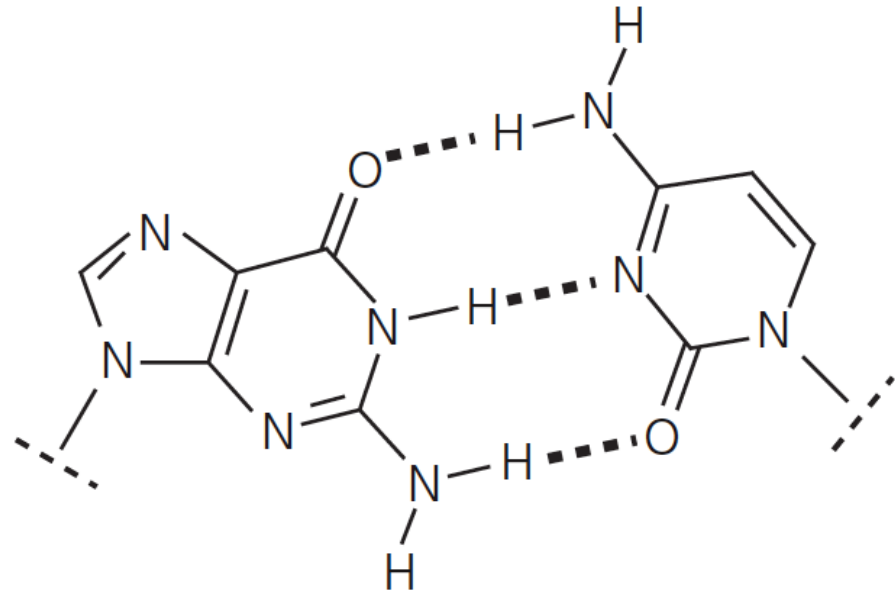


Watson-Crickové párování bazí

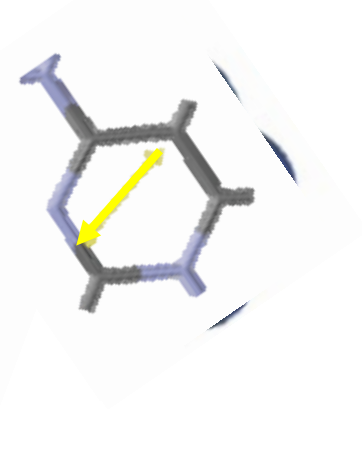
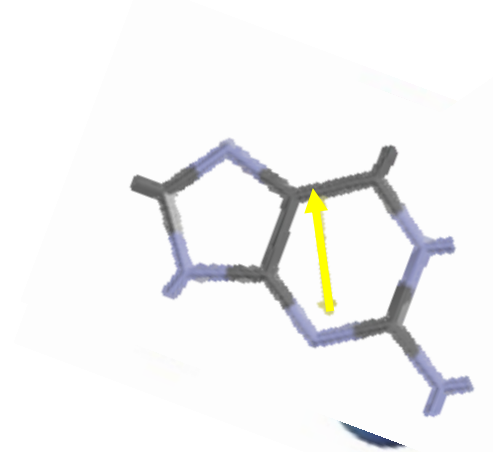
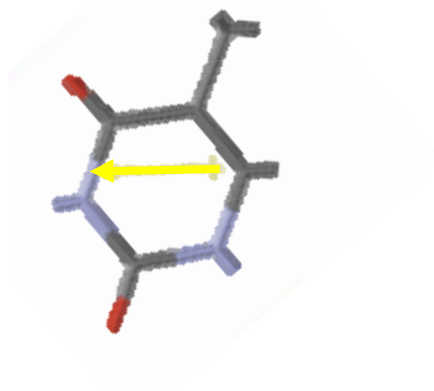
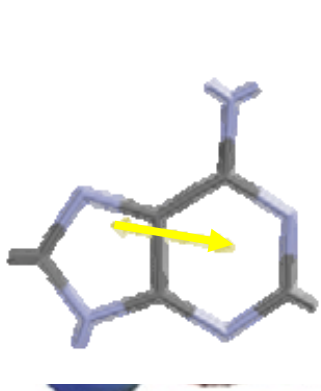




adenine : thymine

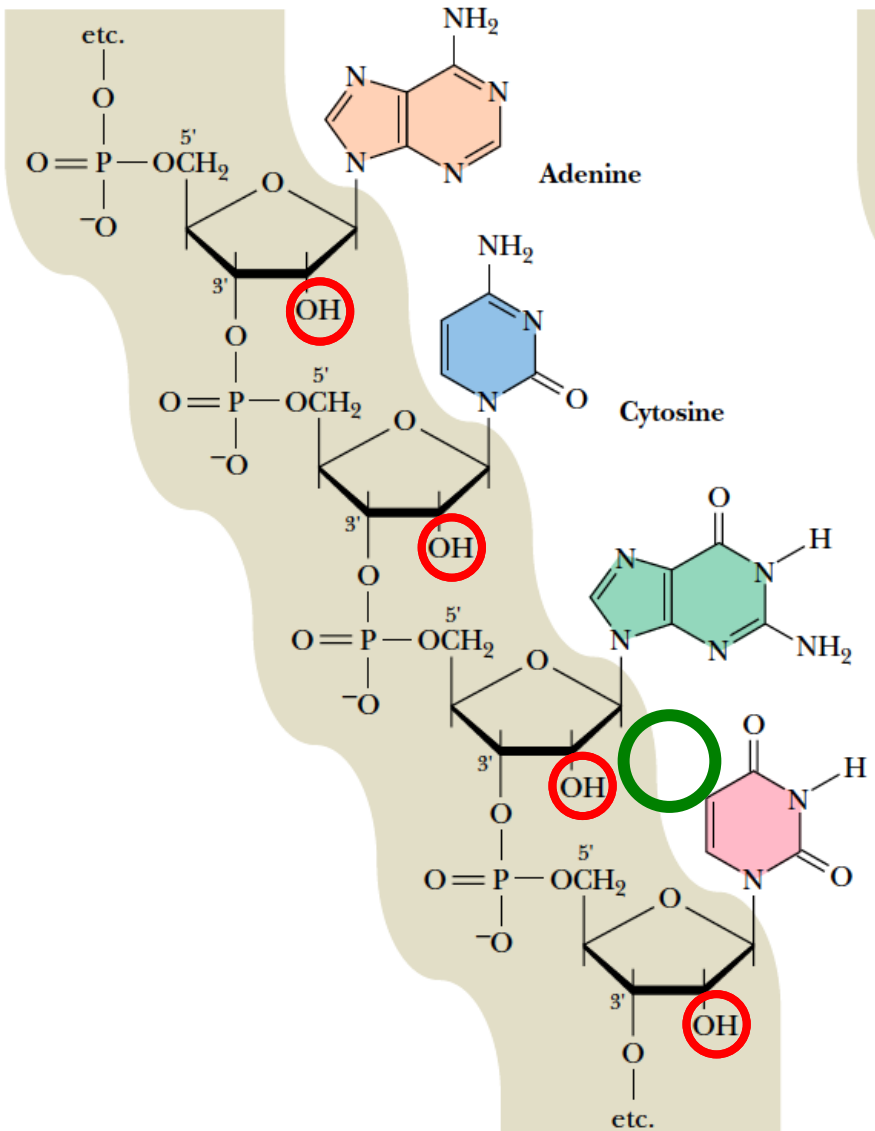


guanaine : cytosine

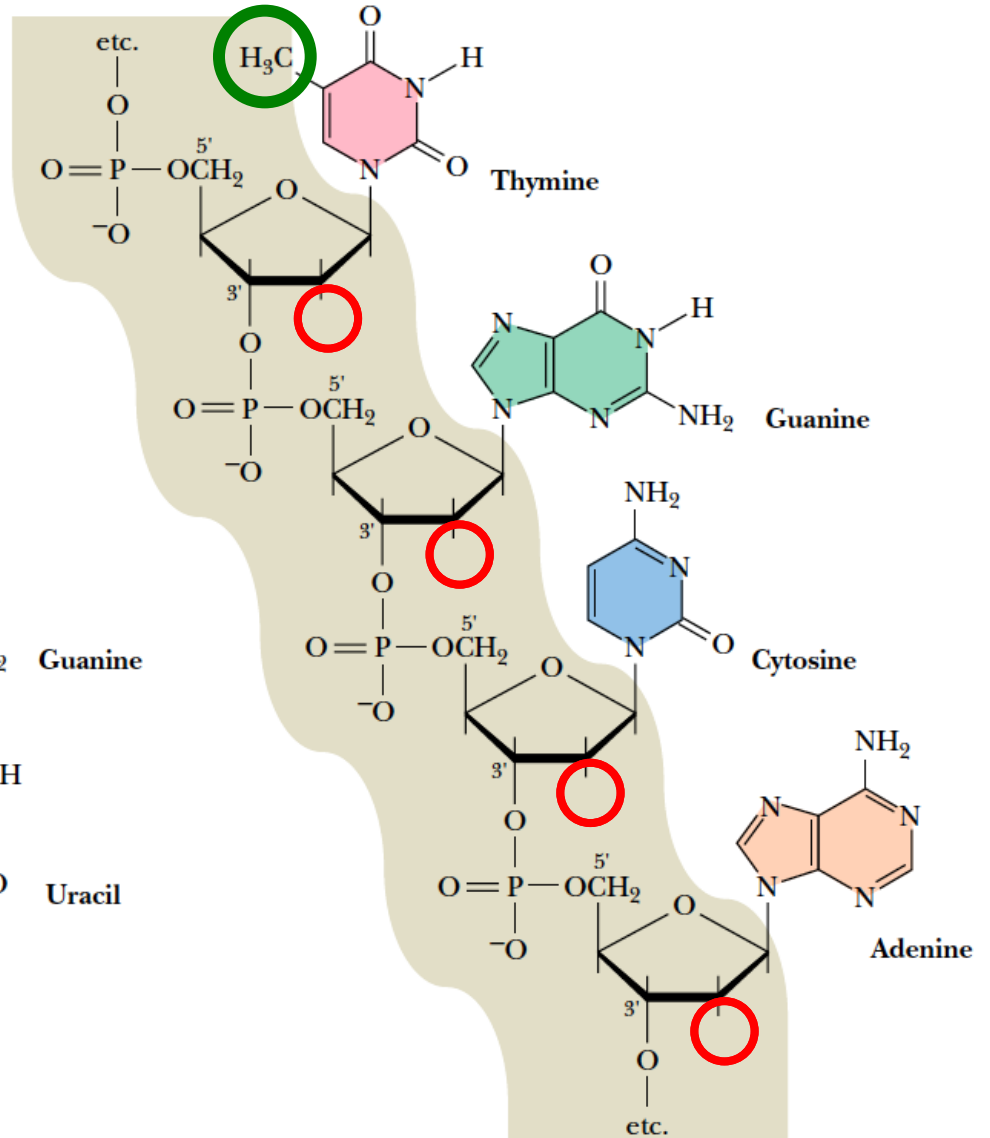


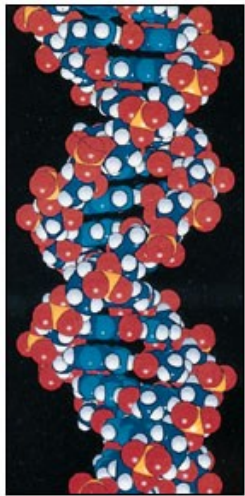
rozložení náboje v nukleobázích + 0 -, šipky označují dipólový moment

RNA



DNA



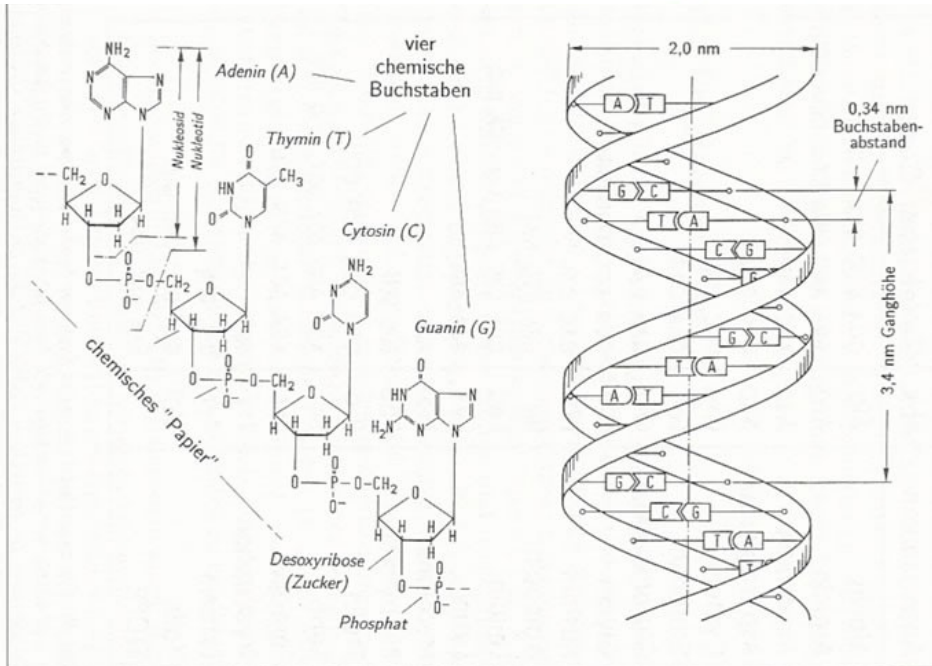
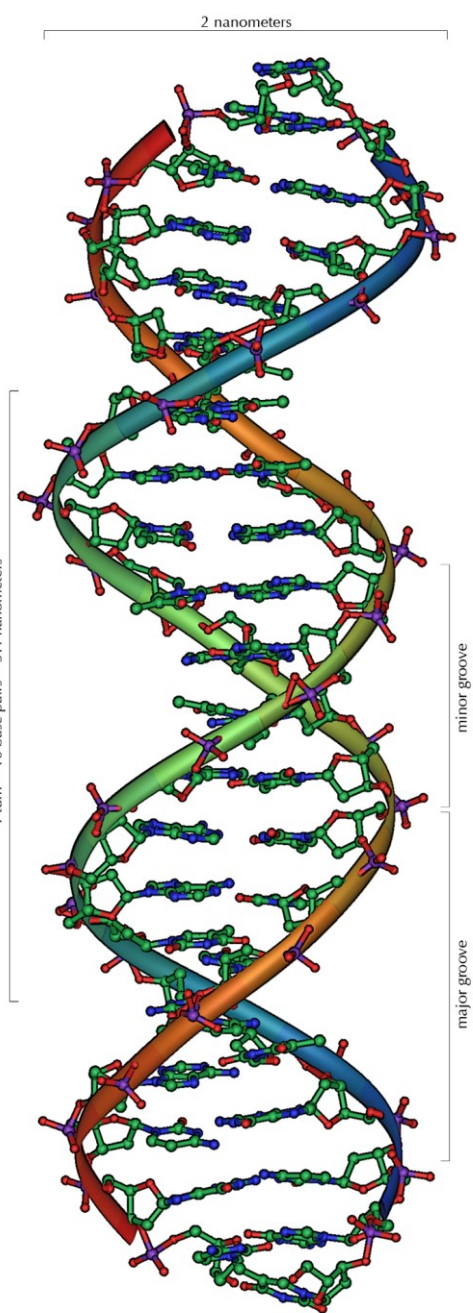
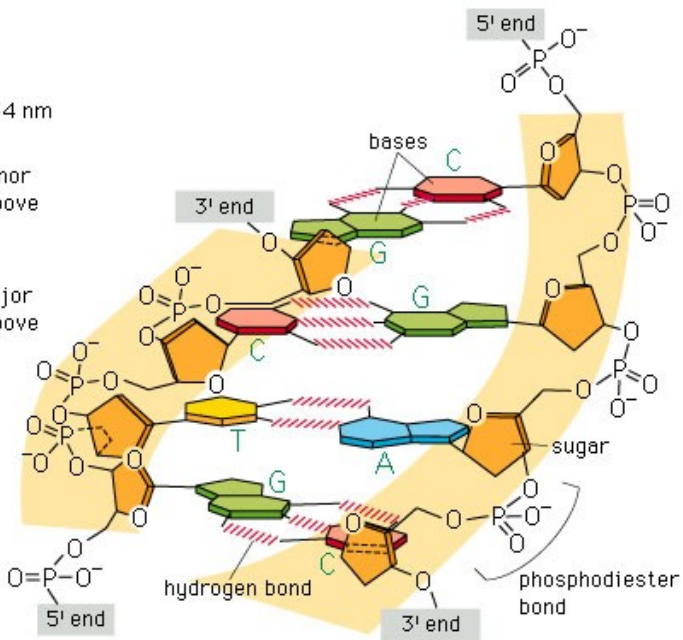


2 nm

0.34 nm

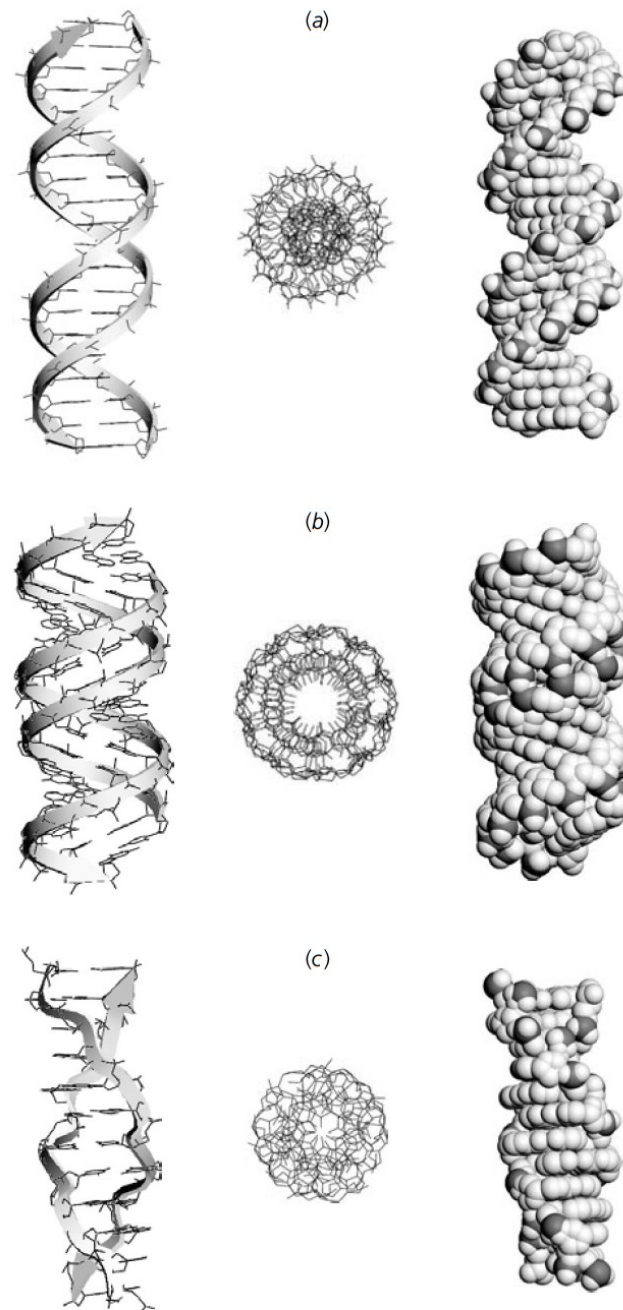
minor groove

major groove



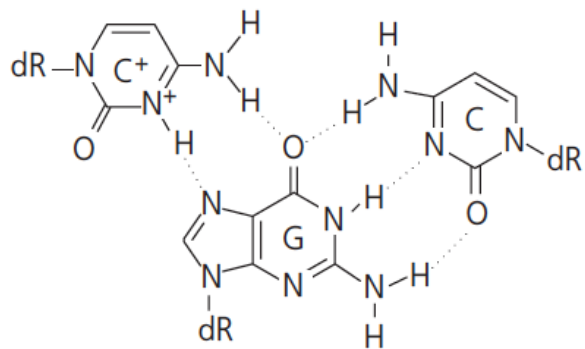
Nejběžnější typy DNA: **B-DNA** (a), **A-DNA** (b), **Z-DNA** (c)

DNA konformace	B	A	Z
Směr vinutí	pravotočivá	pravotočivá	levotočivá
Počet parů bazí na otáčku	10.5	11.0	12.0
Průměr šroubovice	~2.0 nm	~2.6 nm	~1.8 nm
Konformace cukru	C2'- <i>endo</i>	C3'- <i>endo</i>	C2'- <i>endo</i> (pyr) C3'- <i>endo</i> (pur)
Velký žlábek <i>Major groove</i>	široký, hluboký	úzký, hluboký	plochý
Malý žlábek <i>Minor groove</i>	úzký, hluboký	široký, mělký	úzký, hluboký

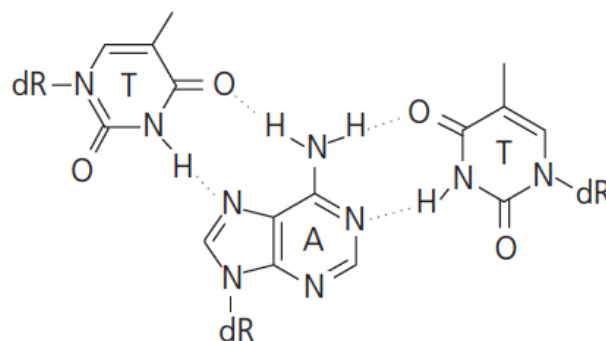


Non-Watson-Crickové (Hoogsteenovo – Karsten Hoogsteen) párování bází

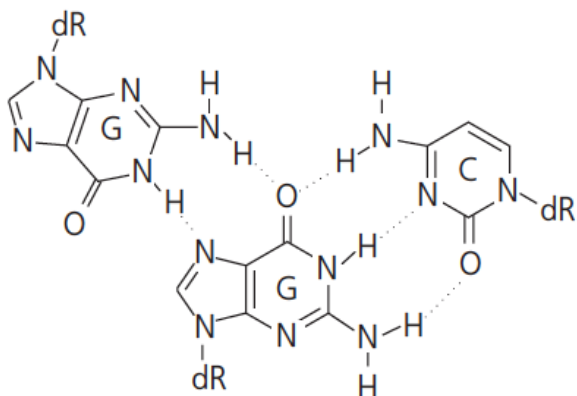
Triplexové struktury



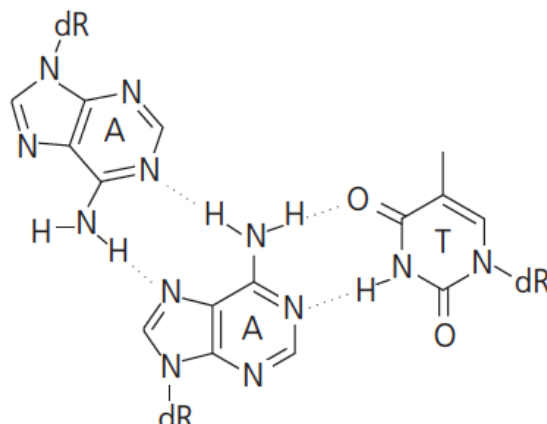
C⁺·GC



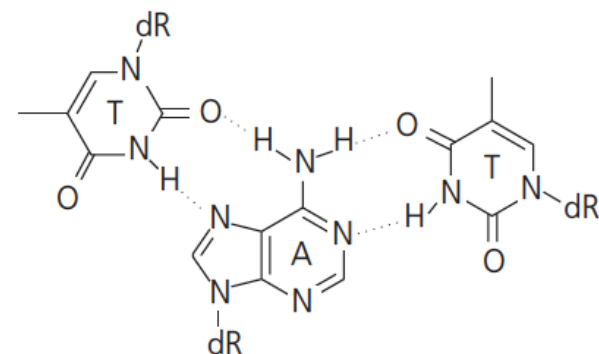
T·AT



G·GC

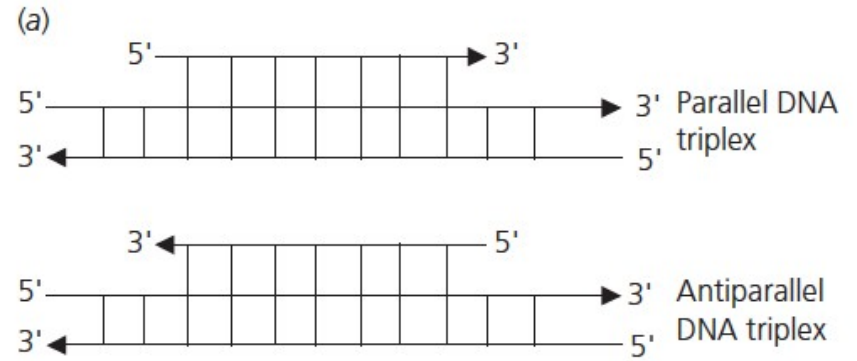
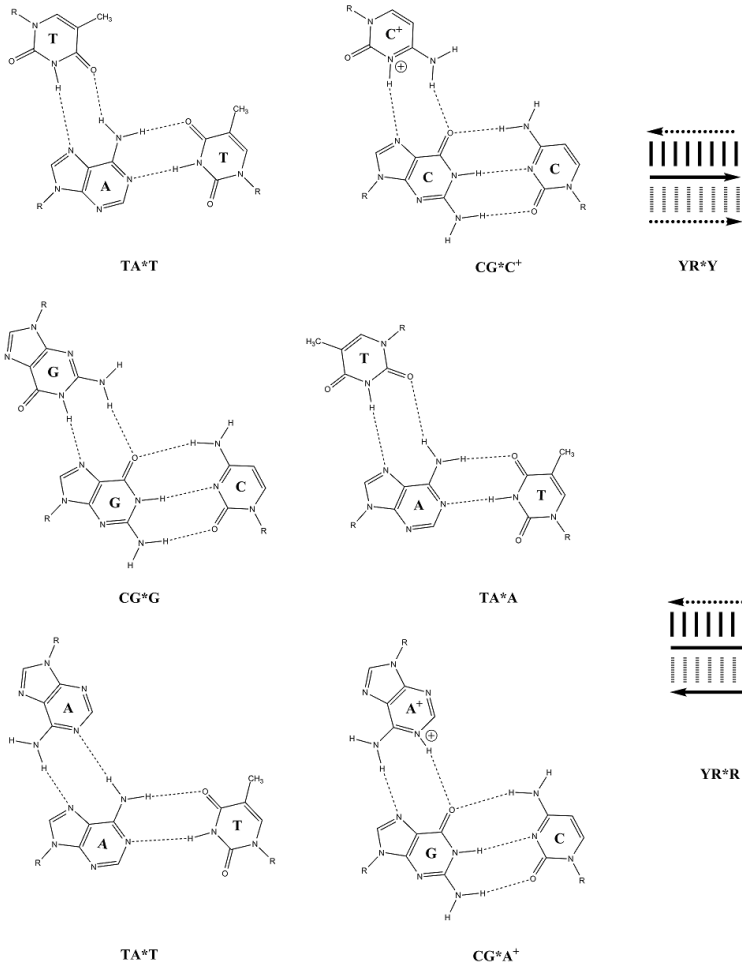


A·AT

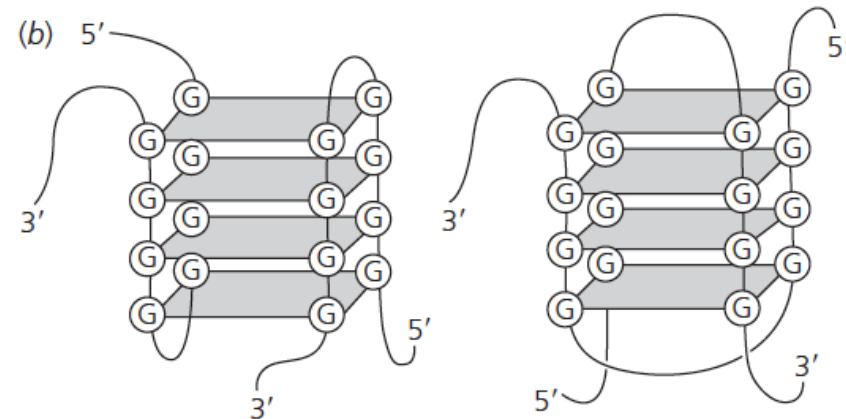
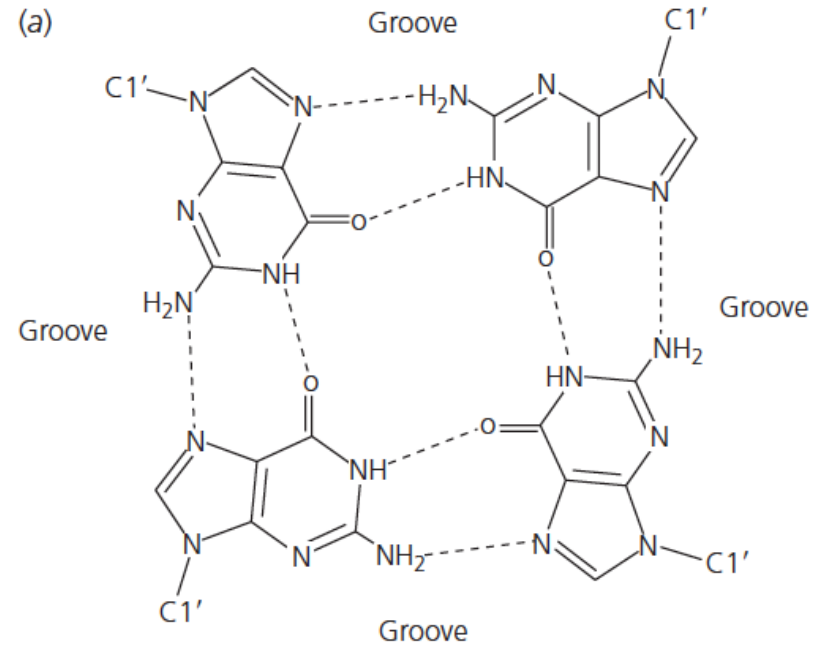
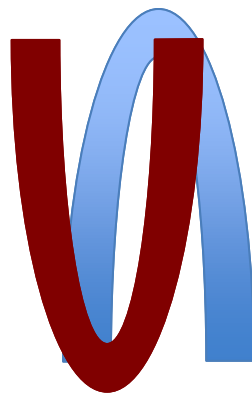
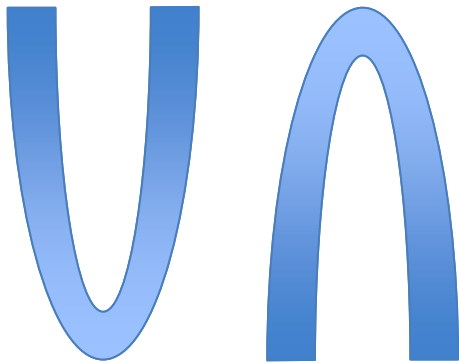


T·AT

Triplexové struktury (triple stranded DNA, H-DNA)



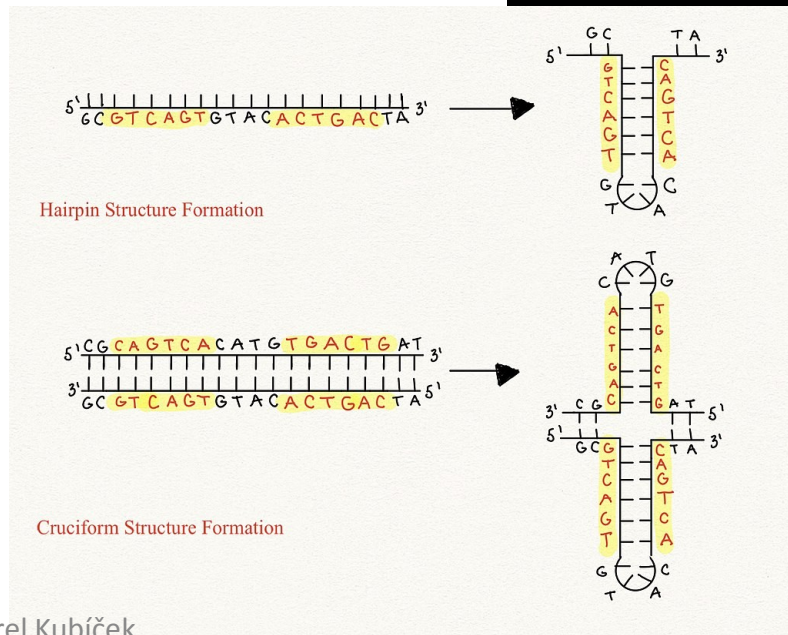
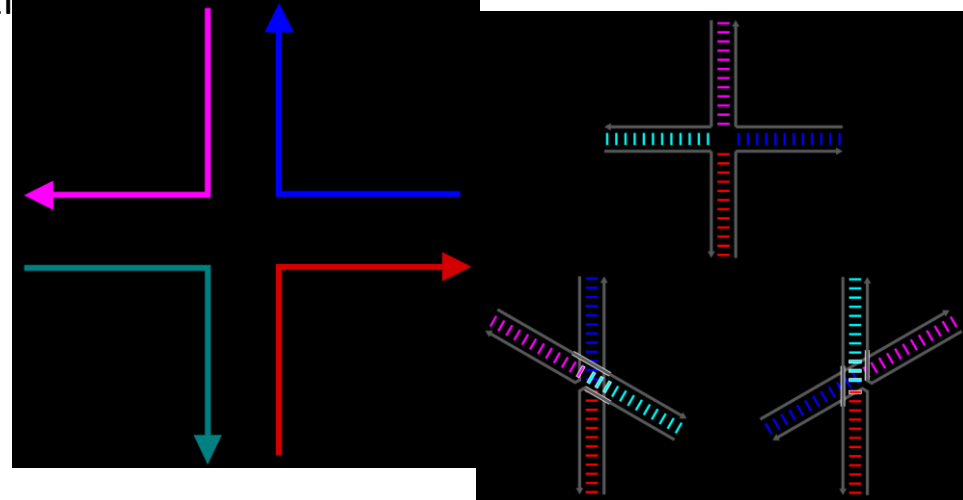
Quadruplexové struktury



Další významné formy DNA:

- 1) Hollidayův spoj (**Holliday junction**)
- 2) displacement loop (**D-loop**, D-smyčka)
- 3) **R-loop** (R-smyčka)
- 4) Křížová struktura DNA (**cruciform**)
- 5) **i-motif** DNA
- 6) DNA nanotechnologie – DNA origami

klíčový meziprodukt v mnoha typech genetické rekombinace a také při opravě dvouřetězcových zlomů



Další významné formy DNA:

1) Hollidayův spoj (**Holliday junction**)

klíčový meziprodukt v mnoha typech genetické rekombinace a také při opravě dvouřetězcových zlomů.

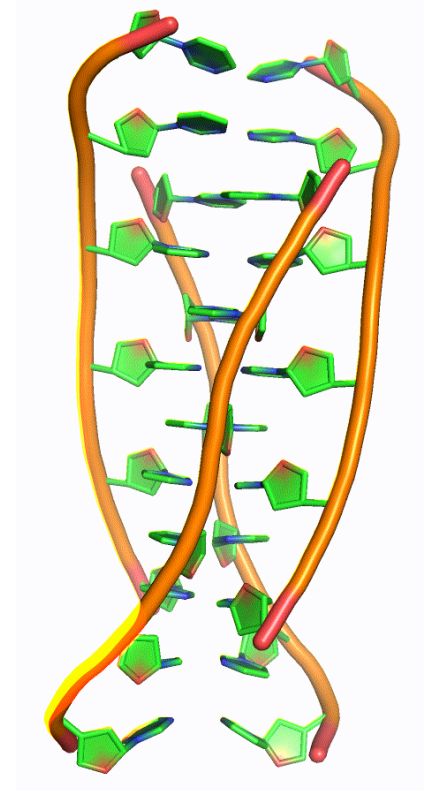
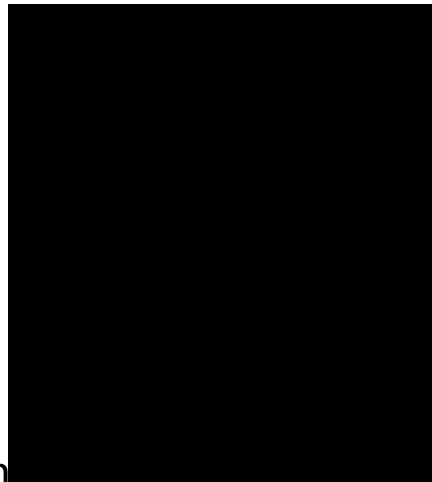
2) displacement loop (**D-loop**, D-smyčka)

3) **R-loop** (R-smyčka)

4) Křížová struktura DNA (**cruciform**)

5) **i-motif DNA / i-motif RNA**

6) DNA nanotechnologie – DNA origami



Další významné formy DNA:

1) Hollidayův spoj (**Holliday junction**)

klíčový meziprodukt v mnoha typech genetické rekombinace a také při opravě dvouřetězcových zlomů.

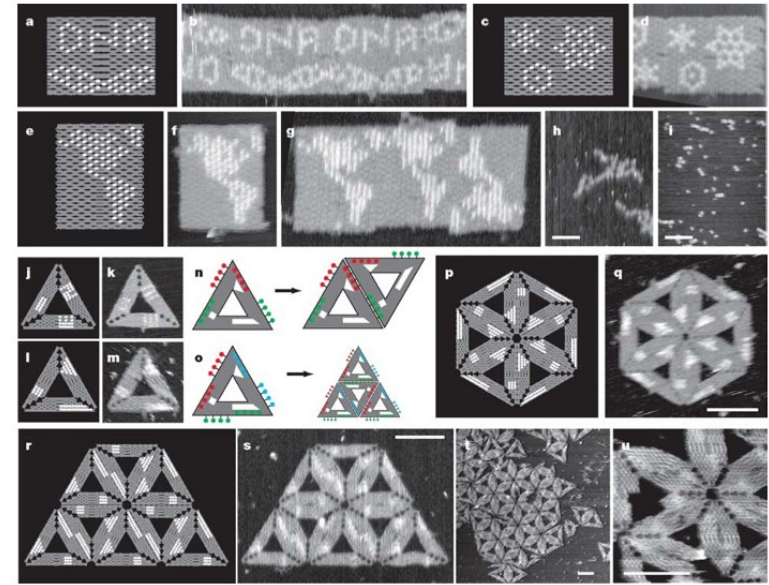
2) displacement loop (**D-loop**, D-smyčka)

3) **R-loop** (R-smyčka)

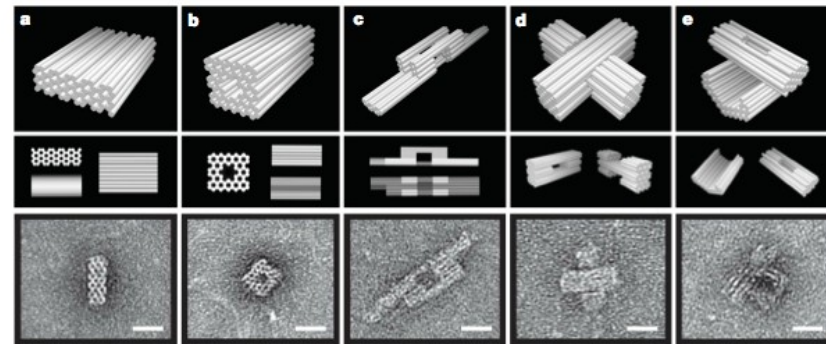
4) Křížová struktura DNA (**cruciform**)

5) i-motif DNA / i-motif RNA

6) **DNA nanotechnologie – DNA origami**



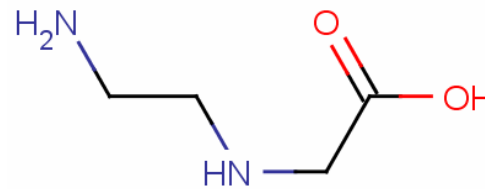
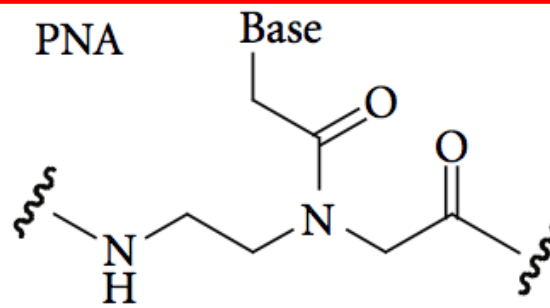
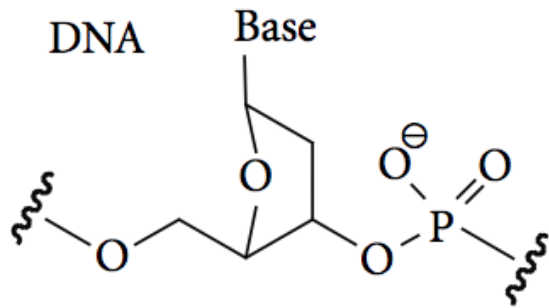
NATURE | Vol 440 | 16 March 2006



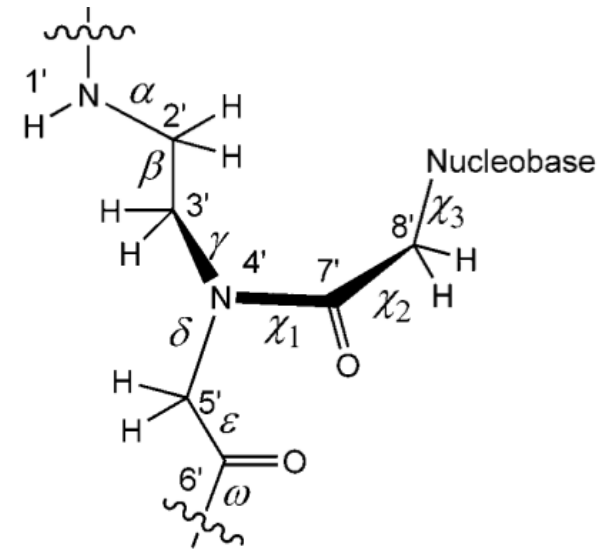
Vol 459 | 21 May 2009 | doi:10.1038/nature08016

Peptidová nukleové kyseliny (PNA)

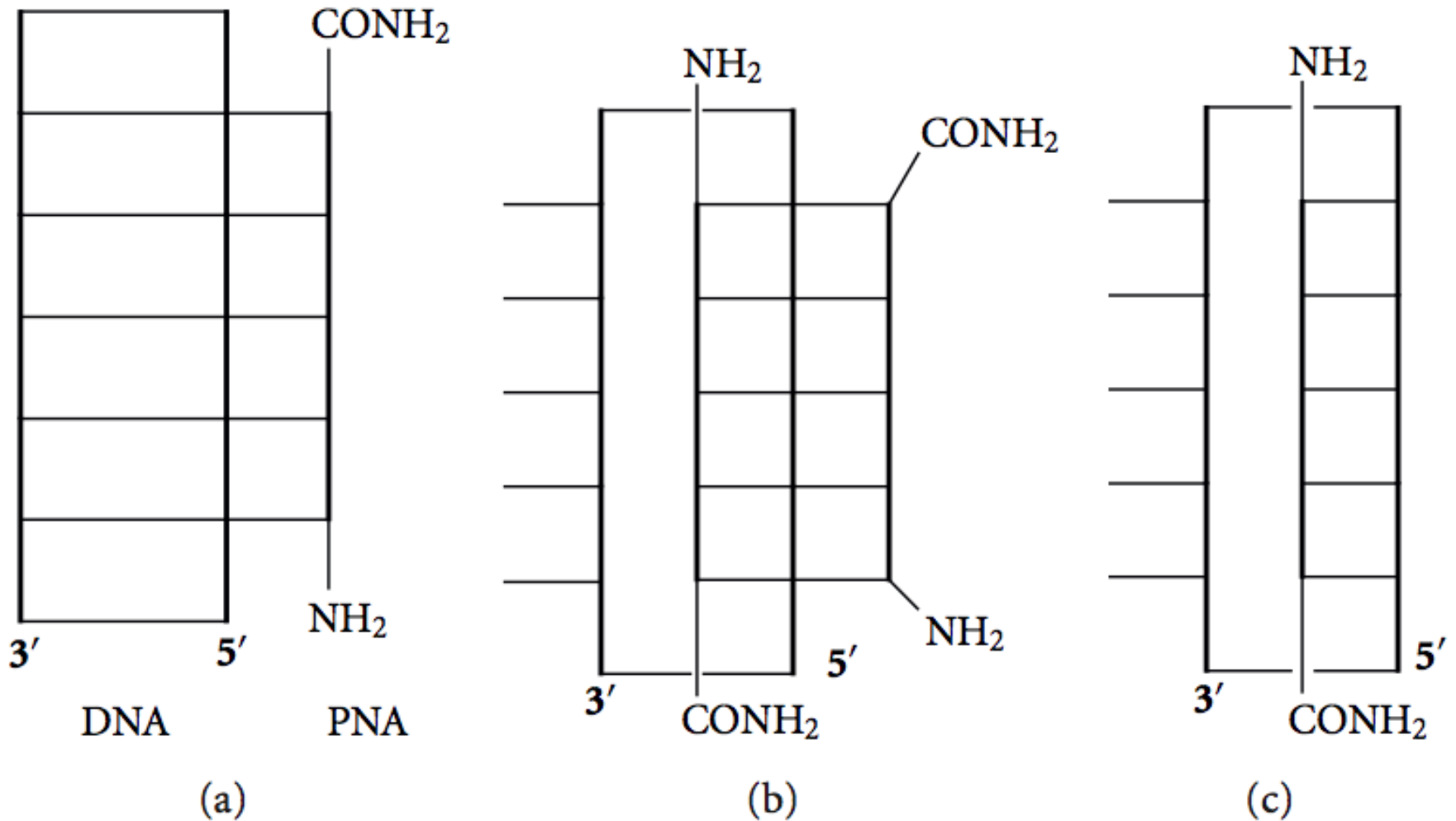
- Nejsou kyselinami!!!
- Jsou syntetické, nicméně se předpokládá(lo), že mohli figurovat jako vývojový stupeň v počátcích vzniku života (naproti tomu stojí "RNA svět")
- Nemají v páteři negativně nabitý fosfát => silnější vazba mezi bázemi



N-aminoethyl glycine



Interakce mezi PNA a DNA dvoušroubovicí

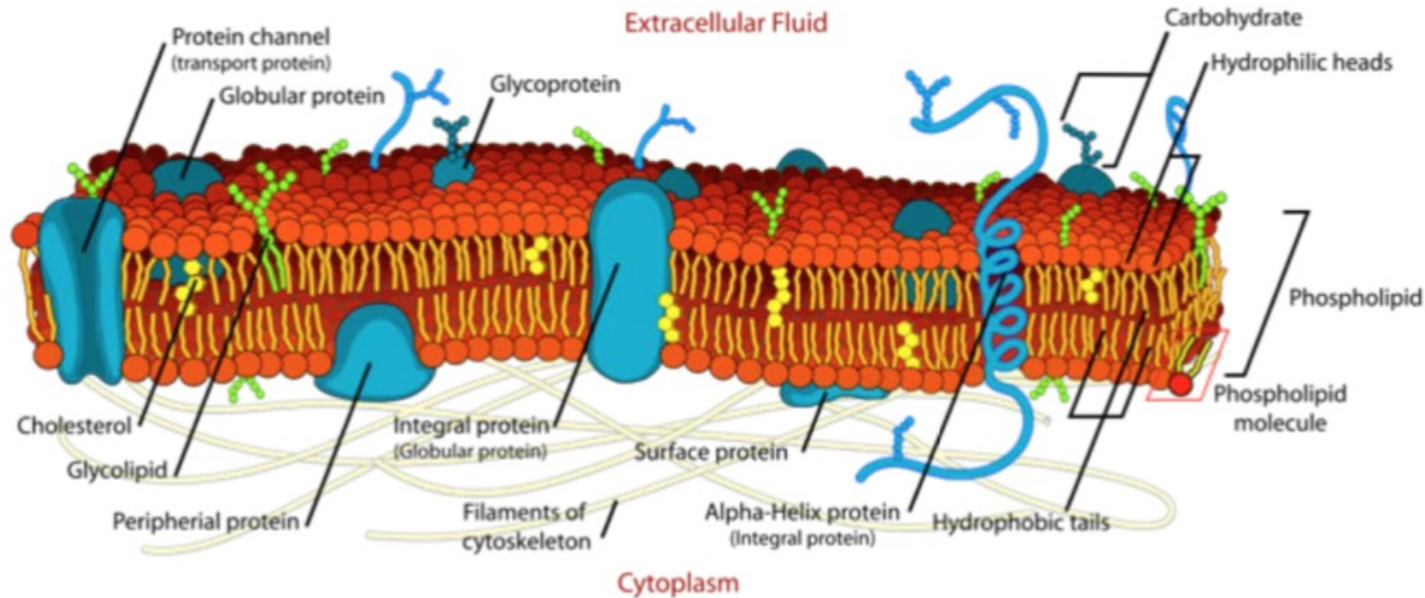


a - triplexová struktura, **b** – triplexová struktura nahrazením jednoho DNA řetězce, **c** – duplexová struktura nahrazením jednoho DNA řetězce

Lipidy

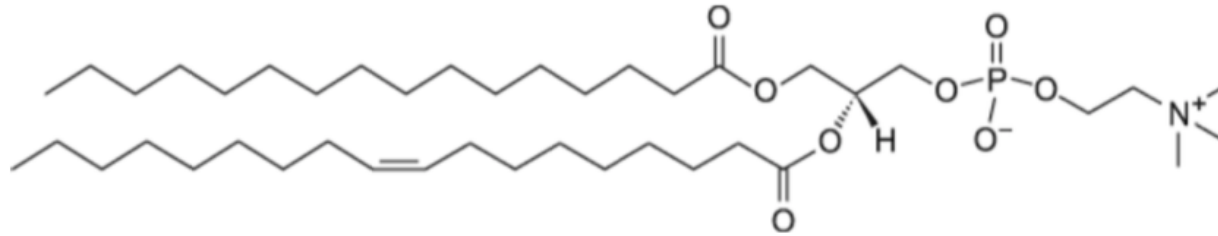
Složení

- lipidy
- cukry
- proteiny

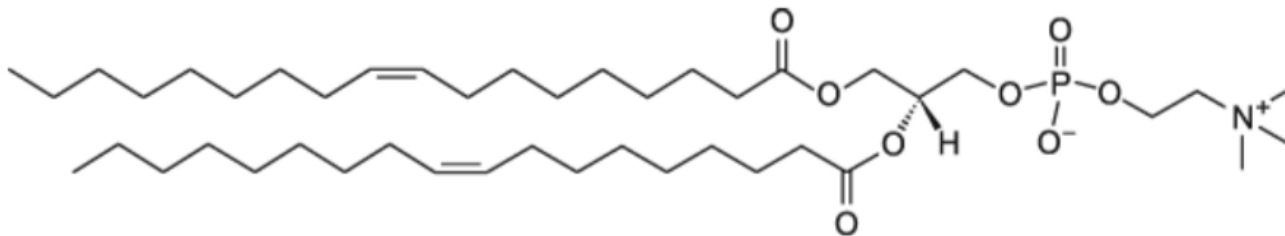


- 1) Lipoprotein: lipid + protein, který je většinou rozpustný v H_2O
- 2) Proteolipid: protein + lipid, -----"----- v organice (e.g. 2:1 = $CHCl_3$: CH_3OH)
- 3) Glycolipid: lipid + carbohydrate. Cukry glycolipidů jsou na vnějším povrchu a velmi pravděpodobně se účastní mezibuněčných komunikací
- 4) Glycoprotein: carbohydrate + protein. Podobně jako glycolipidy, cukerné zbytky glycoproteinů jsou připojeny na ne-cytoplasmické straně membrány.

Zkratky



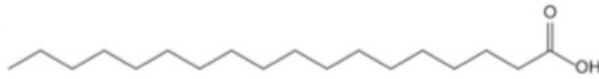
POPC 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine



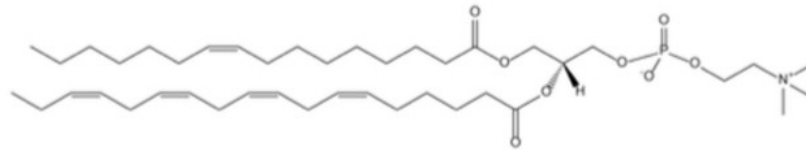
DOPC 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

Lipidy

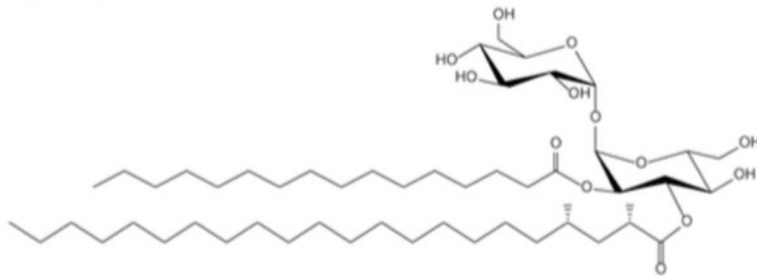
A



(a) Fatty acids: octadecanoic acid

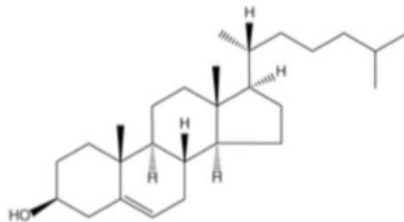


(c) Glycerophospholipids: 1-(9Z-hexadecenoyl)-2-(6Z,9Z,12Z,15Z-octadecatetraenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine



(e) Saccharolipids: 2-O-hexadecanoyl-3-O-(2S,4S-dimethyl-docosanoyl)- α,α -trehalose

B



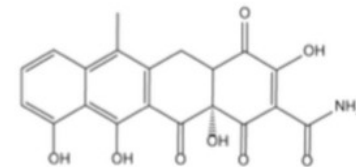
(g) Sterol lipids: cholest-5-en-3 β -ol



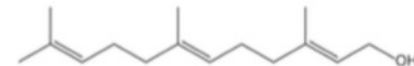
(b) Glycerolipids: 1-hexadecanoyl-2-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoyl)-sn-glycerol



(d) Sphingolipids: N-(hexadecanoyl)-sphing-4-enine

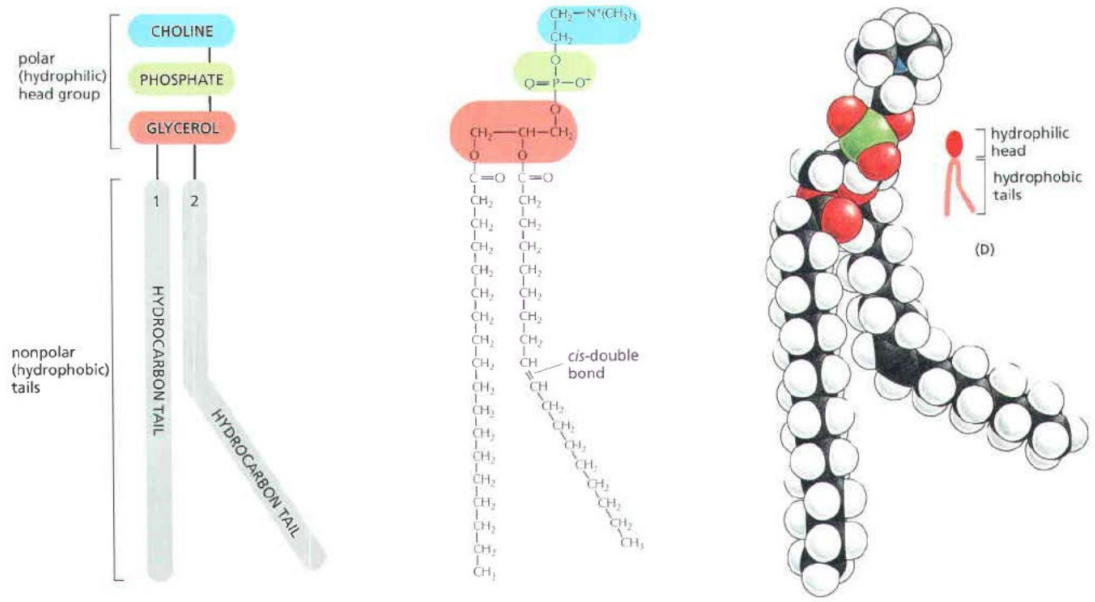


(f) Polyketides: 4-Dedimethylamino-4-oxo-anhydrotetracycline

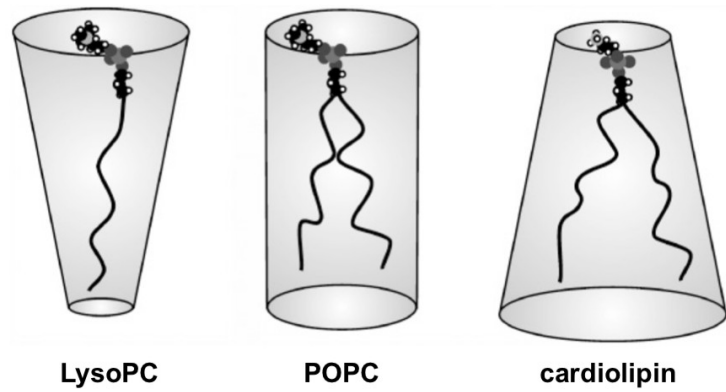


(h) Prenol lipids: 2E,6E-farnesol

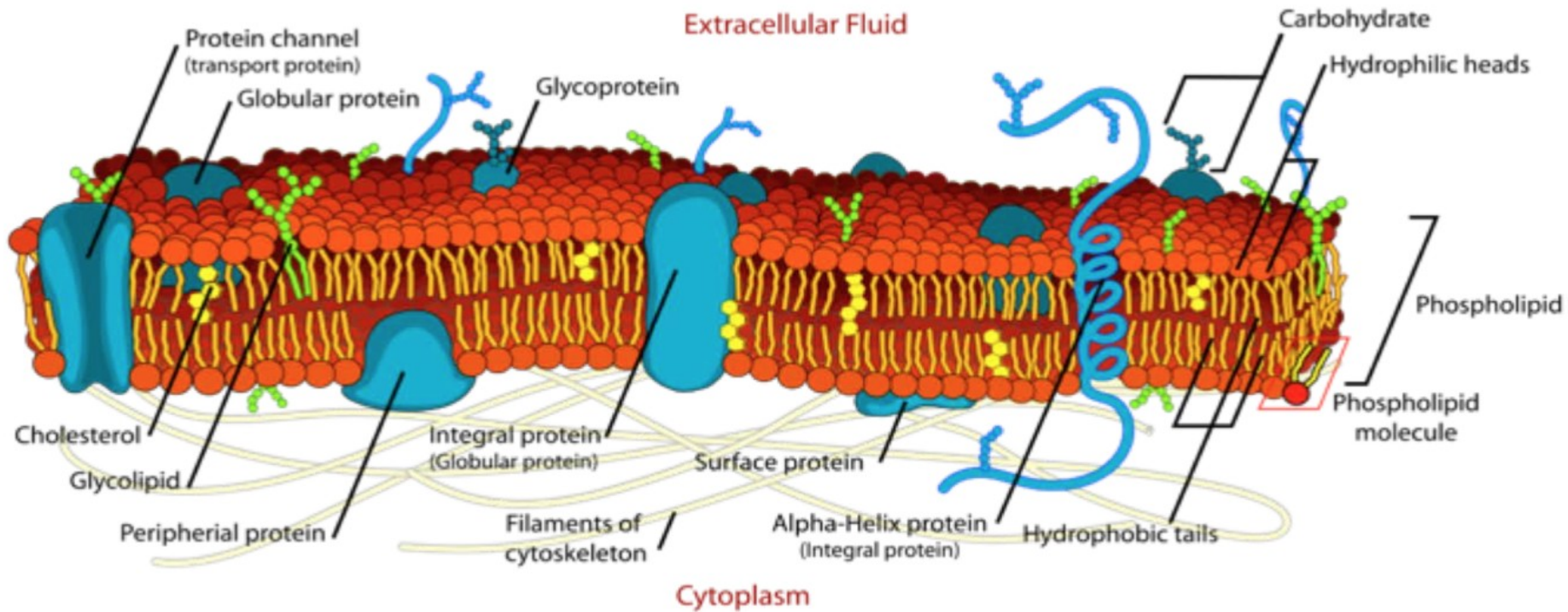
Fosfolipidy



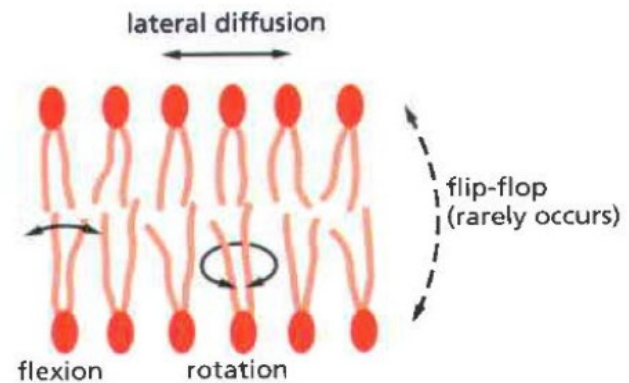
Tvar lipidů



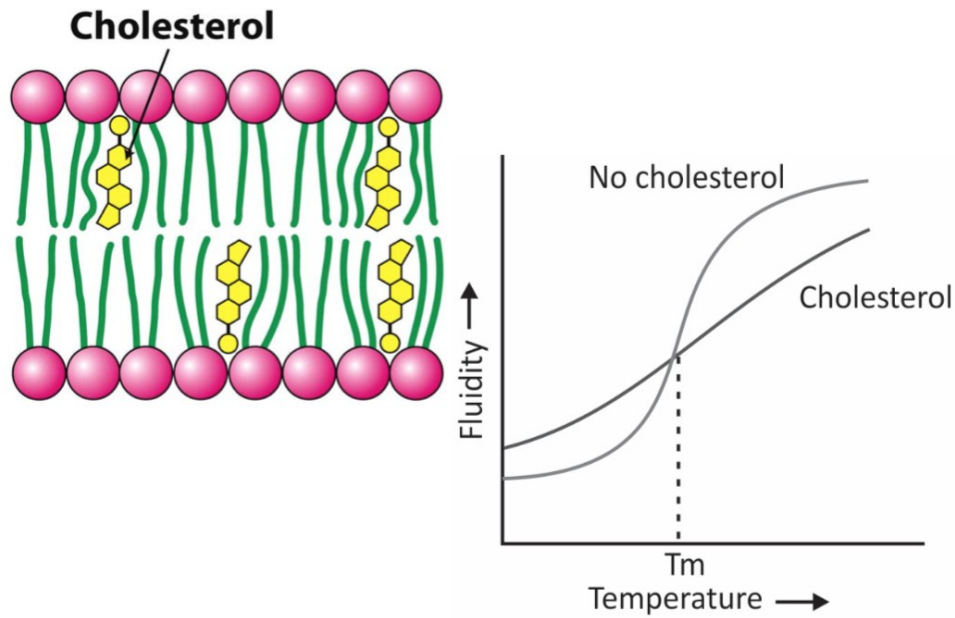
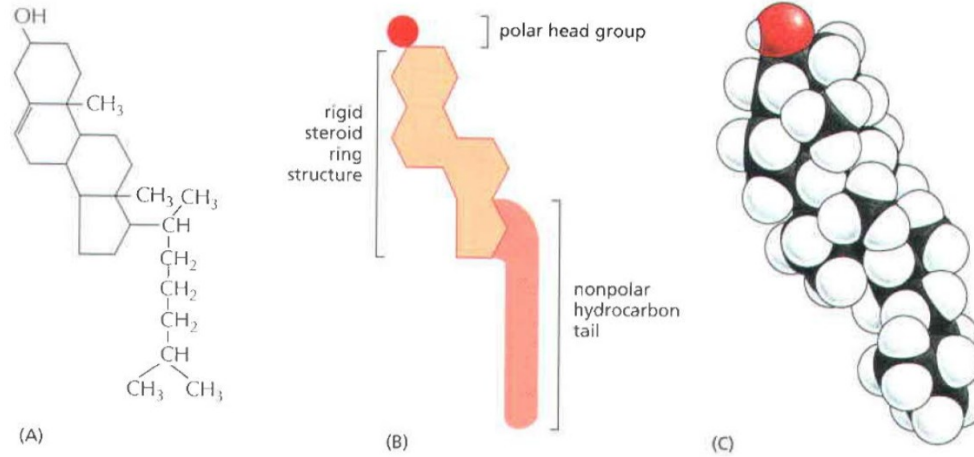
Současný model membrány



fluid mosaic model – 2d tekutá vrstva



Cholesterol



Zařízení založená na interakci elektromagnetického záření s makromolekulami

Druhy spektrofotometrů

- **Spektrofotometry** jsou laboratorní přístroje používané pro měření koncentrace látek absorbujících nebo emitujících infračervené, viditelné nebo ultrafialové světlo. Mohou být též použity pro studium jejich chemické struktury.
- **Absorpční spektrofotometry:** založeny na spektrální závislosti absorpce světla.
- **Emisní spektrofotometry:** Zdrojem světla je sama analyzovaná látka, jež je injektována nebo rozprašována do bezbarvého plamene. Emitované světlo prochází optickým hranolem nebo mřížkou, takže můžeme získat celé emisní spektrum. Frekvence přítomné ve spektru umožňují identifikovat např. přítomné ionty.
- **Spektrofluorimetry:** emise světla je vyvolána světlem o vlnové délce kratší než je vlnová délka světla emitovaného.

Absorpční spektrofotometry: Lambertův-Beerův zákon

Absorpční spektrofotometrie je založena na absorpci světla při průchodu vrstvou roztoku. Jeho koncentrace může být zjištěna pomocí **Lambertova-Beerova zákona**:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon c x}$$

c je koncentrace rozpuštěné látky, x tloušťka vrstvy, I_0 původní intenzita světla, I je intenzita světla po průchodu vrstvou. Konstanta ϵ (epsilon, absorpční nebo extinkční koeficient) **závisí na vlnové délce světla, na rozpuštěné látce a rozpouštědle**. Její hodnoty pro běžné chemické sloučeniny lze nalézt v tabulkách. Tyto hodnoty jsou vždy udávány pro určitou vlnovou délku (obvykle absorpční maximum). Číselné hodnoty tohoto koeficientu závisí na tom, jak je vyjadřována koncentrace rozpuštěné látky. Když použijeme $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, hovoříme o **molárním absorpčním koeficientu**.

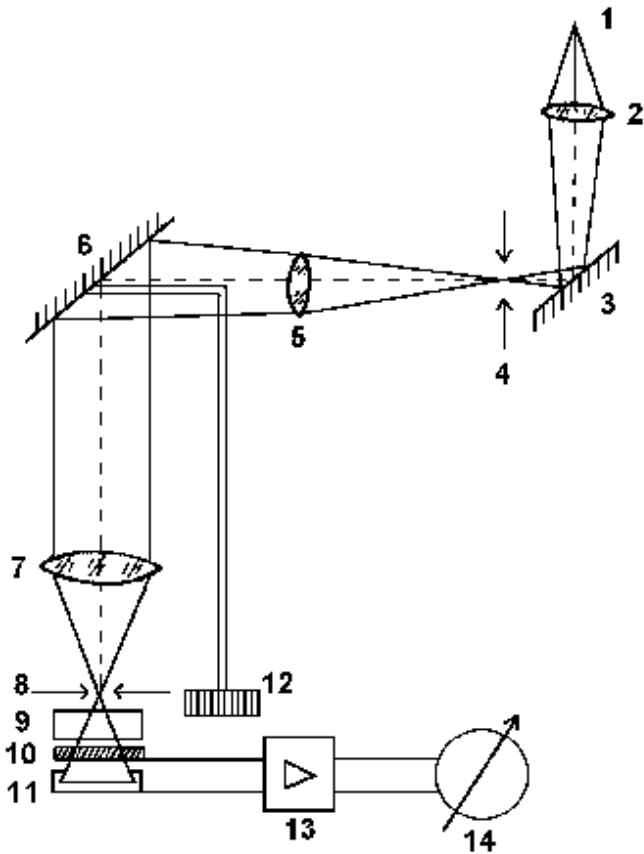
Poměr intenzit světla prošlého a dopadajícího se nazývá **transmittance** (dříve transparence). Dekadický logaritmus převrácené hodnoty transmittance se nazývá **absorbance** A . S ohledem na L.-B. zákon je tedy absorbance přímo úměrná koncentraci rozpuštěné látky a tloušťce absorbující vrstvy roztoku.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot x$$

Druhy absorpčních spektrofotometrů

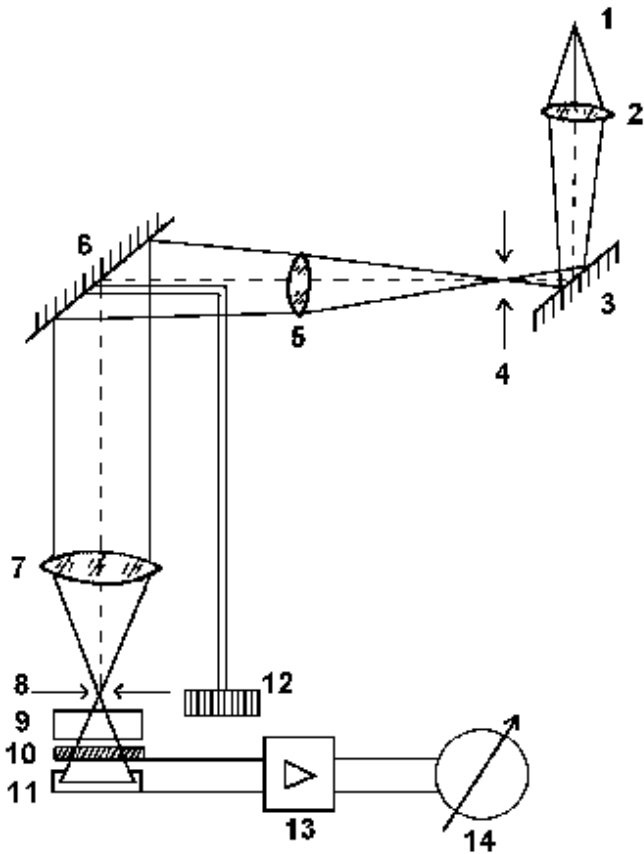
- Podle konstrukce rozdělujeme spektrofotometry na jednopaprskové a dvoupaprskové.
- U **jednopaprskových spektrofotometrů** jeden svazek světla prochází nejdříve srovnávacím a pak měřeným vzorkem (kyvety obsahující roztoky musí být pohyblivé). U **dvoupaprskových spektrofotometrů** jeden svazek světla prochází měřeným vzorkem a druhý srovnávacím vzorkem (blankem). Dvoupaprskové přístroje umožňují podstatně rychlejší měření, avšak jsou dražší. U jednoduchých přístrojů je nastavování vlnové délky světla ruční. U pokročilejších přístrojů se toto nastavování děje automaticky, což umožňuje přímo získávat **absorpční křivky**, tj. grafy závislosti absorbance na vlnové délce světla.

Jednopaprskový spektrofotometr



Zdrojem světla (1) je žárovka s wolframovým vláknem. Její polychromatické světlo prochází kondenzorem (2) a odráží se od zrcadla (3) na vstupní štěrbinu (4) **monochromátoru** (části 4 až 8, plus 12). Světlo je soustředováno čočkou (5) na **odrazovou optickou mřížku (6)**, která tvoří barevné spektrum. Téměř monochromatické světlo je promítáno objektivem (7) na **výstupní štěrbinu (8)** monochromátoru.

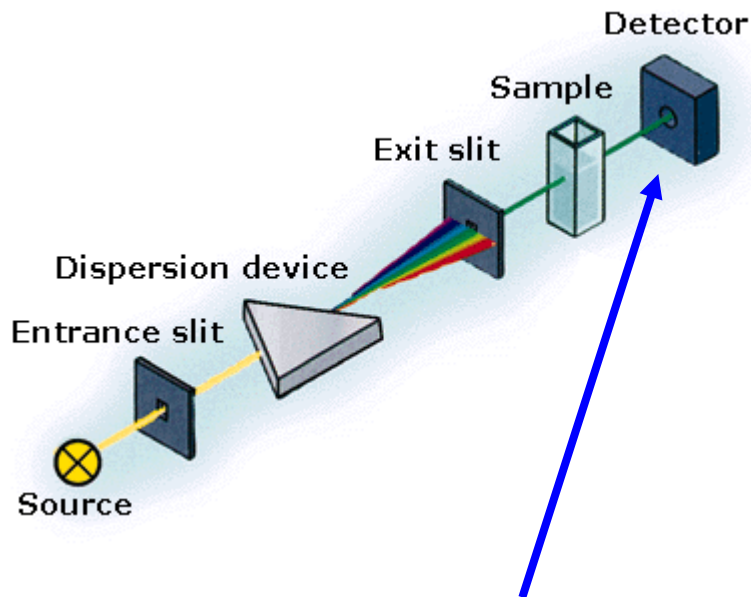
Jednopaprskový spektrofotometr



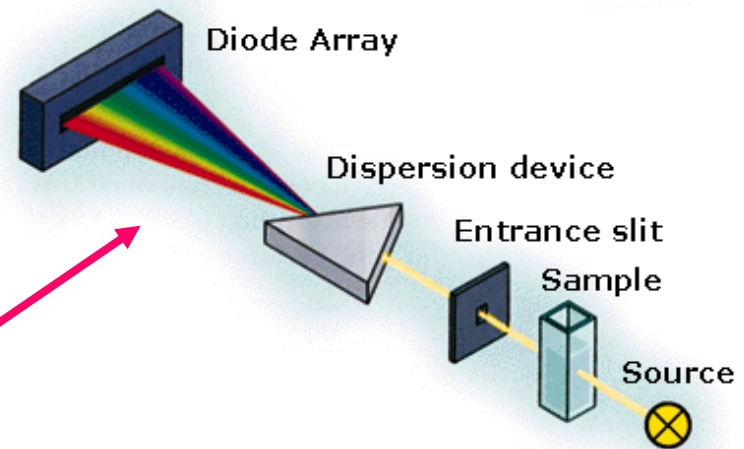
S mřížkou lze otáčet pomocí **ovladače vlnových délek** (12), čímž se zaměřuje světlo o určité vlnové délce na výstupní štěrbinu. Svazek světla pak prochází **kyvetou** (9) se vzorkem. Intenzita prošlého světla je měřena fotodetektorem (10, 11). Jeho signál je zesilován **zesilovačem** (13). Hodnota absorbance je zobrazena na displeji (14). Intenzita světla prošlého srovnávacím roztokem je vždy srovnávána s intenzitou téhož svazku světla prošlého měřeným vzorkem.

Moderní UV/VIS/NIR spektrofotometr

NIR = near infrared = blízká infračervená oblast



Světlo **jedné vybrané vlnové délky** nebo **celé prošlé spektrum** může být měřeno



Absorpční UV spektrofotometrie

- Ultrafialové (**UV**) světlo **je absorbováno** různými sloučeninami, zejména těmi, které mají **konjugované dvojné vazby**. Jak bílkoviny, tak nukleové kyseliny silně absorbují UV světlo, což lze využít pro jejich zkoumání.
 - Aminokyseliny **tryptofan** a **tyrosin** mají absorpční maxima při přibližně **280 nm**. **Fenylalanin** při **255 nm**.
 - **Nukleotidy** (dusíkaté báze) mají absorpční maxima v oblasti **260 - 270 nm**.
 - **Chromofory** – jejich absorpční vlastnosti se mění podle chemického složení prostředí.

UV/Vis spektroskopie proteinů

Absorpční spektrum volného fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu v UV oblast

Podle:<http://www.fst.rdg.ac.uk/courses/fs460/lecture6/lecture6.htm>

Bathochromní efekt (červený posun)



Hypsochromní efekt (modrý posun)



Hypochromní efekt – snížení intenzity



Hyperchromní efekt – zvýšení intenzity

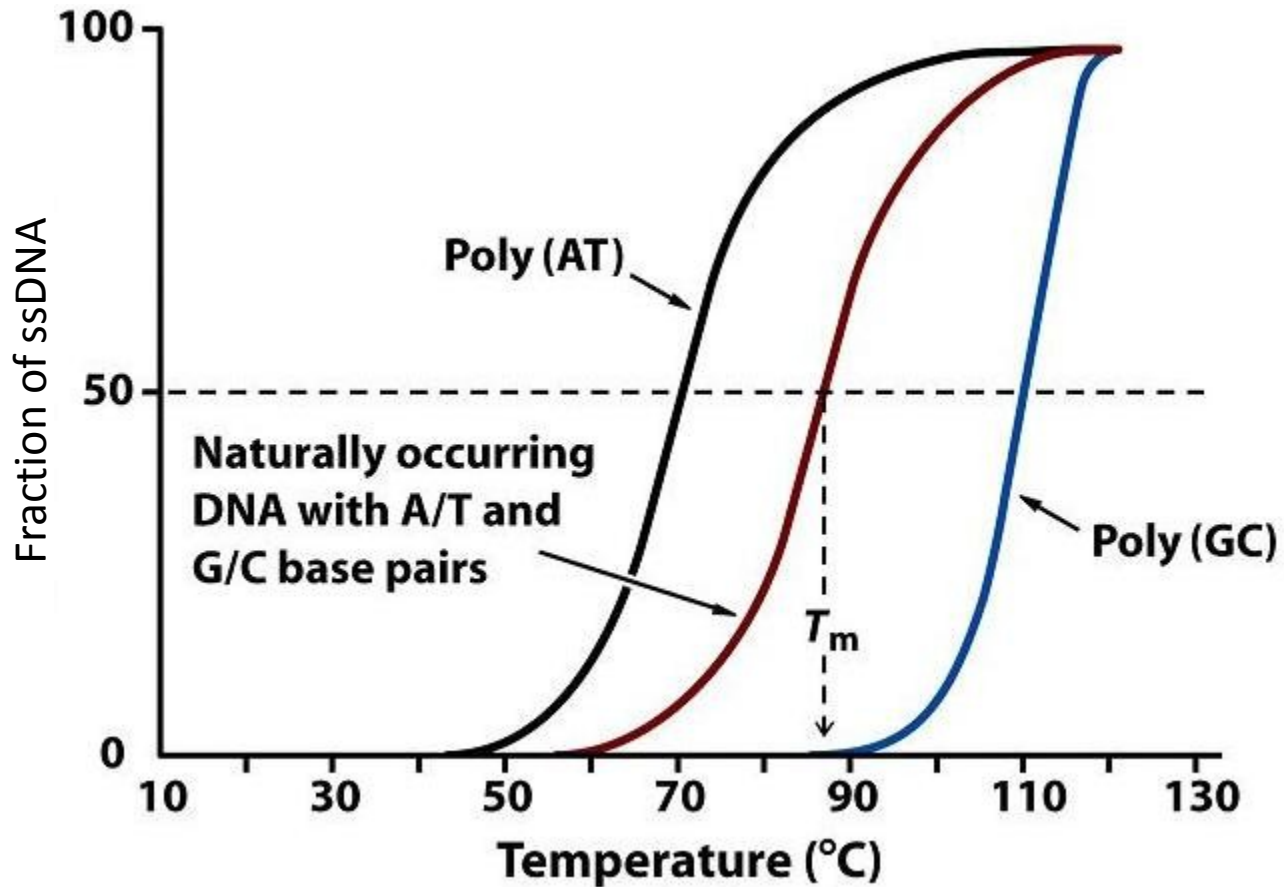


Hypochromní efekt (HE)

- Absorpce světla je ovlivňována dipólovými momenty chemických vazeb, které interagují s fotony. Stochasticky (náhodně) orientované dipólové momenty (denaturovaná bílkovina) absorbují světlo lépe než ve stavu uspořádaném (šroubovice). U **bílkovin** je HE způsoben peptidovými vazbami, které mají UV absorpční maximum kolem 190 nm.
- Dvoušroubovice **DNA** absorbuje UV světlo hůře vlivem patrových a vodíkových interakcí než jednořetězcová (denaturovaná/neuspořádaná).
 $A_{\text{DNA}260\text{nm}}$ v horké vodě > ve studené vodě
- **Helicita** – relativní zastoupení uspořádaných částí makromolekuly

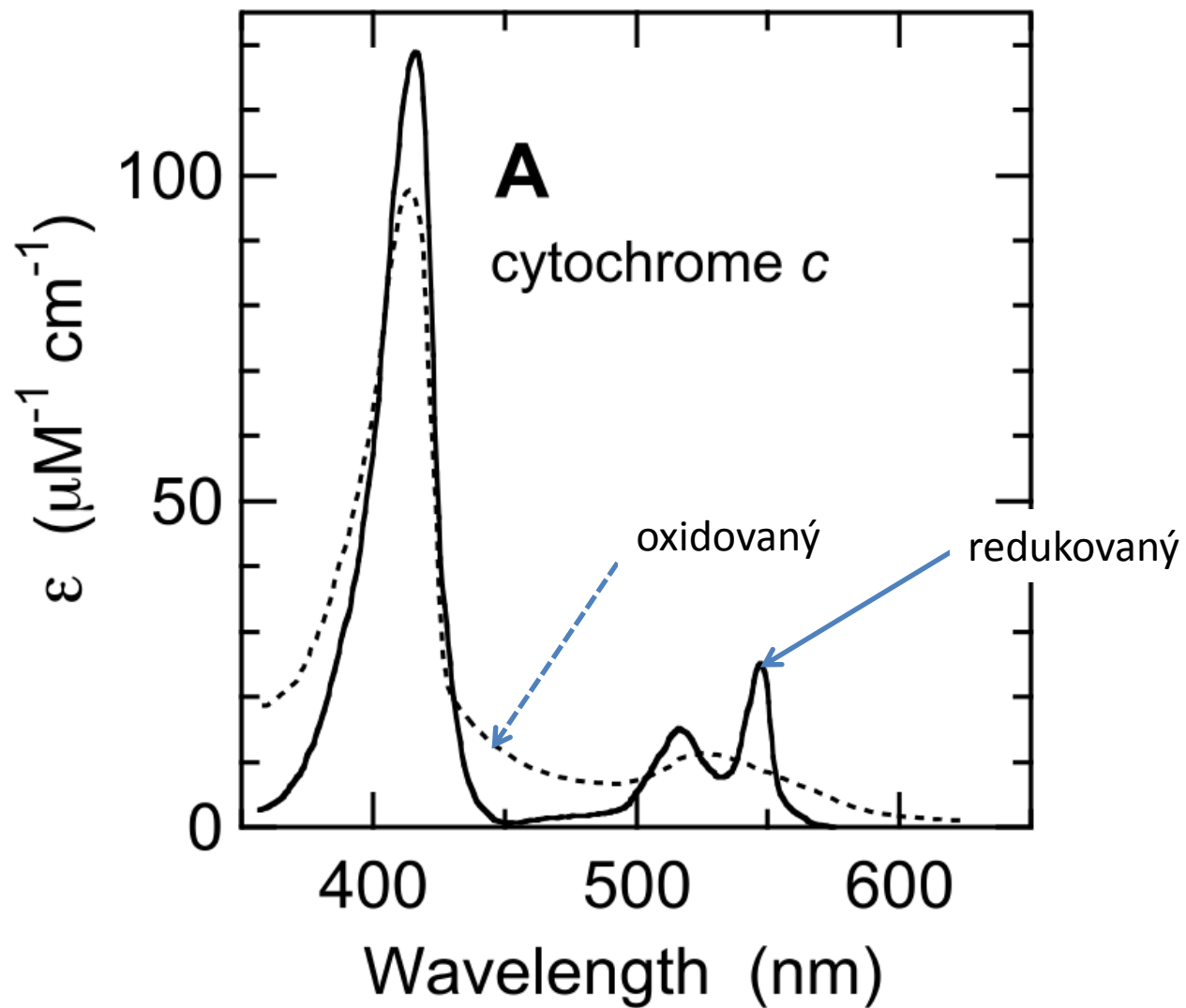
Hypochromní efekt u kys. polyglutamové. Při pH 7 tento polypeptid tvoří stochastické (neuspořádané) klubko (1), při pH 4 získává šroubovicovou strukturu (2). Absorpční maximum peptidových vazeb je sníženo vlivem jejich prostorového uspořádání. ϵ je molární absorpční koeficient a λ je vlnová délka UV světla. [dle: Kalous a Pavlíček, 1980]

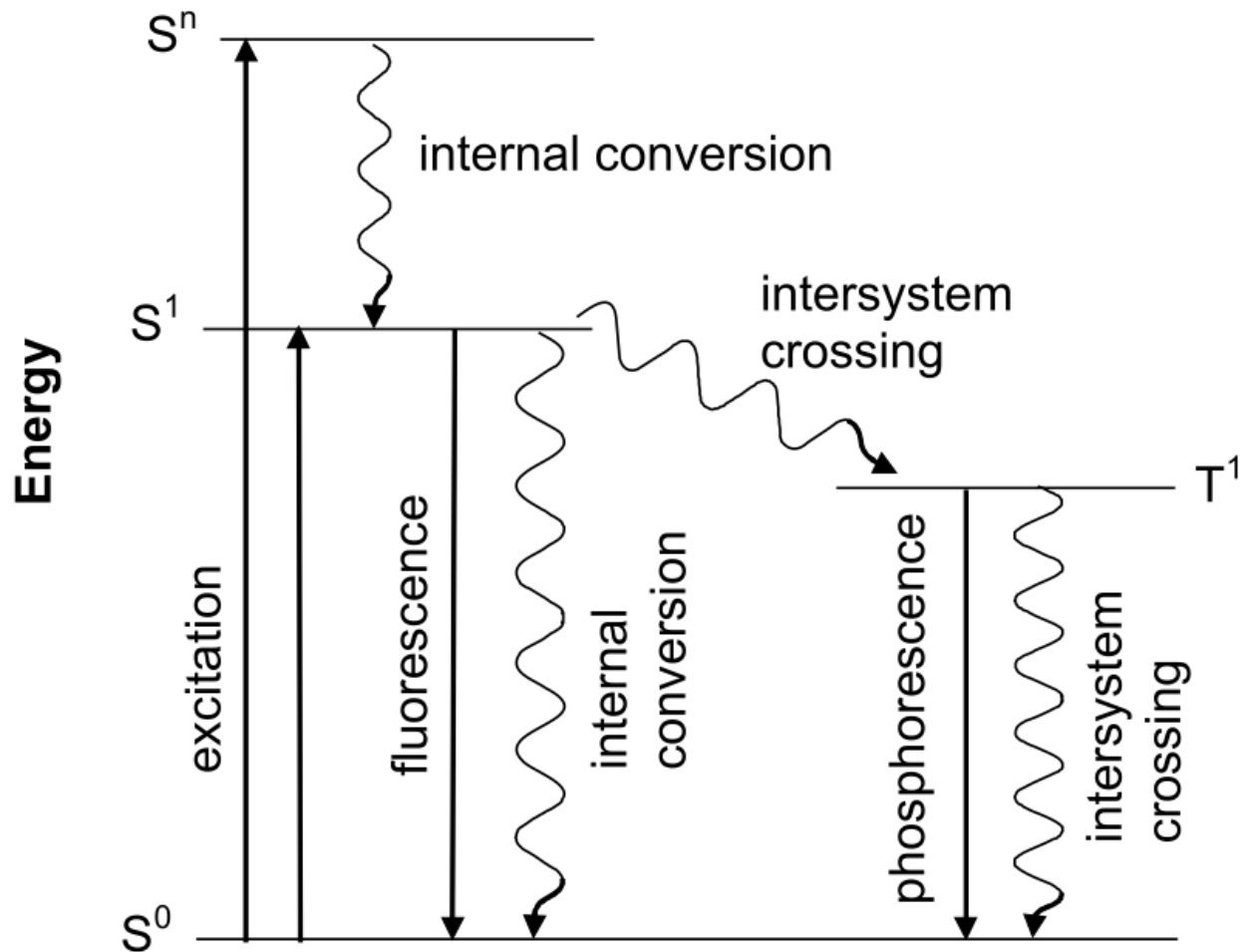
Teplota tání duplexů DNA



<https://sandwalk.blogspot.com/2007/12/dna-denaturation-and-renaturation-and.html>

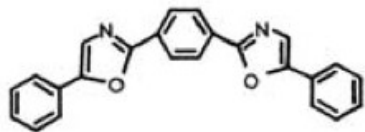
<https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/physical-sciences-practice/physical-sciences-practice-tut/e/melting-point-and-thermodynamics-of-double-stranded-dna-1>



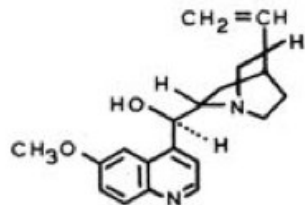


Zářivé procesy (absorpce, fluorescence, fosforescence) jsou indikovány rovnými šipkami. Nezářivé procesy jsou naznačeny zvlněnými šipkami. Diagramy tohoto typu byly zavedeny A. Jablonskim v jeho práci z r. 1935 na téma mechanismu fosforescence. Horizontální osa nemá fyzikální význam.

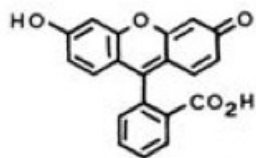
Fluorescenční (Försterův) přenos energie



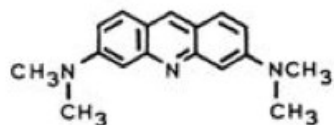
POPOP



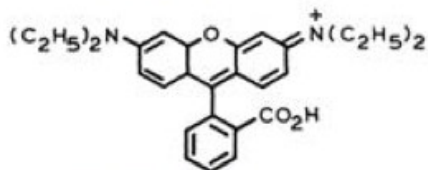
Quinine



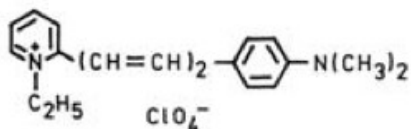
Fluorescein



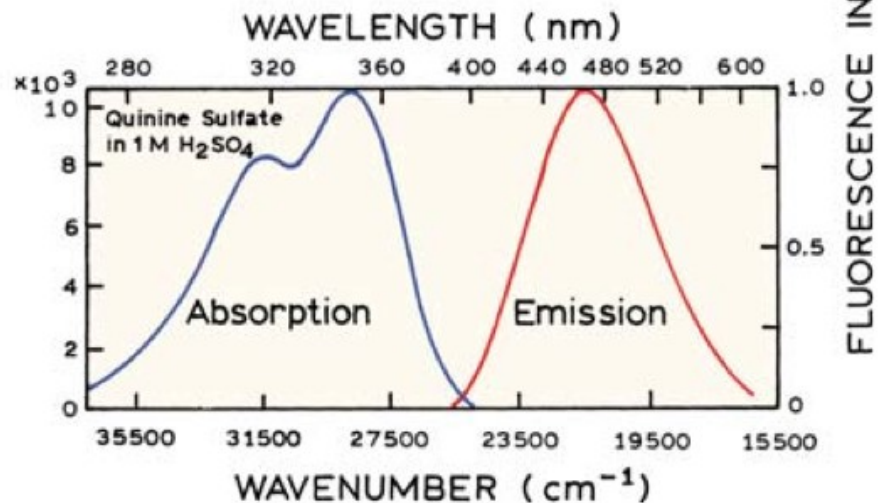
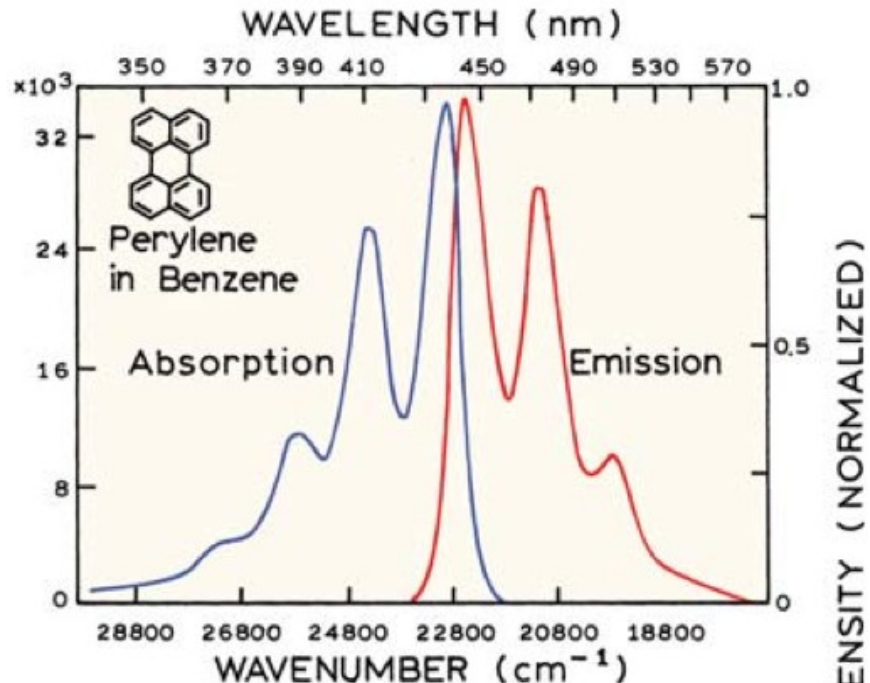
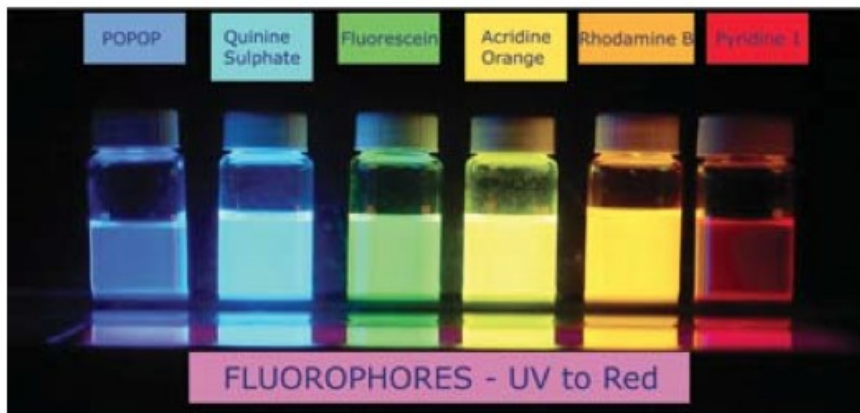
Acridine Orange



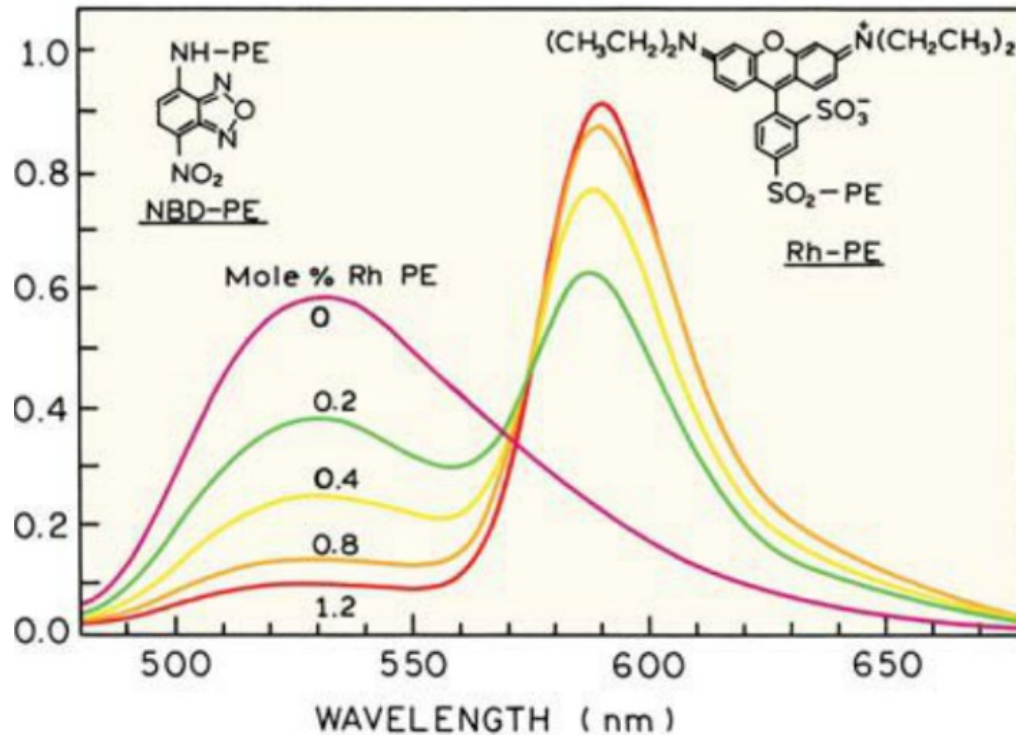
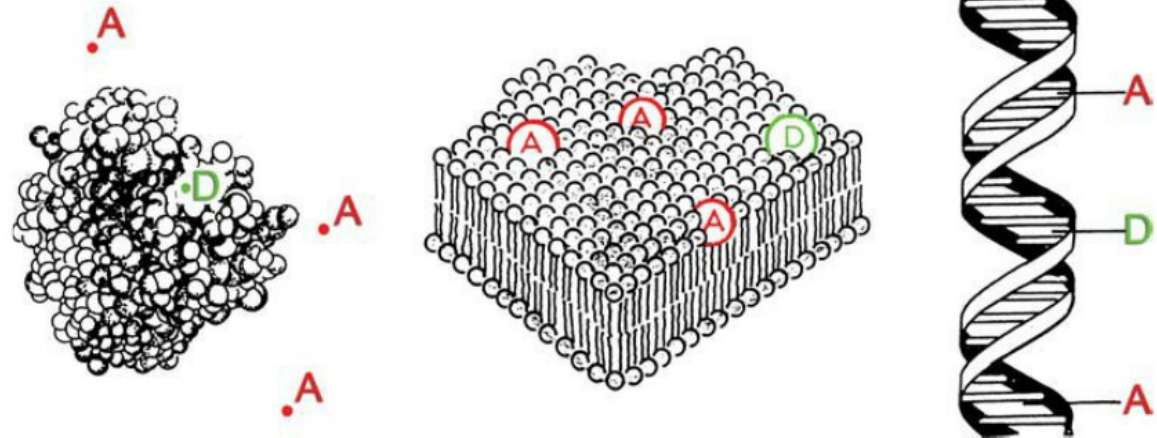
Rhodamine B

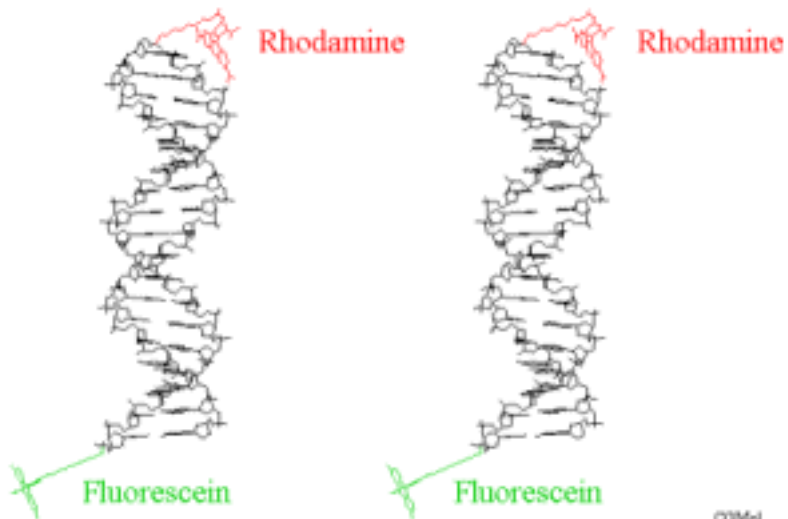


Pyridine 1

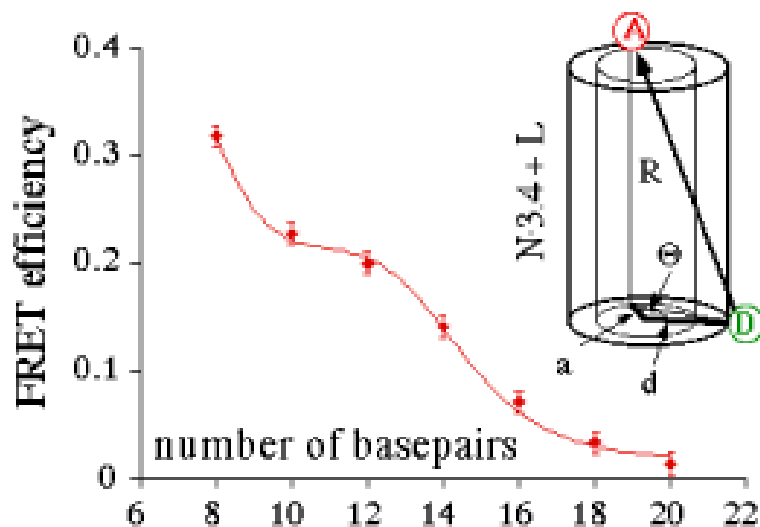
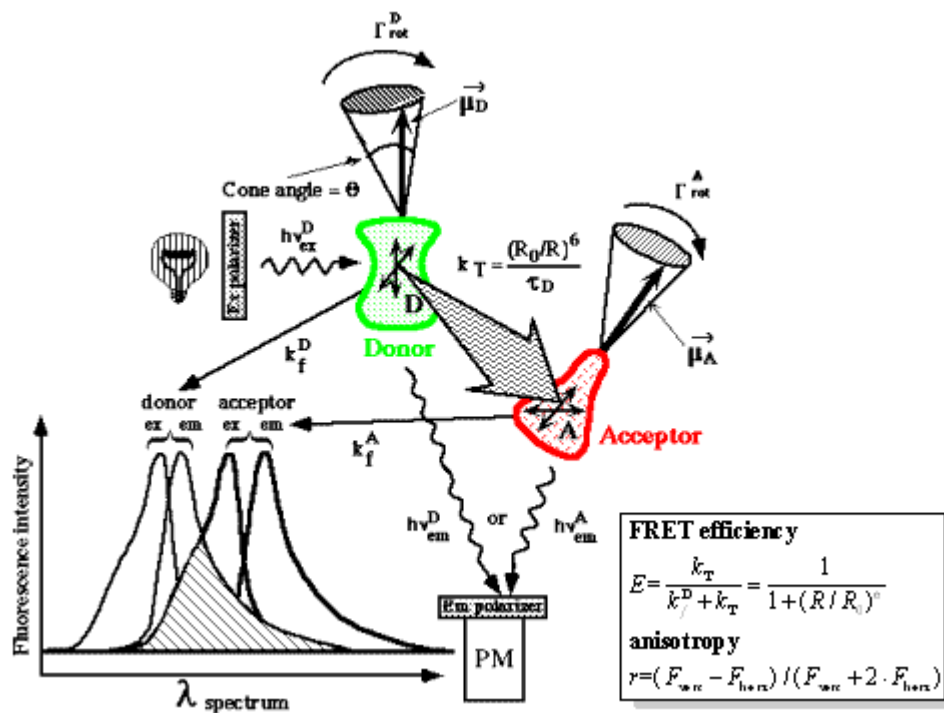


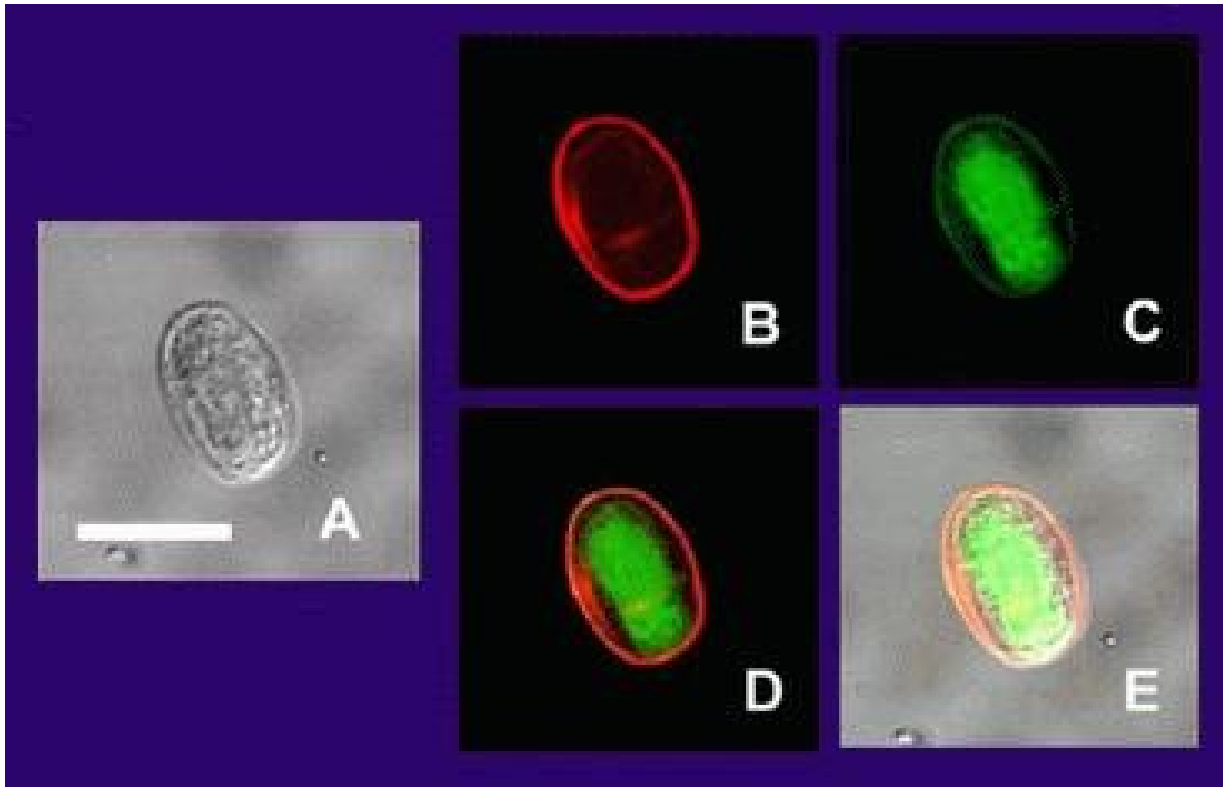
Fluorescenční (Försterův) přenos energie



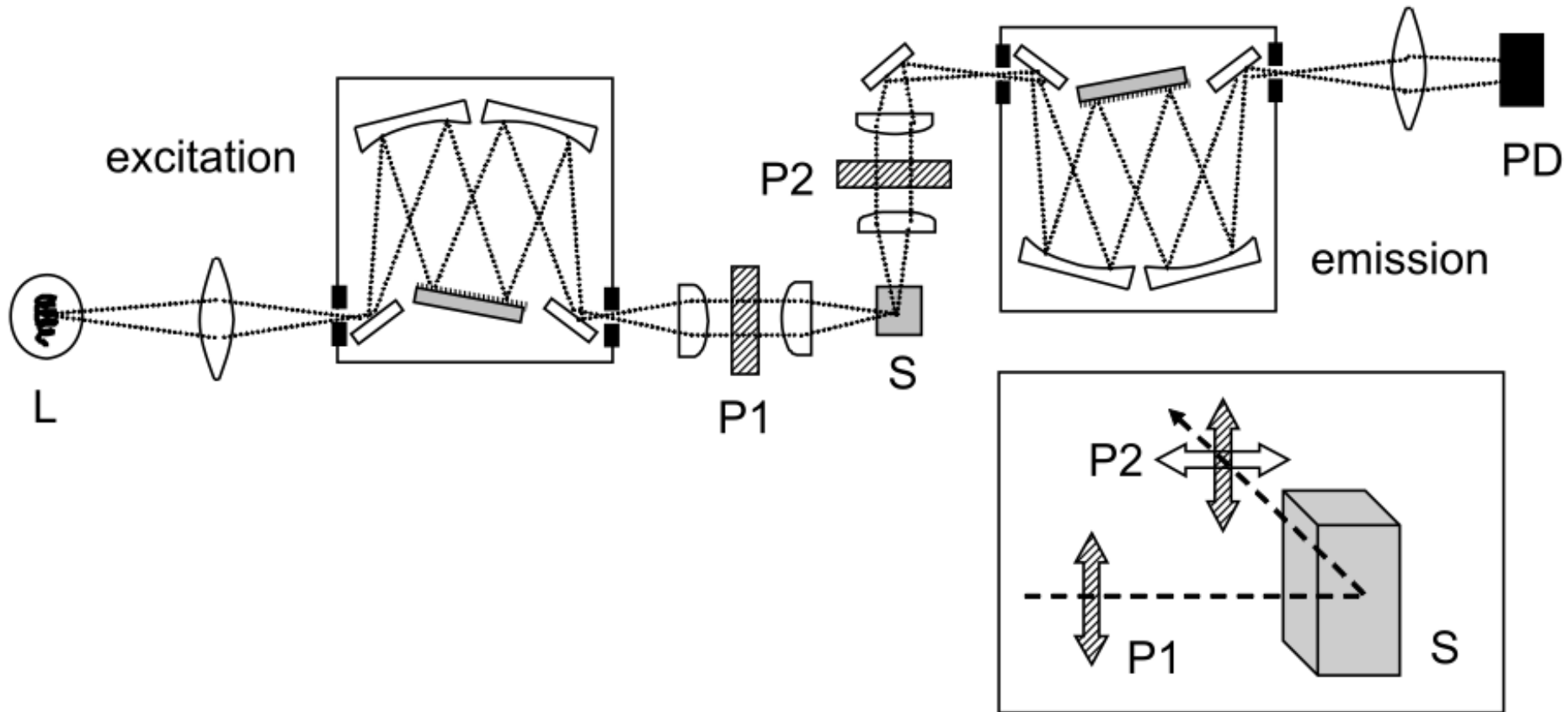


COMSOL





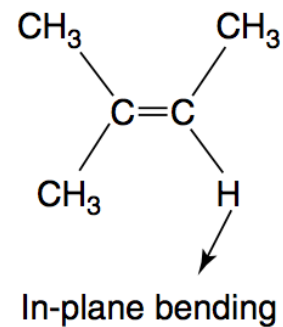
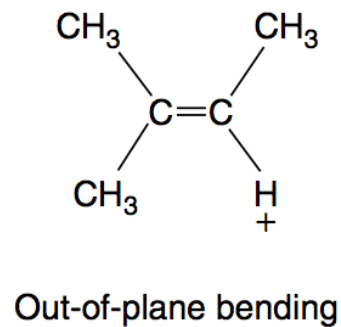
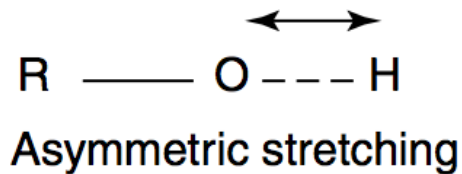
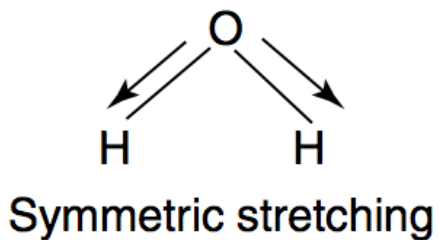
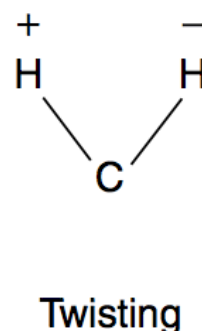
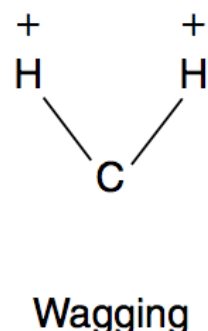
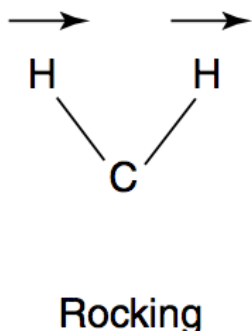
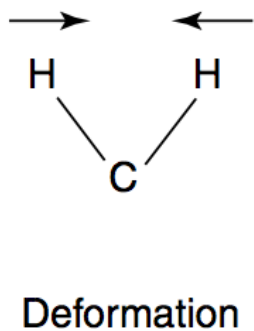
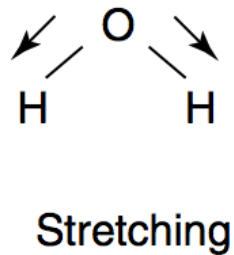
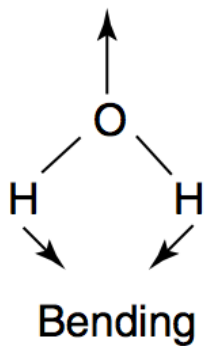
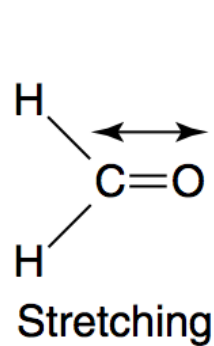
Giardia lamblia (intestinalis) (**A**) is the cyst imaged by transmission (differential interference contrast), only. (**B**) is the cyst wall selectively imaged through use of fluorescent-labelled (TRITC) antibody that is cyst wall specific. (**C**) is the cyst imaged through use of carboxy fluorescein diacetate, a viability stain. (**D**) is a composite image of (**B**) and (**C**). (**E**) is a composite image of (**A**), (**B**), and (**C**). Bar = 10 microns; sample from gerbil feces. Image courtesy of US EPA



Zařízení pro měření fluorescenční anisotropie. V hlavním schématu polarizační filtr nebo hranol (P1) polarizuje dopadající světlo. Intenzita fluorescence je měřena druhým polarizátorem (P2), který může být kolmý nebo paralelní k P1. L – lampa, S – vzorek, PD – fotodetektor.

IR spektrofotometrie

- Infračervené záření (IR) působí na rotační a vibrační stavy molekul. Složité molekuly mohou vibrovat nebo rotovat mnoha různými způsoby (módy). Různé chemické skupiny (-CH₃, -OH, -COOH, -NH₂ atd.) mají specifické vibrační a rotační frekvence, a proto absorbují IR světlo o specifických vlnových délkách.
- Z tohoto důvodu mají infračervená absorpční spektra mnoho maxim. Změna chemické struktury se projevuje jako změna polohy těchto maxim ve spektru.



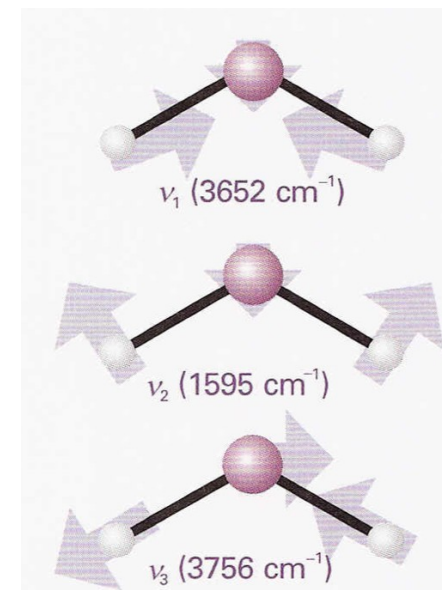
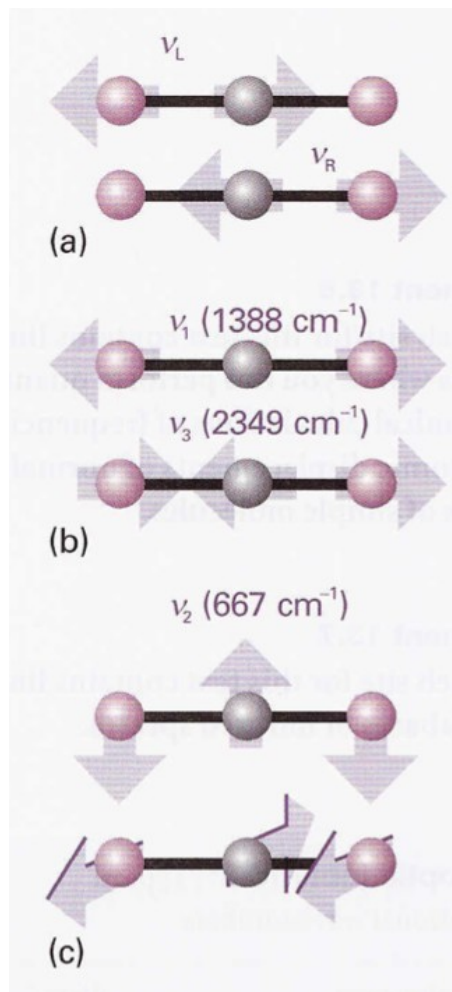
Vibrace

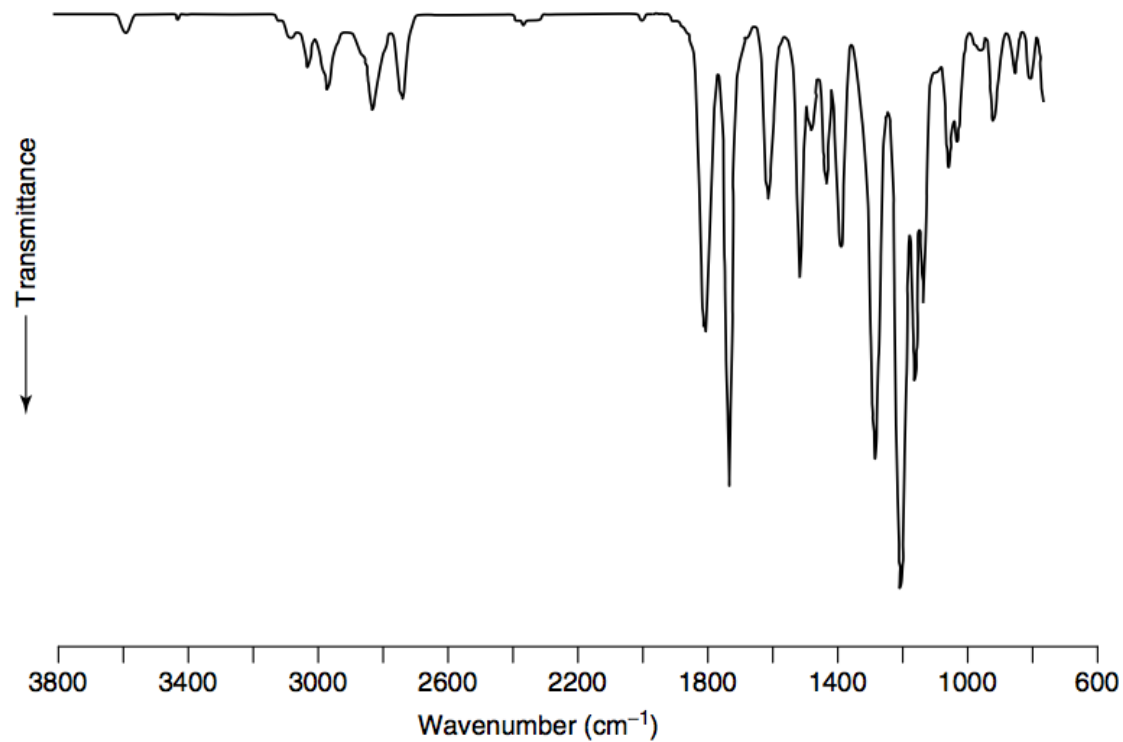
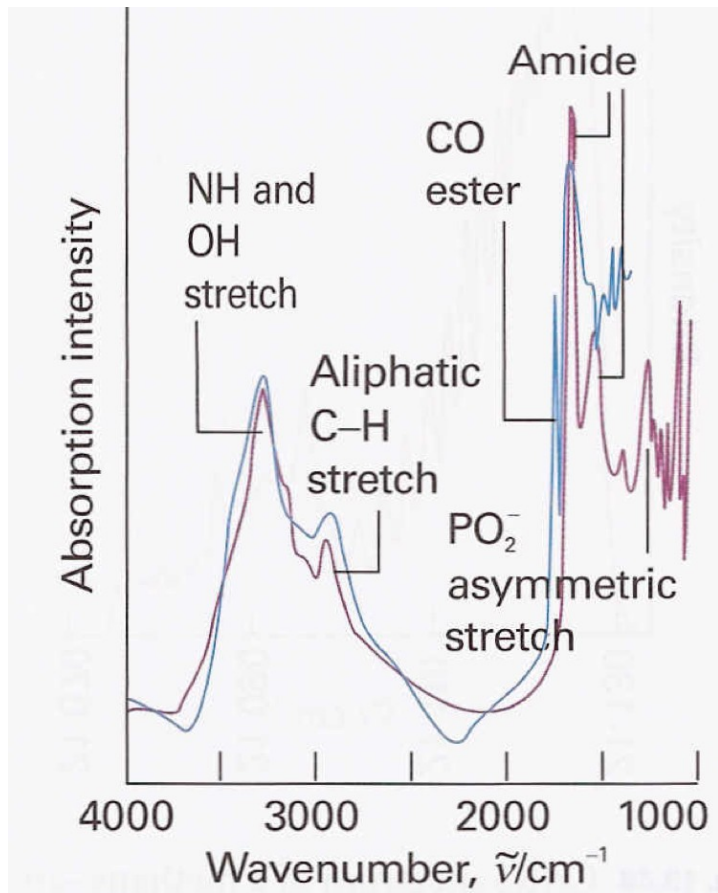
ν/cm^{-1}

C—H stretch	2850–2960
C—H bend	1340–1465
C—C stretch, bend	700–1250
C=C stretch	1620–1680
C≡C stretch	2100–2260
O—H stretch	3590–3650
H-bonds	3200–3570
C=O stretch	1640–1780
C≡N stretch	2215–2275
N—H stretch	3200–3500
C—F stretch	1000–1400
C—Cl stretch	600–800
C—Br stretch	500–600
C—I stretch	500
CO_3^{2-}	1410–1450
NO_3^-	1350–1420
NO_2^-	1230–1250
SO_4^{2-}	1080–1130
Silicates	900–1100

CO_2

H_2O



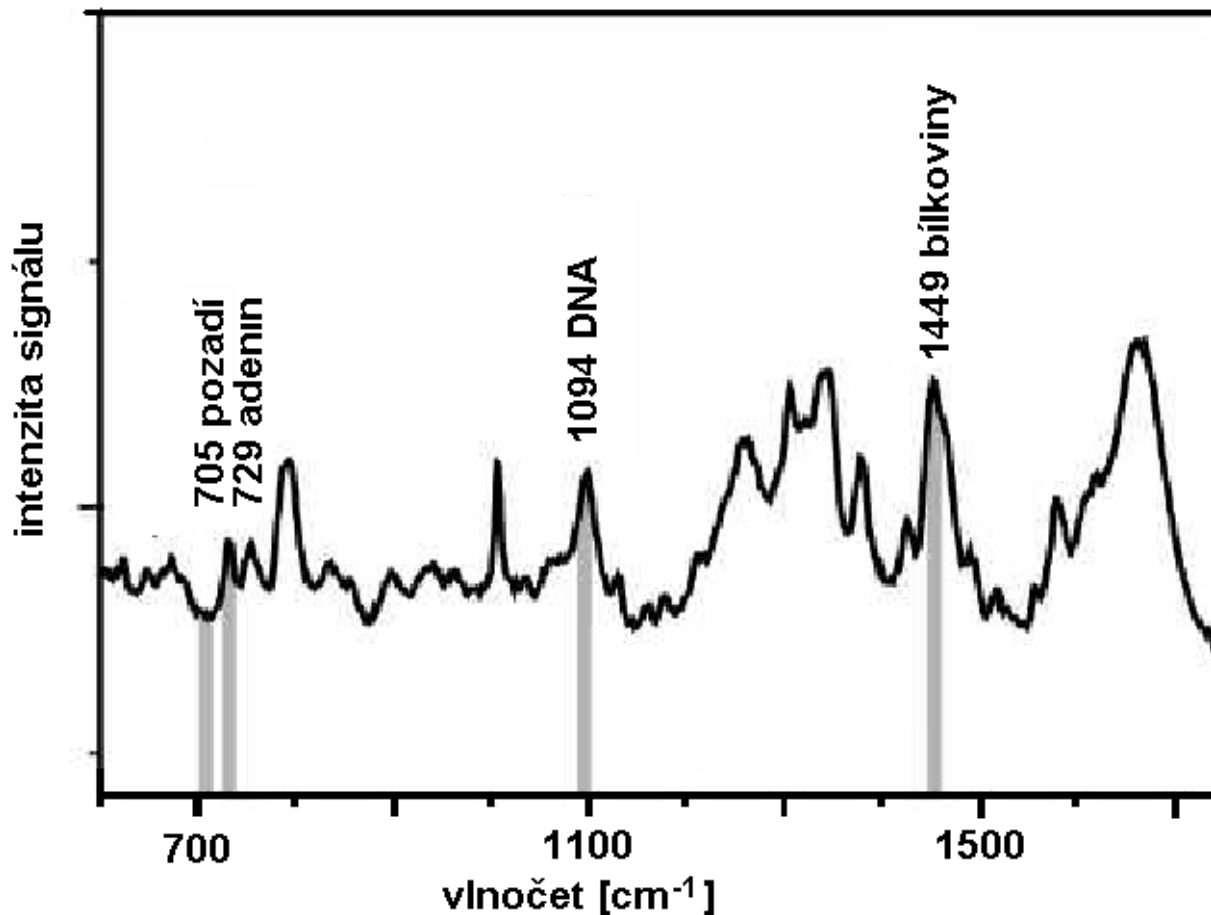


Ukázka IR spekter. Vlevo absorpční spektrum živé (fialově) a umírající (modře) buňky. Vpravo spektrum vanilinu.

Ramanova spektroskopie

- **Sir Chandrasekhara Venkata Raman** – NC 1930 za fyziku „za jeho práci o rozptylu světla a objevu efektu pojmenovanám po něm“
- **Rayleighův rozptyl světla.** Nastává interakce fotonů s molekulami, jež se projevuje jen velmi malou nebo žádnou změnou vlnové délky. Intenzita rozptýleného světla závisí na molekulové hmotnosti a také na úhlu rozptylu, což lze využít pro odhad tvaru makromolekul.
- **Ramanova spektrometrie.** Při rozptylu fotonů nastává malá změna (posun) vlnové délky, způsobená malým poklesem nebo zvýšením energie rozptýlených fotonů během přechodu z původního do změněného vibračního nebo rotačního stavu interagující molekuly. Tyto stavy se mohou měnit v důsledku strukturálních změn molekul.
- Proto změny v Ramanových spektrech (intenzita signálu v závislosti na posunu vlnové délky) odrážejí konformační změny molekul.

Ramanova spektroskopie

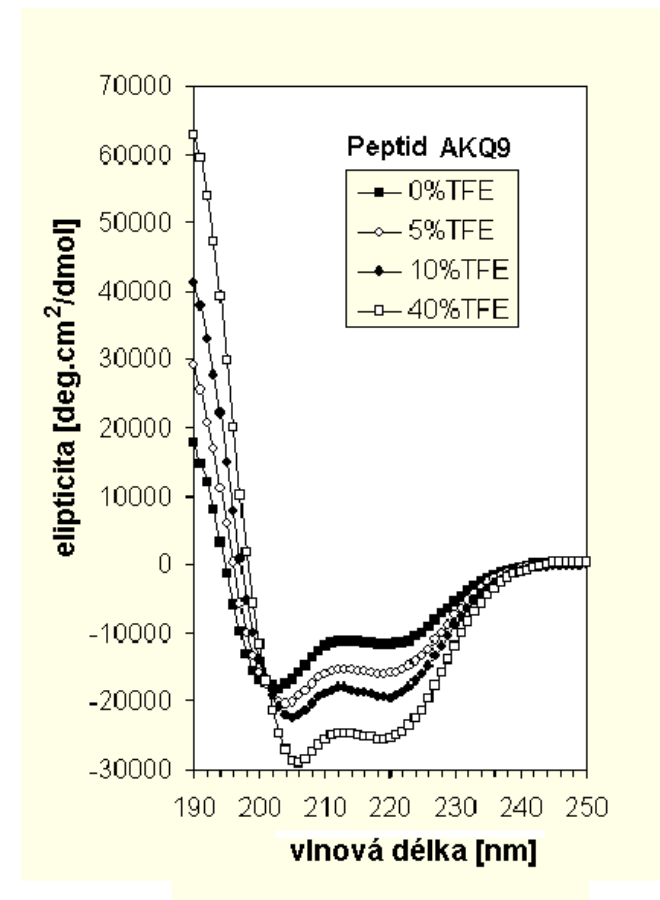


Ramanovo spektrum polytenního chromosomu pakomára Chironomus. Při zvolených vlnočtech lze uskutečnit ramanovskou mikroskopií. Vybuzeo laserovým světlem o vlnové délce 647.1 nm.

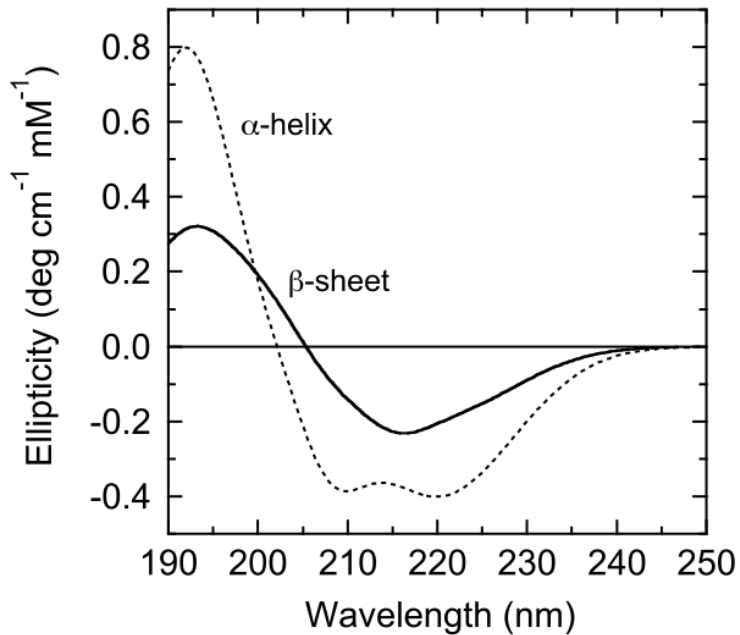
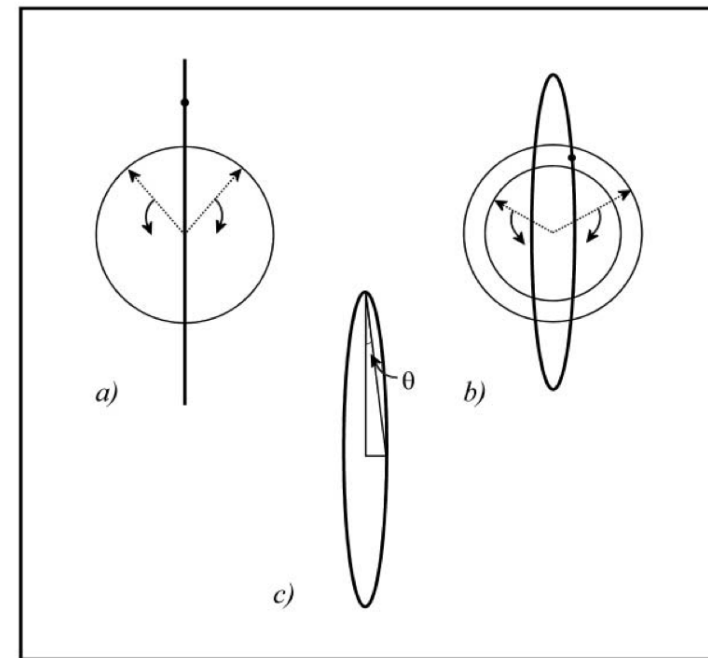
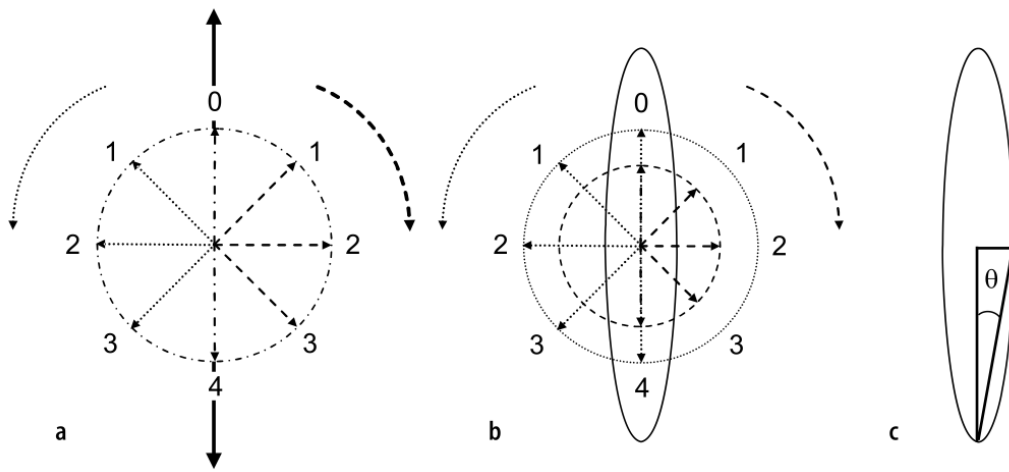
Cirkulární dichroismus (CD)

- Měření **optické aktivity** (schopnosti stáčet rovinu polarizovaného světla). Konformační změny molekul mohou být sledovány jako změny optické aktivity při použití speciálního polarimetru.
- U metody CD srovnáváme absorbance levotočivě a pravotočivě cirkulárně polarizovaného světla, jehož vlnová délka je blízka absorpčnímu maximu bílkoviny.
- CD lze využít též pro studium struktury nukleových kyselin.

Obrázek ukazuje změny **elipticity** syntetického polypeptidu, obsahujícího dlouhé sekvence poly-glu, po přidavku trifluoroethanolu (TFE), který zvyšuje podíl α -šroubovice. <http://www-structure.llnl.gov/cd/polyg.htm>



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



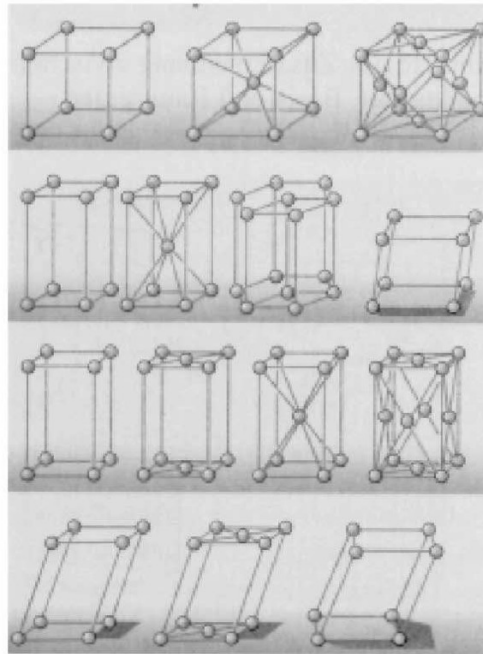
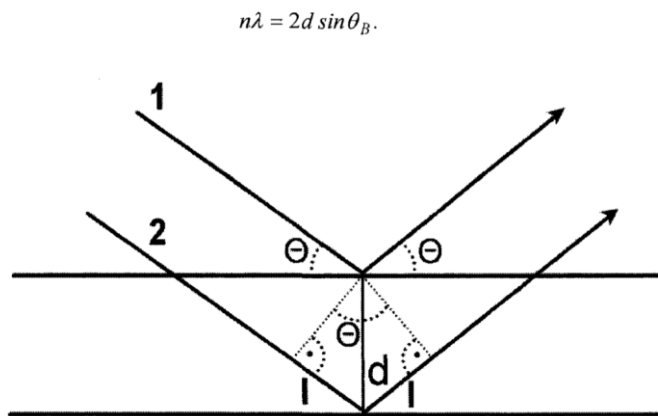
Nejčastěji se CD vyjadřuje jako závislost na Delta Epsilon.

$$\Delta \epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R = (A_L - A_R) / (dl)$$

ϵ_L a ϵ_R jsou definované levo-a pravo-točivé extinkční koeficienty, l je délka dráhy a d je molární koncentrace vzorku.

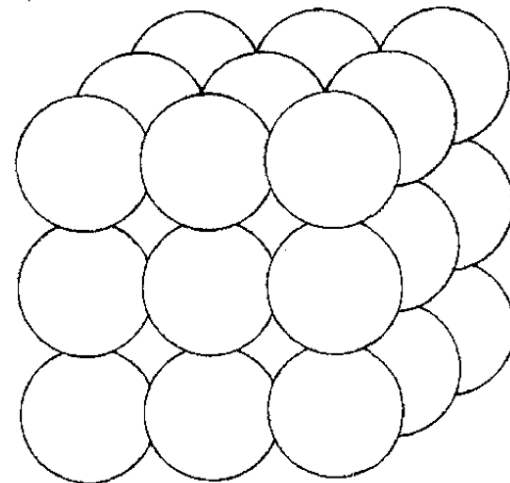
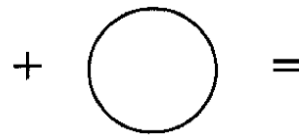
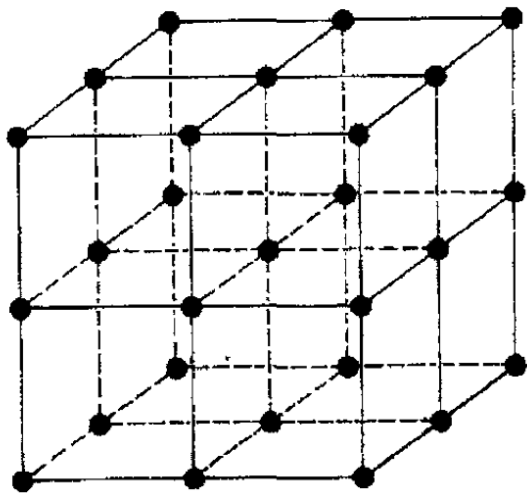
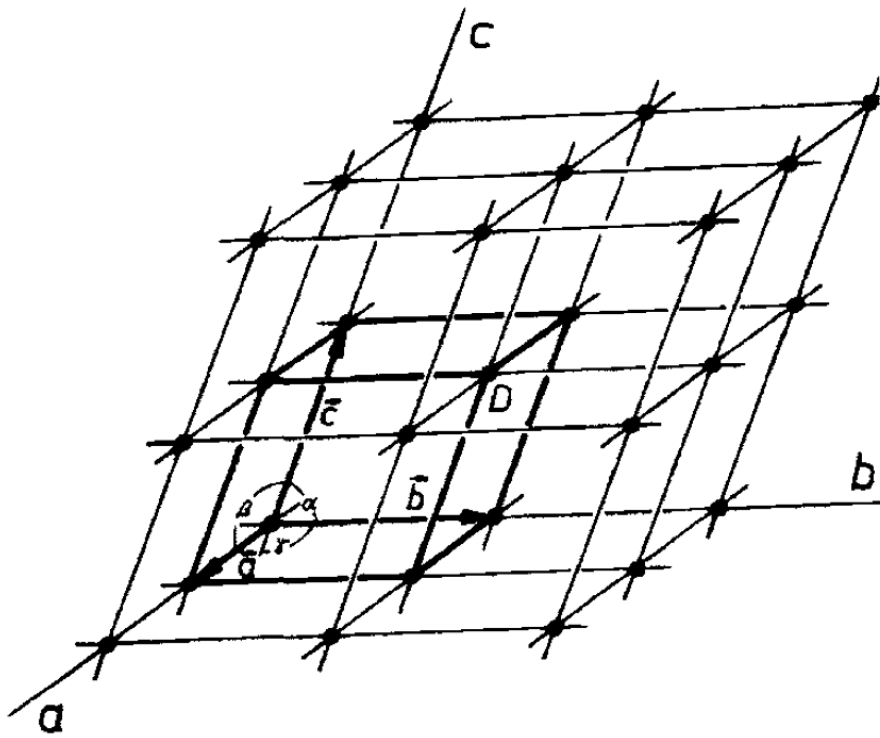
Rentgenstrukturní analýza

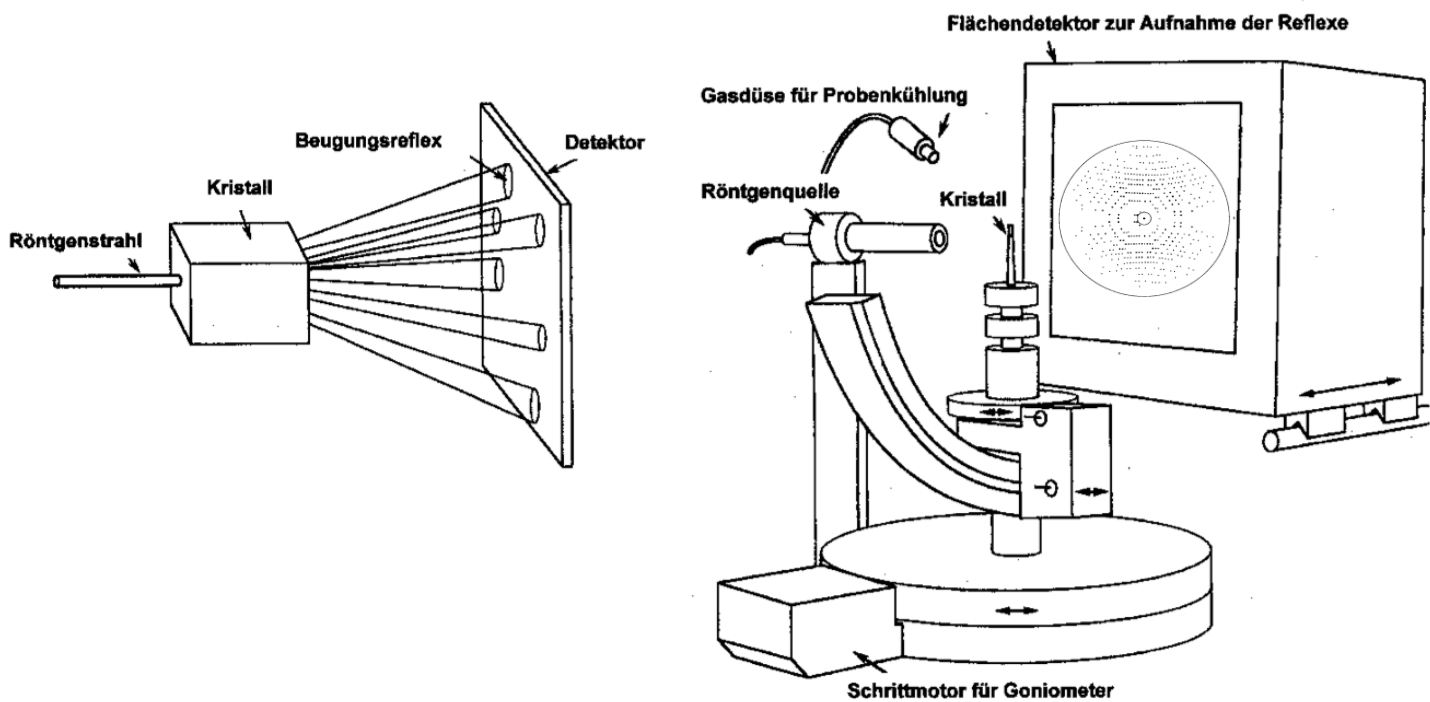
Krystalová mřížka působí na rentgenové záření jako optická mřížka na viditelné světlo. Nastávají ohybové jevy a na stínítku se objevuje difrakční obrazec. Tyto obrazce mohou být matematicky analyzovány, aby se získala informace o rozložení elektronů v molekulách tvořících krystal.



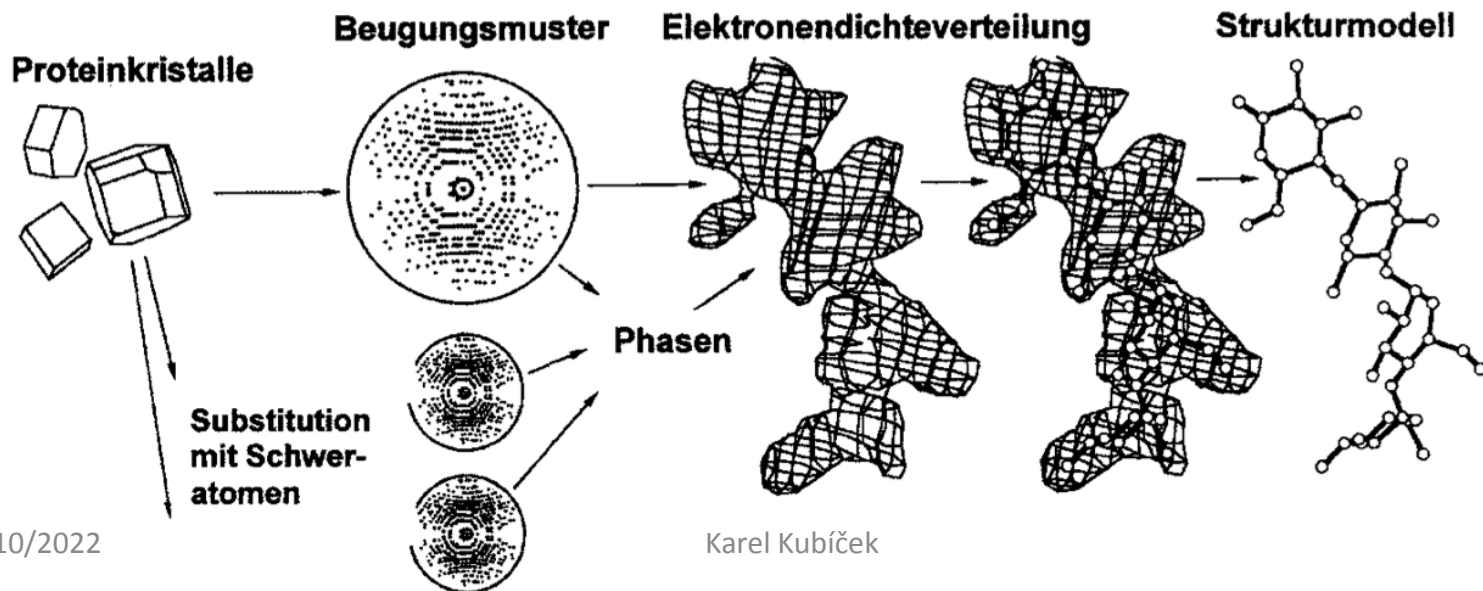
Raumgitter

$\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3 \neq 90^\circ$:	triklin
$\alpha_1 = \alpha_2 = 90^\circ$, $\alpha_3 \neq 90^\circ$:	monoklin
$\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = 90^\circ$, $a_0 \neq b_0 \neq c_0$:	orthorhombisch
$\alpha_2 = \alpha_3 = 90^\circ$, $\alpha_1 = 60^\circ$, $b_0 = c_0$:	hexagonal
$\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 \neq 90^\circ$, $a_0 = b_0 = c_0$:	trigonal (rhomboedrisch)
$\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = 90^\circ$, $a_0 = b_0 \neq c_0$:	tetragonal
$\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = 90^\circ$, $a_0 = b_0 = c_0$:	kubisch

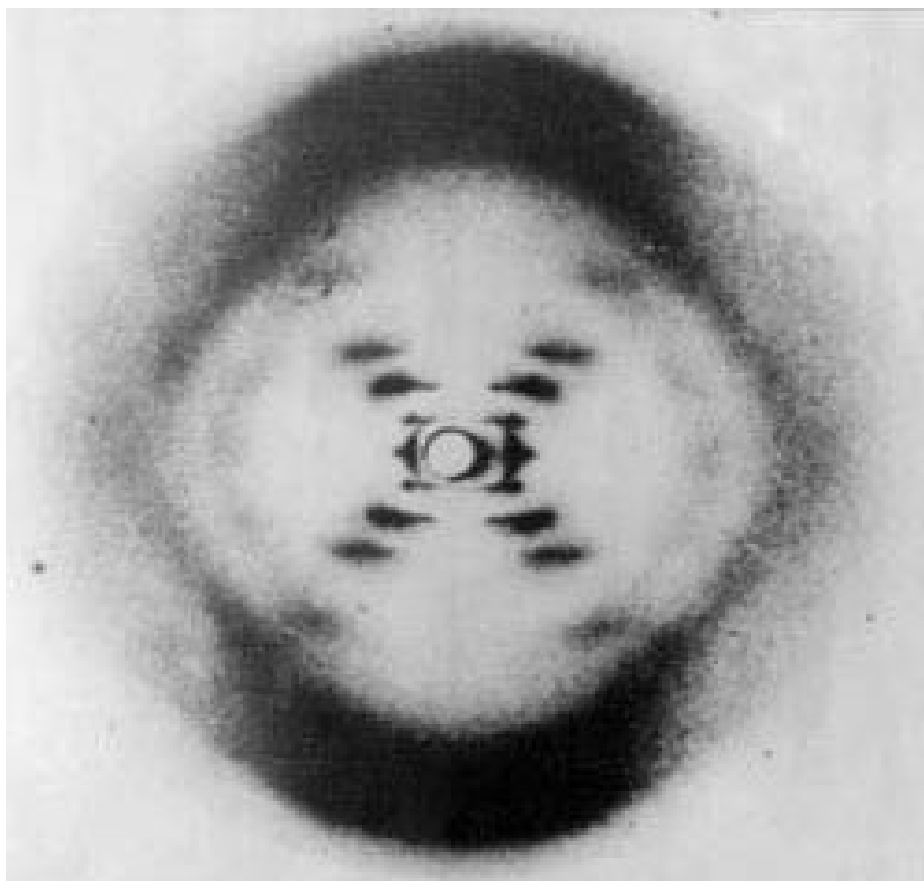




Verfeinerung („refinement“) der Struktur



Krystalogram **B-DNA** získaný v r. **1952** Rosalindou E. **Franklinovou**, na jehož základě **Watson** a **Crick** navrhli dvoušroubovicový model struktury DNA. **C. & W.** dostali v r.**1962** společně s Mauricem Hugh Frederick Wilkinsem NC za fyziologii a medicínu „za jejich objevy týkající se molekulární struktury nukleových kyselin a jejich významu při přenosu informací v živých organizmech“



F



C



W

Confidence in structural features of proteins determined by X-ray crystallography

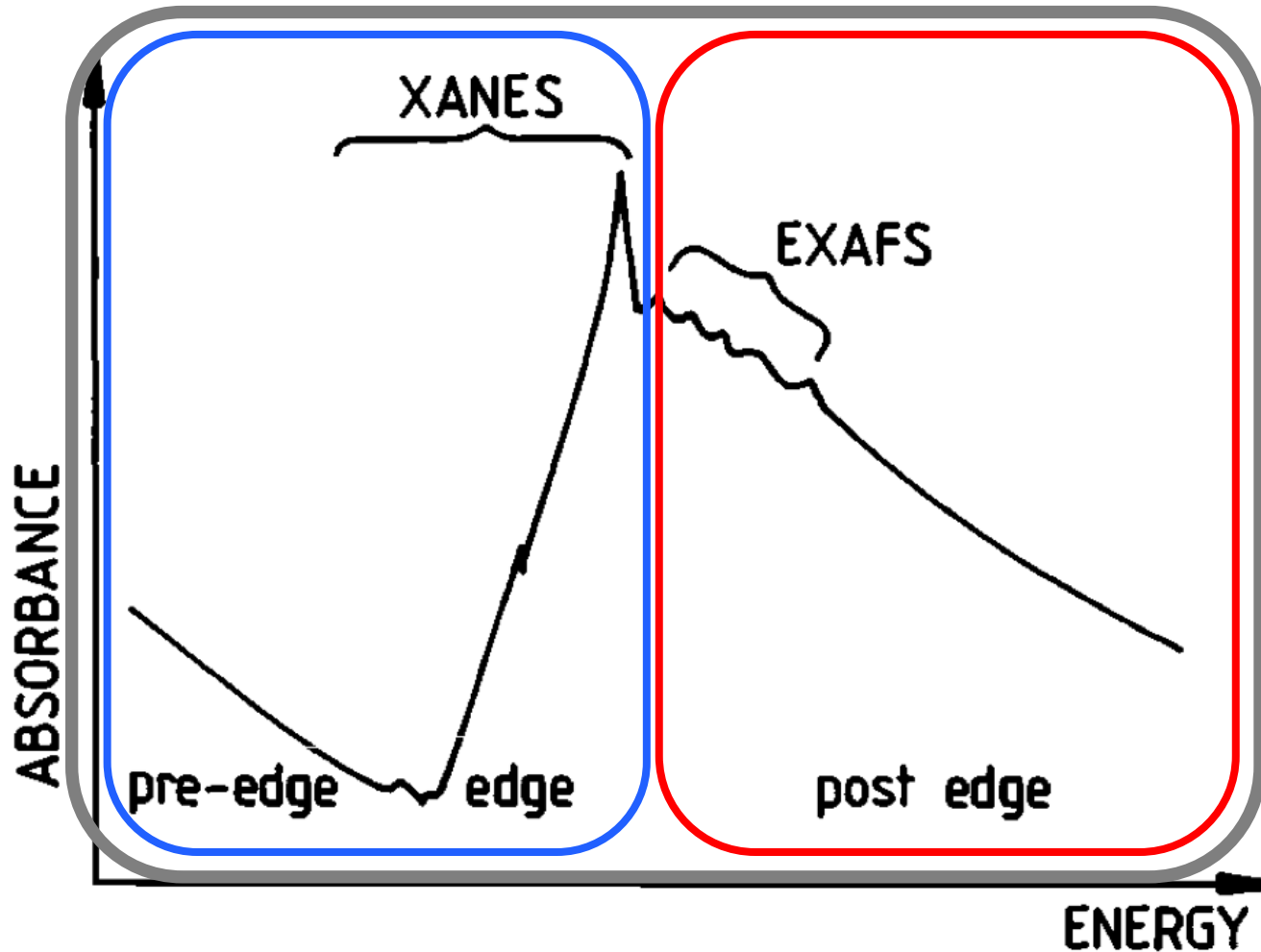
(estimates are very rough and strongly depend on the quality of the data)

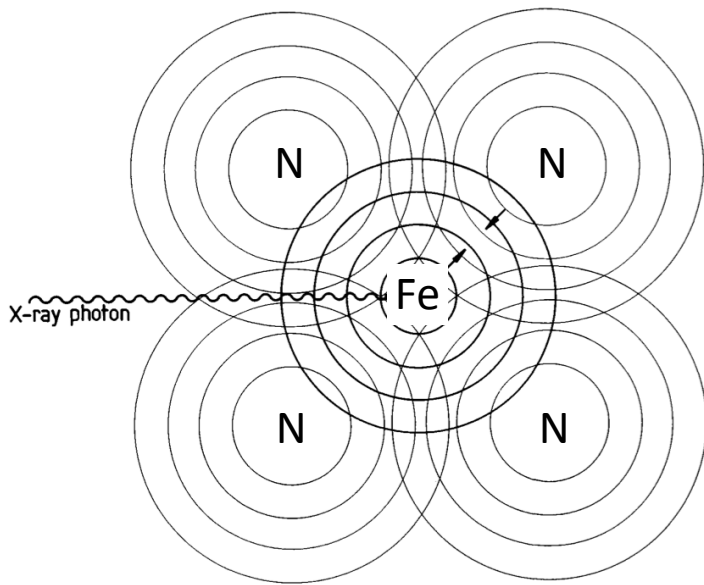
Structural feature			Resolution		
	5 Å	3 Å	2.5 Å	2 Å	1.5 Å
Chain tracing	-	Fair	Good	Good	Good
Secondary structure	Helices fair	Fair	Good	Good	Good
Sidechain conformations	-	-	Fair	Good	Good
Orientation of peptide planes	-	-	Fair	Good	Good
Protein hydrogen atoms visible	-	-	-	-	Good

XAS = X-ray Absorption Spectroscopy

XANES = X-ray Absorption Near Edge Structure

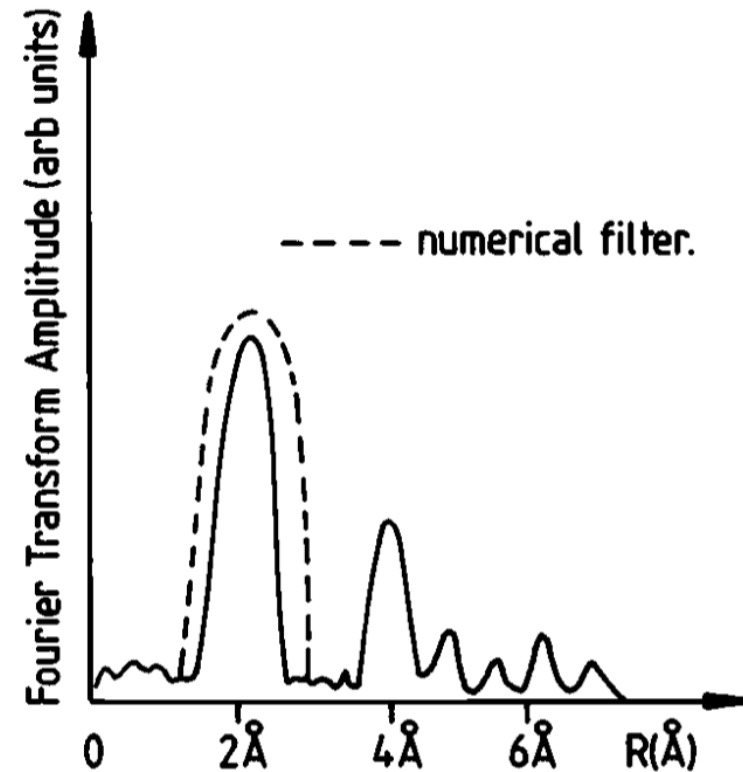
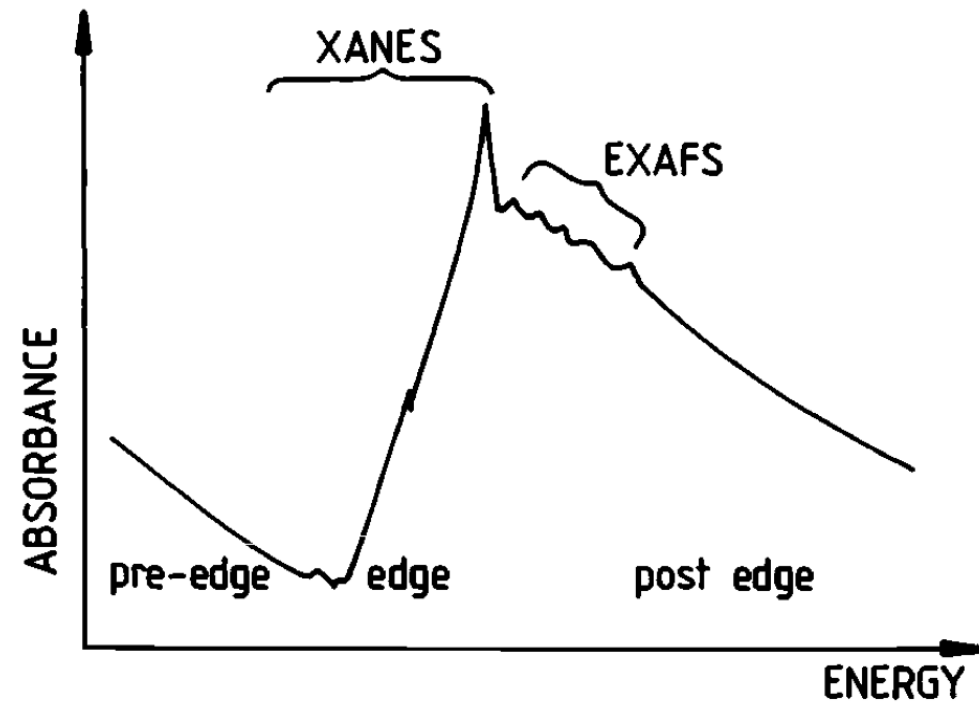
EXAFS = Extended X-Ray Absorption Fine Structure





$$I = I_0 \exp(-\mu x)$$

EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Spectroscopy) poskytuje informace o nejbližších slupkách atomů sousedících s absorbujícím atomem



SAXS – Small Angle X-ray Scattering (RTG rozptyl pod malým úhlem)

Terminology

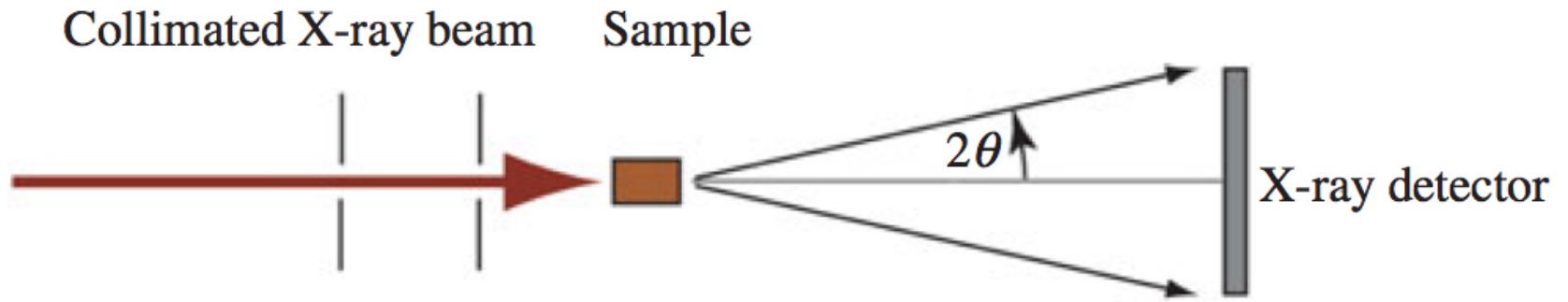
- 1) X-ray – diffraction / scattering
- 2) XS - X-ray scattering
- 3) SAXS/WAXS - Small/Wide Angle X-ray Scattering
- 4) SANS - "-----"----- Neutron ---"---

- A) Otto Kratky (1902, Vienna-1995, Graz)
- B) Günter Porod (1919 near Villach, 1984 Graz)
- C) Dmitri I. Svergun

- I) Scattering
- II) Scattering curve
- III) Guinier plot
- IV) PDF (Pair-distribution function)

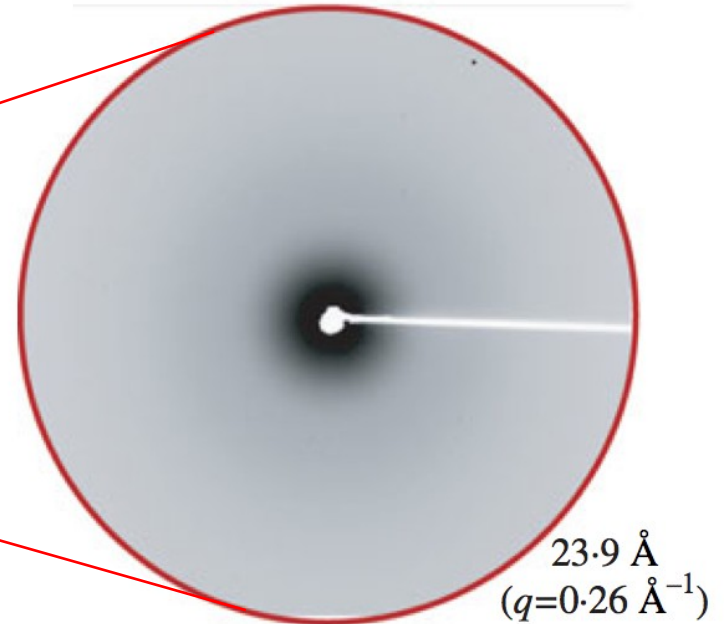
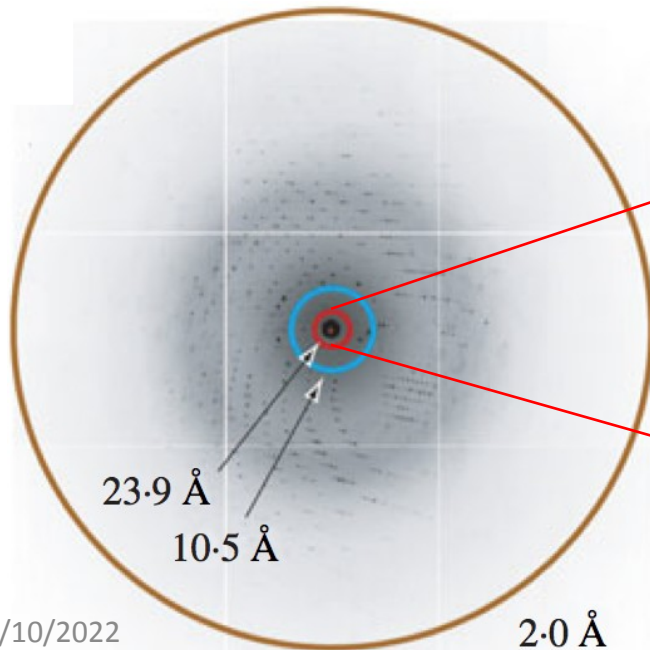
- a) Bead model
- b) Bead model - / SAXS - envelope

Experimental setup



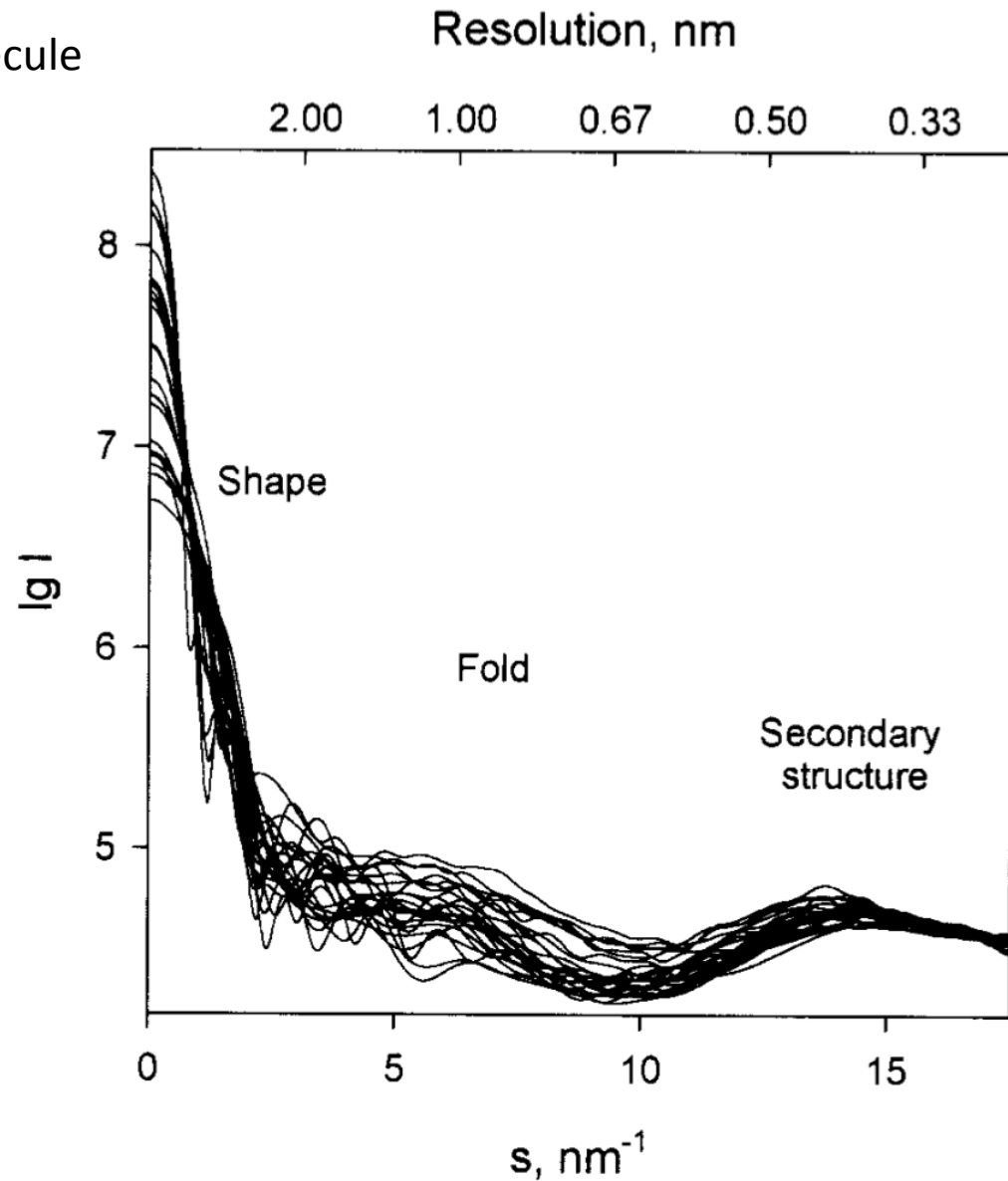
X-ray

SAXS



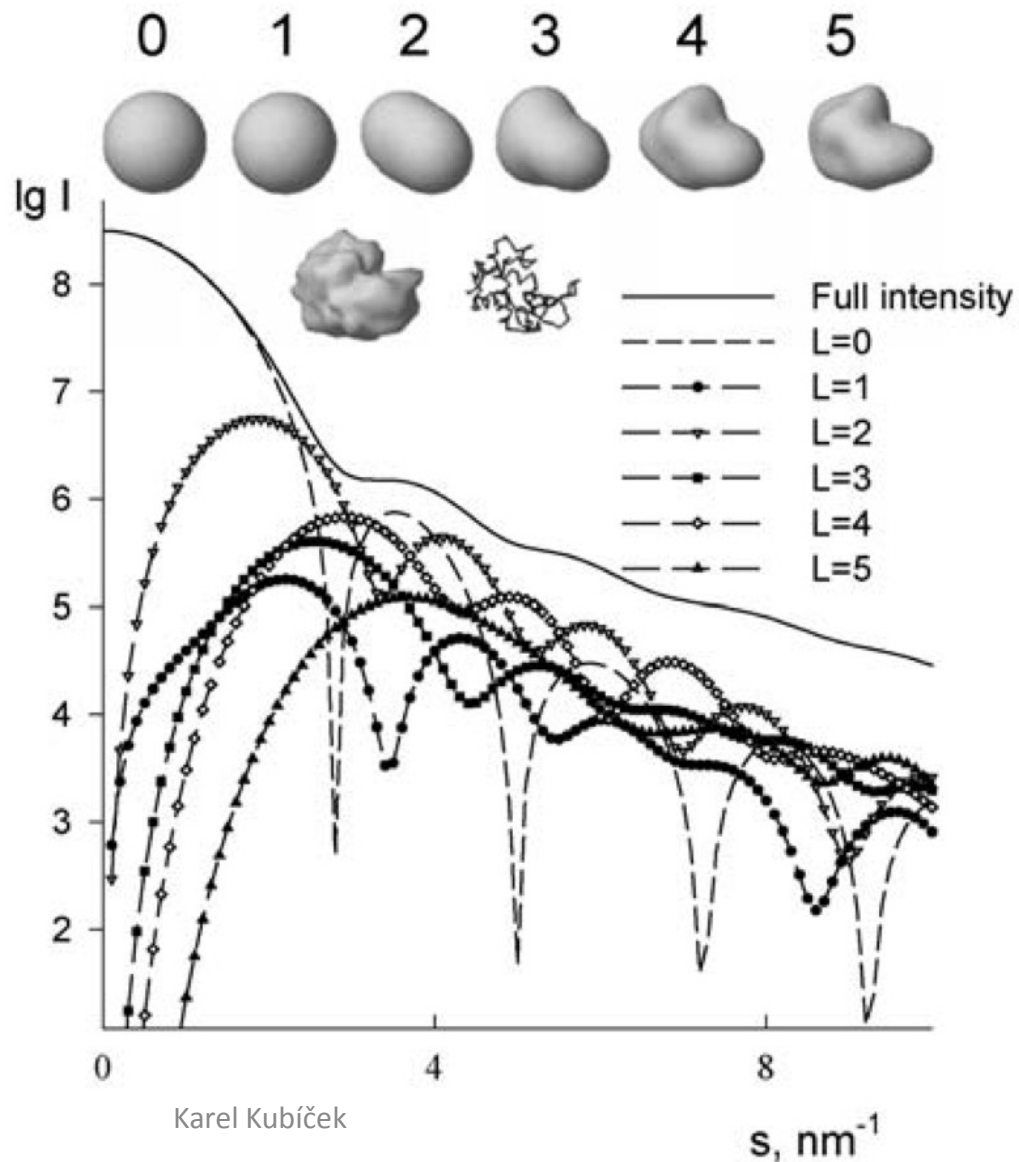
What can we learn from the scattering curve:

- 1) Shape of the studied molecule
- 2) Fold
- 3) Secondary structure



Bead model

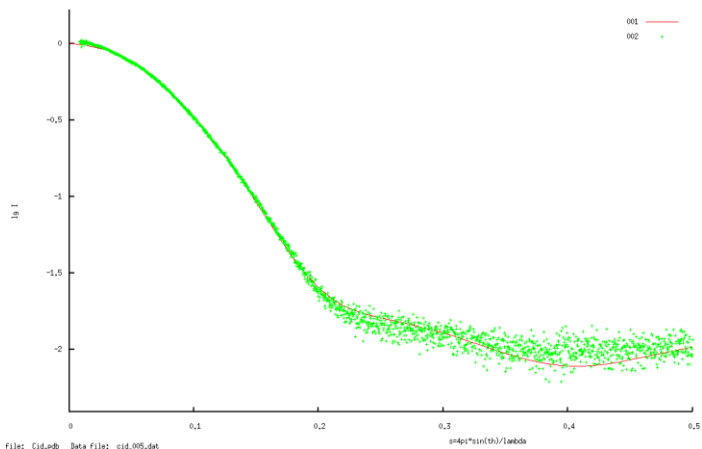
Spherical harmonics problem to be solved



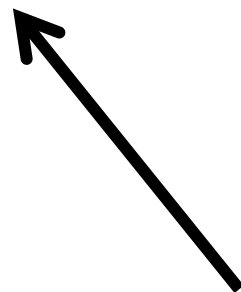
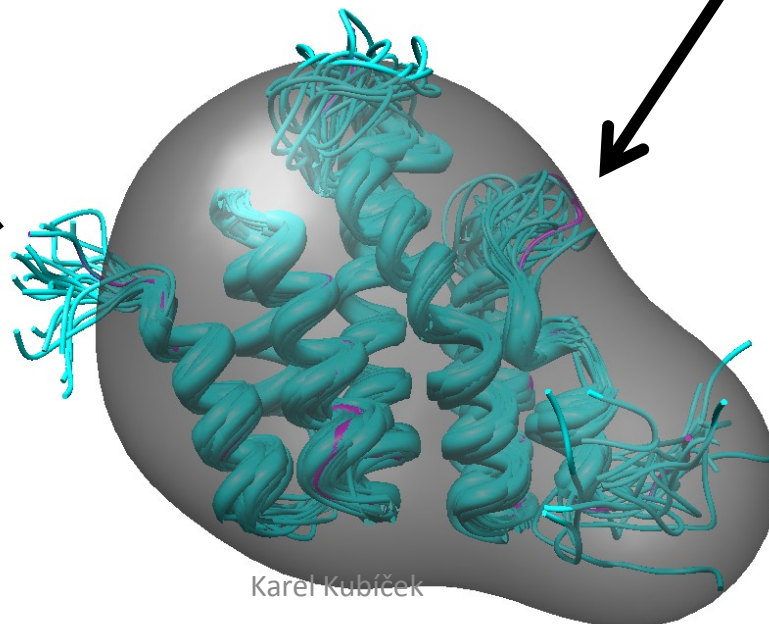
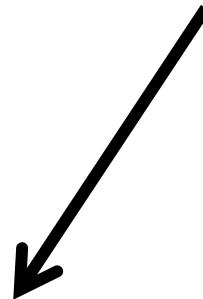
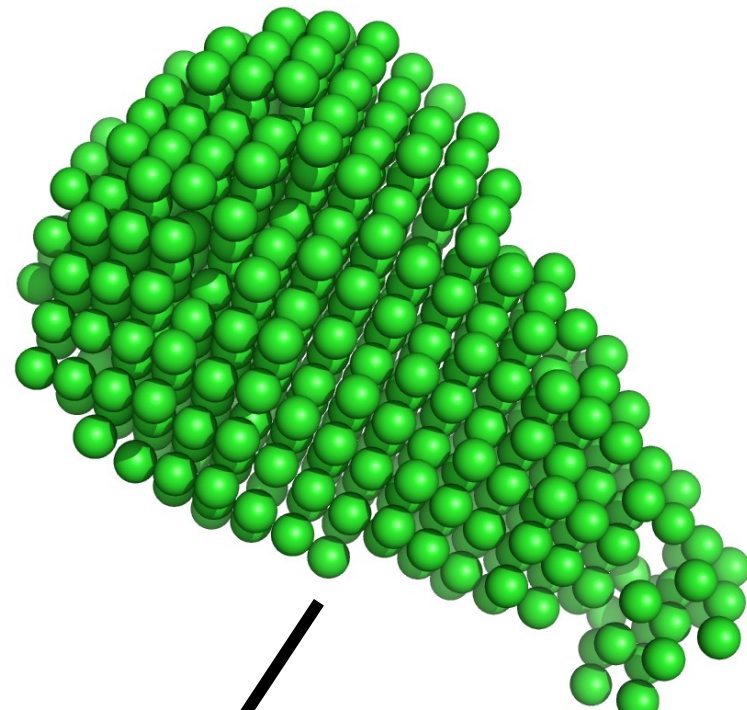
Evaluation of the experimental data

12-Nov-2011 15:18:12

Dos: 0,075 Res: 1,469 RSE: 18,53 ROT: 18,22 Vol: 488476, Dns: 1,472



PDB File: cid.pdb Data file: cid_005.dat



NMR

1) Jaderný spin $\neq 0$ (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P)

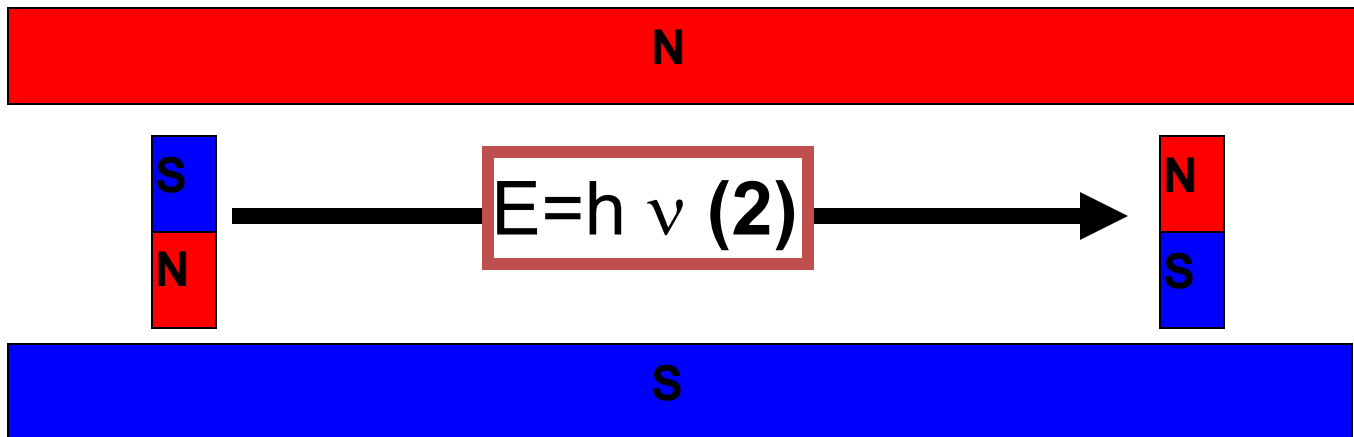
- počet neutronů **a** počet protonů jsou sudá čísla ($^{12}\text{C}=6\text{p}+6\text{n}$) \Rightarrow **nulový spin**

- počet neutronů **plus** počet protonů je liché číslo ($^1\text{H}=\text{p}$, $^{13}\text{C}=6\text{p}+7\text{n}$) \Rightarrow **neceločíselný spin** (i.e. $1/2$, $3/2$, $5/2$)

- počet neutronů **a** počet protonů jsou lichá čísla ($^2\text{H}=\text{p}+\text{n}$) \Rightarrow **celočíselný spin** (i.e. 1, 2, 3)

1) $\nu = \gamma \cdot B$ (1) – pokud vložíme do magnetického pole intezity **B**, jádro mající nenulový spin může absorbovat foton frekvence ν . Frekvence ν závisí na gyromagnetickém poměru γ jader

2) Z kvantové mechaniky víme, že spin I může nabývat $2I + 1$ orientací \Rightarrow **jádro se spinem $1/2$ může mít dvě orientace v externím magnetickém poli – nižší / vyšší energie**



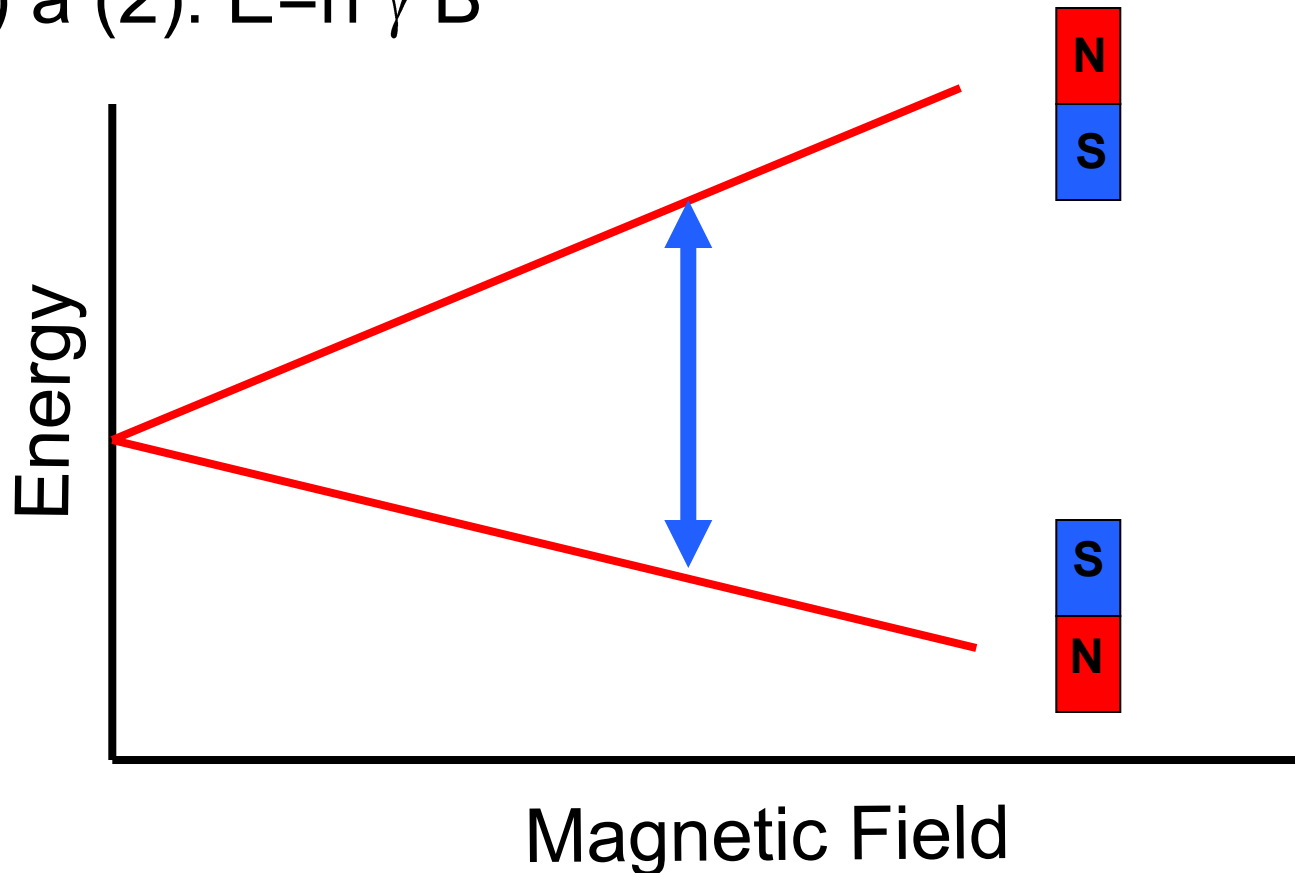
Resonanční podmínka $\omega_0 = -\gamma B_0$

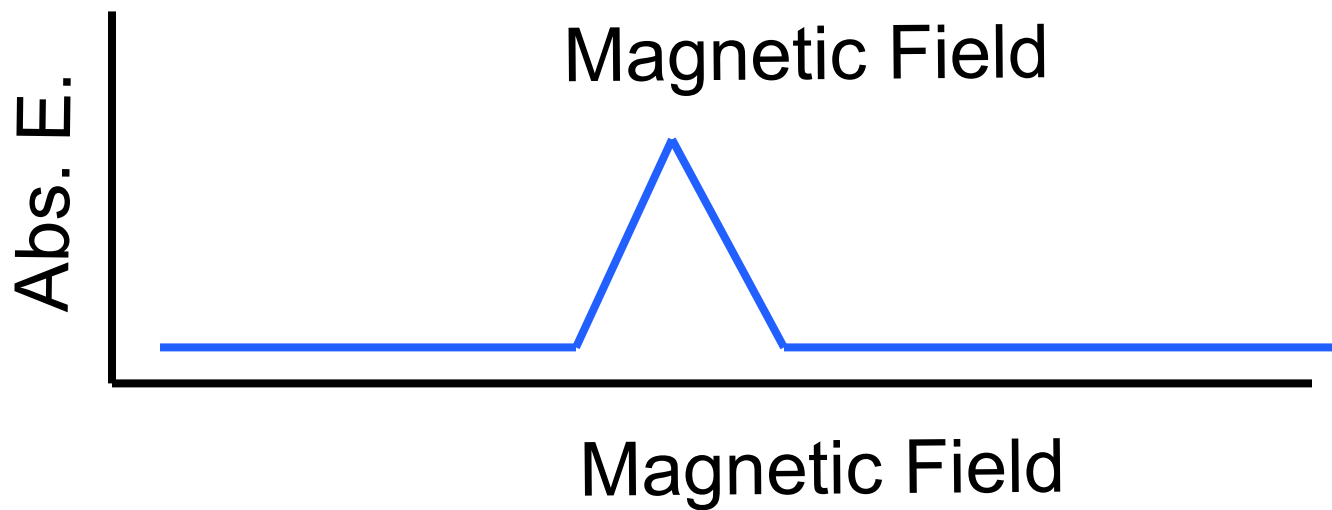
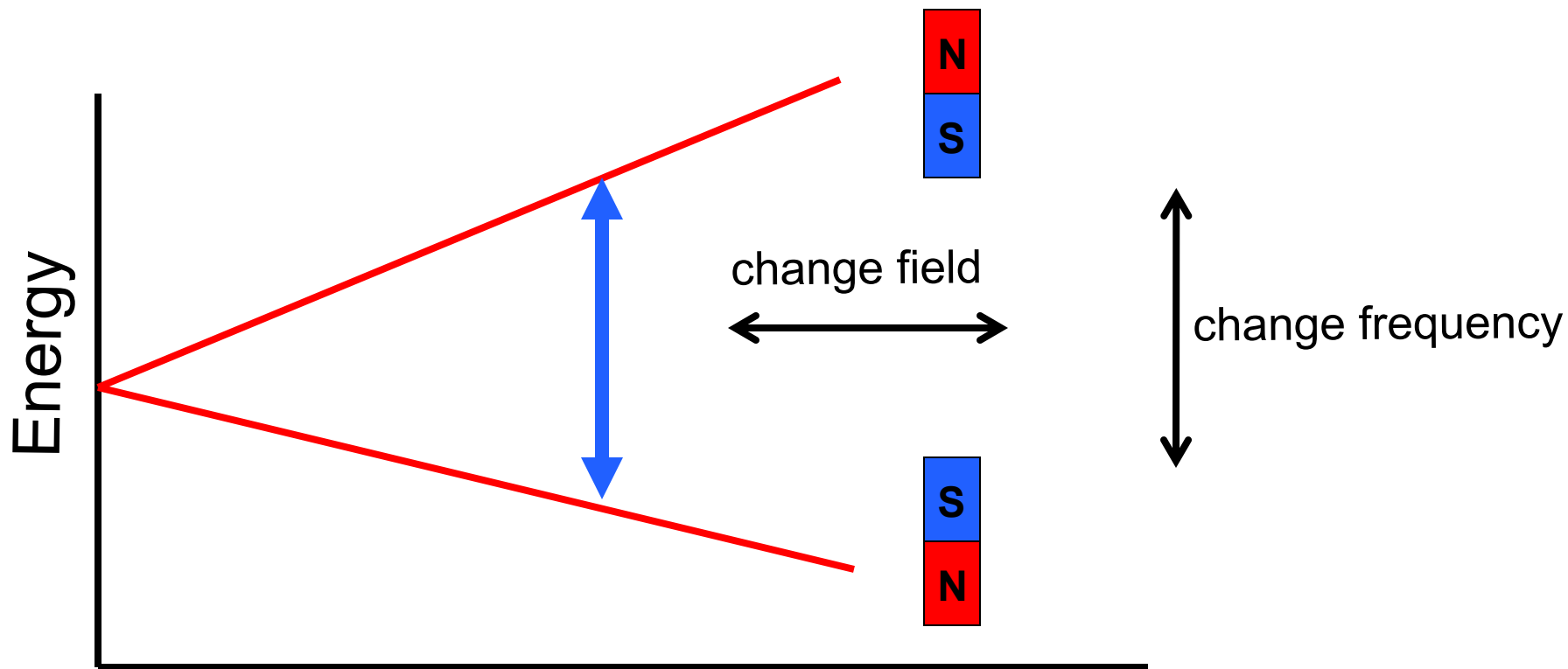
Isotope	Ground state spin	Natural abundance	Magnetogyric ratio $\gamma/\text{rad s}^{-1} \text{T}^{-1}$	NMR frequency at 11.7433 T ($\nu^0 \cdot 2\pi$)/MHz
^1H	1/2	~100	267.522×10^6	500.000
^2H	1	0.015%	$41\,066 \times 10^6$	76.753
^3H	1/2	0	$285\,349 \times 10^6$	533 370
^{10}B	3	19.9	$28\,747 \times 10^6$	53 718
^{11}B	3/2	80.1%	85.847×10^6	-160 420
^{13}C	1/2	1.1%	67.283×10^6	125.725
^{14}N	1	99.6%	19.338×10^6	36 132
^{15}N	1/2	0.37%	$-27\,26 \times 10^6$	50.684
^{17}O	5/2	0.04%	-36.281×10^6	+67 782
^{19}F	1/2	~100%	251.815×10^6	-470.470
^{23}Na	3/2	~100%	70.808×10^6	-132 259
^{27}Al	5/2	~100%	69.763×10^6	- 30 285
^{29}Si	1/2	4.7%	-53.190×10^6	99.336
^{31}P	1/2	~100%	108.394×10^6	-202.606
^{35}Cl	3/2	75.77%	10.610×10^6	-48 990
^{37}Cl	3/2	24.23%	8.832×10^6	-40.779
^{63}Cu	3/2	69.17%	71.118×10^6	132 577
^{65}Cu	3/2	30.83%	76.044×10^6	-142.018
^{107}Ag	1/2	51.84%	-10.889×10^6	+ 20.239
^{109}Ag	1/2	48.16%	12.518×10^6	+23.268
^{129}Xe	1/2	24.4%	74.521×10^6	+ 139.045
^{207}Pb	1/2	22.1%	55.805×10^6	-104 603
^{12}C	0	98.9%		
^{16}O	0	~100%		

Nuclear Magnetic Resonance

Stručně

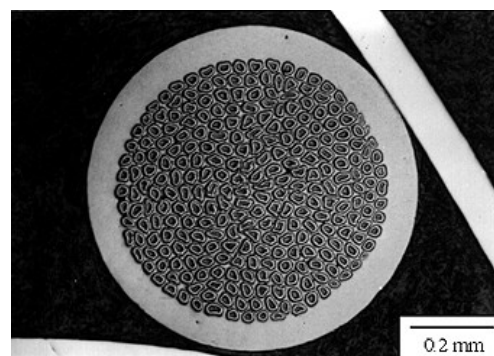
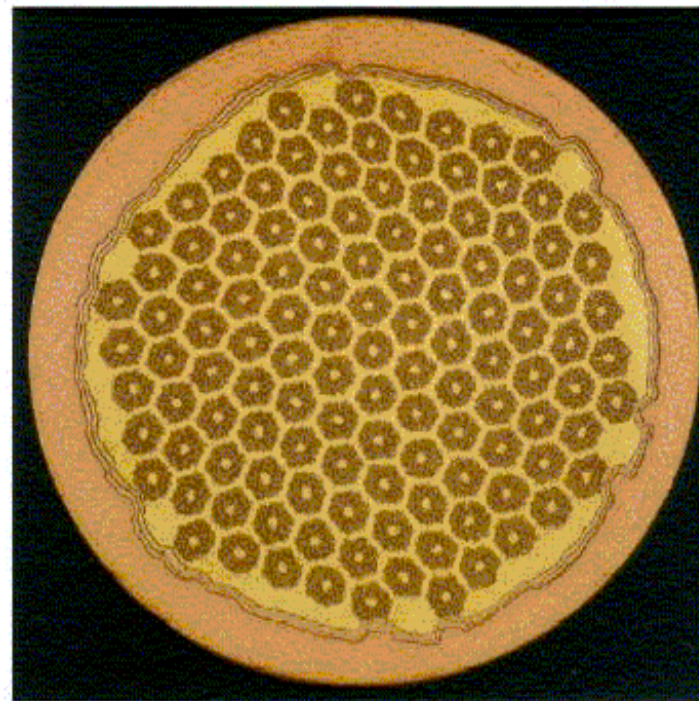
Z (1) a (2): $E = h \gamma B$



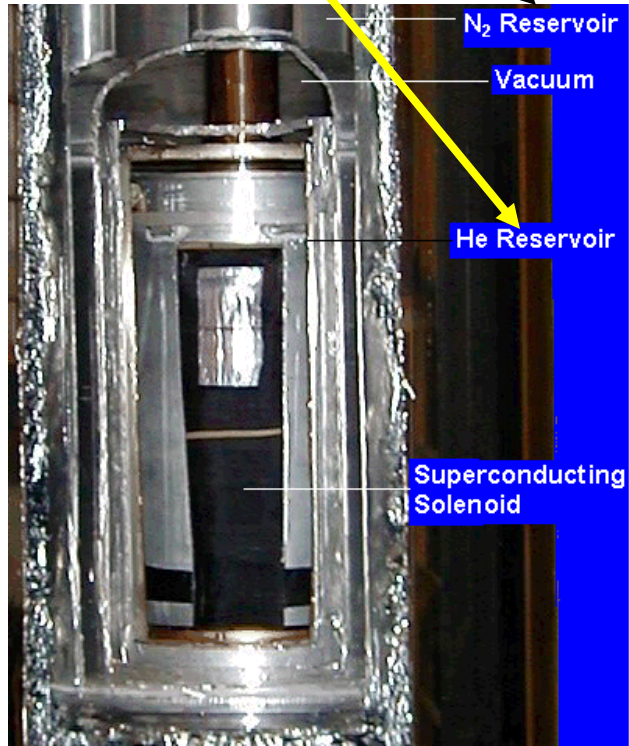
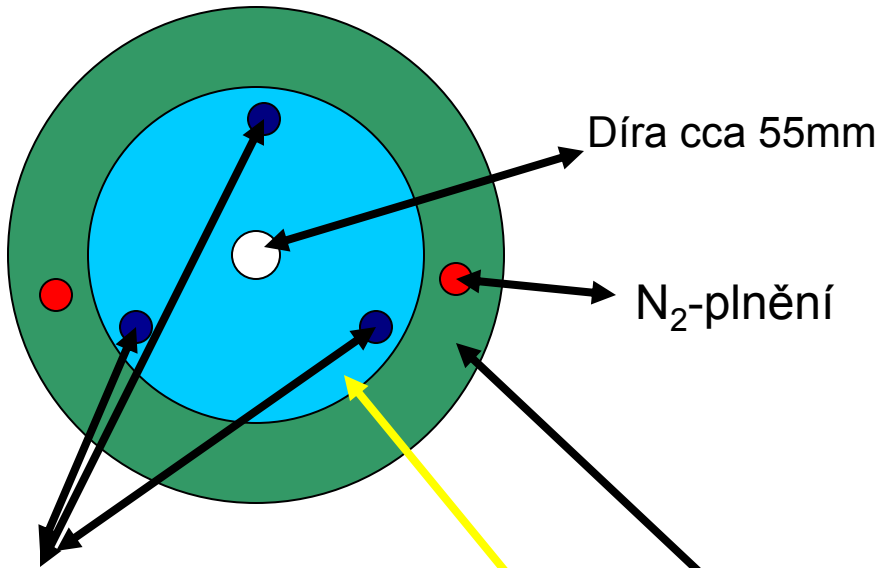


Magnet

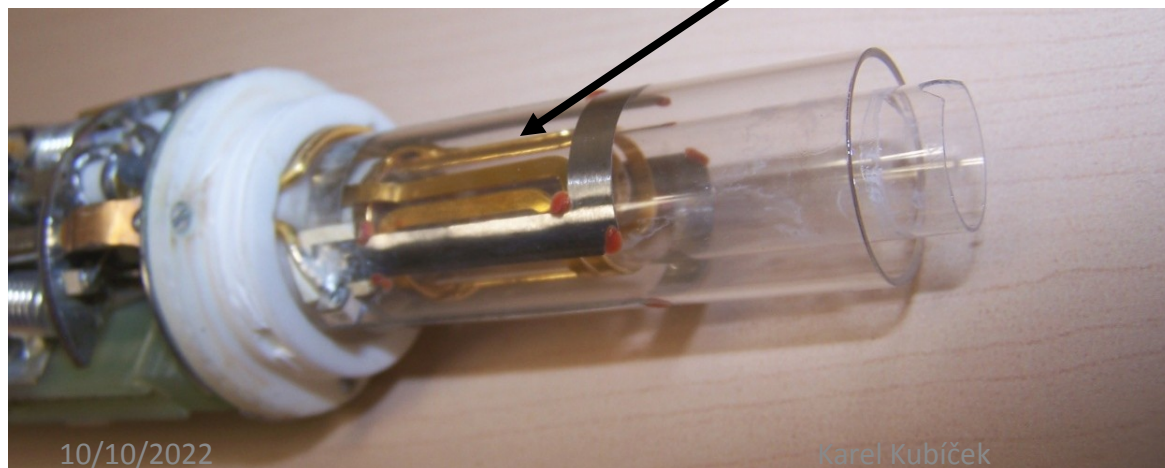
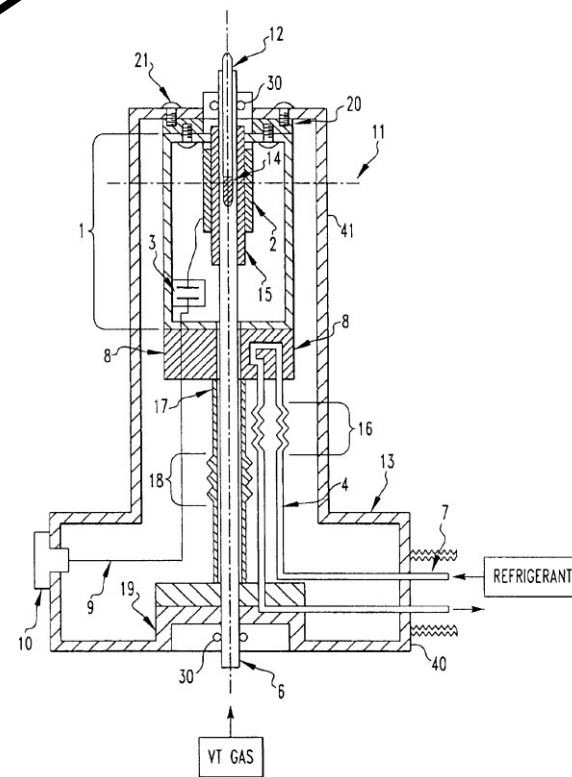
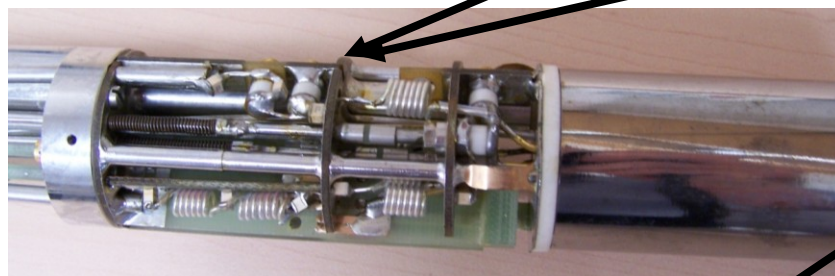
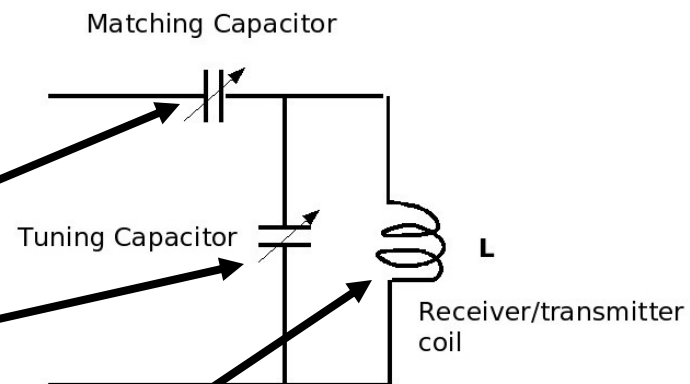
- supravodivé solenoidy na bázi
- Nb a Sn ponořené do heliové a dusíkové lázně
- He-lázeň **~4 K** dále snížena J-T
- pumpou na **~2.1 K**
- v současnosti až 22 Tesla
- magnetické pole země $\sim 50\mu\text{T}$



$(\text{Nb}, \text{Ta})_3\text{Sn}$ supravodič o šířce 0.81 mm s 271 vlákny vnořenými do OFHC měděné matrice



NMR měřicí sonda



CW vs. Fourier transform NMR

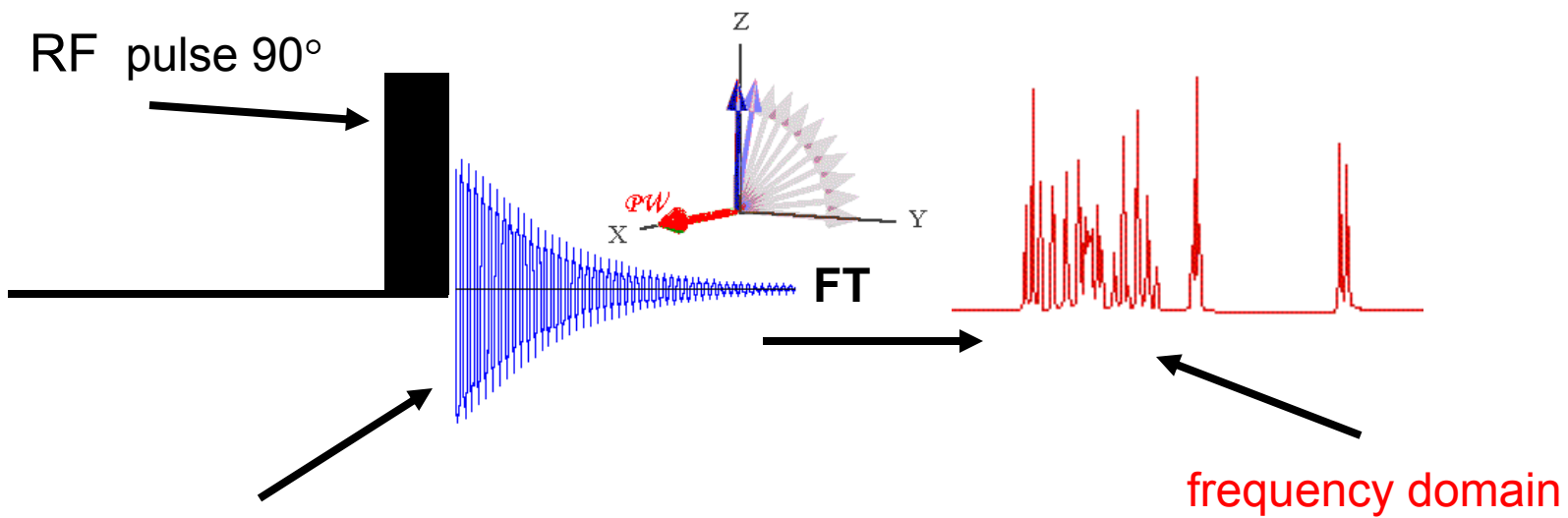
Solution II.

FT-NMR \Rightarrow *all frequencies* in a spectrum are *irradiated simultaneously* with a radio frequency pulse.

Following the pulse, the nuclei return to thermal equilibrium. A signal is recorded by the instrument as the nuclei relax.

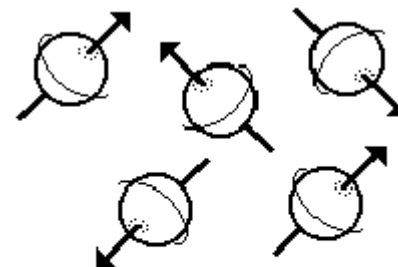
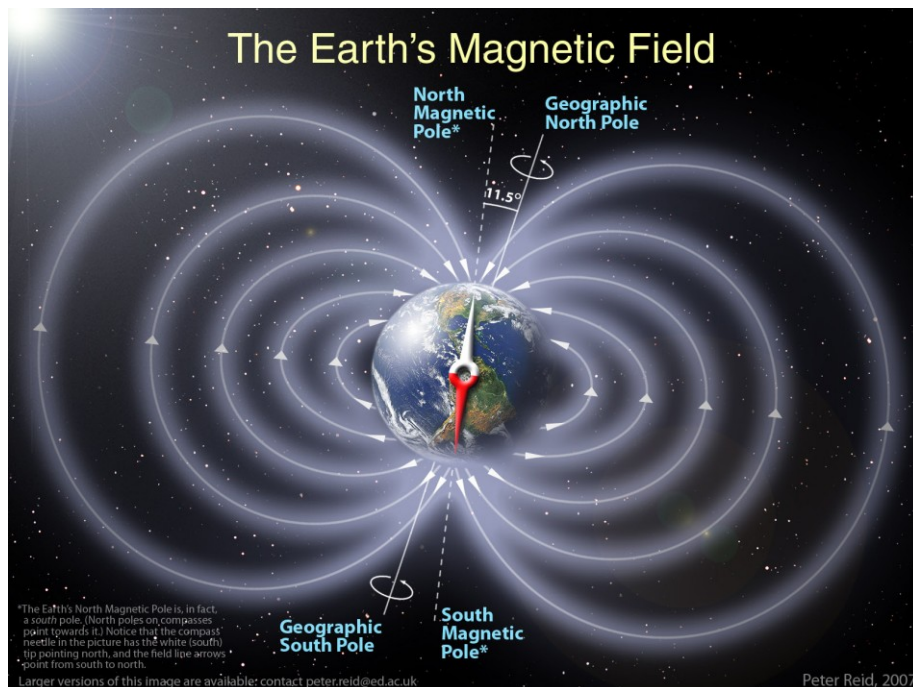
time domain emission

A *frequency domain* spectrum is *obtained by Fourier transformation*.

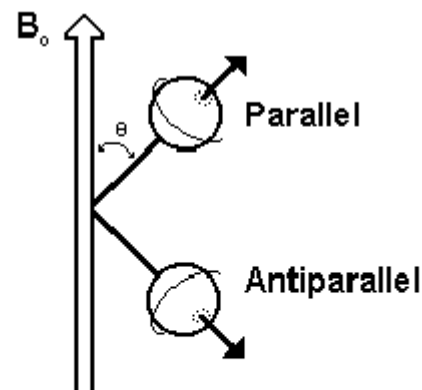


For NMR, nuclear spin is needed!!!

Spin analogy to a compass needle



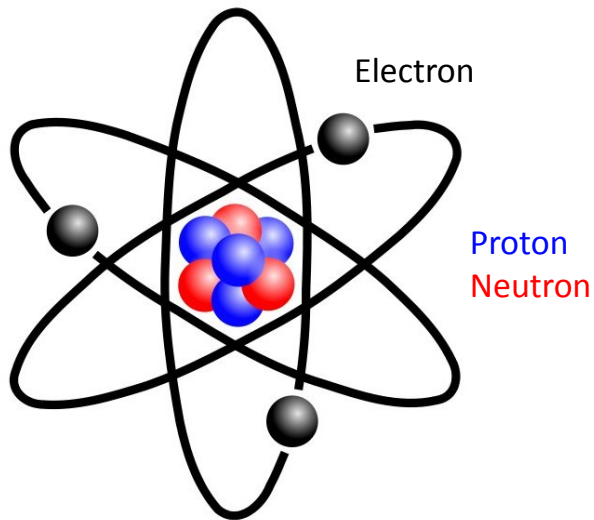
magnetic field = 0



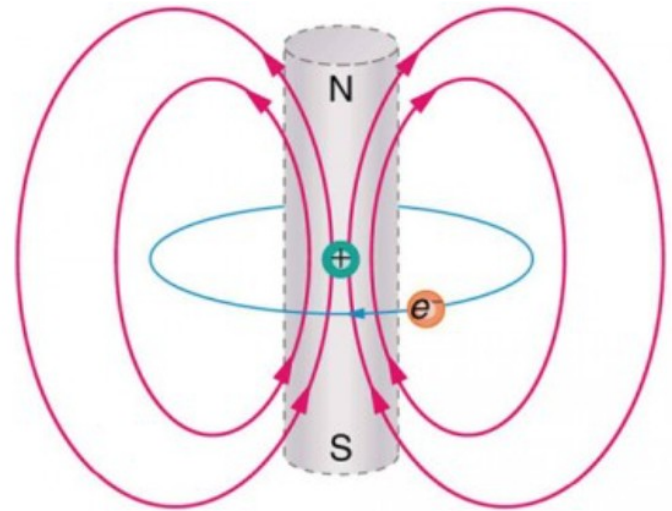
magnetic field > 0

Nuclear magnetic moments in the presence of an external field

Atom



=



In the planetary model of the atom, an **electron orbits a nucleus**, forming a closed-current loop and **producing a magnetic field** with a north pole and a south pole.

Molecule is hence a group of small magnetic fields and each atom within the molecule experiences different local magnetic field.

Size



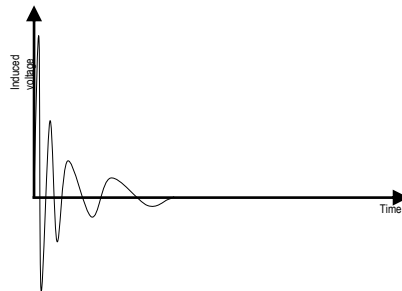
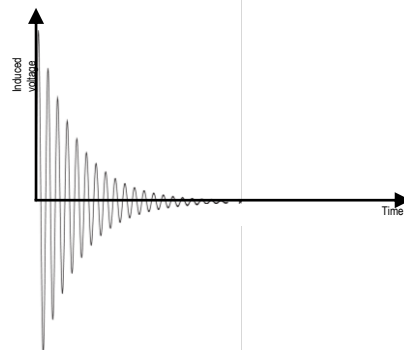
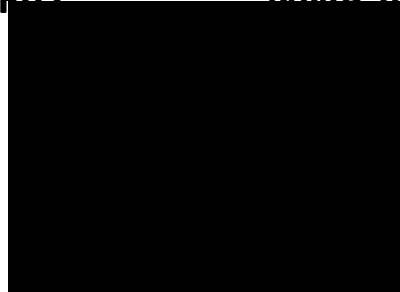
Relaxation

slow (i.e. long t_2 time)

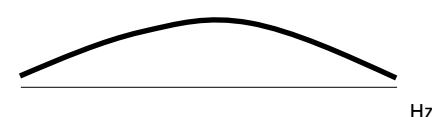
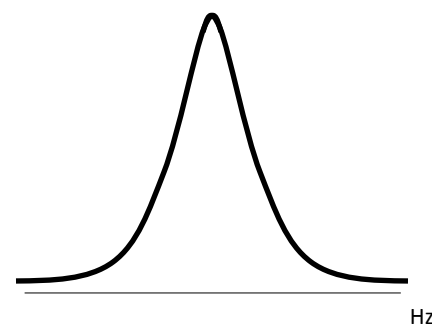
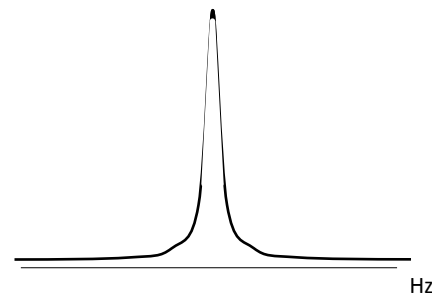
medium

fast

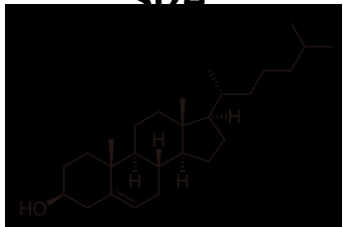
FID



NMR line(width) after FT



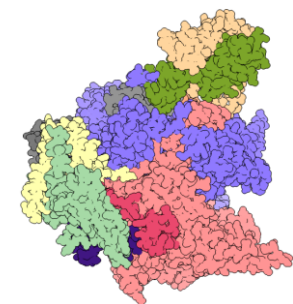
Size



e.g. Cholesterol



Biomolecules 5-30 kDa



Large molecules 50+ kDa

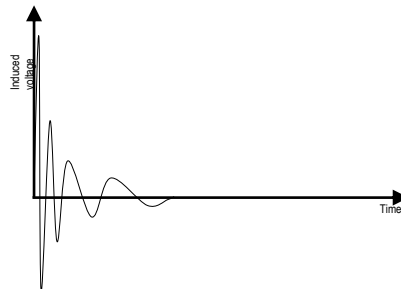
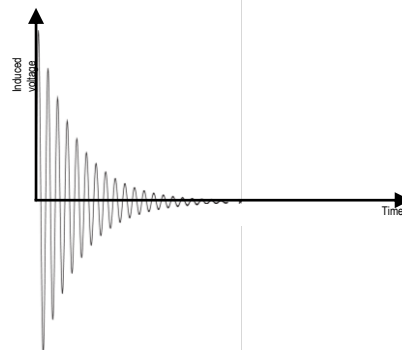
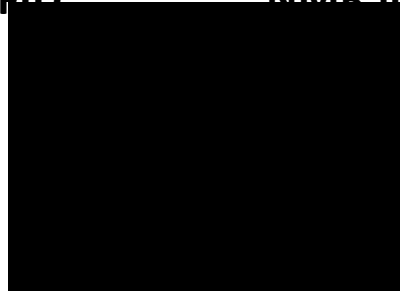
Relaxation

slow (i.e. long t_2 time)

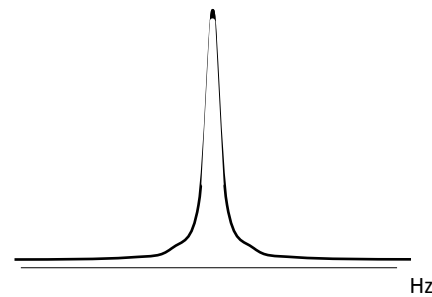
medium

fast

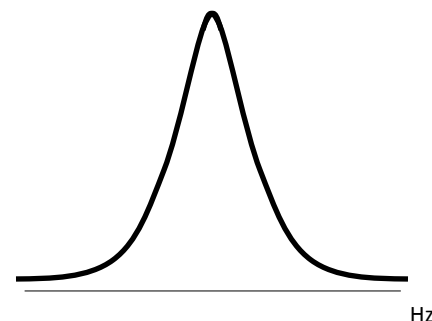
FID



NMR line(width) after FT



Hz



Hz

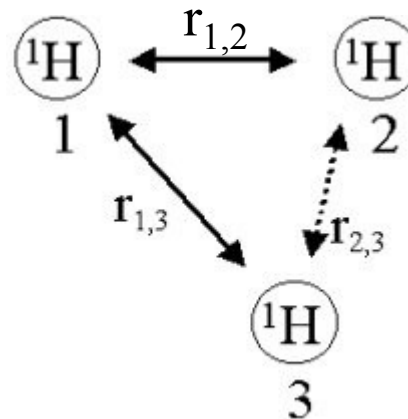
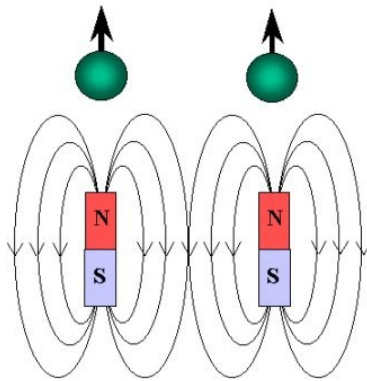


Hz

NMR as a tool for study structure, dynamics and interactions of biomolecules

- 0) AA/NA sequence, resonance assignment, standard chemical shifts
- 1) Structure determination of proteins/NAs
- 2) NMR can provide detailed information about the structure at the atomic level resolution relying on the spatial proximity of two interacting protons – nuclear Overhauser enhancement (NOE)
- 3) Additional structural information can be obtained (residual dipolar couplings – RDCs, J -couplings, backbone chemical shifts - CSI)

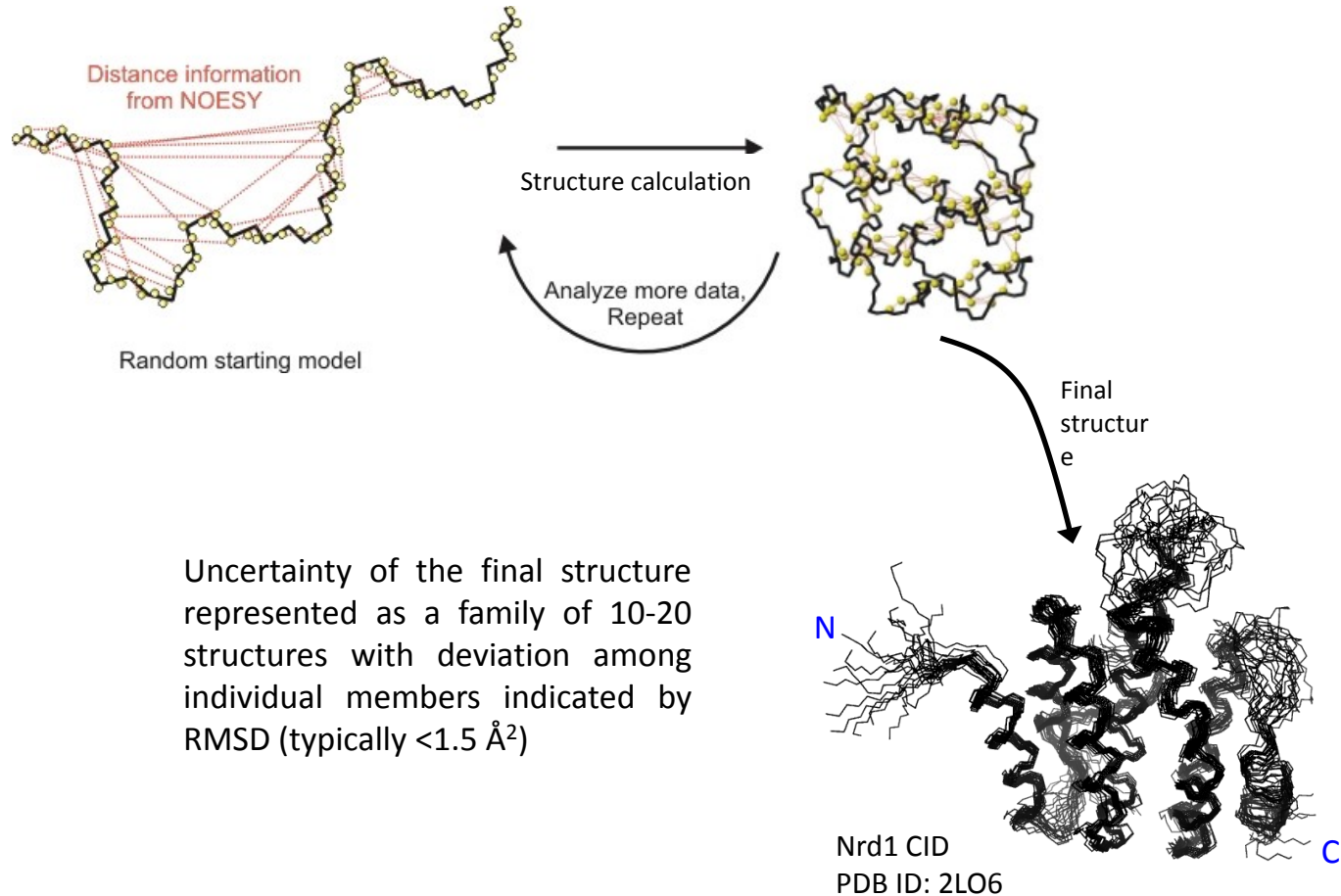
NOE:



$$r_{1,2}; r_{1,3}; r_{2,3} \leq 6 \text{ \AA}$$

$$1 \text{ \AA} = 1.10^{-10} \text{ m}$$

Iterative procedure of structure determination by NMR

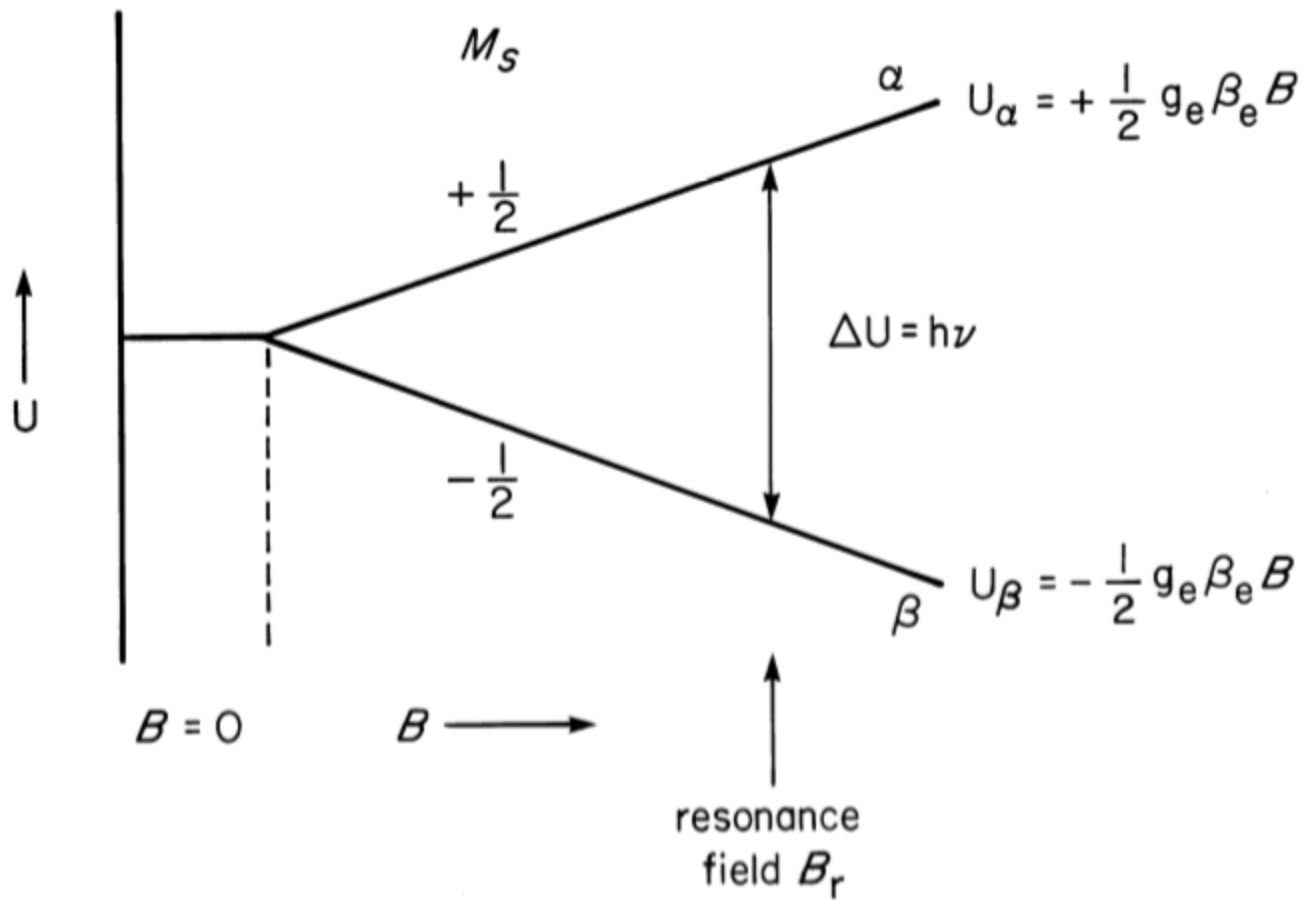


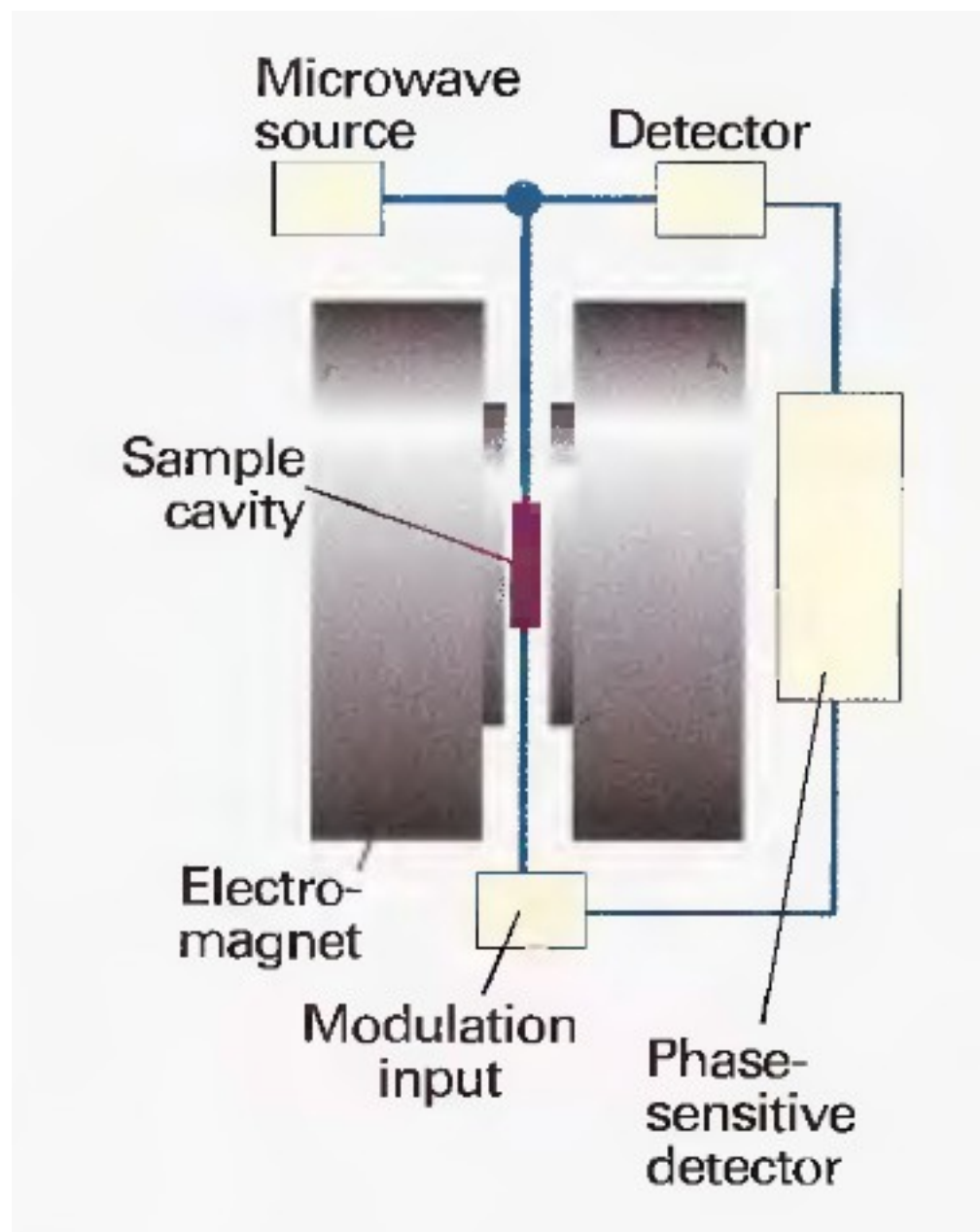
http://www.fbregents.com/basics_nmr/9proteins.htm

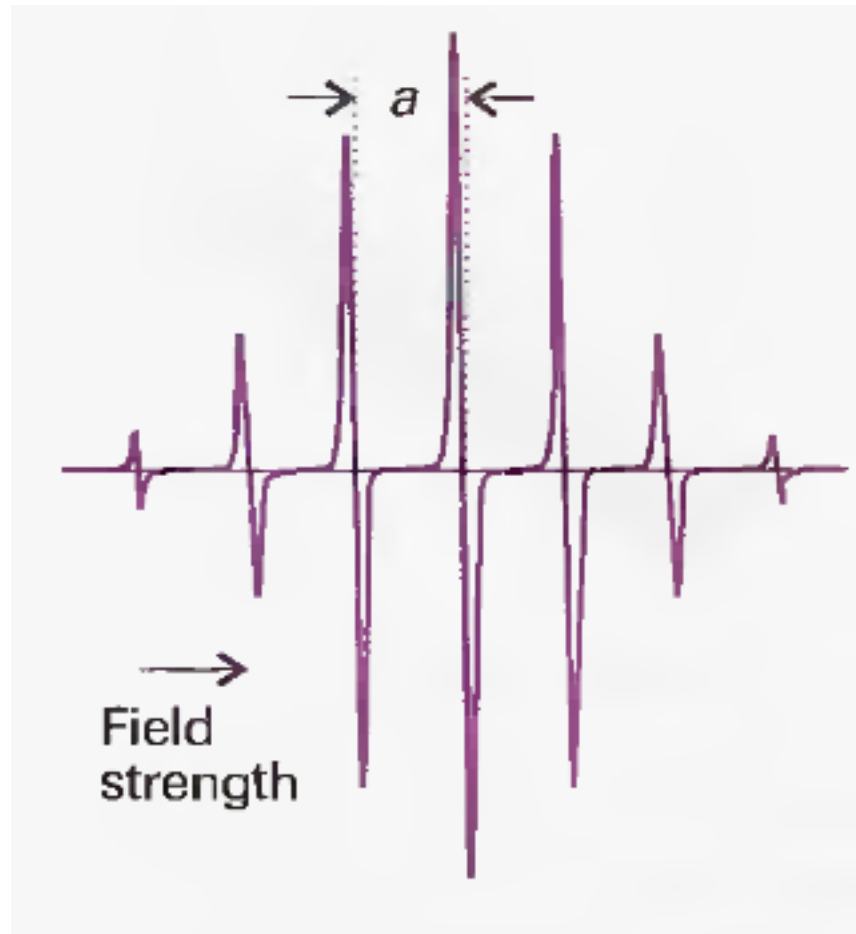
EPR - Electron Paramagnetic Resonance

When the molecules exhibit **paramagnetism** as a result of **unpaired electron** spins, transitions can be induced between spin states by applying a **magnetic field** and then supplying **electromagnetic energy**, usually in the **microwave range** of frequencies. The **resulting absorption spectra** are described as electron spin resonance (**ESR**) or electron paramagnetic resonance (**EPR**).

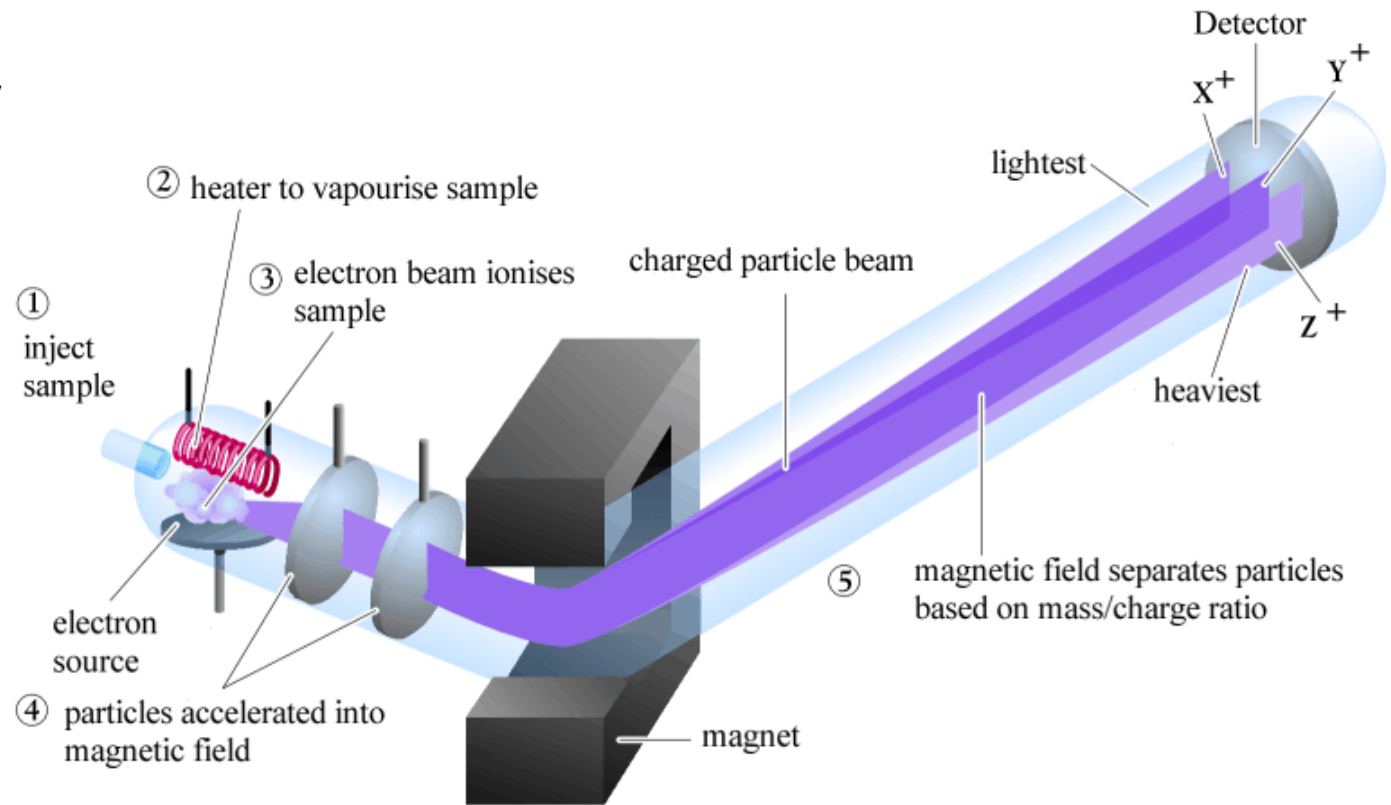
1st EPR experiment in Kazan (Tatarstan, USSR), E.K.Zavoisky on $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, rf source @133 MHz.







Mass spectrometry



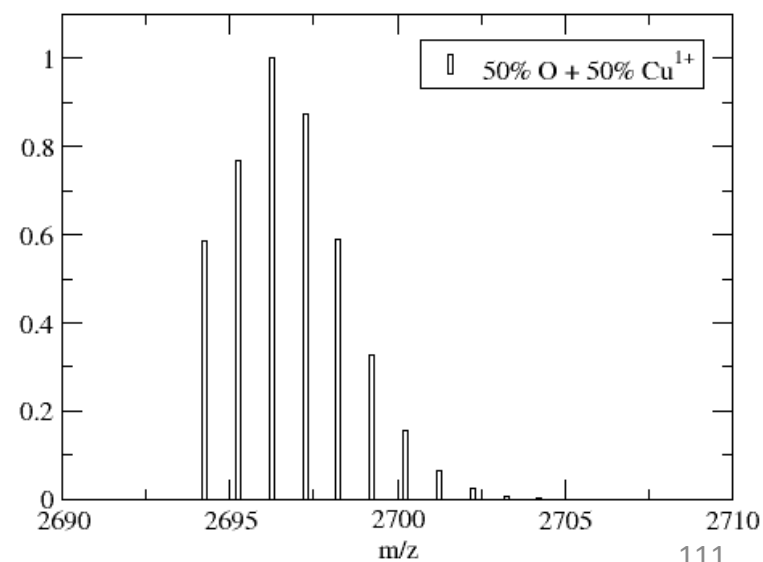
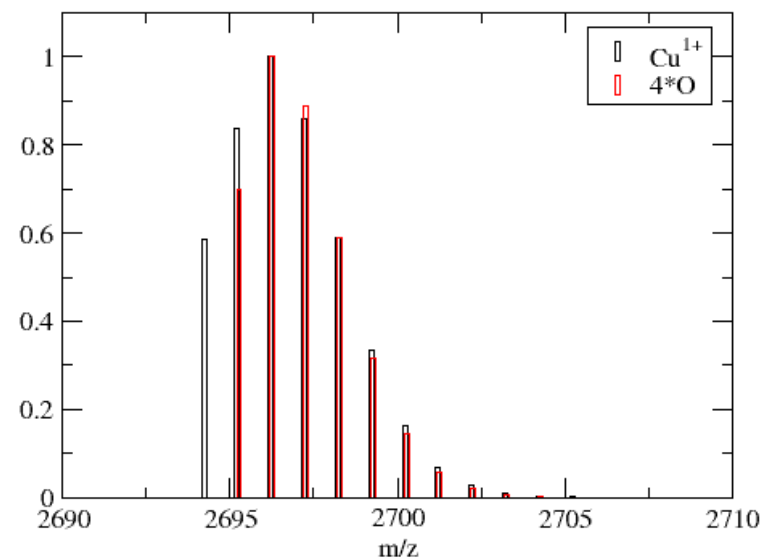
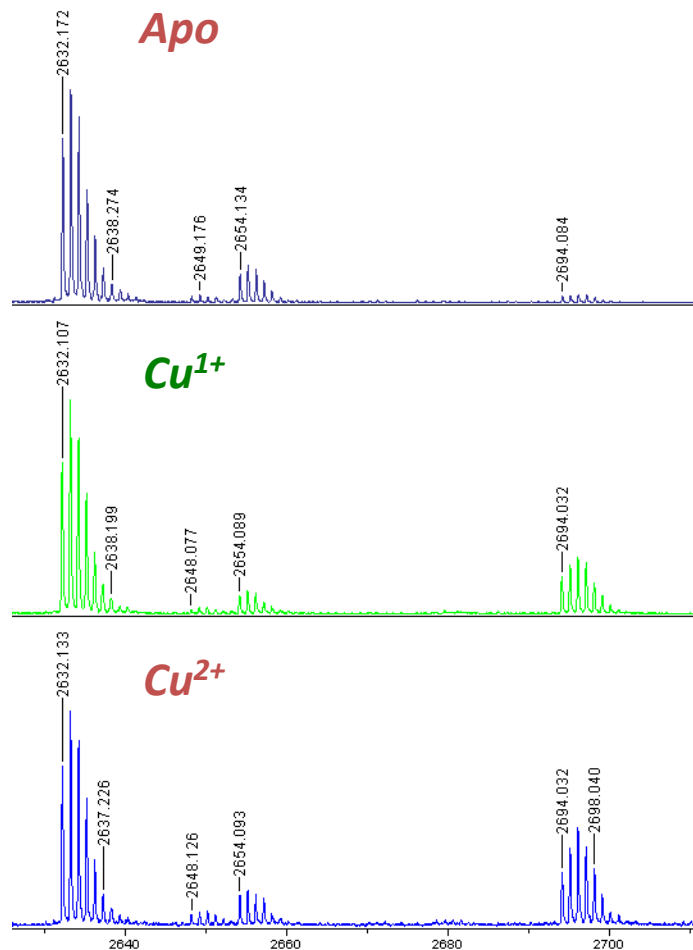
Mass spectrometry is among the most accurate techniques for the determination of molar masses. The procedure consists of ionizing the sample in the gas phase and then measuring the mass-to-charge number ratio (m/z) of all ions. Macromolecules present a challenge because it is difficult to produce gaseous ions of large species without fragmentation. However, two new techniques have emerged that circumvent this problem: **matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)** and **electrospray ionization**. We shall discuss **MALDI-TOF mass spectrometry**, so called because the MALDI technique is coupled to a time-of-flight (TOF) ion detector.

Peptide Mapping with MALDI TOF

Tryptic digestion o/n 1:30-50 (trypsin:protein)

Analysis with PAWS (Genomic Solutions, Inc.)

L61-K87



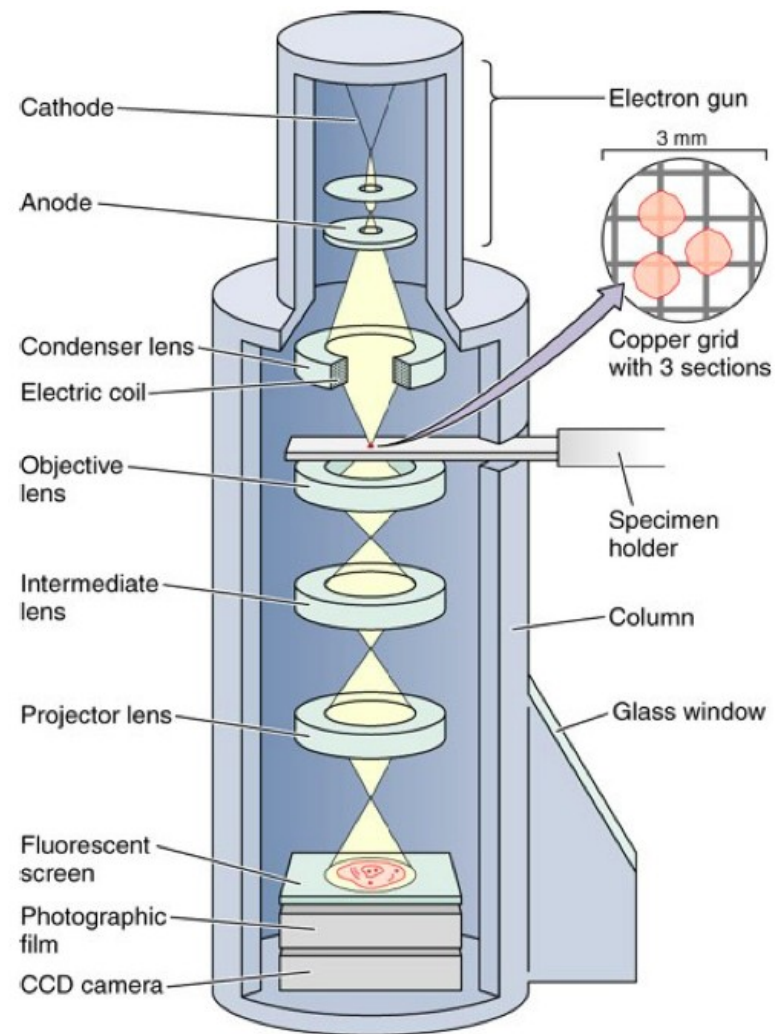
Elektronová mikroskopie

Credit to Jiří Nováček

Optický mikroskop

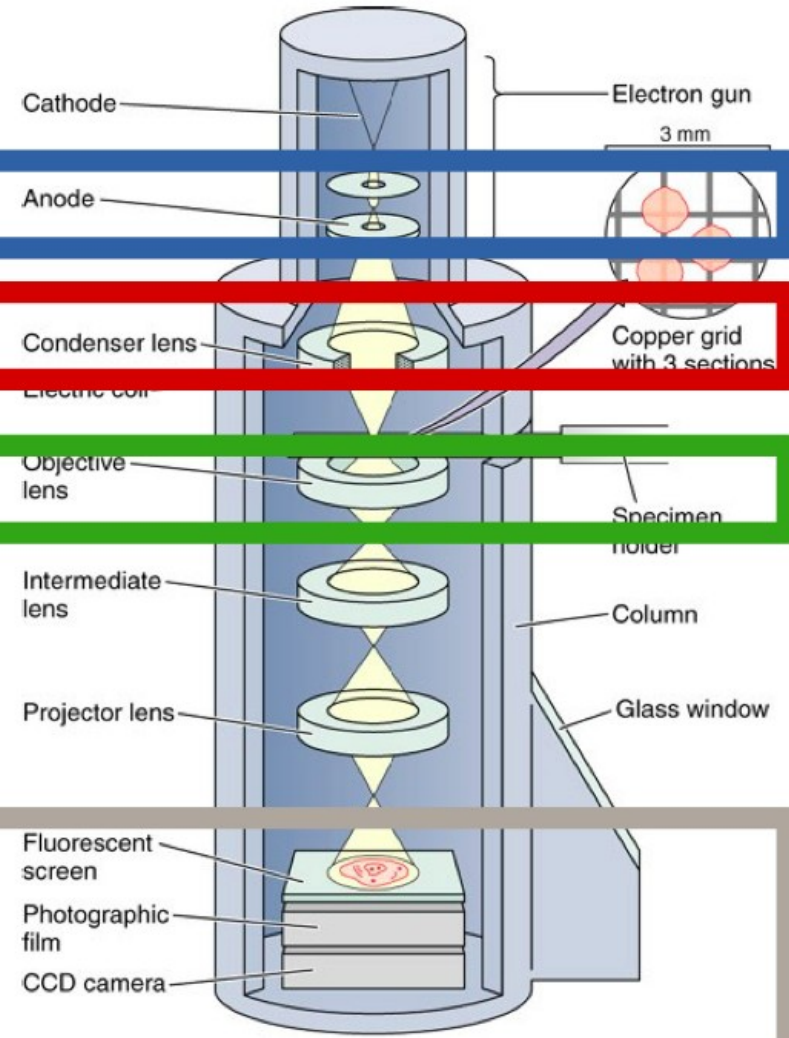
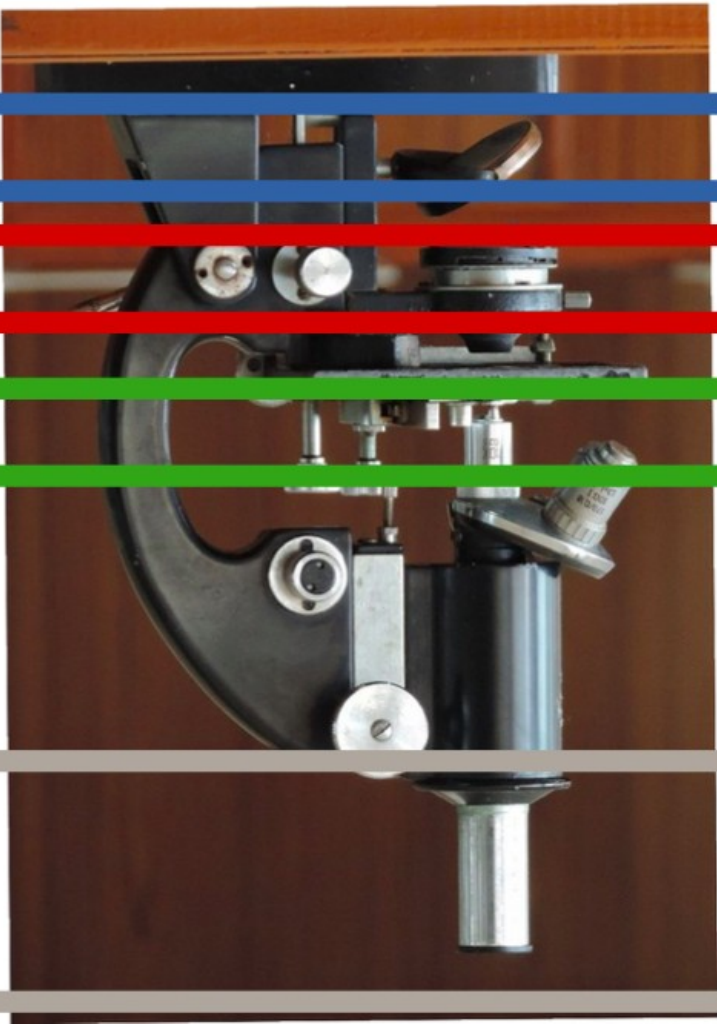


Elektronový mikroskop



Optický mikroskop

Elektronový mikroskop



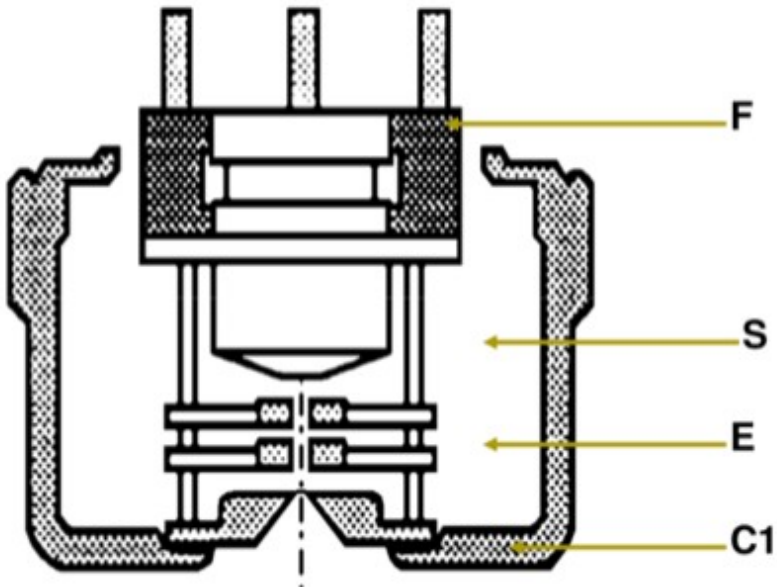
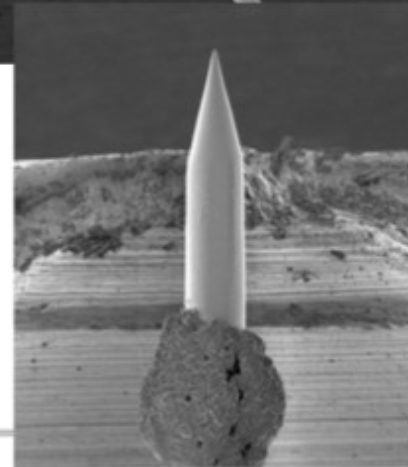
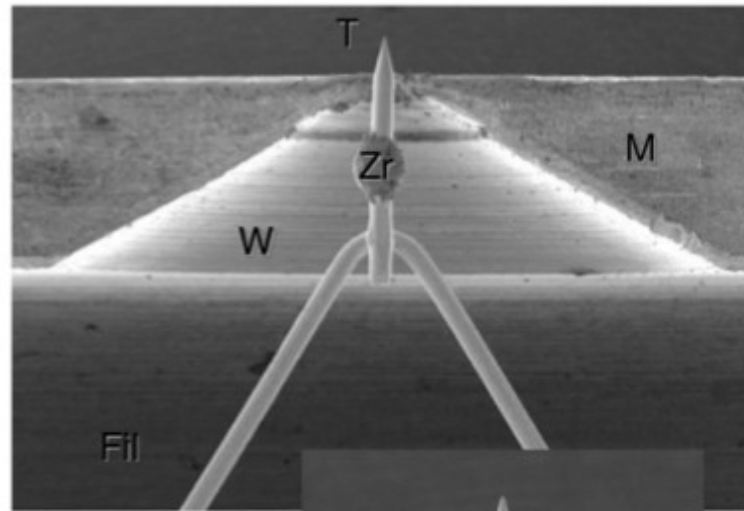
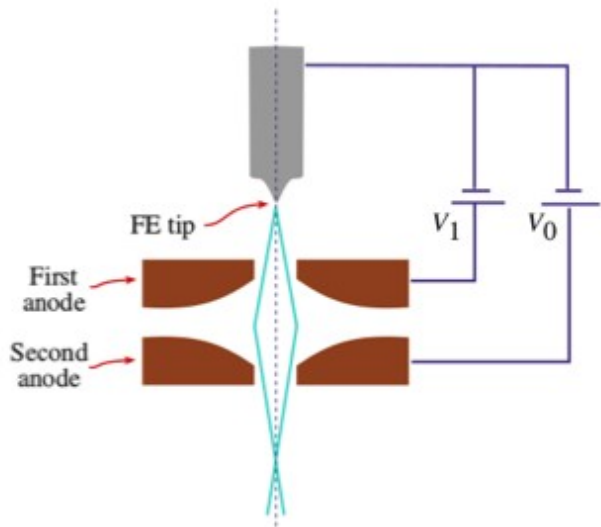
source

condensor

objective

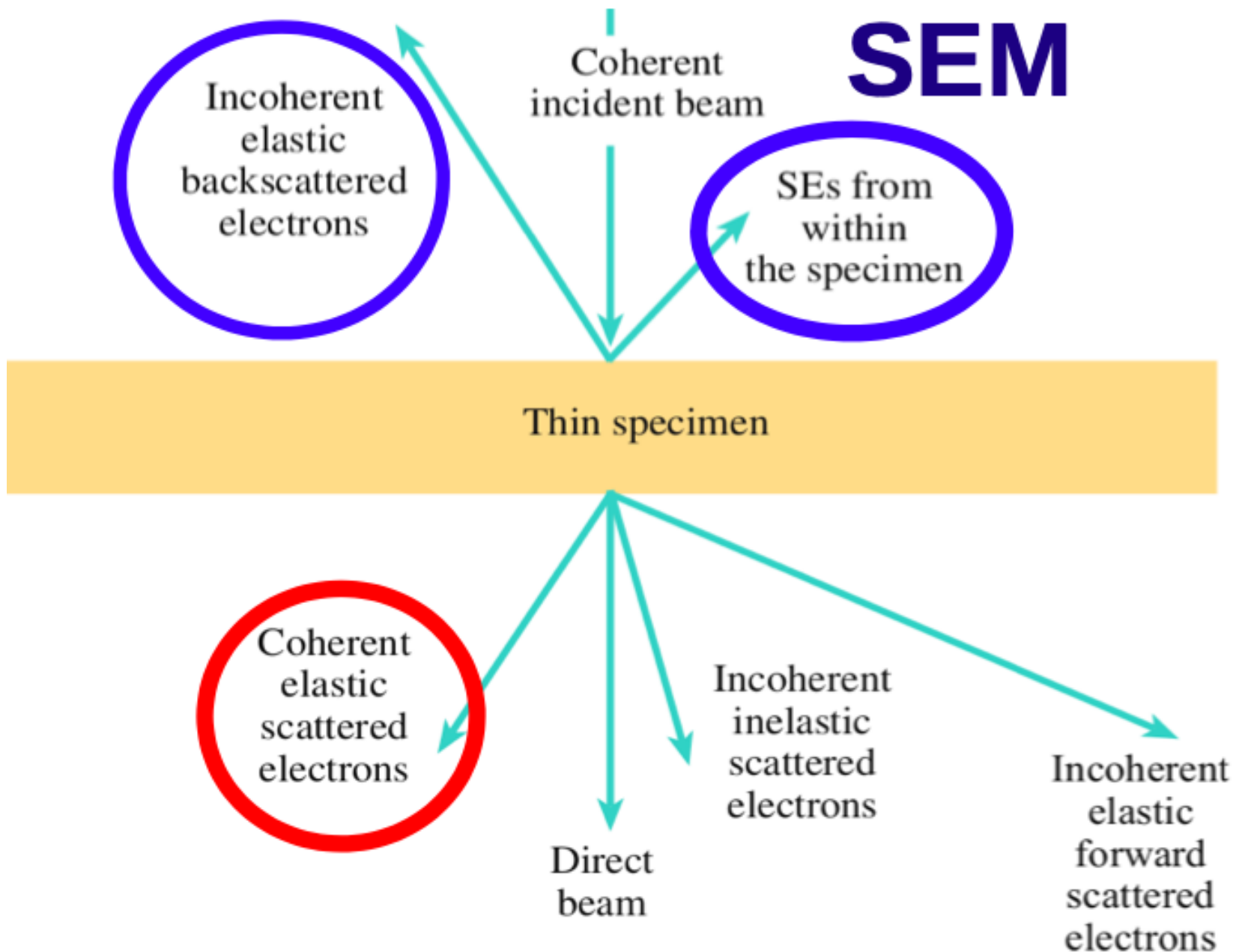
detector

Electron source - FEG

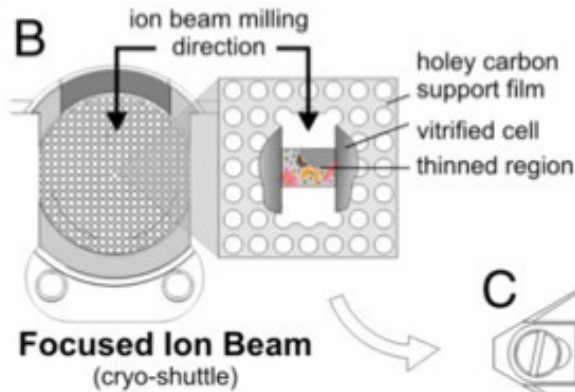
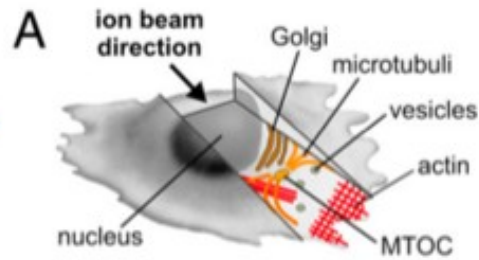
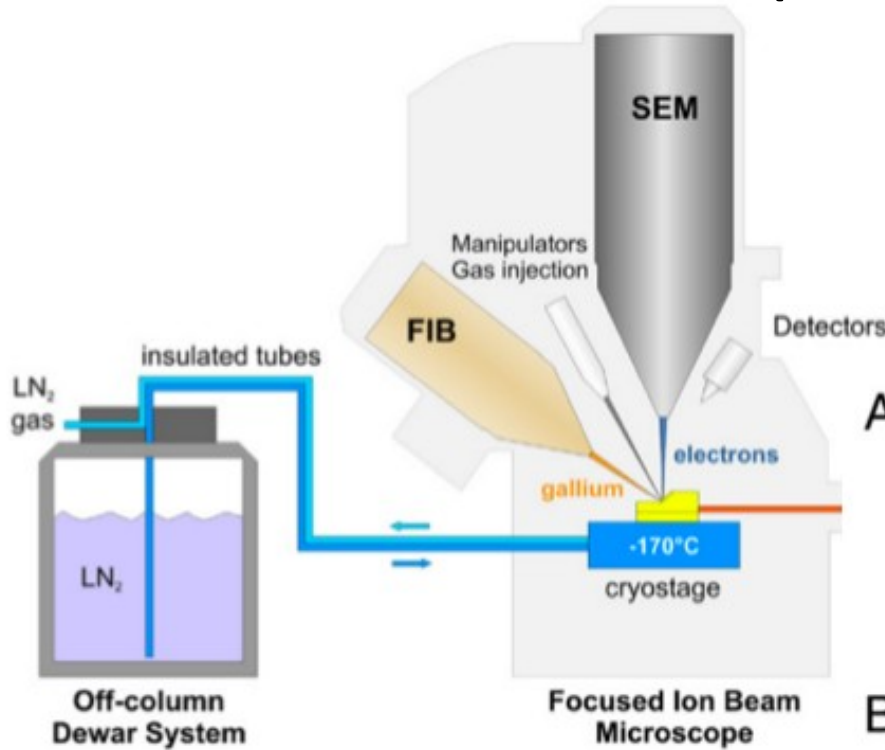


FEG - Field Emission Gun

SEM

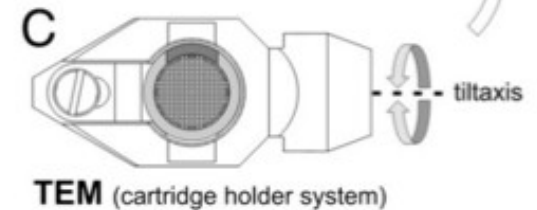
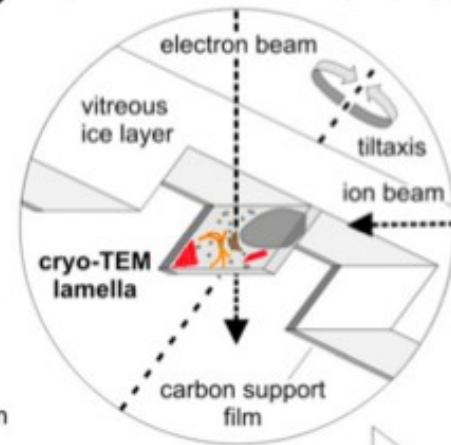


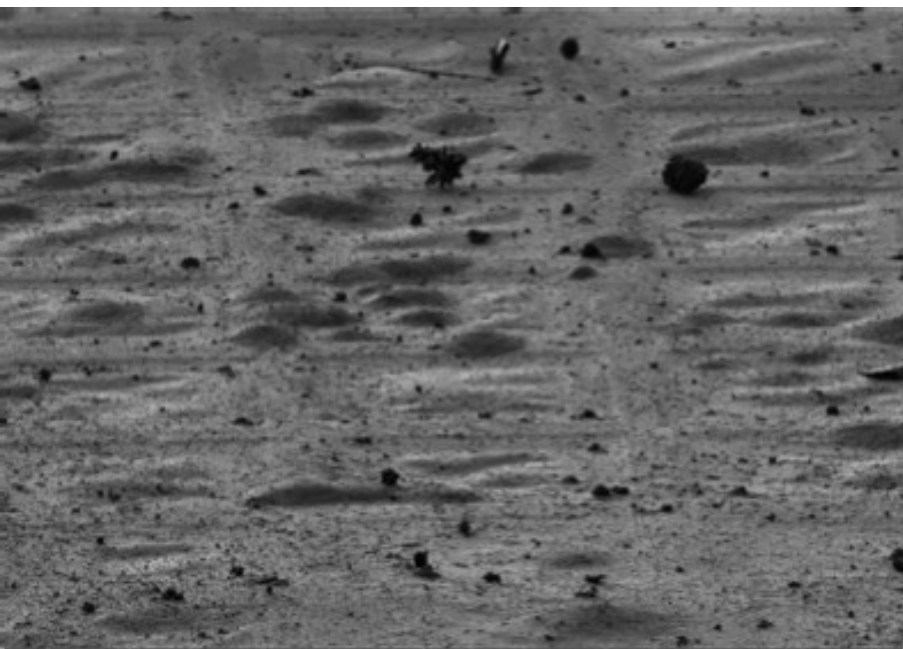
Focused Ion Beam (FIB) + SEM



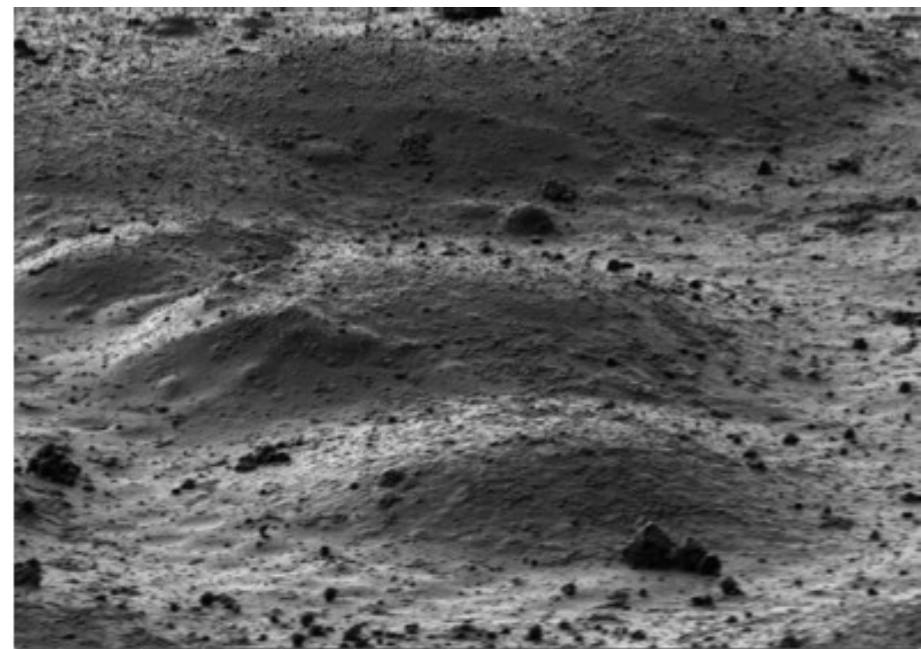
Focused Ion Beam
(cryo-shuttle)

D Cryo-Electron Tomography

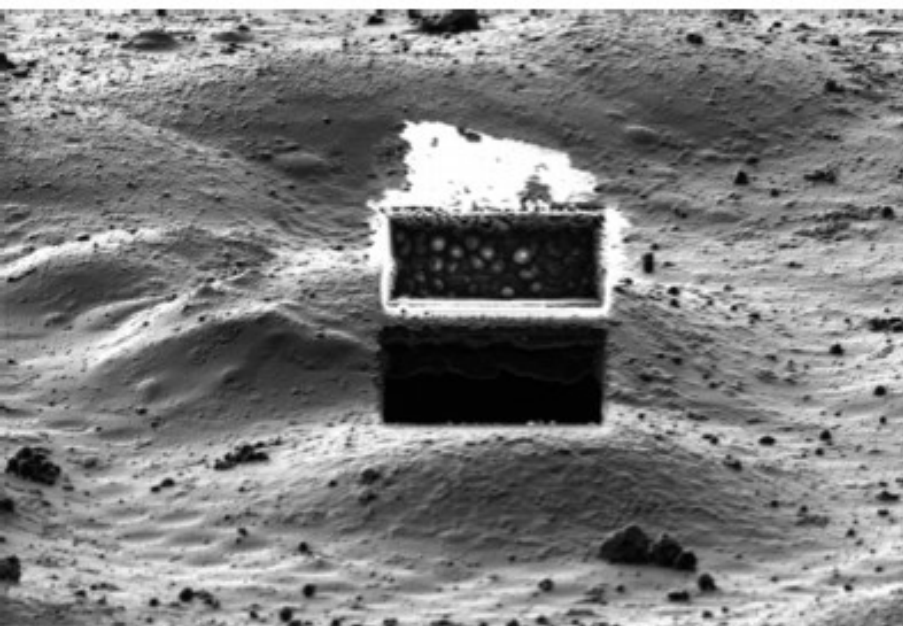




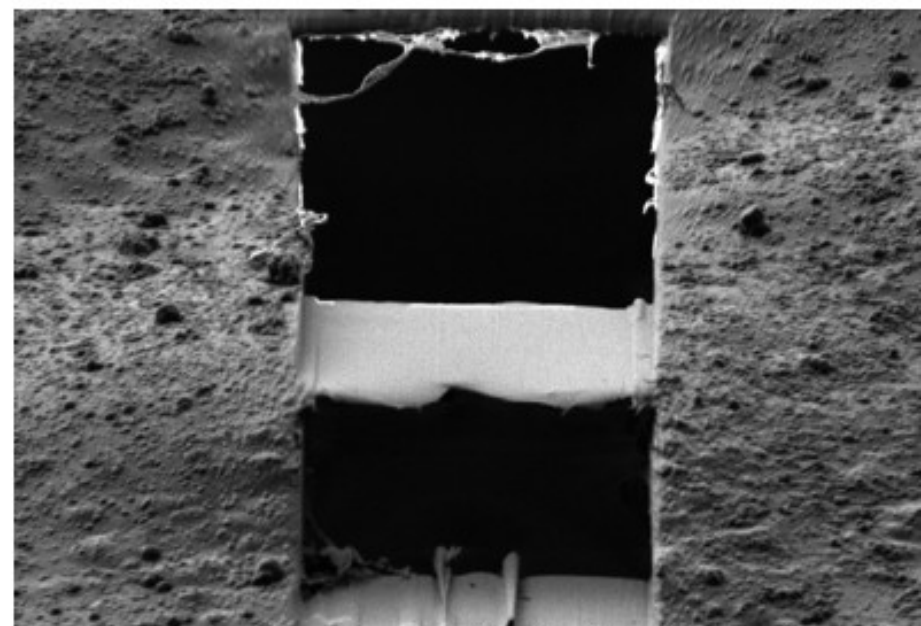
HV	curr	HPW	mag	pressure	det	mode	WD	tilt	Scale
30.00 kV	10 pA	319 μm	650 x	8.10e-5 Pa	ETD	SE	19.0 mm	10 °	50 μm
Versa 3D									



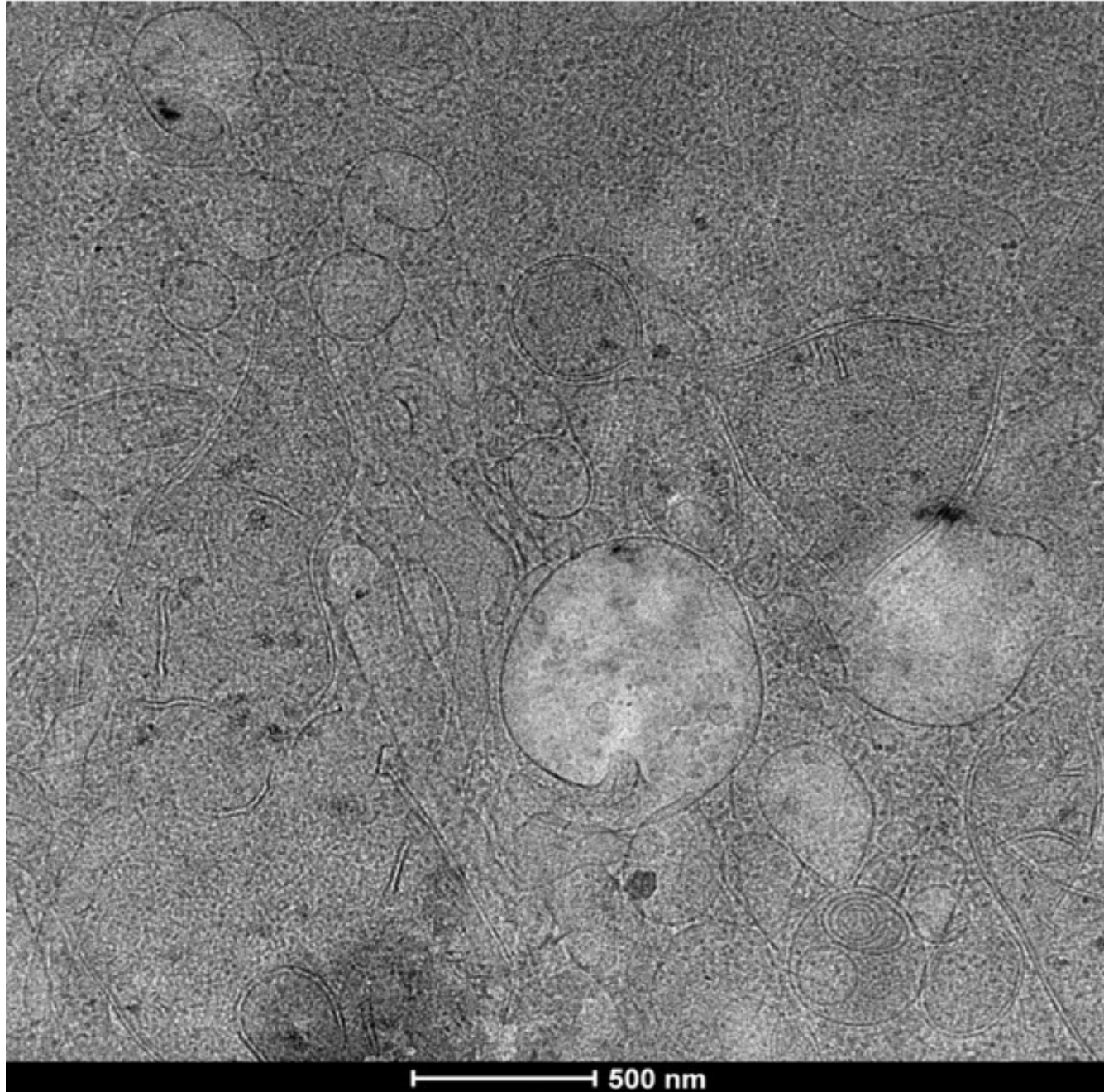
HV	curr	HPW	mag	pressure	det	mode	WD	tilt	Scale
30.00 kV	10 pA	41.4 μm	5 000 x	7.57e-5 Pa	ETD	SE	19.4 mm	10 °	5 μm
Versa 3D									



HV	curr	HPW	mag	pressure	det	mode	WD	tilt	Scale
30.00 kV	10 pA	41.4 μm	5 000 x	7.75e-5 Pa	ETD	SE	19.4 mm	10 °	5 μm
Versa 3D									

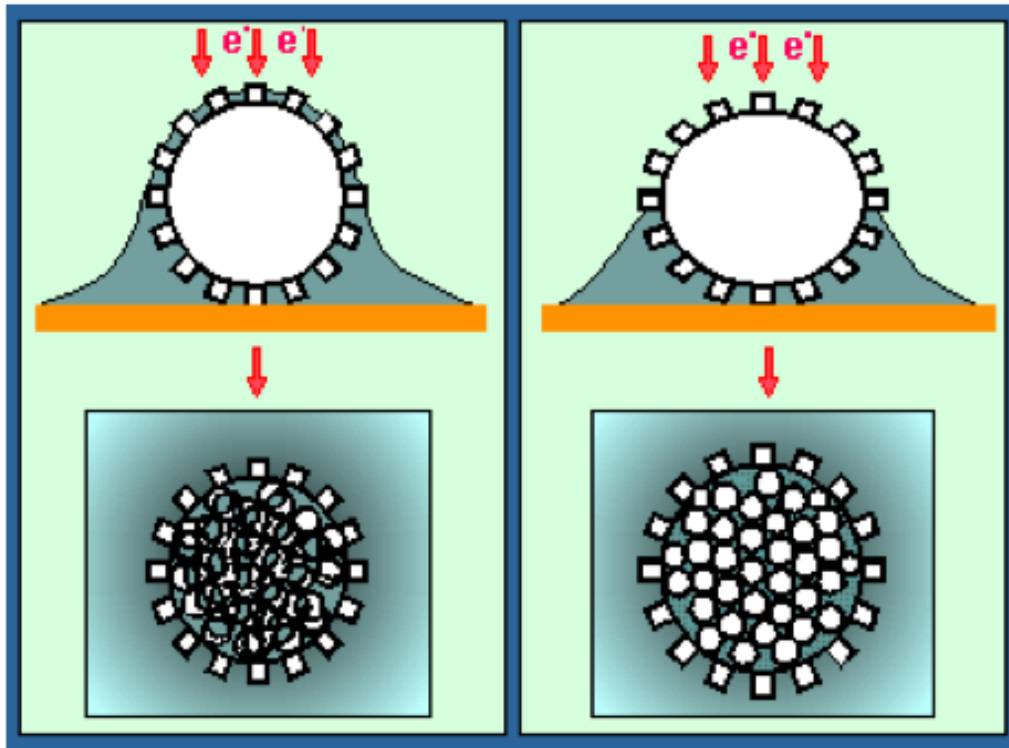


HV	curr	HPW	mag	pressure	det	mode	WD	tilt	Scale
30.00 kV	1.5 pA	25.9 μm	8 000 x	7.57e-5 Pa	ETD	SE	19.5 mm	20 °	5 μm
Versa 3D									



TEM – příprava vzorku

Negative staining



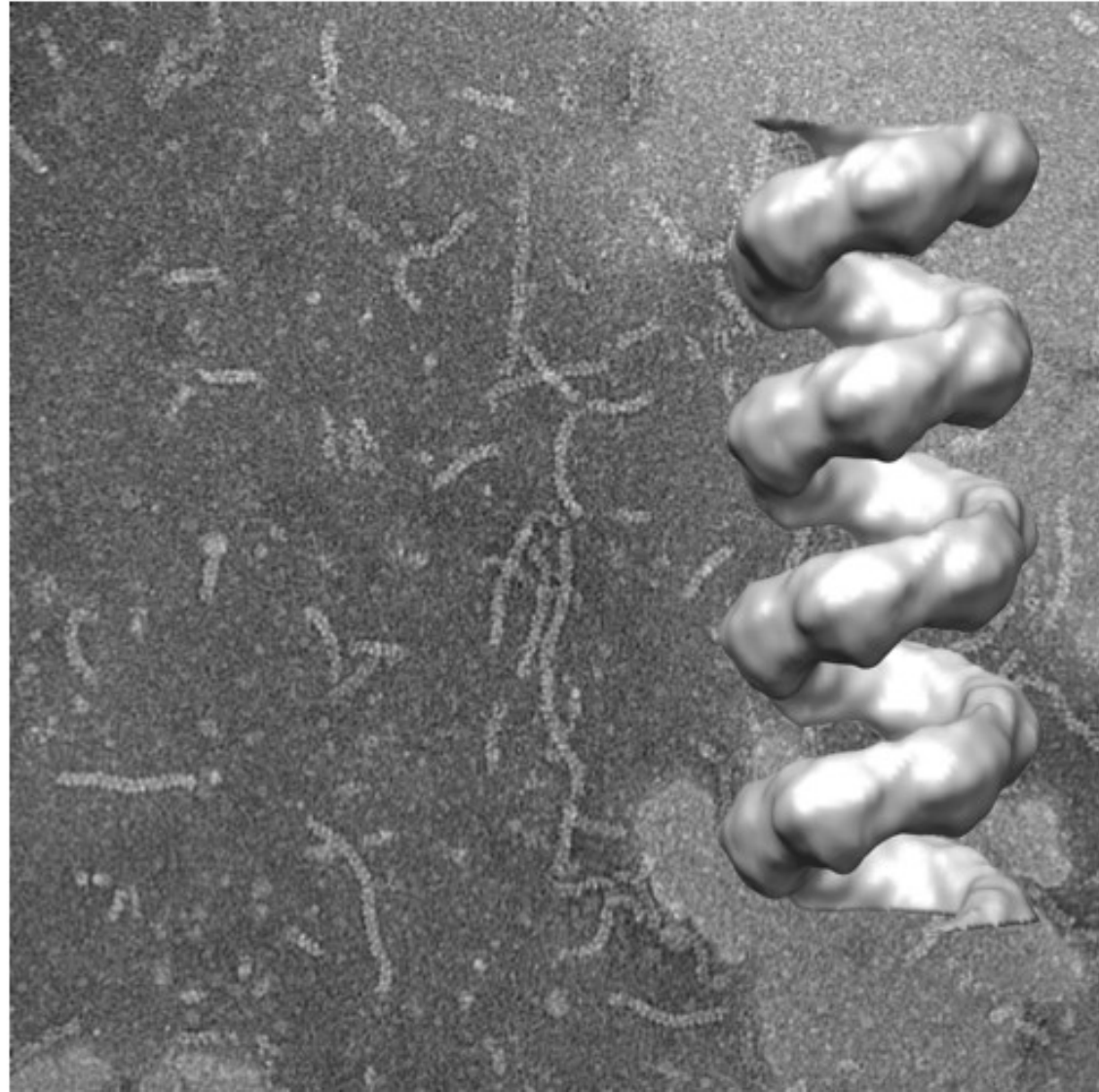
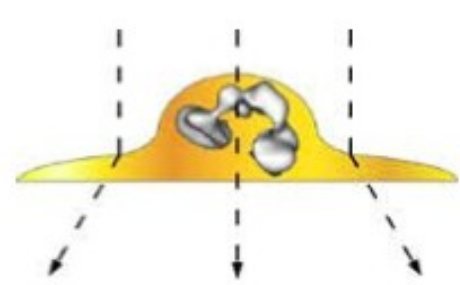
Pros: quick sample screening
high amplitude contrast
less prone to beam damage

Cons: limited resolution (20Å)
flattening artefacts
denaturation of proteins

Heavy metal staining

e.g. uranyl acetate

Negative staining

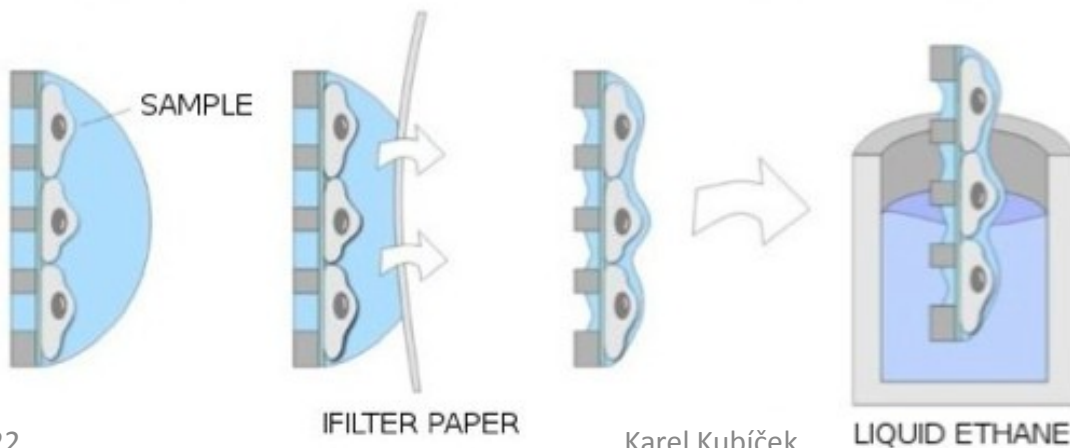


Vitrifikace vzorku

Cryogen	Melting point (°C)	Boiling point (°C)	Cooling rate (10^3 °C/s)	Relative cooling efficiency*
Ethane	-183	-89	-260 – -258	1.3
Liquid nitrogen	-210	-196	-272	0.1
Propane	-189	-42	-263 – -261	1.0
Freon 22	-160	-41	-267 – -265	0.7

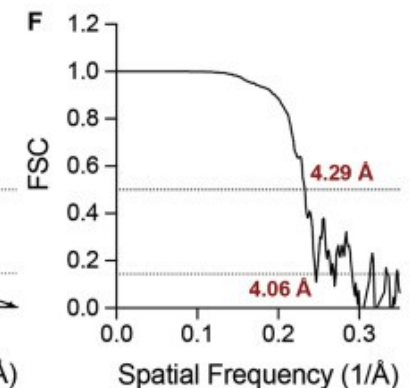
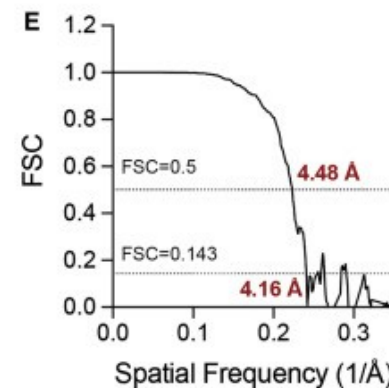
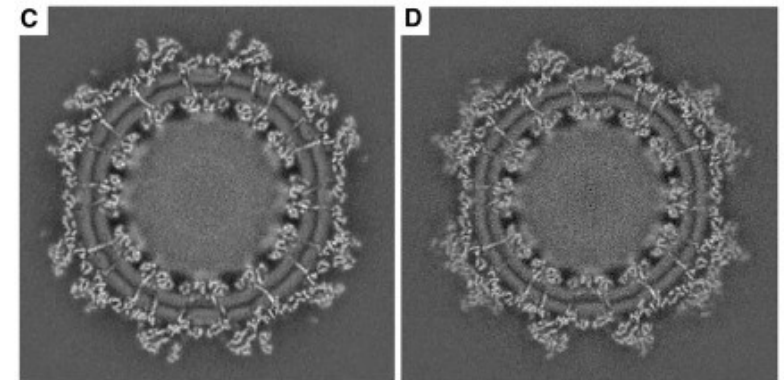
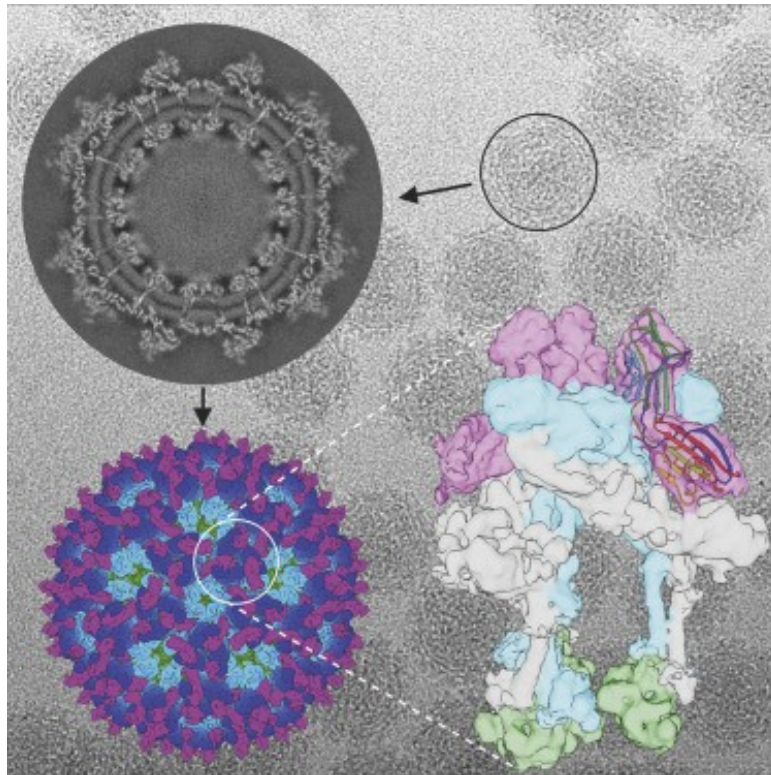
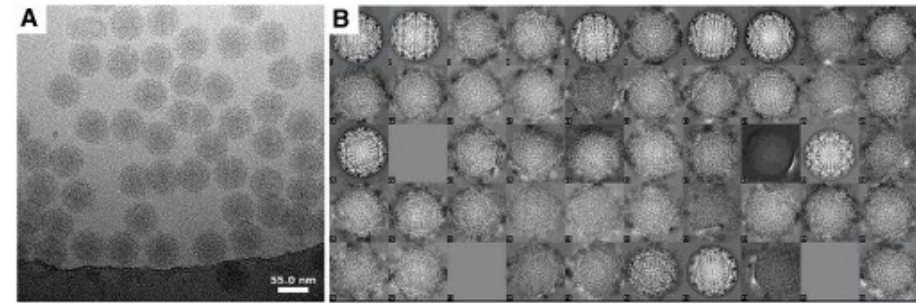


3-4ul
0.1-1mg/ml for purified protein complexes
OD~0.5 for bacteria



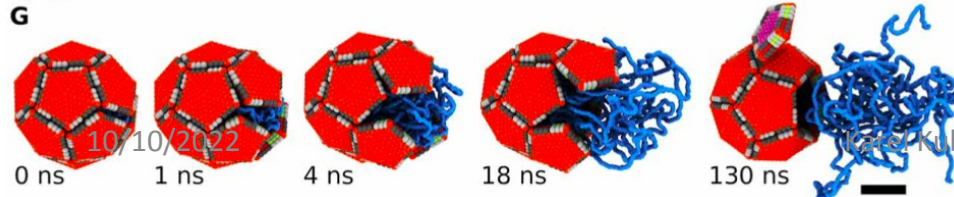
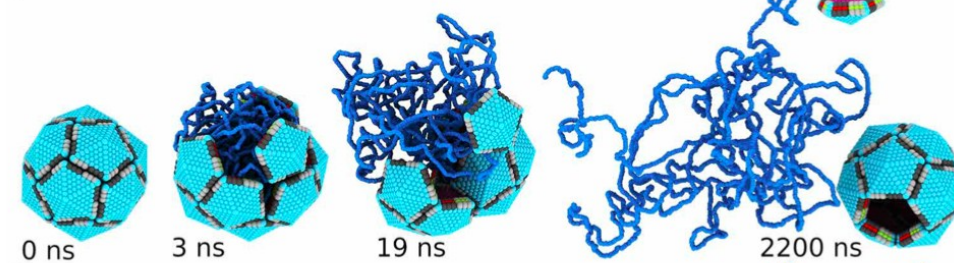
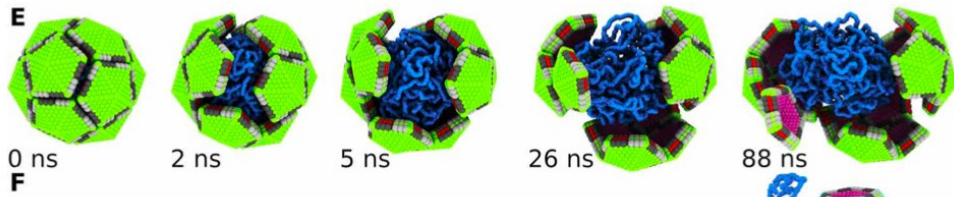
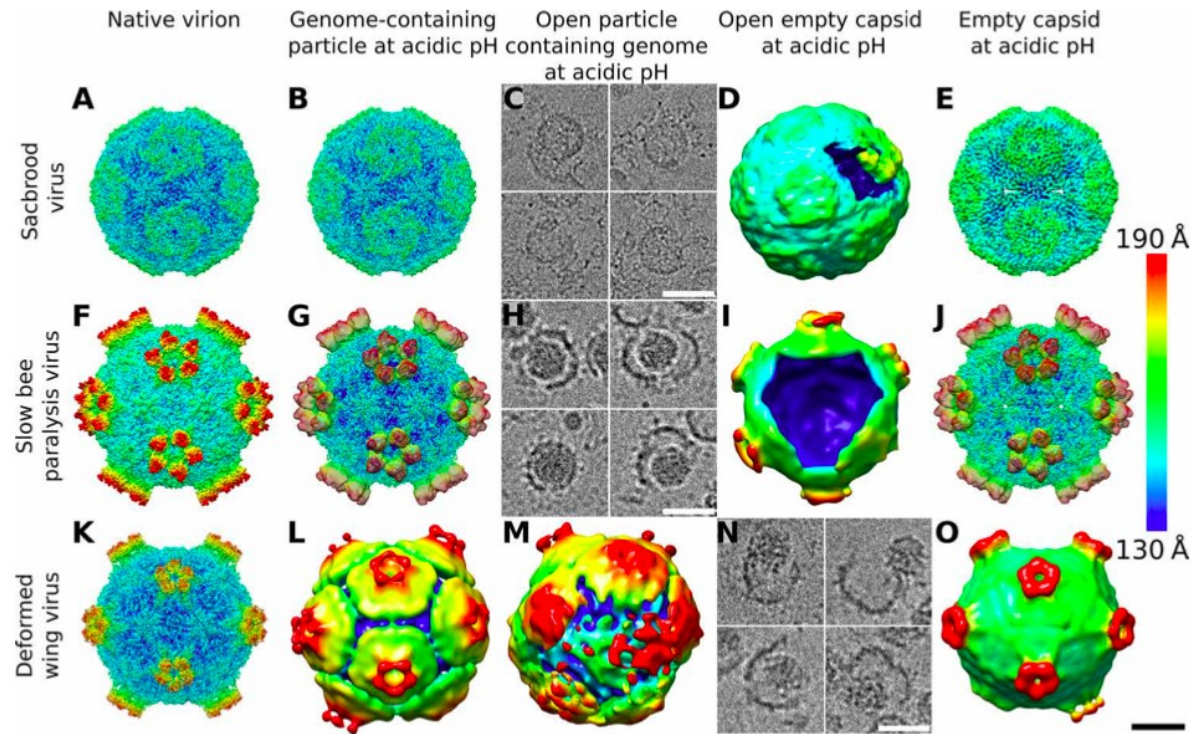
Určování 3D biomolekulárních struktur pomocí kryoEM

1) Sample preparation – 2) vitrification – 3) measurement – 4) particle picking – 5) 2D classification – 6) 3D model reconstruction



<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.006>

Výpočetní + experimentální metody



Skubnik, K; Sukenik, L; Buchta, D; Fuzik, T; Prochazkova, M; Moravcova, J; Smerdova, L; Pridal, A; Vacha, R; Plevka, P, 2021: Capsid opening enables genome release of iflaviruses. *SCIENCE ADVANCES* 124

10/10/2022

Jan Kubiček

NEURODEGENERATION

Cryo-EM structures of amyloid- β 42 filaments from human brains

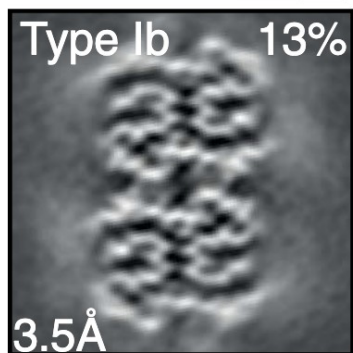
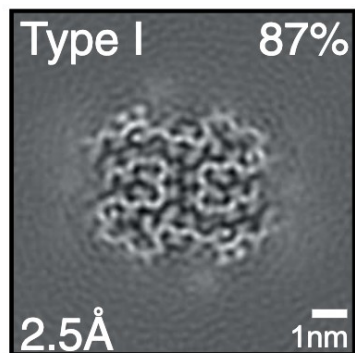
Yang Yang^{1†}, Diana Arseni^{1†}, Wenjuan Zhang^{1†‡}, Melissa Huang¹, Sofia Lövestam¹, Manuel Schweighauser¹, Abhay Kotecha², Alexey G. Murzin¹, Sew Y. Peak-Chew¹, Jennifer Macdonald¹, Isabelle Lavenir¹, Holly J. Garringer³, Ellen Gelpi⁴, Kathy L. Newell³, Gabor G. Kovacs^{4,5}, Ruben Vidal³, Bernardino Ghetti^{3*}, Benjamin Ryskeldi-Falcon^{1*}, Sjors H. W. Scheres^{1*}, Michel Goedert^{1*}

Filament assembly of amyloid- β peptides ending at residue 42 (A β 42) is a central event in Alzheimer's disease. Here, we report the cryo-electron microscopy (cryo-EM) structures of A β 42 filaments from human brains. Two structurally related S-shaped protofilament folds give rise to two types of filaments. Type I filaments were found mostly in the brains of individuals with sporadic Alzheimer's disease, and type II filaments were found in individuals with familial Alzheimer's disease and other conditions. The structures of A β 42 filaments from the brain differ from those of filaments assembled in vitro. By contrast, in *App*^{NL-F} knock-in mice, A β 42 deposits were made of type II filaments. Knowledge of A β 42 filament structures from human brains may lead to the development of inhibitors of assembly and improved imaging agents.

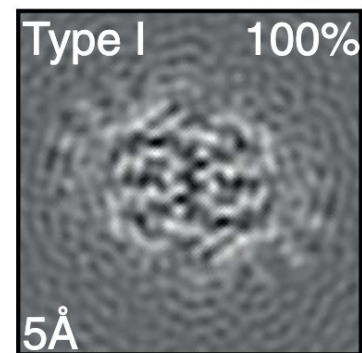
Yang et al., *Science* 375, 167–172 (2022)

Sofia Lövestama & Sjors H. W. Scheres, *Faraday Discussions*, 2022

sAD case 1



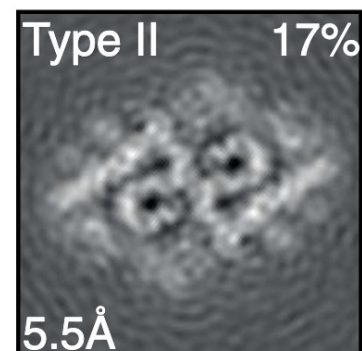
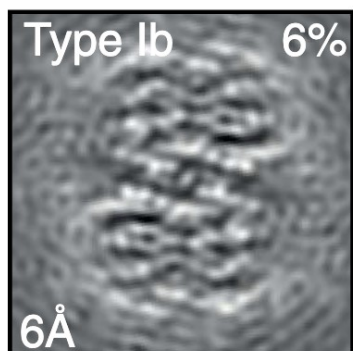
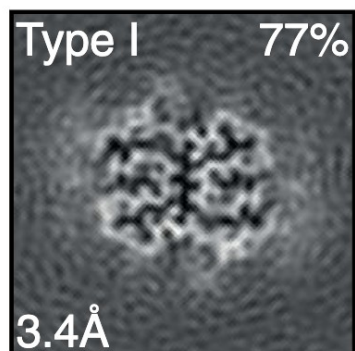
sAD case 2



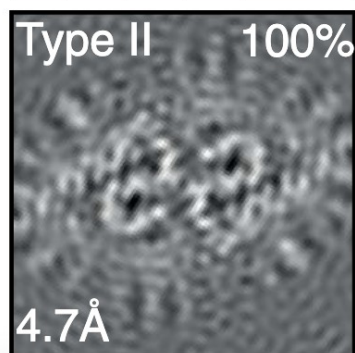
Alzheimer's disease

three sporadic (sAD cases 1 to 3) and **two familial** (fAD case 1, mutation in APP encoding V717F, and fAD case 2, mutation in PSEN1 encoding F105L)

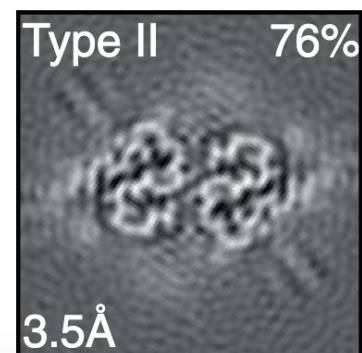
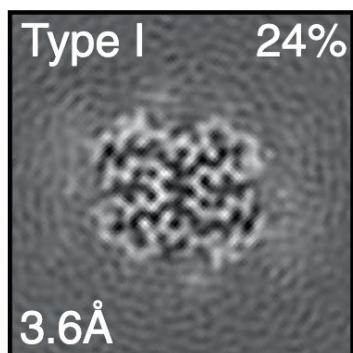
sAD case 3



fAD case 1

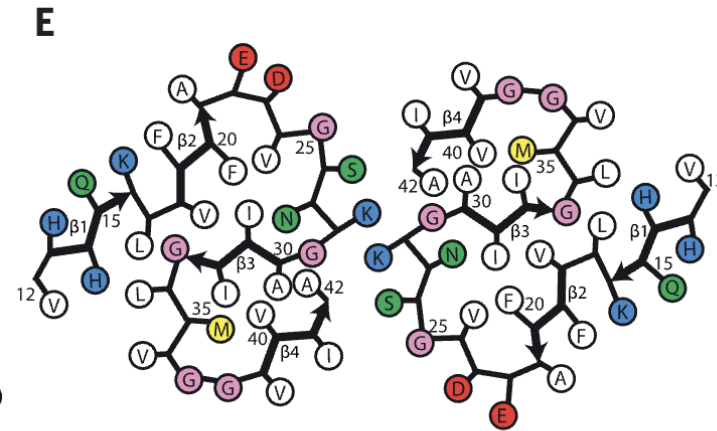
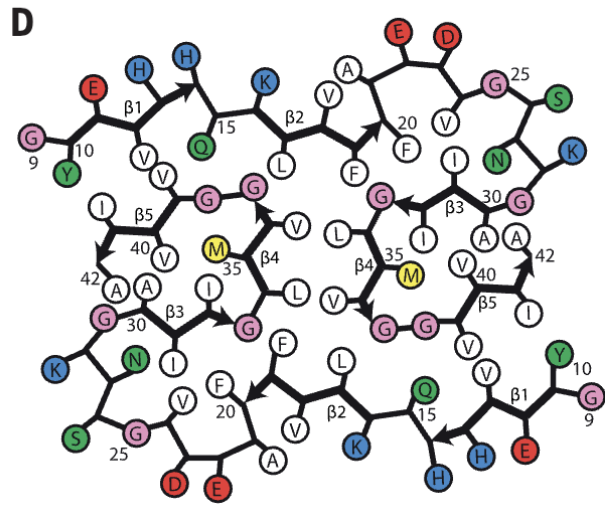
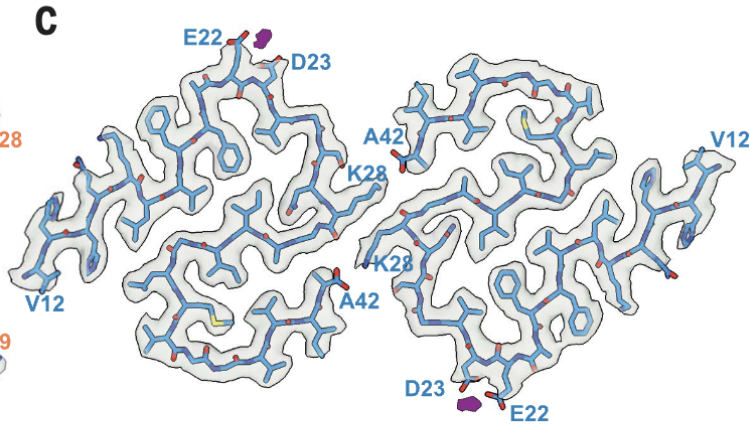
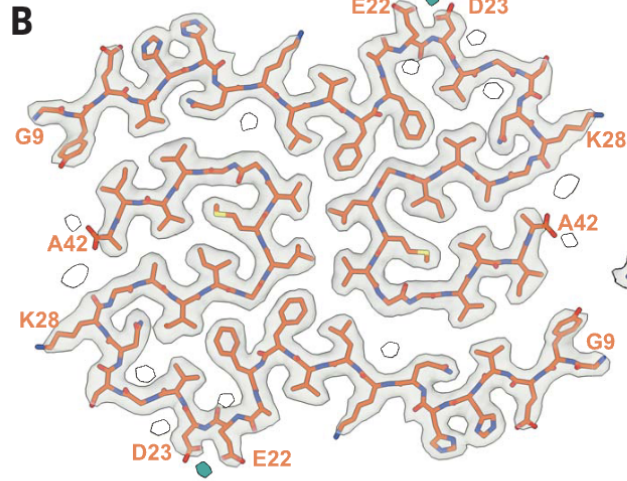
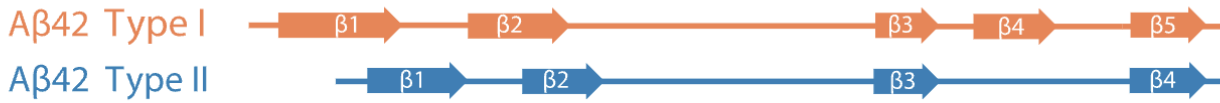


fAD case 2



Yanget al., *Science* 375, 167–172 (2022)
Sofia Lövestama & Sjors H. W. Scheres, *Faraday Discussions*, 2022

A 1 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA 42



Aβ42 filaments
Type I: G9 - A42,
Type II: V12 - A42.

Cryo-EM density maps + atomic models for type I and type II filaments. Solvent molecules in white, putative metals in teal and purple.

Schematics of type I and type II Aβ42 folds.

Elektroforéza

- Elektroforéza – pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Při rovnoměrném přímočarém pohybu **sférické** částice o poloměru r , je elektrostatická síla působící na částici v rovnováze se silou tření, jež je dána viskozitou. Sílu tření lze vypočítat dle **Stokesova vzorce**:

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

kde v je rychlost částice a η je dynamická viskozita prostředí.

- Elektrické pole působí na částici silou:

$$F = z \cdot e \cdot E$$

kde z je počet elementárních nábojů nesených částicí, e je elementární náboj ($1,602 \cdot 10^{-19}$ C) a E [$V \cdot m^{-1}$] je intenzita elektrického pole v daném místě.

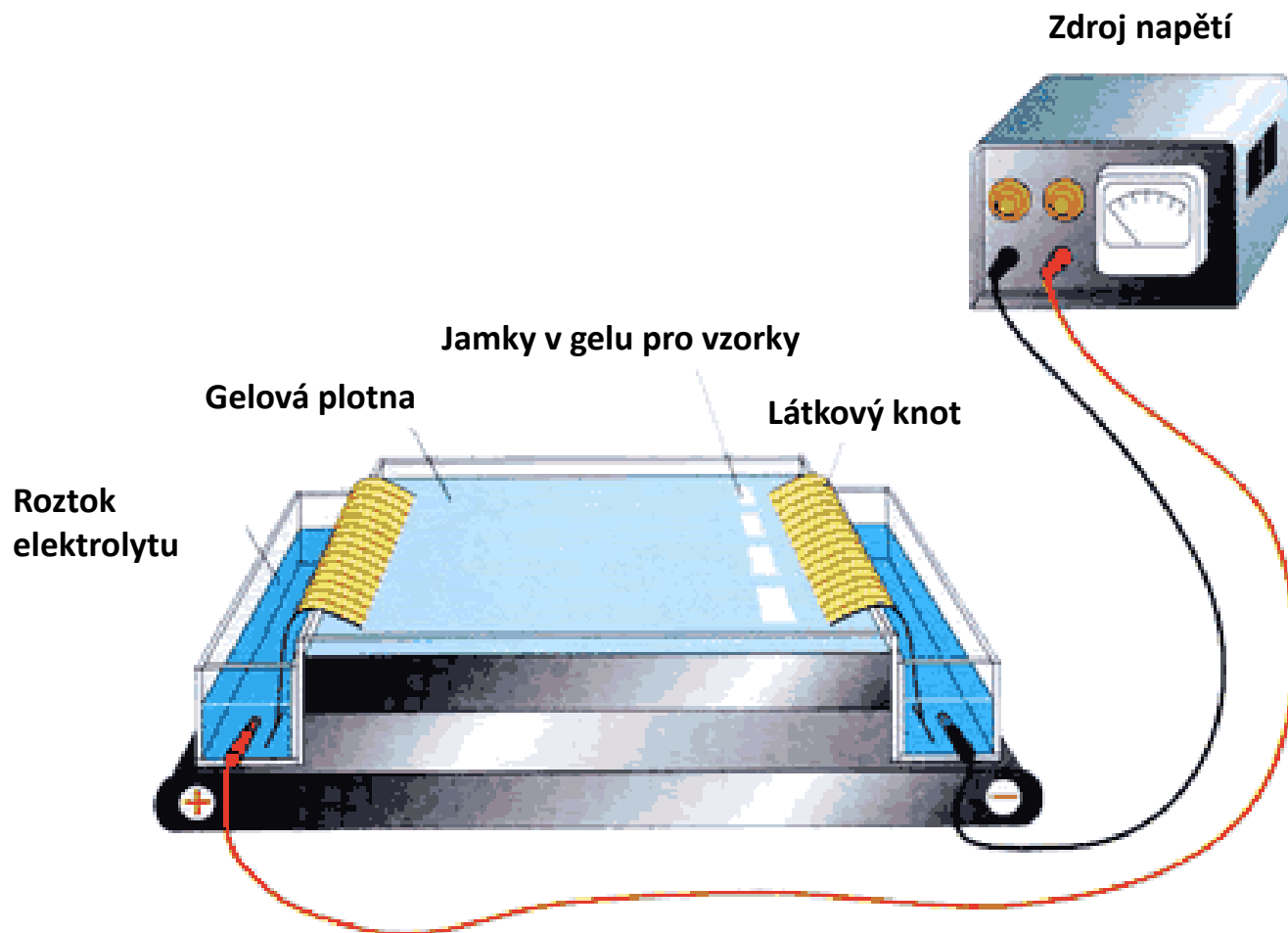
- Rychlost částice je pak v důsledku rovnosti obou sil:

Elektroforetická pohyblivost

- Elektroforetická pohyblivost u nezávisí na intenzitě elektrického pole. Je definována jako podíl rychlosti částice a intenzity elektrického pole. Platí:

Poznámka. Elektroforéza s dodecylsulfátem sodným. Tato sloučenina, která nese jeden negativní elementární náboj, se váže definovaným způsobem k bílkovinám a eliminuje jejich vlastní elektrický náboj. Molekuly bílkovin se pak pohybují s různou rychlostí jen proto, že mají různou velikost (poloměr).

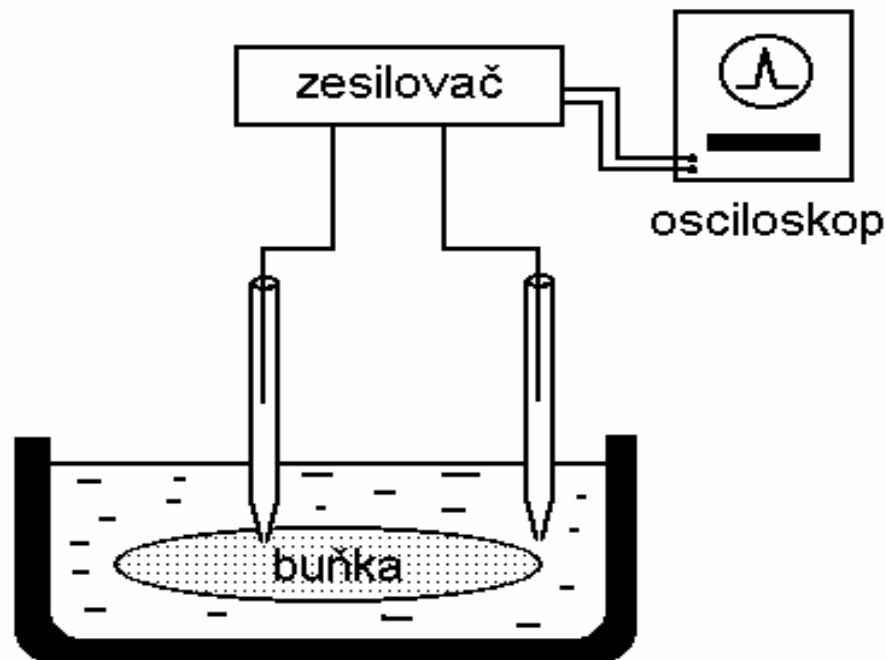
Zařízení pro elektroforézu



Měření membránových potenciálů

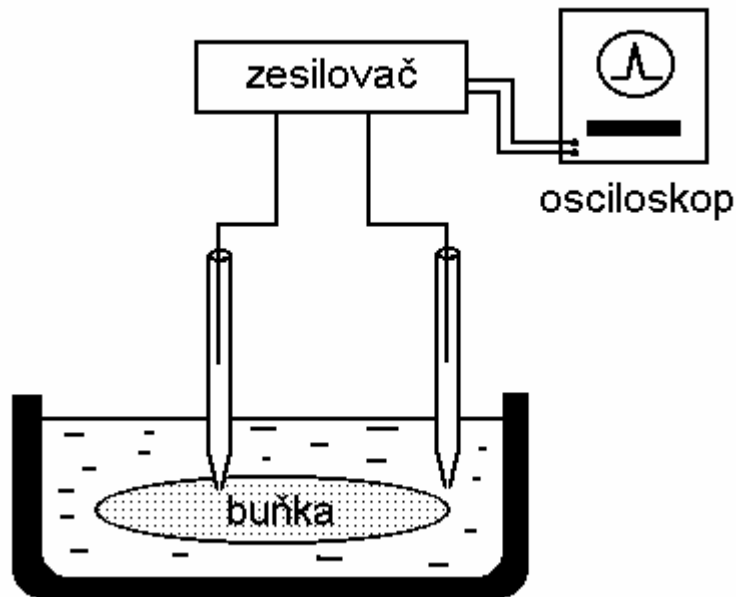
- Membránové potenciály se měří s pomocí **skleněných mikroelektrod**, tj. skleněných kapilár s velmi jemnou úzkou špičkou. Průměr otvoru na konci špičky musí být menší než 1 μm , aby nedošlo při zavádění do buňky k jejímu významnému poškození. Vnitřní prostor špičky kapiláry je naplněn roztokem KCl o koncentraci 3 mol.l^{-1} . Jako elektroda srovnávací se používá elektroda stříbrochloridová umístěná do mimobuněčného prostoru.
- Pro skleněné mikroelektrody je charakteristický vysoký vnitřní odpor (kolem 10 $\text{M}\Omega$), takže potřebujeme pro měření vysoce kvalitní zesilovače, abychom zamezili zkreslení měřeného napětí.

Experimentální uspořádání pro měření membránových potenciálů kapilárními mikroelektrodami



Pomocí skleněných mikroelektrod lze také měřit jiné elektrochemické parametry buněk a membrán, např. koncentraci některých iontů. Mohou být připraveny jako elektrody iontově selektivní pro Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , H^+ ...

Metoda patch-clamp („terčíkový zámek“)



Tupá skleněná mikroelektroda se přiloží k povrchu buňky nebo k části biologické či umělé membrány. Otvor na konci mikroelektrody je zcela uzavřen „terčíkem“ membrány a měřená elektrická napětí nebo proudy se proto týkají jen malého okrsku membrány, v němž se nalézá jen malý počet iontových kanálů.

Některé iontové kanály mohou být předem uzavřeny nebo otevřeny, náplň mikroelektrody může obsahovat ligandy, schopné interagovat s iontovými kanály, a všeobecně jakékoliv látky, jež mohou ovlivňovat funkci membrány. Tato metoda umožňuje studium aktivity jednotlivých iontových kanálů nebo jejich malých skupin.