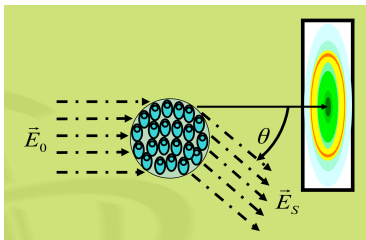


# Makromolekulární krystalografie - aplikace

*Metody biofyzikální chemie - seminář (C5856)*

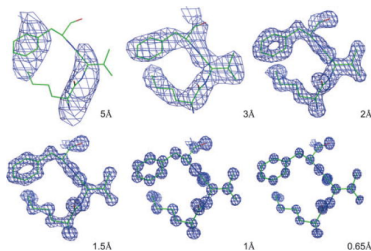
Jan Novotný  
novotnyjan@mail.muni.cz

3. října 2016



# Rozhodně o pravdivosti následujících tvrzení:

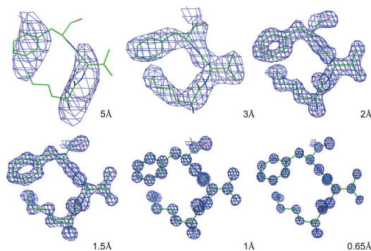
- Pozice každého atomu molekuly v elementární buňce ovlivňuje intezitu všech reflexí.
- Čím vyšší jsou  $hkl$  indexy reflexe, tím úžeji jsou rozmístěny příslušné difrakující roviny.
- Rozlišení difrakčního experimentu nezávisí na počtu detekovaných reflexí.
- Přesnost určení průměrné intezity dané reflexe je tím vyšší, čím větší má redundanci.
- Refinement proteinu o molekulové hmotnosti 20kDa zahrnuje optimalizaci cca. 600 parametrů.
- $R$ -faktor ( $\sum |F_{obs} - F_{calc}| / \sum F_{obs}$ ) popisuje jak inherentní chyby experimentu, tak odlišnost molekulárního modelu od reality.



FEBS J. 2008 Jan; 275(1): 1–21.

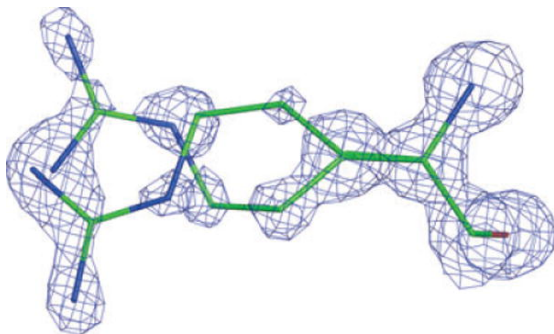
# Rozhodně o pravdivosti následujících tvrzení:

- Pozice každého atomu molekuly v elementární buňce ovlivňuje intezitu všech reflexí.
- Čím vyšší jsou  $hkl$  indexy reflexe, tím úžeji jsou rozmístěny příslušné difrakující roviny.
- Rozlišení difrakčního experimentu nezávisí na počtu detekovaných reflexí.
- Přesnost určení průměrné intezity dané reflexe je tím vyšší, čím větší má redundanci.
- Refinement proteinu o molekulové hmotnosti 20kDa zahrnuje optimalizaci cca. 600 parametrů.
- $R$ -faktor ( $\sum |F_{obs} - F_{calc}| / \sum F_{obs}$ ) popisuje jak inherentní chyby experimentu, tak odlišnost molekulárního modelu od reality.



FEBS J. 2008 Jan; 275(1): 1–21.

O čem vypovídá následující výsledek difrakčního experimentu?



FEBS J. 2008 Jan; 275(1): 1–21.

Vysvětlete rozdíl mezi pojmy *static* a *dynamic disorder*?

# Řešení fázového problému: izomorfní náhrada

**Na jakých předpokladech je založen tento přístup?**

$$F_{PH} = F_P + F_H$$

# Řešení fázového problému: izomorfní náhrada

**Na jakých předpokladech je založen tento přístup?**

$$F_{PH} = F_P + F_H$$

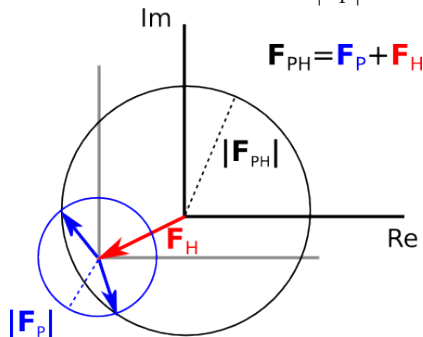
**Je dán vektor  $F_H$  a amplitudy  $|F_P|$  a  $|F_{PH}|$ . Načrtněte možné fáze strukturního faktoru  $|F_P|$ .**

# Řešení fázového problému: izomorfní náhrada

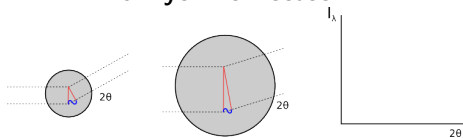
Na jakých předpokladech je založen tento přístup?

$$F_{PH} = F_P + F_H$$

Je dán vektor  $F_H$  a amplitudy  $|F_P|$  a  $|F_{PH}|$ . Načrtněte možné fáze strukturního faktoru  $|F_P|$ .

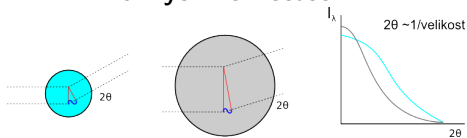


Načrtněte odhad závislosti intezity rozptýleného záření pro dvě částice o různých velikostech?

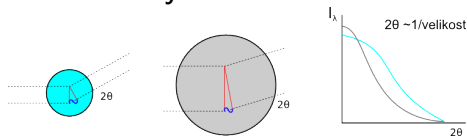




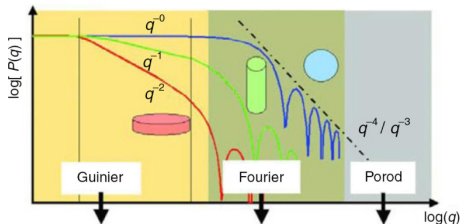
Načrtněte odhad závislosti intezity rozptýleného záření pro dvě částice o různých velikostech?



Načrtněte odhad závislosti intezity rozptýleného záření pro dvě částice o různých velikostech?

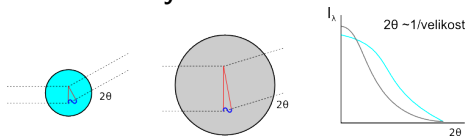


Do schématu závislosti SAXS experimentu na rozptylovém vektoru doplňte klíčový typ informace, kterou lze získat z jednotlivých regionů.

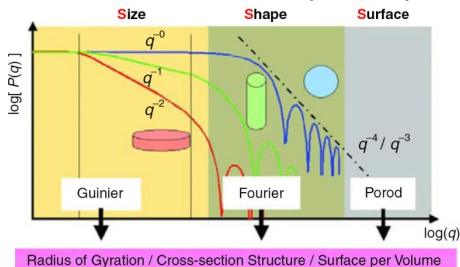


Heimo Schnablegger, The Basics of Small-Angle X-Ray

Načrtněte odhad závislosti intezity rozptýleného záření pro dvě částice o různých velikostech?



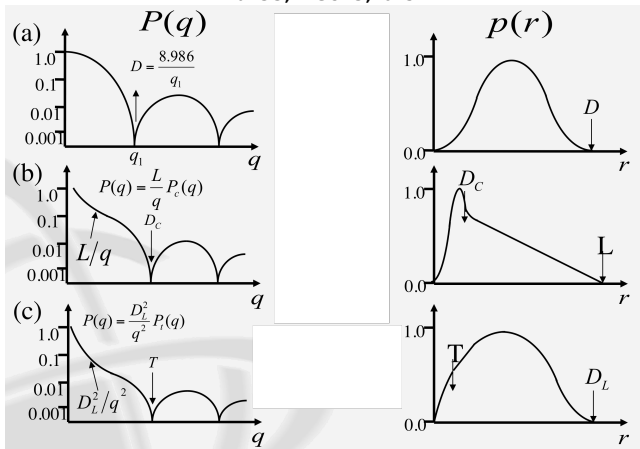
Do schématu závislosti SAXS experimentu na rozptylovém vektoru doplňte klíčový typ informace, kterou lze získat z jednotlivých regionů.



Heimo Schnablegger, The Basics of Small-Angle X-Ray

# Tvar molekuly

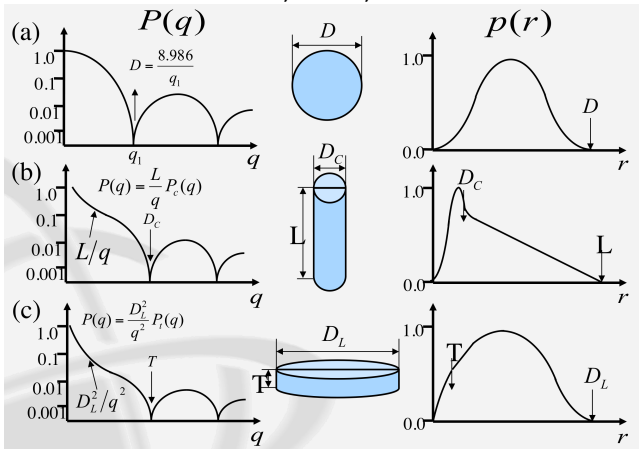
Vysvětlete význam přiložených diagramů SAXS experimentu provedeného na homogenní částici. Přiraďte ke každé dvojici odpovídající tvar částice: válec, koule, disk



Heimo Schnablegger, The Basics of Small-Angle X-Ray Scattering

# Tvar molekuly

Vysvětlete význam přiložených diagramů SAXS experimentu provedeného na homogenní částici. Přiřadte ke každé dvojici odpovídající tvar částice: válec, koule, disk



Heimo Schnablegger, The Basics of Small-Angle X-Ray Scattering

# 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. **X-ray** či **ssNMR**
- 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**

Wlodawer, Alexander et al. "Protein Crystallography for Non-Crystallographers, or How to Get the Best (but Not More) from Published Macromolecular Structures."  
The FEBS journal 275.1 (2008): 1–21.

<http://dasher.wustl.edu/bio5357/reading/eisenberg-xray-79.pdf>

R.M. Sweet: Fundamentals of Crystallography

# Příště: Luminiscenční metody