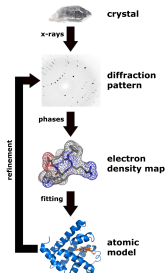


Makromolekulární krystalografie

Metody biofyzikální chemie - seminář (C5856)

Jan Novotný
novotnyjan@mail.muni.cz

30. září 2015

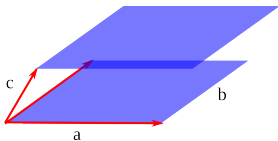


Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Neuspořádané části proteinů se projevují intenzivními odezvami v difrakčním obrazci.

Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Neuspořádané části proteinů se projevují intenzivními odezvami v difrakčním obrazci.
- 2 Vzdálenost mezi rovinami ab v *elementární buňce* (ax, by, cz) se rovná výrazu $\frac{(\mathbf{a} \times \mathbf{b}) \cdot \mathbf{c}}{|\mathbf{a} \times \mathbf{b}|}$.



Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Neuspořádané části proteinů se projevují intenzivními odezvami v difrakčním obrazci.
- 2 Vzdálenost mezi rovinami ab v *elementární buňce* (ax, by, cz) se rovná výrazu $\frac{(\mathbf{a} \times \mathbf{b}) \cdot \mathbf{c}}{|\mathbf{a} \times \mathbf{b}|}$.
- 3 Sekvenční podobnost vyšší než 40% umožňuje využít metodu molekulárního přemístění (Molecular replacement) pro řešení fázového problému.

Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Neuspořádané části proteinů se projevují intenzivními odezvami v difrakčním obrazci.
- 2 Vzdálenost mezi rovinami ab v *elementární buňce* (ax, by, cz) se rovná výrazu $\frac{(\mathbf{a} \times \mathbf{b}) \cdot \mathbf{c}}{|\mathbf{a} \times \mathbf{b}|}$.
- 3 Sekvenční podobnost vyšší než 40% umožňuje využít metodu molekulárního přemístění (Molecular replacement) pro řešení fázového problému.
- 4 Rozlišení metody SAXS se pohybuje v intervalu 1-25 Å.

Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Neuspořádané části proteinů se projevují intenzivními odezvami v difrakčním obrazci.
- 2 Vzdálenost mezi rovinami ab v *elementární buňce* (ax, by, cz) se rovná výrazu $\frac{(\mathbf{a} \times \mathbf{b}) \cdot \mathbf{c}}{|\mathbf{a} \times \mathbf{b}|}$.
- 3 Sekvenční podobnost vyšší než 40% umožňuje využít metodu molekulárního přemístění (Molecular replacement) pro řešení fázového problému.
- 4 Rozlišení metody SAXS se pohybuje v intervalu 1-25 Å.
- 5 Vylepšení (refinement) X-ray struktury nezbytně vyžaduje empirické parametry silového pole.

Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Neuspořádané části proteinů se projevují intenzivními odezvami v difrakčním obrazci.
- 2 Vzdálenost mezi rovinami ab v *elementární buňce* (ax, by, cz) se rovná výrazu $\frac{(\mathbf{a} \times \mathbf{b}) \cdot \mathbf{c}}{|\mathbf{a} \times \mathbf{b}|}$.
- 3 Sekvenční podobnost vyšší než 40% umožňuje využít metodu molekulárního přemístění (Molecular replacement) pro řešení fázového problému.
- 4 Rozlišení metody SAXS se pohybuje v intervalu 1-25 Å.
- 5 Vylepšení (refinement) X-ray struktury nezbytně vyžaduje empirické parametry silového pole.
- 6 Metoda isomorfního přemístění je založena na předpokladu, že strukturní faktor těžkého atomu inkorporovaného do studované struktury je charakterizován fází blízkou fází pozorované difrakce.

Příprava vzorku biomolekuly pro strukturní analýzu

K uvedeným charakteristikám se pokuste uvést příklad exp. metody k jejich zjištění:

- 1 Homogenita, čistota
- 2 Fold, rozpustnost
- 3 Monodisperzní
- 4 Aktivita
- 5 Stabilita

Příprava vzorku biomolekuly pro strukturní analýzu

K uvedeným charakteristikám se pokuste uvést příklad exp. metody k jejich zjištění:

- ① Homogenita, čistota
 - ② Fold, rozpustnost
 - ③ Monodisperzní
 - ④ Aktivita
 - ⑤ Stabilita
- ELF, MASS
 - CD, FTIR
 - DLS, DOSY
 - enzymatic assay
 - (viz výše)

Rentgenová krystalografie vs. SAS vs. NMR spektroskopie

Kterou z metod považujete za vhodnější pro řešení následujících problémů a proč?

- A) Řešení struktury membránového proteinu.
- B) Určení protonačního stavu cytosinového nukleotidu v i-motivu DNA.
- C) Strukturní analýza proteinového komplexu o $M_r=1$ MDa.
- D) Analýza radiální distribuční funkce solvatačního obalu kationtu.
- E) Strukturní analýza metalloproteinu s paramagnetickým centrem.
- F) Studium segmentového pohybu domény.
- H) Určení rozměrů příčného řezu celulozové mikrofibrily ve lnu.

Rentgenová krystalografie vs. SAS vs. NMR spektroskopie

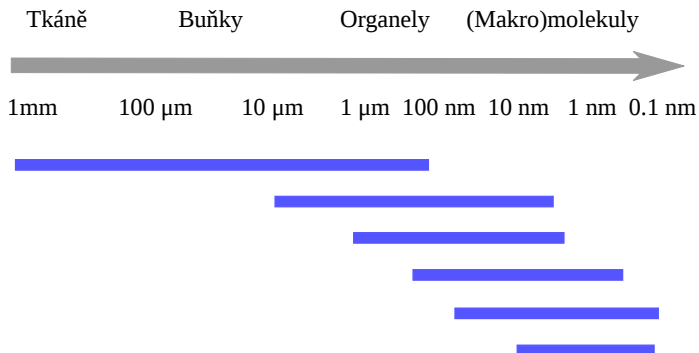
Kterou z metod považujete za vhodnější pro řešení následujících problémů a proč?

- A) Řešení struktury membránového proteinu. (ss)NMR
- B) Určení protonačního stavu cytosinového nukleotidu v i-motivu DNA. NMR
- C) Strukturní analýza proteinového komplexu o $M_r=1$ MDa. X-ray
- D) Analýza radiální distribuční funkce solvatačního obalu kationtu. SANS
- E) Strukturní analýza metalloproteinu s paramagnetickým centrem. X-ray
- F) Studium segmentového pohybu domény. NMR
- H) Určení rozměrů příčného řezu celulozové mikrofibrily ve lnu. SAXS

Srovnání rozsahu uplatnění strukturních metod

Do schématu doplňte na odpovídající místo následující metody:

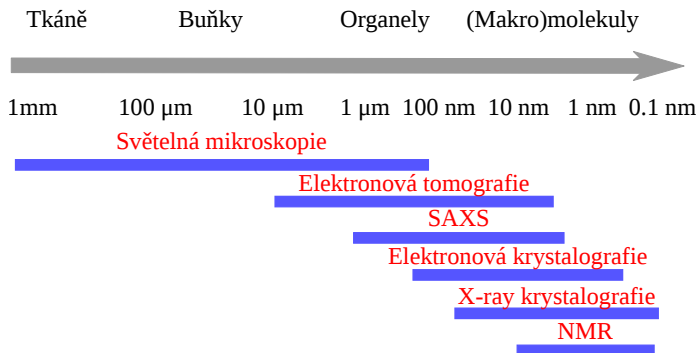
Rentgenová krystalografie, Elektronová tomografie, NMR, Elektronová krystalografie, Světelná mikroskopie, SAXS rozptyl



Srovnání rozsahu uplatnění strukturních metod

Do schématu doplňte na odpovídající místo následující metody:

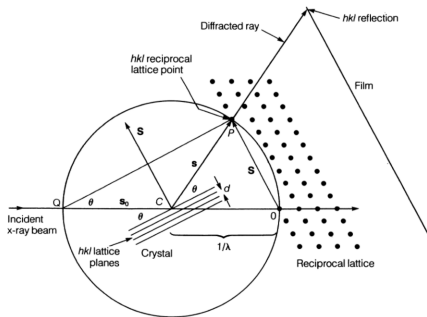
Rentgenová krystalografie, Elektronová tomografie, NMR, Elektronová krystalografie, Světelná mikroskopie, SAXS rozptyl



Obecný koncept krystalografie - terminologie

Do následující tabulky doplňte odpovídající protipól:

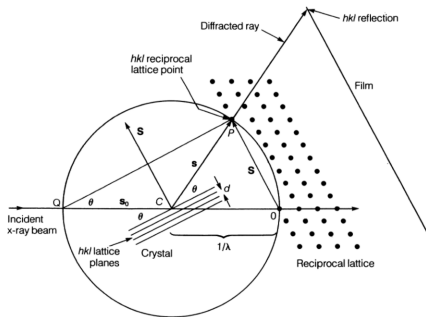
Prvek	Krystal(Direct)	FT obraz(Reciprocal)
Obsah	Molekula	
Dimenze	$r(XYZ)$	
Funkce		Strukturní faktor $F(hkl)$
Vlastnosti	Spojité, reálná	



Obecný koncept krystalografie - terminologie

Do následující tabulky doplňte odpovídající protipól:

Prvek	Krystal(Direct)	FT obraz(Reciprocal)
Obsah	Molekula	Difrakční obrazec
Dimenze	$r(XYZ)$	$S(hkl)$
Funkce	$\rho(r)$	Strukturální faktor $F(hkl)$
Vlastnosti	Spojité, reálná	Diskrétní, komplexní

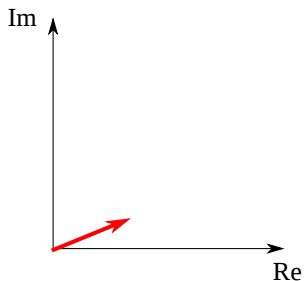
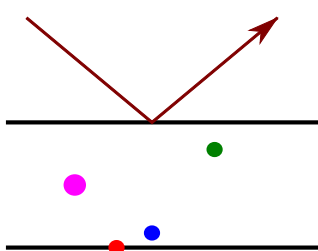


Amplituda a fáze

Amplituda rozptýleného záření závisí na ...

Fáze rozptýleného záření závisí na ...

$$f_{hkl} = f_j \cdot e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)}$$

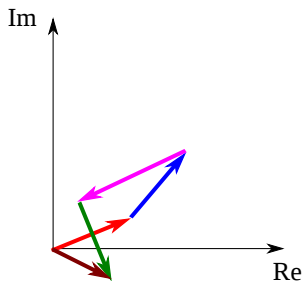
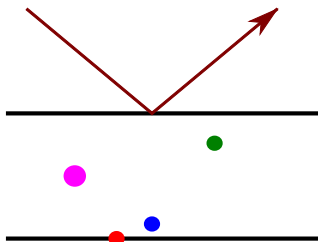


Amplituda a fáze

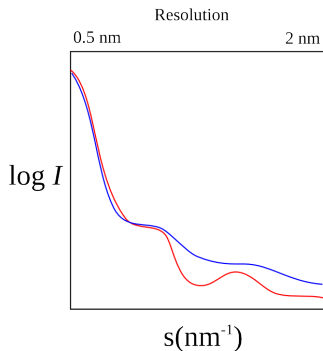
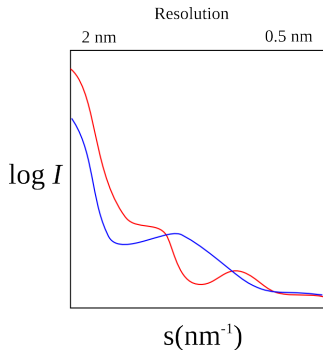
Amplituda rozptýleného záření závisí na ...

Fáze rozptýleného záření závisí na ...

$$f_{hkl} = f_j \cdot e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)}$$



Který ze schématických obrázků se více podobá reálnému výsledku SAXS experimentu?



Výpočetní úloha č. 1

Určete vlnovou délku paprsku neutronů, které jsou v termodynamické rovnováze s okolím o teplotě 373 K.

hodnoty potřebných konstant: $1,38 \cdot 10^{-23}$; $1,68 \cdot 10^{-27}$; $6,63 \cdot 10^{-34}$

Výpočetní úloha č. 1

Určete vlnovou délku paprsku neutronů, které jsou v termodynamické rovnováze s okolím o teplotě 373 K.

hodnoty potřebných konstant: $1,38 \cdot 10^{-23}$; $1,68 \cdot 10^{-27}$; $6,63 \cdot 10^{-34}$

Řešení

$$E_k = \frac{1}{2}kT = \frac{p^2}{2m}$$

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{\sqrt{kmT}} = 0.22 \text{ nm}$$

Výpočetní úloha č. 2

Protein globulin izolovaný z tabákových semen krystaluje v plošně centrované kubické soustavě o mřížkovém parametru 12.3 nm a hustotě $1.287 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Jaká je jeho molekulová hmotnost.

Výpočetní úloha č. 2

Protein globulin izolovaný z tabákových semen krystaluje v plošně centrované kubické soustavě o mřížkovém parametru 12.3 nm a hustotě 1.287 g.cm^{-3} . Jaká je jeho molekulová hmotnost.

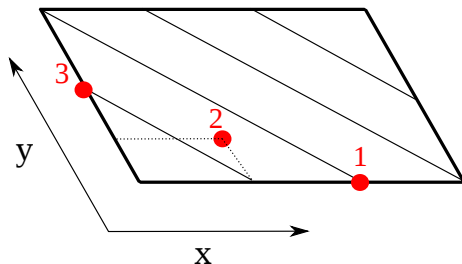
Řešení

$$N = 8 * \frac{1}{8} + 6 * \frac{1}{2} = 4$$

$$M_m = \frac{\rho \cdot V}{N \cdot m_u} = \frac{1287 \cdot (12,3 \cdot 10^{-9})^3}{4 \cdot 1,66 \cdot 10^{-27}} = 3.5 \text{ kDa}$$

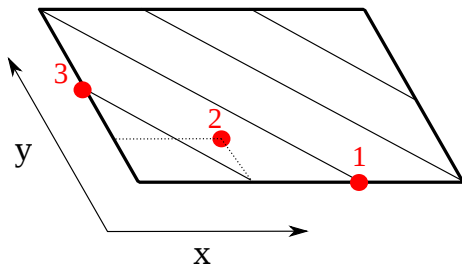
Výpočetní úloha č. 3

Vypočtete fázi rozptýleného záření pro body zadané v 2D mřížce s vyznačenými Braggovými rovinami.



Výpočetní úloha č. 3

Vypočtete fázi rozptýleného záření pro body zadané v 2D mřížce s vyznačenými Braggovými rovinami.



Řešení

$$e^{i\phi_1} = e^{i \cdot 2\pi(kx_1 + ly_1)} = e^{i \cdot 2\pi(3 \cdot \frac{2}{3} + 2 \cdot 0)} = e^{i4\pi} = 1$$

$$e^{i\phi_2} = e^{i \cdot 2\pi(kx_2 + ly_2)} = e^{i \cdot 2\pi(3 \cdot \frac{1}{3} + 2 \cdot \frac{1}{4})} = e^{i3\pi} = -1$$

$$e^{i\phi_3} = e^{i \cdot 2\pi(kx_3 + ly_3)} = e^{i \cdot 2\pi(3 \cdot 0 + 2 \cdot \frac{1}{2})} = e^{i2\pi} = 1$$

<http://dasher.wustl.edu/bio5357/reading/eisenberg-xray-79.pdf>
R.M. Sweet: Fundamentals of Crystallography
P. Atkins, J. de Paula: Physical Chemistry

Příště: Mgr. M. Novák - Mezimolekulové interakce