

Bioinformatika III

Trimačių struktūrų analizė ir spėjimas

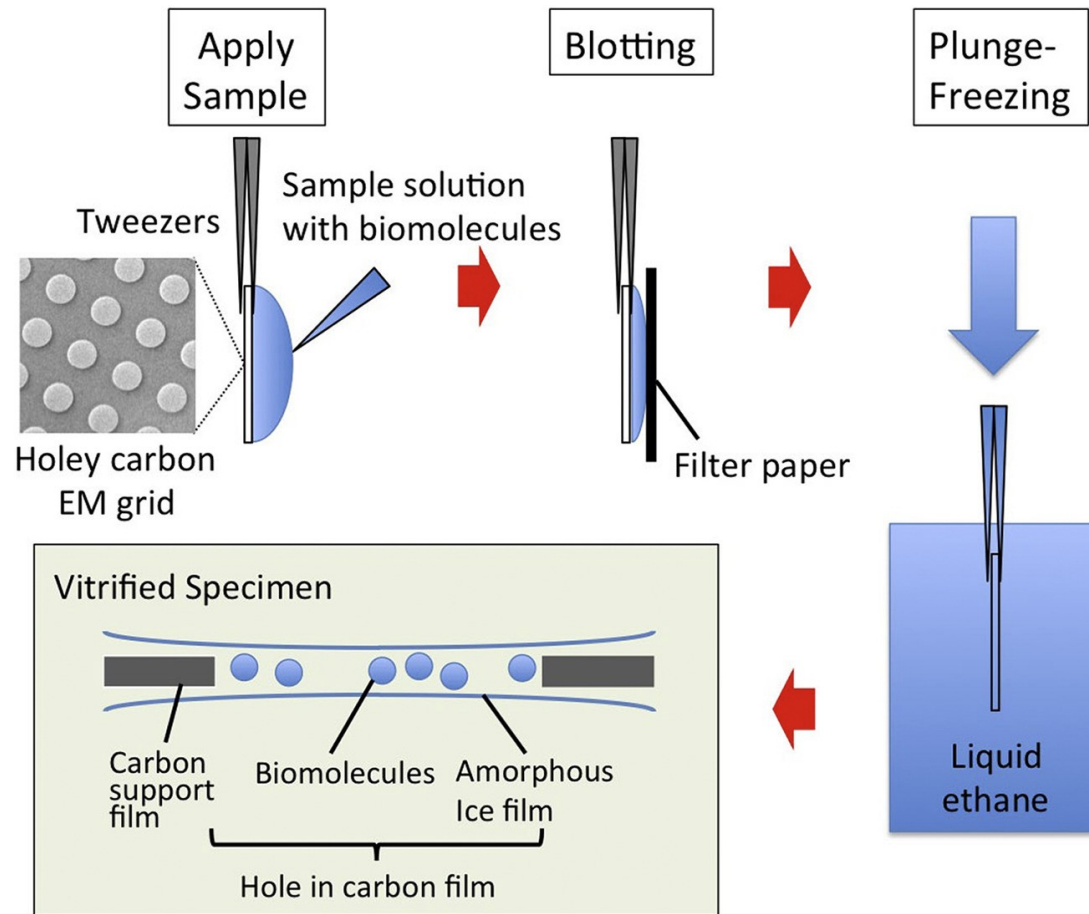
Eksperimentiniai struktūrų
nustatymo metodai

Saulius Gražulis
2024 m.

Struktūrinēs informācijas gavimo būdai

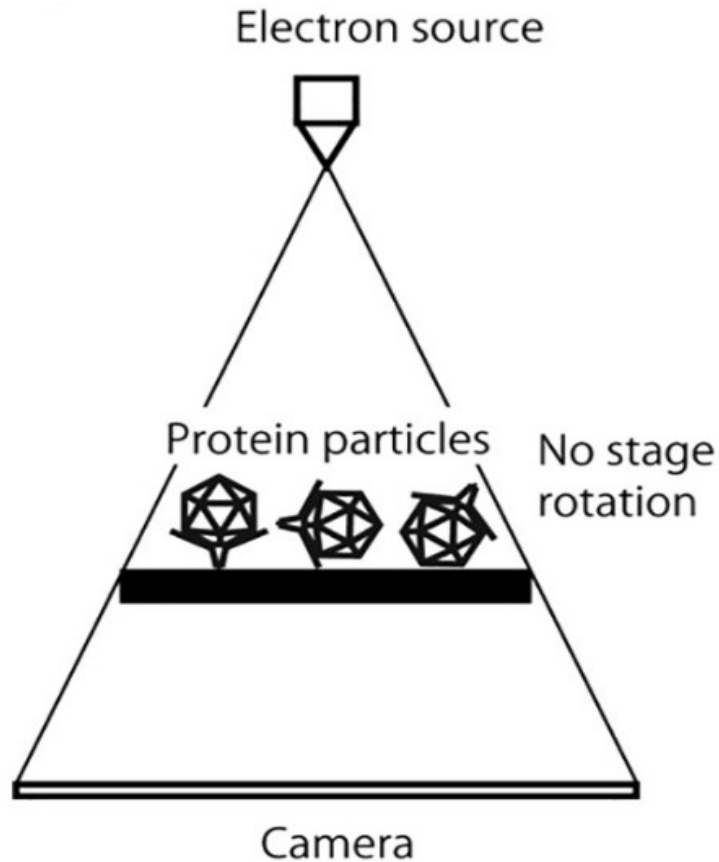
- **BMR (NMR)**
- **Rentģeno kristalografija (X-ray crystallography)**
- **CryoEM (Cryo Electron microscopy, multiple particle analysis, electron tomography)**
- EM (Electron microscopy, negative staining)
- Sklaidymas mažais kampais (SAXS/SANS – Small Angle X-ray/Neutron Scattering)
- EXAFS, XANES
- ...

CryoEM

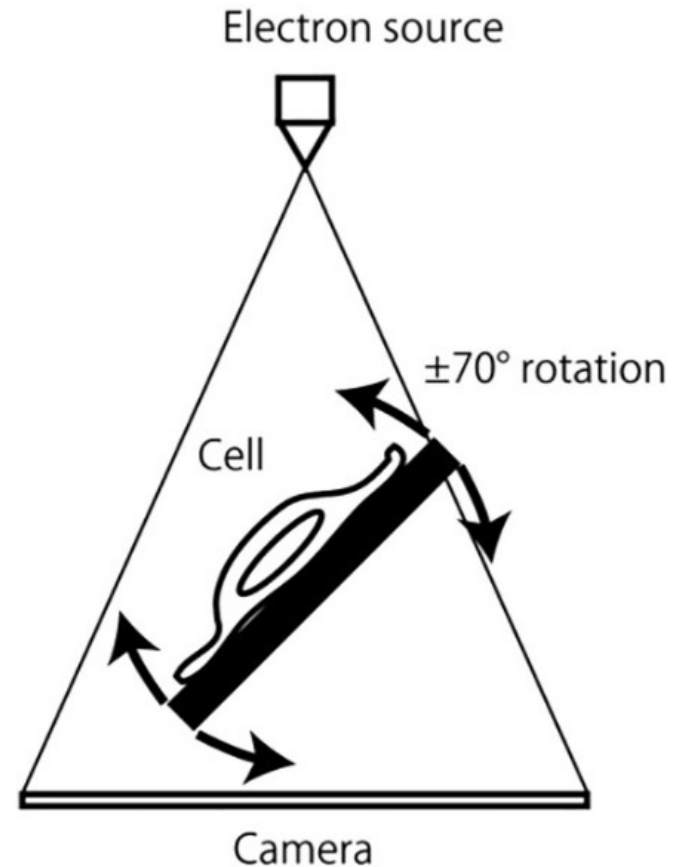


Paveikslukas iš: (Murata & Wolf, 2018) CC BY

SPA & CryoET

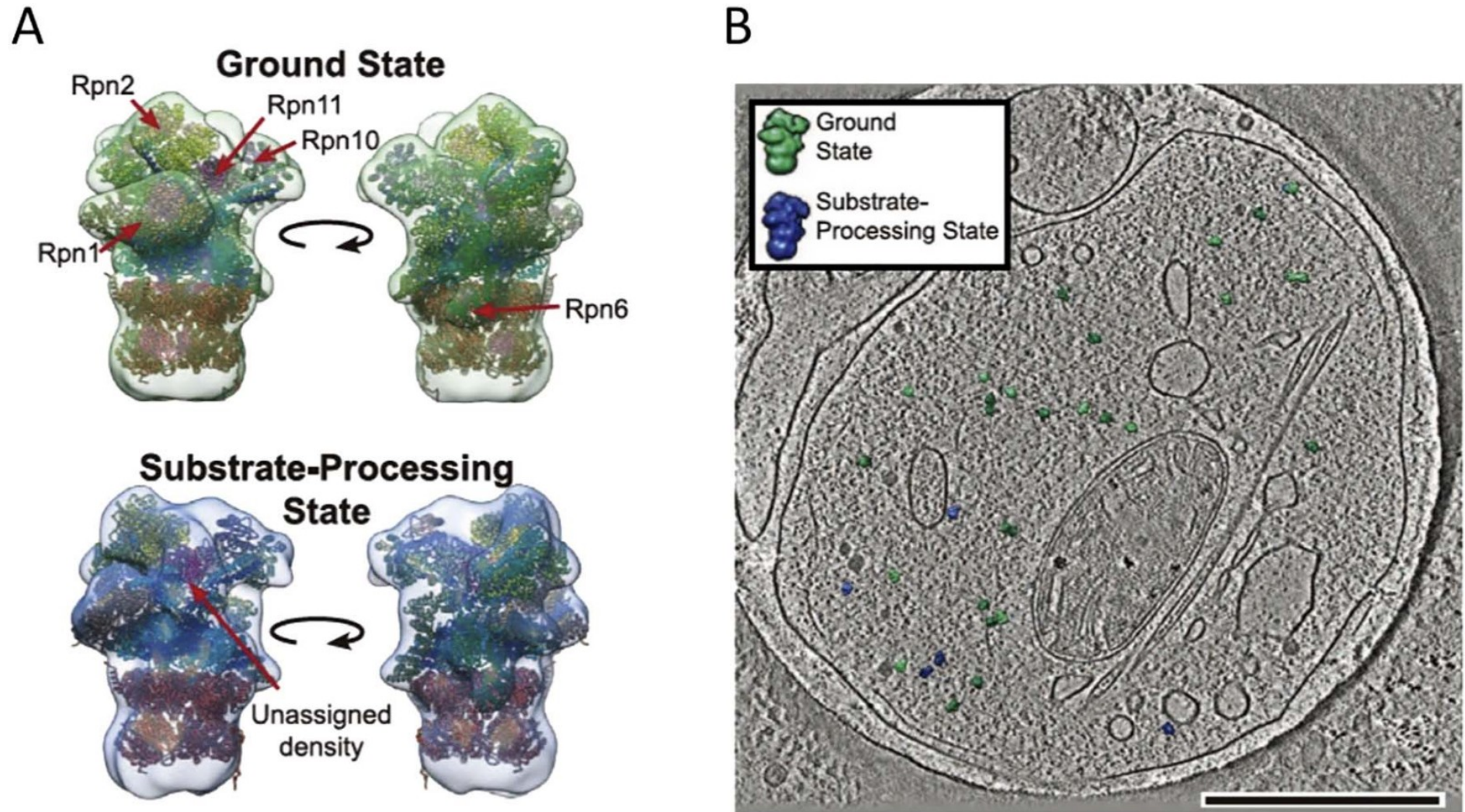


SPA (Single Particle Analysis)



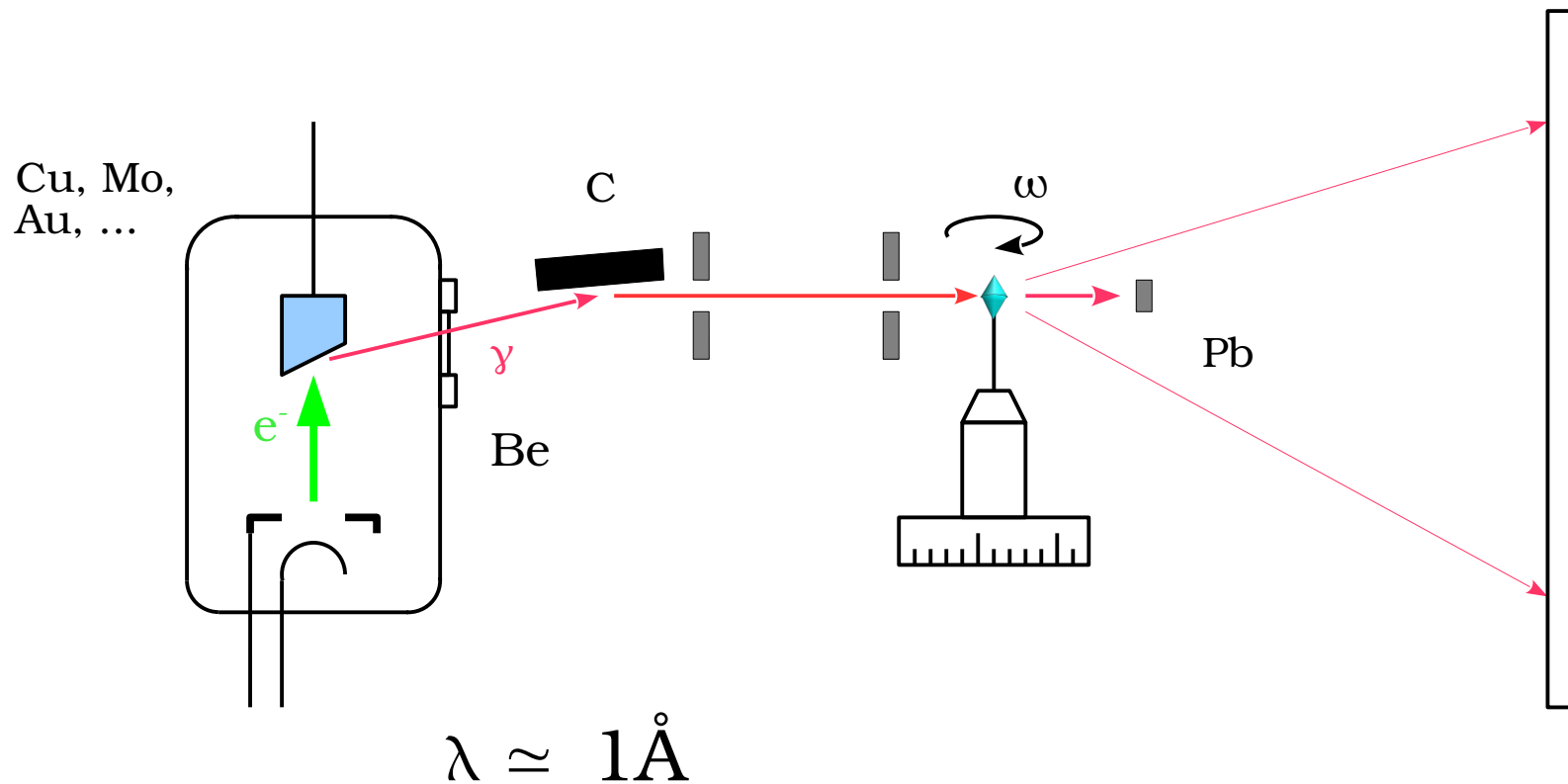
ET (Electron Tomography)

CryoEM elektronų tankis



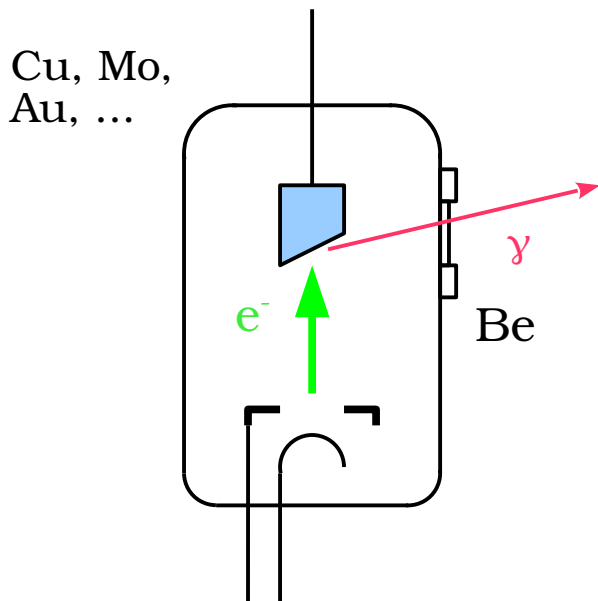
Paveikslukas iš: (Murata & Wolf, 2018) CC BY

Difraktometras ir eksperimento eiga

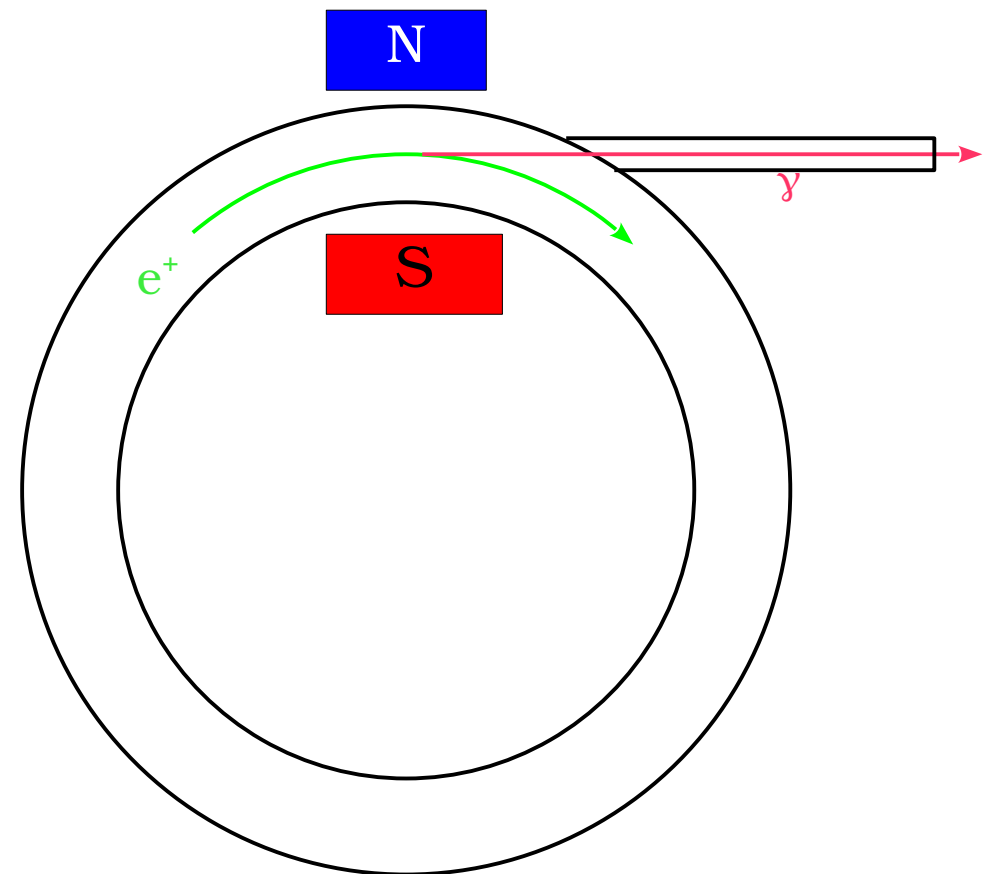


Rentgeno spindulių šaltiniai

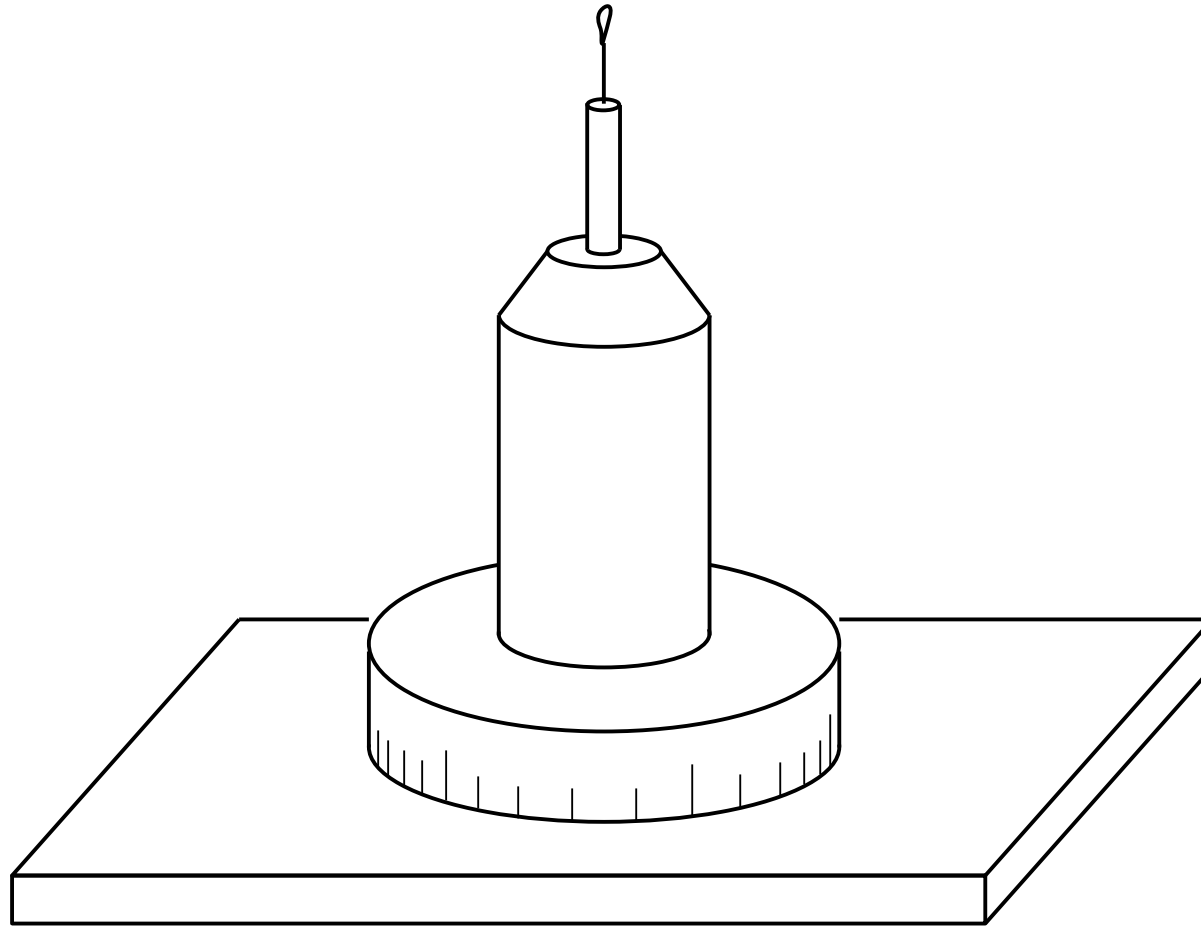
Rentgeno vamzdeliai



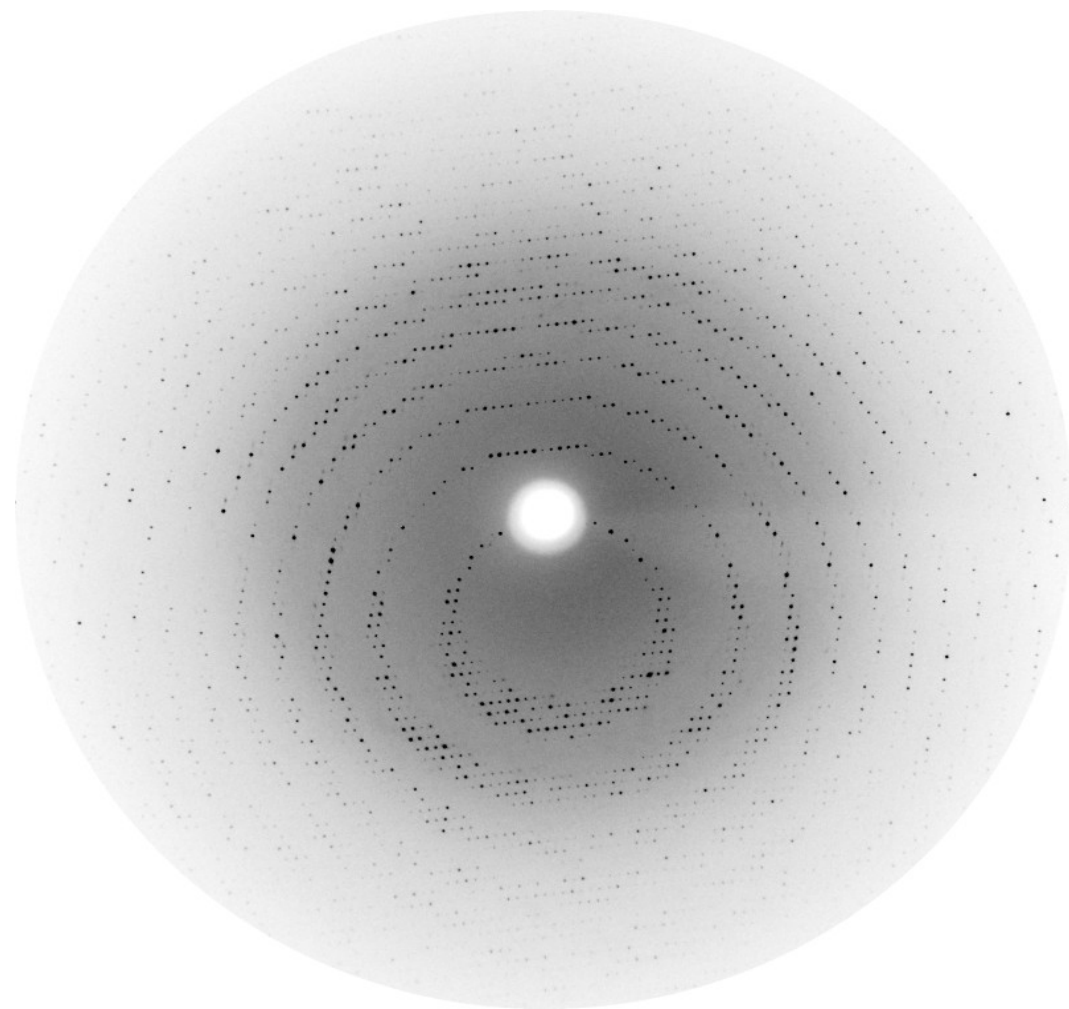
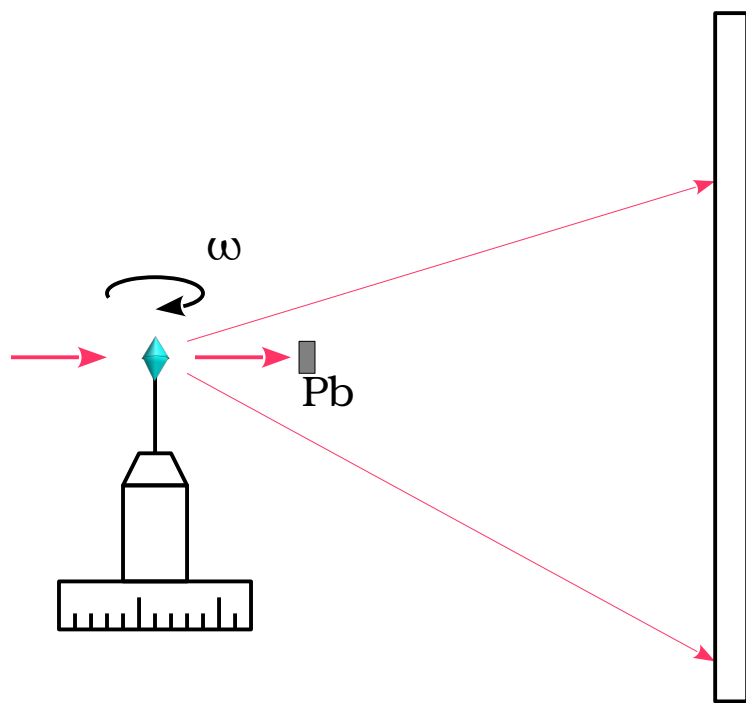
Sinchrononai



Goniometras



Tipiškas difrakcijos vaizdas

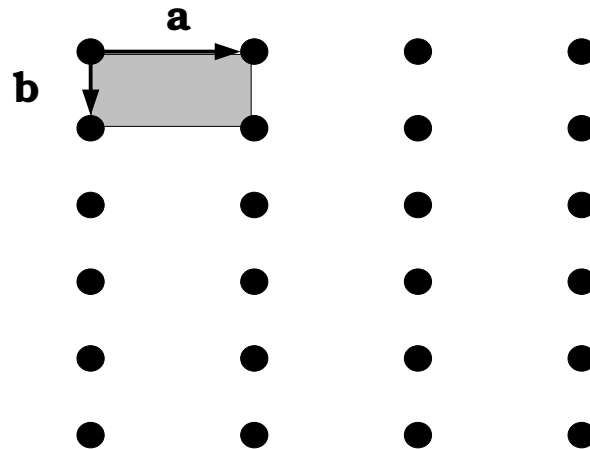


Kristalai – (betriukšmiai?) signalu stiprintuvai

Pagrindinės kristalo savybės:

0) periodiškumas

1) diskretiškumas



Atspindžių savybės

- Kiekvienas atspindys turi savo ***amplitudę*** (el. lauko amplitudė) ir ***fazę*** (el.-m. bangos vėlavimas, plg. su kitais atspindžiais) (amplitude, phase).
- Abu šie dydžiai priklauso nuo ***struktūrinio faktoriaus*** (structure factor).

Atspindžių savybės (2)

- Atspindžių geometrinis išsidėstymas priklauso nuo **kristalo gardelės parametru** ir nepriklauso nuo elementarios gardelės turinio.
- Atspindžių intensyvumai (ir fazės) priklauso nuo **gardelės turinio**.

Duomenų rinkinys

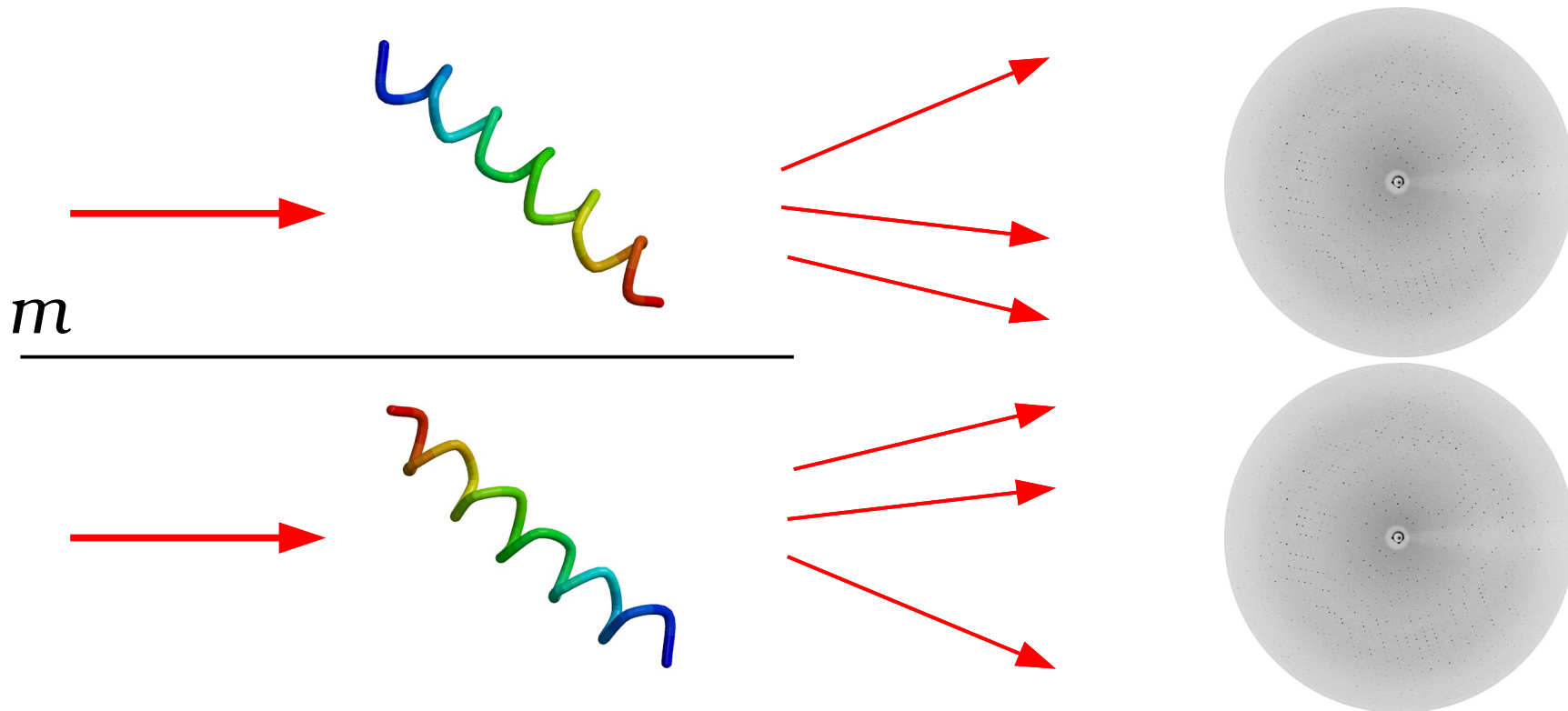
Kristalą sukant, vieni atspindžiai išnyksta, kiti atsiranda. Norint surinkti visą informaciją apie kristalo turinį, reikia apsukti jį taip, kad „pamatytume“ visus galimus atspindžius, maksimum – 360°.

Duomenų rinkinio savybės

- Skiriamoji geba
- Pilnumas
- Kartotinumumas
- Triukšmo lygis (R_{merge} , I/σ_I)

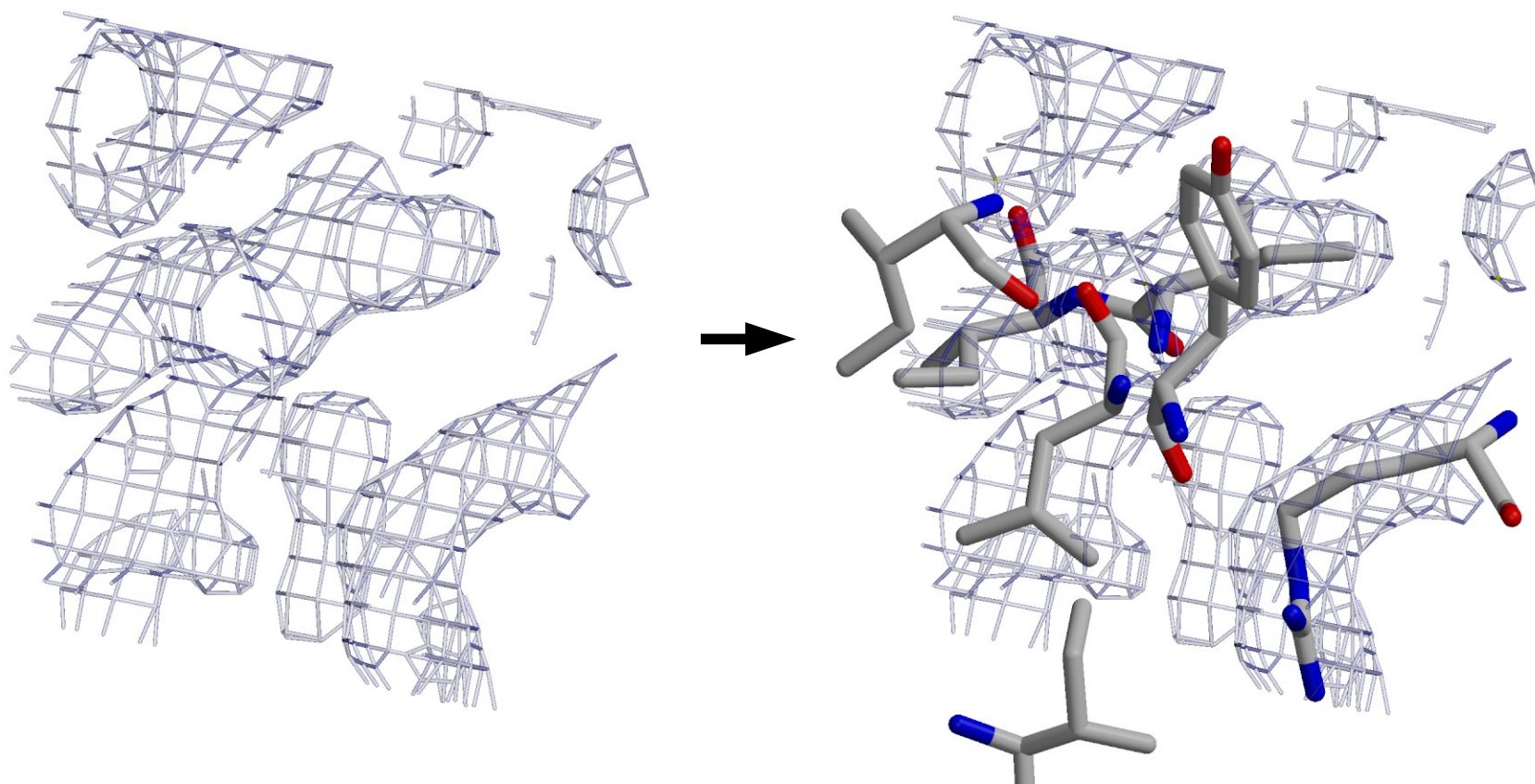
Difrakcijos uždavinio sprendinys - ne vienintelis!

Pavyzdys:



Atspindėta struktūra turi identišką difrakcijos vaizdą
(jei nėra anomalaus sklaidymo...)

Elektronų tankis – o kas toliau?



Rankinis modelio konstravimas

The screenshot displays a molecular modeling software interface. The main window shows a 3D wireframe model of a protein structure, with various atoms and bonds visible. The interface includes several menus and command windows:

- Object_menu**: A list of object properties and their status (on/off).
- User Menu**: A list of user-defined macros and actions.
- Controls**: A menu with options like Zoom, Rot Z, Rot Y, Rot X, Slab, Trans Z, Trans Y, Trans X.
- Display**: A menu with options like Build, Rebuild, Bones, Density, Menus.
- Graph**: A menu with options like Graph, Rebuild, Bones, Density, Menus.
- Menus**: A menu with options like User Menu, Centre_ID, Clear_ID, Clear_flags, @remap, @delpos, @delneg, @mir, @mod, @aomit, @omit, @make, @remake, @regenerate, @next-ca, @prev-ca, @next-O, @prev-O, Move_zone, Move_atom, Dial_next, Dial_previou, Yes, Refi_zone, Lego_Side_Ch, RSR_rigid, RSR_rotamer, @store, @ci, @rcsdiff, Dist_define, @on_startup, @ldmask, @ldomac, @reload, @ldbuild, @ldmaps.

The command window on the left shows the following commands and their outputs:

```
Mol> Created
Sam> File ty
Sam> Databa
Sam> Space f
Sam> Space f
Sam> Molecul
Sam>
Mol> Nothin
Mol> Created
Sam> File ty
Sam> Databa
Sam> Space f
Sam> Space f
Sam> Molecul
Sam>
Mol> Nothin
Mol> Created
Sam> File ty
Sam> Databa
Sam> Space f
Sam> Space f
Sam> Molecul
Sam>
Mol> Nothin
Mol> Created
Sam> File ty
Sam> Databa
Sam> Space f
Sam> Space f
Sam> Molecul
Sam>
Mol> Nothin
Mol> Created
Mol> Macro i
As2> Macro i
As2> Macro i
Map> New map
Map>
Map> New map
Map>
Map> centre-atom
As3> Macro in database.
Map> New map format :-
Map> red
Map> New map format :-
Map> blue
```

The status bar at the bottom indicates the file name "111_1580".

Papildoma informacija modelio konstravimui

- Molekulių skaičius asimetriniame vienete
- Baltymo dydis ir seka
- Individualių a.r. struktūros ;-)
- Kristalinimo tirpalų sudėtis (jonai, mažos molekulės) ir sudedamųjų dalių struktūros/savybės

Struktūrų patikslinimas

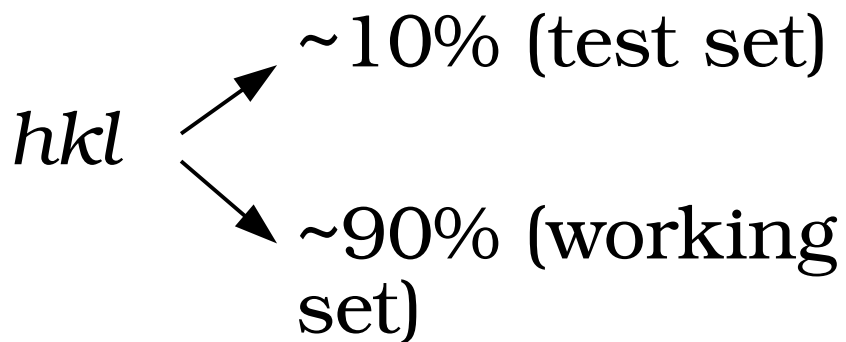
- Mažiausių kvadratų metodas
- Didžiausio tikėtinumo (maximum likelihood) metodai
- Bajeso statistika (Bayesian statistics)

Patikslinimo kriterijai

Kristalografinis R-faktorius:

$$R_{cryst} = \sum_{hkl} |F_{hkl}^{obs} - F_{hkl}^{calc}| / \sum_{hkl} |F_{hkl}^{obs}|$$

R-free:



$$R_{free} = \sum_{hkl \in Test\ set} \dots$$

$$R_{cryst} = \sum_{hkl \in Working\ set} \dots$$

Patikslinimo parametrai

- Atomų koordinatės
 - Temperatūriniai (B) faktoriai
 - Atomų pozicijų užimtumai
-
- Svarbu:
Parametru/matavimų skaičiaus
santykis

Struktūros kokybės rodikliai

- Skiriamoji geba (Å)
- R faktorius (R-factor), R_{cryst}
- „Laisvasis“ R faktorius, R_{free}
- $R_{\text{free}} - R_{\text{cryst}}$, $R_{\text{cryst}}/R_{\text{free}}$
- R_{cryst} ir R_{free} išoriniame atspindžių sluksnyje
- Vidutinė jungčių ilgių ir kampų paklaida

Nebaltyminės molekulės baltymo struktūroje

- Tirpiklio (vandens) molekulės
- Jonai
- Ligandai, kofaktoriai
- Modifikuotos amino rūgštys ar DNR bazės

Chaosu liudininkai

- Nuliniai užimtumai
- Milžiniški B-faktoriai
- Liekanos be šoninių grandinių

Resursai tinkle

Protein Data Bank (PDB)

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

Macromolecular Structure Database

<http://www.ebi.ac.uk/msd/>

International Union of Crystallography

<http://www.iucr.org/>

Crystallography Open Database (COD)

<http://www.crystallography.net/>