

Kisszögű röntgenszórás – a mérések kiértékelése: “Mit nyerhetünk a szórési görbéből?”

Wacha András

MTA Természettudományi Kutatóközpont

Tartalom

Ismétlés

Önszerveződő rendszerek

Rendezett fázisok

Multilamellás és hexagonális fázisok

Unilamellás vezikulák

Micellák és bicellák

Kiterjedt – hierarchikus – rendszerek

Aktív szenek anizotrópiájának és porozitásának jellemzése

Arany-cisztein nanokomplex önszerveződésének in situ követése

Részecske-jellegű rendszerek

SiO₂ nanorészecskék méreteloszlása

Fehéjék – biológiai makromolekulák

Összefoglalás

Tartalom

Ismétlés

Önszerveződő rendszerek

Rendezett fázisok

Multilamellás és hexagonális fázisok

Unilamellás vezikulák

Micellák és bicellák

Kiterjedt – hierarchikus – rendszerek

Aktív szenek anizotrópiájának és porozitásának jellemzése

Arany-cisztein nanokomplex önszerveződésének in situ követése

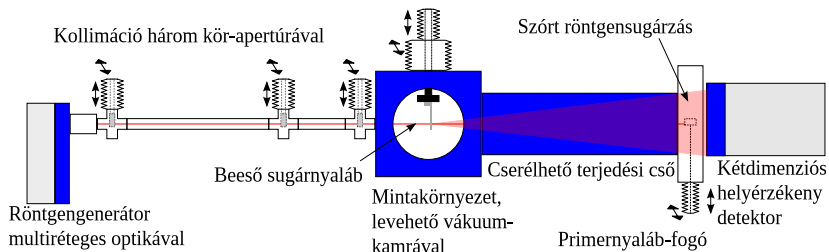
Részecske-jellegű rendszerek

SiO₂ nanorészecskék méreteloszlása

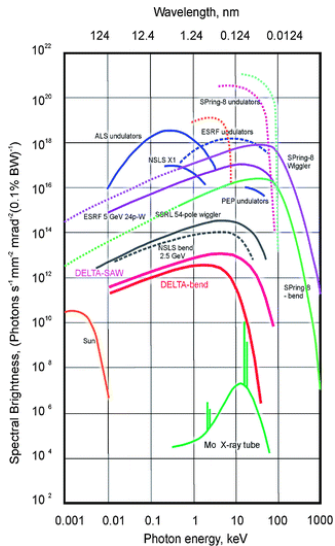
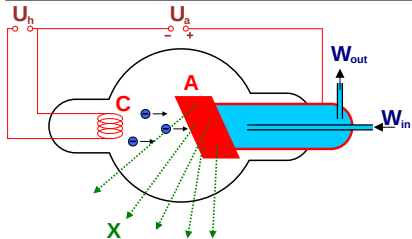
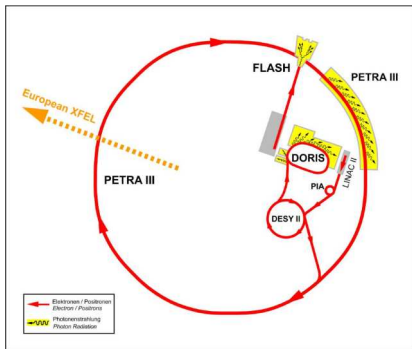
Fehéjék – biológiai makromolekulák

Összefoglalás

A pinhole kamera

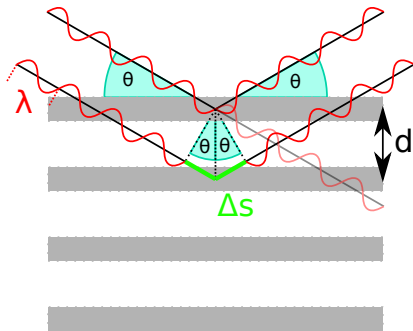


Röntgenső és szinkrotron

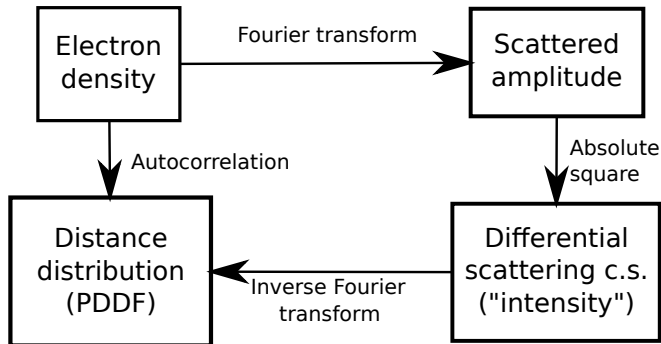


A Bragg-egyenlet

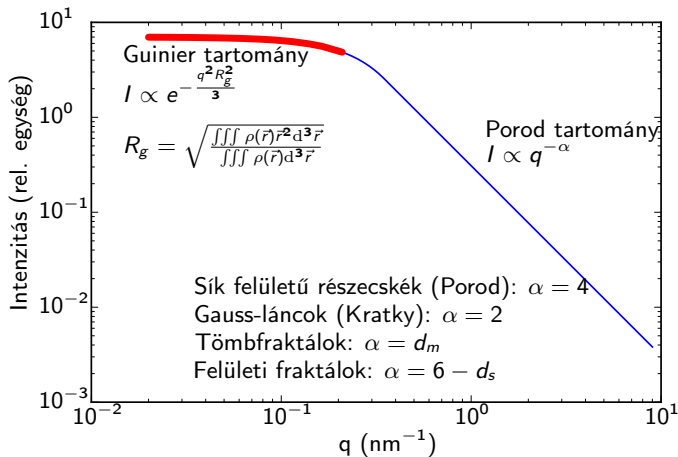
- ▶ Periodikus minta (d periódustávolság)
- ▶ θ beesési és visszaverődési szög
- ▶ Konstruktív interferencia a detektorban: A szomszédos síkokról visszaverődő sugarak azonos fázisban
- ▶ $\Delta s = n\lambda$ ahol $n \in \mathbb{N}$
- ▶ Geometriailag: $\Delta s = 2d \sin \theta$
- ▶ $2d \sin \theta = n\lambda$
- ▶ $\frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta = \frac{2\pi}{d} n$
- ▶ $q = \frac{2\pi}{d} n$



A szerkezet és a szórás közti összefüggés



Guinier és Porod határesetek



Tartalom

Ismétlés

Önszerveződő rendszerek

Rendezett fázisok

Multilamellás és hexagonális fázisok

Unilamellás vezikulák

Micellák és bicellák

Kiterjedt – hierarchikus – rendszerek

Aktív szenek anizotrópiájának és porozitásának jellemzése

Arany-cisztein nanokomplex önszerveződésének in situ követése

Részecske-jellegű rendszerek

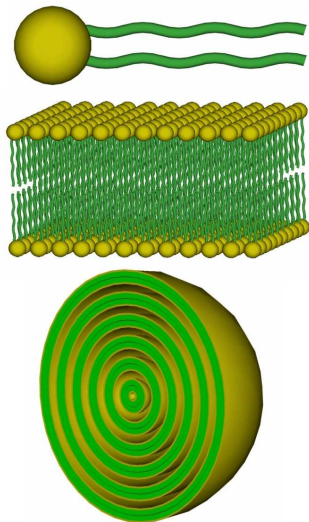
SiO₂ nanorészecskék méreteloszlása

Fehéjék – biológiai makromolekulák

Összefoglalás

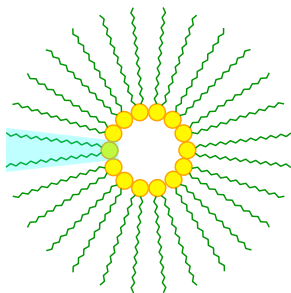
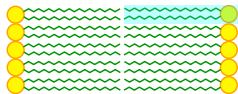
Lipid rendszerek, liposzómák

- ▶ Amfipatikus molekulák: hidrofil fejcsoport, hidrofób farok
- ▶ Vízben oldva önszerveződő rendszerek
- ▶ Élő szervezetek sejtmembránjai
- ▶ Más hasonló molekulák: tenzidek, detergensok stb.
- ▶ Alkalmazás
 - ▶ Membránmodell
 - ▶ Gyógyszerhordozó
 - ▶ Nanoreaktor
 - ▶ ...
- ▶ Fázisok
 - ▶ Termotrop
 - ▶ Liotrop



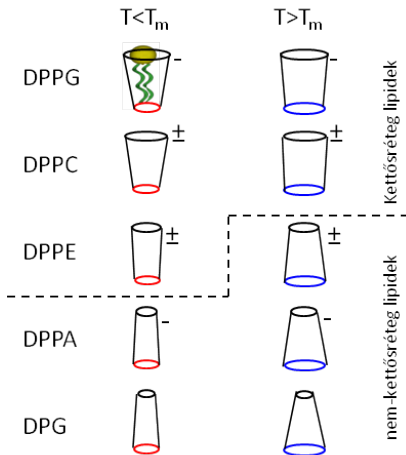
Foszfolipid rendszerek önszerveződő struktúrái

- ▶ A kialakuló szerkezetet alapvetően meghatározza:
 - ▶ A lipidmolekula alakja
 - ▶ A szénlác hossza és mozgékonyága
 - ▶ A fejcsoport töltésviszonyai
- ▶ Kettősréteg-alkotó lipidek (bilayer lipids): körülbelül henger alak
- ▶ Nem kettősréteg-alkotó lipidek (non-bilayer lipids): kúpos alak
 - ▶ Kis fejcsoport-terület: inverz micella / inverz hexagonális fázis
 - ▶ Nagy fejcsoport-terület: micella / hexagonális fázis



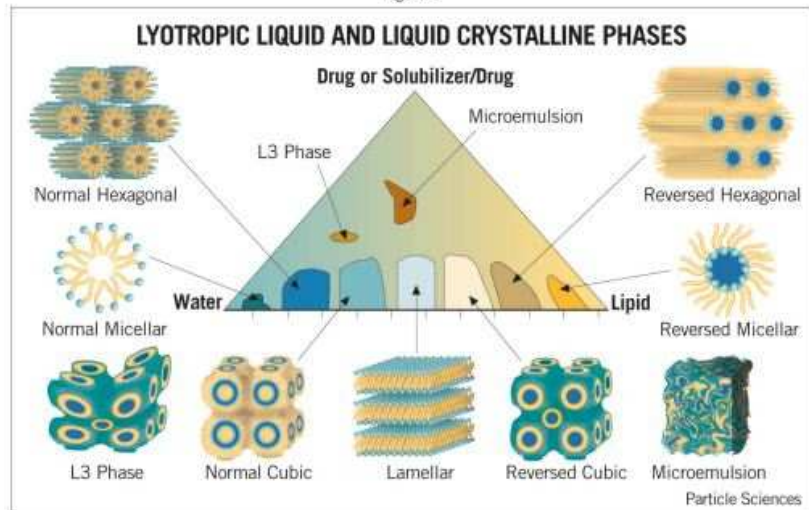
Foszfolipid rendszerek önszerveződő struktúrái

- ▶ A kialakuló szerkezetet alapvetően meghatározza:
 - ▶ A lipidmolekula alakja
 - ▶ A szénlánc hossza és mozgékonyasága
 - ▶ A fejcsoport töltésviszonyai
- ▶ Kettősréteg-alkotó lipidek (bilayer lipids): körülbelül henger alak
- ▶ Nem kettősréteg-alkotó lipidek (non-bilayer lipids): kúpos alak
 - ▶ Kis fejcsoport-terület: inverz micella / inverz hexagonális fázis
 - ▶ Nagy fejcsoport-terület: micella / hexagonális fázis

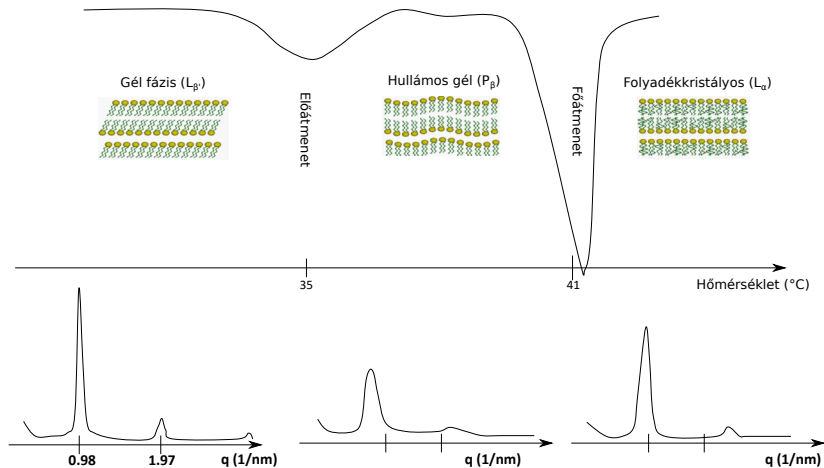


Lipid/víz rendszer liotrop fázisai

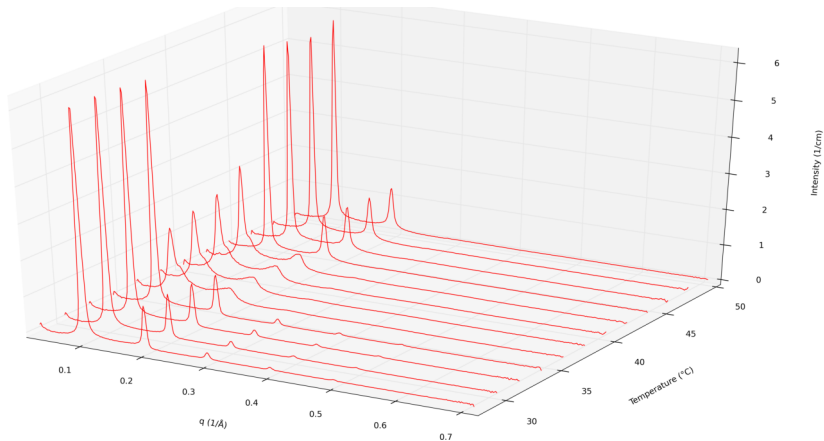
Figure 1



A DPPC termotrop fázisai

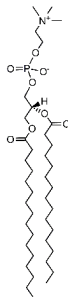
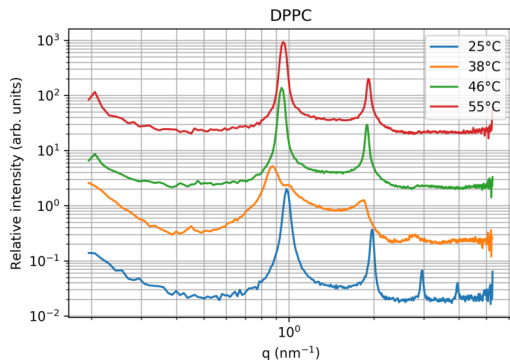


A DPPC termotrop fázisai: SAXS



Csúcshely-arányok: 1, 2, 3, 4 \rightarrow lamelláris

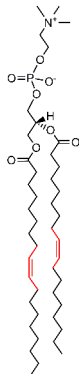
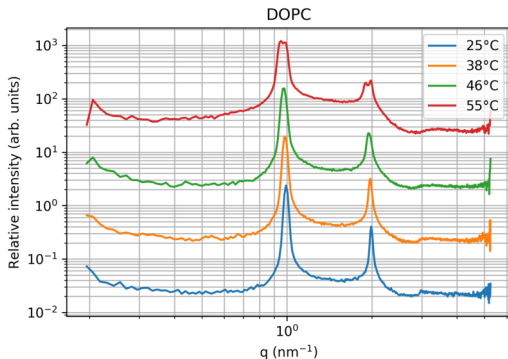
A DPPC termotrop fázisai: SAXS



Csúcshely-arányok: 1, 2, 3, 4 → lamelláris

Hőmérséklet	25°C	38°C	46°C	55°C
Fázis	L_{β}	P_{β}'	L_{α}	L_{α}
Periódustávolság	6.373 nm	„7.193 nm*”	6.657 nm	6.569 nm

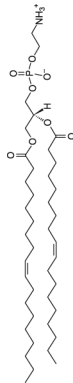
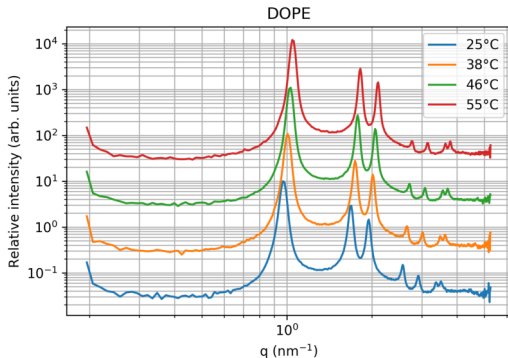
DOPC



Csúcshely-arányok: 1, 2, (3)

Hőmérséklet	25°C	38°C	46°C	55°C
Fázis	L_{α}	L_{α}	L_{α}	L_{α}
Periódustávolság	6.323 nm	6.370 nm	6.440 nm	6.642 nm 6.335 nm

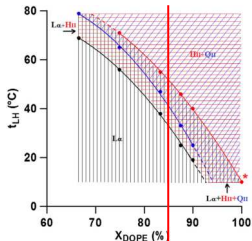
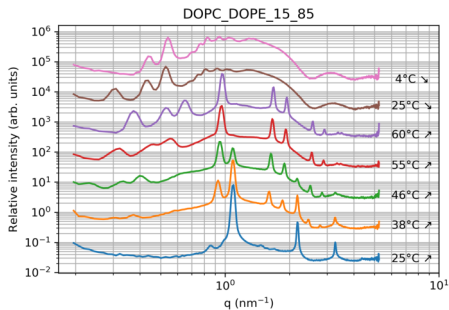
DOPE: hexagonális fázis



Csúcshely-arányok: 1, $\sqrt{3}$, 2, $\sqrt{7}$, 3, $\sqrt{12}$, $\sqrt{13}$

Hőmérséklet	25°C	38°C	46°C	55°C
Fázis	H _{II}	H _{II}	H _{II}	H _{II}
Rácsparaméter	6.458 nm	6.244 nm	6.119 nm	5.989 nm

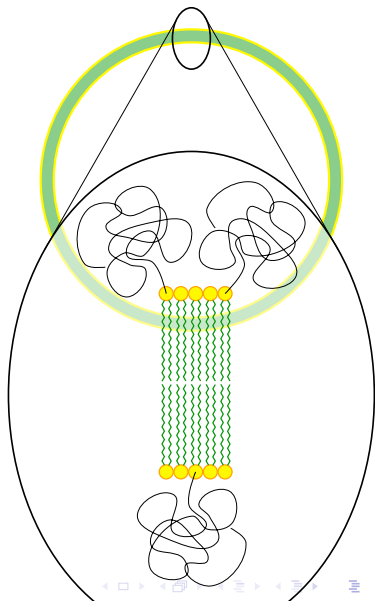
Együttesen jelenlevő fázisok



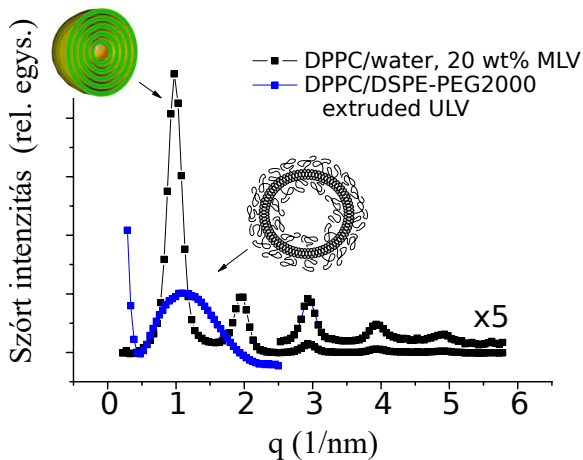
- ▶ Szobahőmérsékleten lamellás fázis (L_{α})
- ▶ 38 °C: az inverz hexagonális (H_{II}) megjelenik
- ▶ 46 °C: a köbös fázis (Q_{II}) megjelenése, a három fázis koegzisztenciája
- ▶ 55 °C: eltűnik a lamellás fázis
- ▶ visszahűtve: a köbös fázis megmarad, a lamellás nem tér vissza

Sztérikusan stabilizált unilamellás vezikulák

- ▶ Unilamellás vezikula: egyetlen kettősréteg
- ▶ Kettősréteg lipidek hidratáláskor *automatikus* multilamellás vezikulákat képeznek
- ▶ Unilamellásítás: ultrahang / extrudálás
- ▶ Spontán összeépülés elkerülése:
 - ▶ Töltött lipidek
 - ▶ Sztérikus stabilizálás: pl. PEG-konjugált lipidek
- ▶ Elsődleges felhasználás: gyógyszerhordozó és -célzó ágensek ⇒ a méret kritikus!

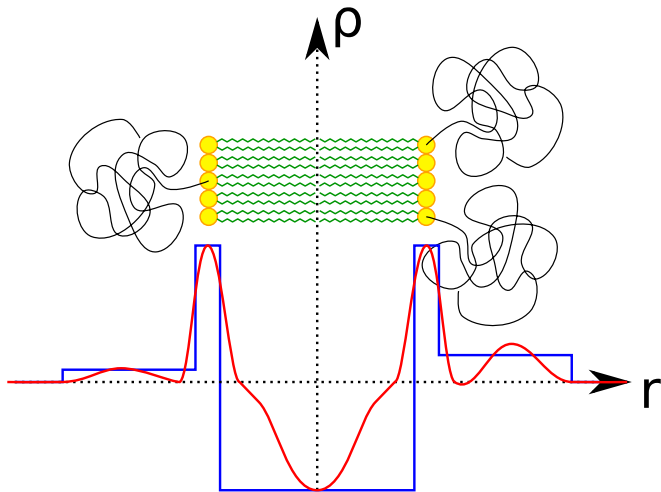


Sztérikusan stabilizált vezikulák



- ▶ Kevesebb szóró elektron \Rightarrow gyengébb szórési intenzitás
- ▶ Nincs réteg-réteg korreláció \Rightarrow csúcsok hiánya
- ▶ Amit látunk: a kettősréteg formafaktora

Foszfolipid kettősréteg szórása



$$I_{SSL}(q) = [F_{PEG,in}(q) + F_{head,in}(q) + F_{CH}(q) + F_{head,out}(q) + F_{PEG,out}(q)]^2$$

Kettősréteg szórása

$$I_{SSL}(q) =$$

$$[F_{PEG,in}(q) + F_{head,in}(q) + F_{CH}(q) + F_{head,out}(q) + F_{PEG,out}(q)]^2$$

- ▶ Minden tag lépcsőfüggvény vagy Gauss

$$\rho(q) = \begin{cases} \rho_0 & \text{ha } |r - r_0| < \sigma \\ 0 & \text{egyébként} \end{cases} \quad \rho(q) = \frac{\rho_0}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{-\frac{(r-r_0)^2}{2\sigma^2}}$$

- ▶ Modellparaméterek:

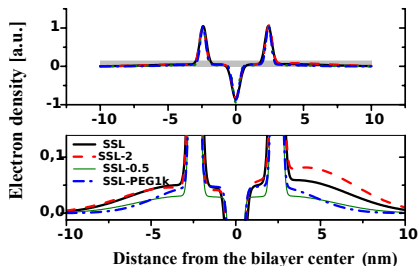
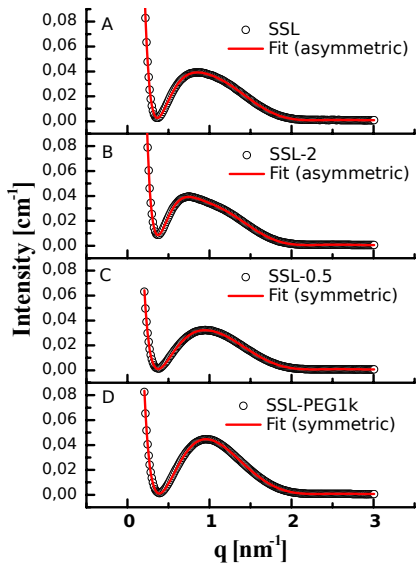
	ρ	r	σ
Belső PEG	$\rho_{PEG,in}$	$r_{PEG,in}$	$\sigma_{PEG,in}$
Belső fejcsoport	ρ_{head}	$-r_{head}$	σ_{head}
Szénlánc	-1	0	σ_{tail}
Külső fejcsoport	ρ_{head}	r_{head}	σ_{head}
Külső PEG	$\rho_{PEG,out}$	$r_{PEG,out}$	$\sigma_{PEG,out}$

+ külső skálázás (A) + konstans háttér (C) + vezikula sugara (R_0)

+ vezikula sugarának szórása (δR)

- ▶ Aszimmetrikus modell (PEG-ek különböznek): 14 paraméter
- ▶ Szimmetrikus modell (PEG-ek ekvivalensek): 11 paraméter

Sztérikusan stabilizált vezikulák



SSL: HSPC +
DSPE-PEG2000

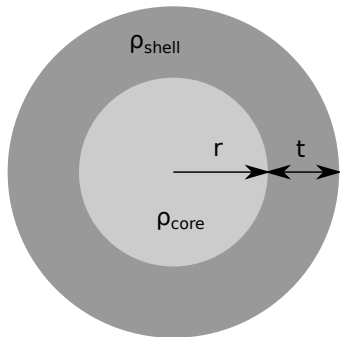
SSL-2: HSPC +
2×DSPE-PEG2000

SSL-0.5: HSPC +
0.5×DSPE-PEG2000

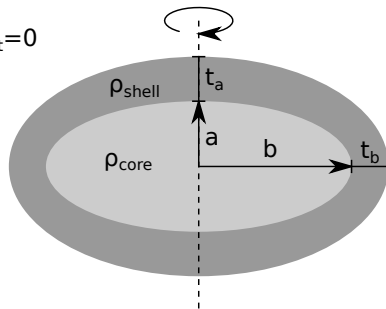
SSL-PEG1k: HSPC +
DSPE-PEG1000

Micellák

- ▶ Amfipatikus molekulákból fölépülő önszerveződő rendszerek
- ▶ Kúp alakú molekulák: széles hidrophil fej, keskeny hidrofób lánc
- ▶ Kritikus micella koncentráció (CMC)
- ▶ Nem csak gömb alakú lehet

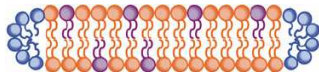


$$\rho_{\text{solvent}} = 0$$

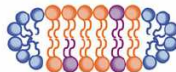


Bicellák

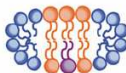
- ▶ Két komponens: hosszú szénláncú kettősréteg-képző lipid és rövid szénláncú detergens
- ▶ Alakot befolyásolja: $q = c_{\text{lipid}} / c_{\text{detergens}}$
 - ▶ $q = 0$: detergens micella
 - ▶ $q \rightarrow \infty$: kettősréteg
- ▶ Fontosságuk: kisméretű hordozók membránfehérjékhez
- ▶ Gyakori példa: DHPC-DMPC bicella
 - ▶ DHPC: 1,2-Dihexanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
 - ▶ DMPC: 1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine



$q = 2.5$



$q = 1$

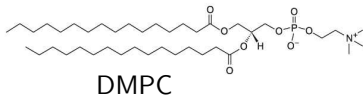
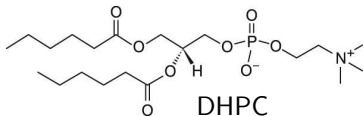


$q = 0.5$

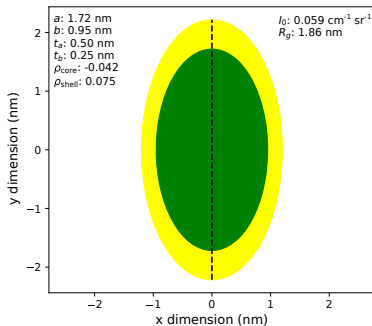
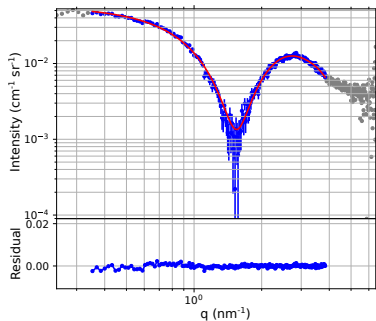


$q \sim 0$

 Detergent   Long chain lipid

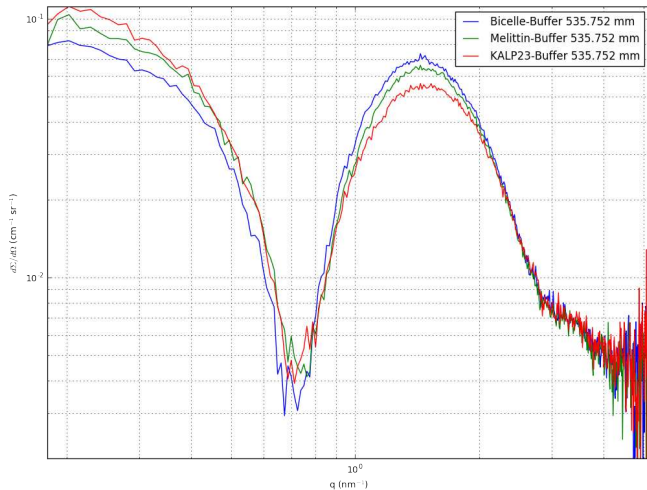


DHPC micella szórása



- ▶ A szórás hasonló a lipid kettősrétegekéhez
- ▶ Guinier tartomány
- ▶ Illesztésből megadható a micella alakja

Peptid-hordozó DHPC-DMPC bicellák



Tartalom

Ismétlés

Önszerveződő rendszerek

Rendezett fázisok

Multilamellás és hexagonális fázisok

Unilamellás vezikulák

Micellák és bicellák

Kiterjedt – hierarchikus – rendszerek

Aktív szenek anizotrópiájának és porozitásának jellemzése

Arany-cisztein nanokomplex önszerveződésének in situ követése

Részecske-jellegű rendszerek

SiO₂ nanorészecskék méreteloszlása

Fehéjék – biológiai makromolekulák

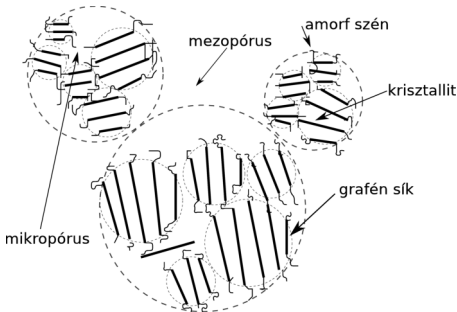
Összefoglalás

Aktív szenek

Aktív szenek

- ▶ Adsorbens, hordozó, szerkezeti anyag
- ▶ Hierarchikus nanoszerkezet
- ▶ Előállítás:
 1. Pirolízis/karbonizálás
 2. Aktiválás = pórusosítás
- ▶ Jól variálható
 - ▶ Prekursor anyag választása
 - ▶ Aktivációs folyamat hangolása
- ▶ Anizotrópia: eddig ki nem használt lehetőségek

A hierarchikus szerkezet modellje



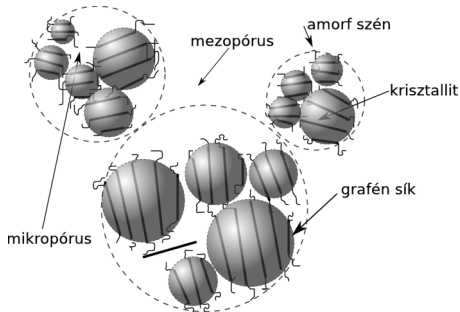
Hirsch, Proc. Royal Soc. Lond. A (1954) 226(1165) 143-169

Aktív szenek

Aktív szenek

- ▶ Adsorbens, hordozó, szerkezeti anyag
- ▶ Hierarchikus nanoszerkezet
- ▶ Előállítás:
 1. Pirolízis/karbonizálás
 2. Aktiválás = pórusosítás
- ▶ Jól variálható
 - ▶ Prekursor anyag választása
 - ▶ Aktivációs folyamat hangolása
- ▶ Anizotrópia: eddig ki nem használt lehetőségek

A hierarchikus szerkezet modellje



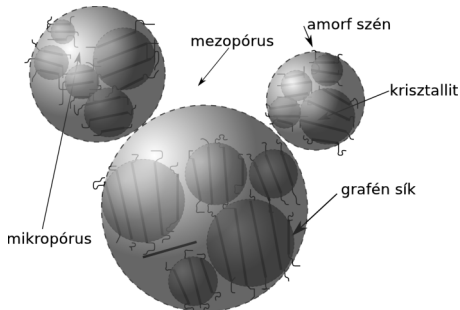
Hirsch, Proc. Royal Soc. Lond. A (1954) 226(1165) 143-169

Aktív szenek

Aktív szenek

- ▶ Adsorbens, hordozó, szerkezeti anyag
- ▶ Hierarchikus nanoszerkezet
- ▶ Előállítás:
 1. Pirolízis/karbonizálás
 2. Aktiválás = pórusosítás
- ▶ Jól variálható
 - ▶ Prekursor anyag választása
 - ▶ Aktivációs folyamat hangolása
- ▶ Anizotrópia: eddig ki nem használt lehetőségek

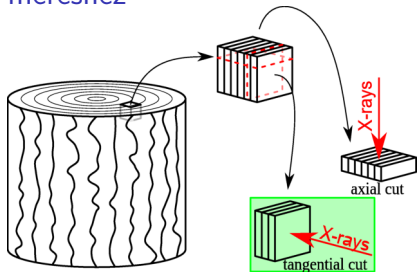
A hierarchikus szerkezet modellje



Hirsch, Proc. Royal Soc. Lond. A (1954) 226(1165) 143-169

Mintaelőkészítés

Mintaelőkészítés SAXS méréshez



- ▶ 1 cm³-es fakockák pirolízise (700 °C) → 6 × 6 × 6 mm³ szénkockák
- ▶ Fizikai aktiválás: $C_{(s)} \xrightarrow[900^{\circ}\text{C}]{\text{H}_2\text{O}_{(g)}} C_{(g)}$
- ▶ Tömegveszteség (konverzió) az aktiválás idejének növelésével:

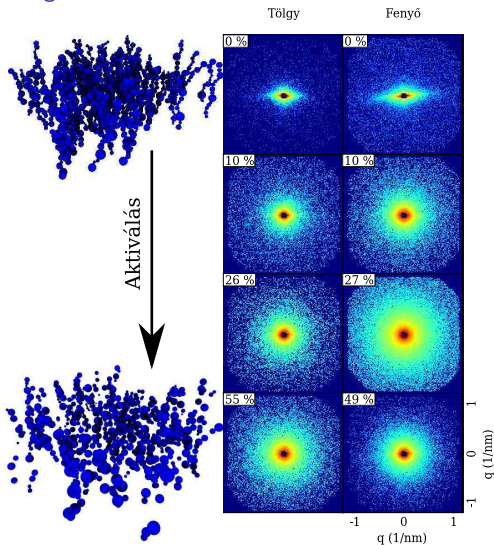
	Bükk	Tölgy	Fenyő
0 perc	0 %	0 %	0 %
15 perc	9 %	10 %	10 %
45 perc	26 %	26 %	27 %
90 perc	54 %	55 %	49 %

- ▶ SAXS mérés: szinkrotron mérőhelyeknél (Hamburg, Berlin)

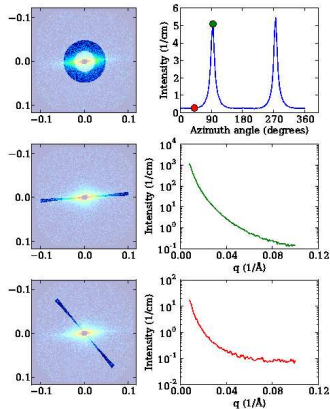
Részletek: Wacha, Varga, Vainio, Hoell, Bóta (2011) Carbon 49(12) 3958-3971.

Aktívszenek SAXS mérése

Tangenciális metszet

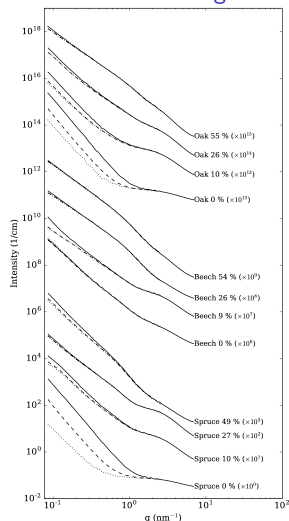


- ▶ Vízszintes szórási kép: függőleges szálak
- ▶ Az anizotrópia csökkenése: szálak tördelődése, pórusformálódás
- ▶ Az anizotrópia jellemzése: azimutális szórási görbék és szektor-integrálás



Az anizotrópia térbeli kiterjedése

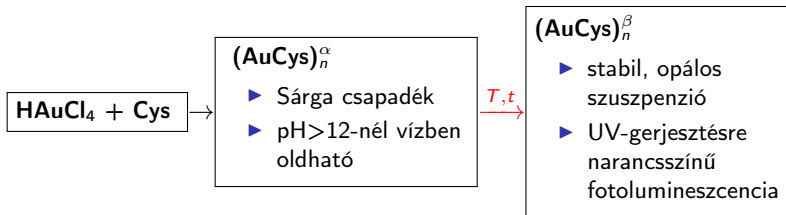
Radiális szektor-átlagok



- ▶ Radiális szórás görbék számolása a szórás képből
 - ▶ A teljes 2π azimutszög tartományban (—)
 - ▶ A legintenzívebb azimutális csúcs környezetére szűkítve (---)
 - ▶ Az előbbi irányra merőlegesen (···)
- ▶ Anizotrópia a kis méreteknél ($q > 2 \text{ nm}^{-1}$) nem jelentkezik
- ▶ Az anizotrópia az aktiválással csökken
- ▶ Hatványfüggvények (\rightarrow fraktáldimenzió) és Guinier-tartományok (\rightarrow girációs sugár)
- ▶ Két Guinier-tartomány:
 - ▶ Kis konverzió: mikropórusok
 - ▶ Nagy konverzió: mezopórusok
- ▶ Tömbfraktál \rightarrow felületi fraktál átmenet
 - ▶ Fenyő: 49 %-os kiégésnél újra felületi fraktál: mikrorepedések
 - ▶ Bükk: nincs felületi fraktál: eleve porózus?

Fotolumineszcens arany-cisztain nanokomplexek

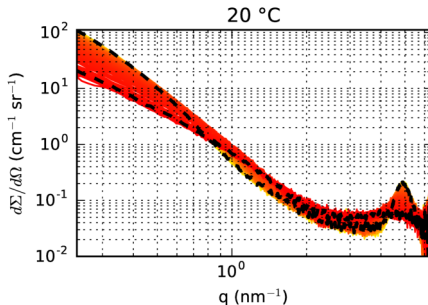
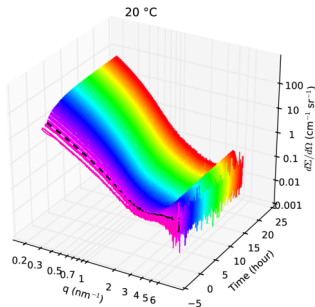
- ▶ Fehérjék által stabilizált szupramolekuláris arany-asszociátumok: fotolumineszcencia
- ▶ Au-Cys nanokomplex: legegyszerűbb rendszer a stabilizáló mechanizmus földelésére



- ▶ Az átalakulás sebessége erősen függ az inkubáció hőmérsékletétől. Időskála: pár óra - nap \Rightarrow időfeloldásos SAXS a CREDO berendezésen

Au-Cys nanokomplex TRSAXS vizsgálata

Inkubálás 20 °C-on



Görbület a kis q tartományban (ld. Guinier)

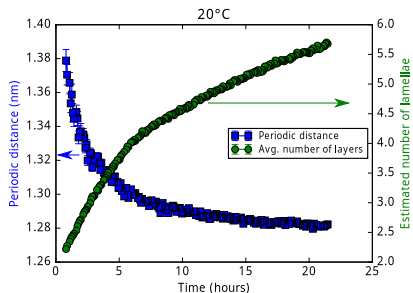
- ▶ Határozott méretű objektumok
- ▶ Balra mozdul → méretnövekedés
- ▶ Intenzitás nő → számuk is nő
- ▶ Előtte $I \propto q^{-2}$ → 2D kiterjedt lamellák

Csúcs a nagy q tartományban

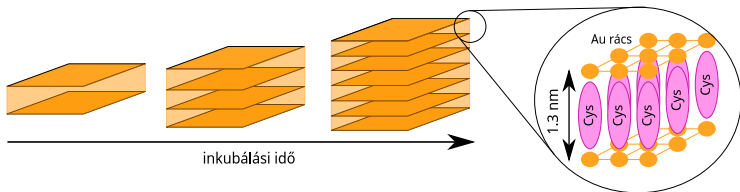
- ▶ Periodikus szerkezet
- ▶ Intenzitás nő → periodicitás egyre „tökéletesebb”

Automatikus modellillesztés

Rétegek száma és periódustávolság

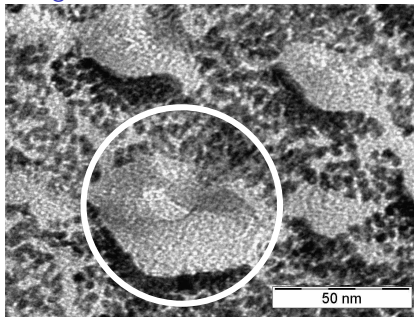


- ▶ Guinier közelítés kiterjedt lamellákra:
 $I_{\text{vastagság}} \approx G \cdot q^{-2} e^{-q^2 R_T^2} \rightarrow$
Homogén réteg vastagsága:
 $T = \sqrt{12} R_T$
- ▶ Végleges periódustávolság: 1.29 nm
- ▶ A rétegek finomszerkezete: egymás fölött ≈ 1.3 nm-re elhelyezkedő Au síkok, Cys távtartókkal
- ▶ Korreláció a fotolumineszcencia intenzitásának növekedésével: 0.9208

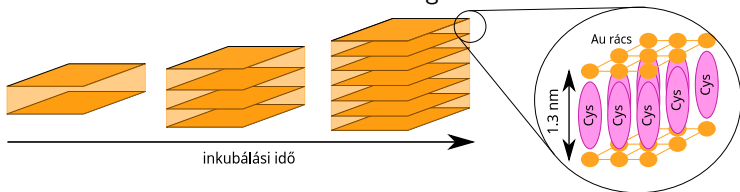


Automatikus modellillesztés

Rétegek FF-TEM felvételeken



- ▶ Guinier közelítés kiterjedt lamellákra:
 $I_{\text{vastagság}} \approx G \cdot q^{-2} e^{-q^2 R_T^2} \rightarrow$
Homogén réteg vastagsága:
 $T = \sqrt{12} R_T$
- ▶ Végleges periódustávolság: 1.29 nm
- ▶ A rétegek finomszerkezete: egymás fölött ≈ 1.3 nm-re elhelyezkedő Au síkok, Cys távtartókkal
- ▶ Korreláció a fotolumineszcencia intenzitásának növekedésével: 0.9208
- ▶ FF-TEM mérések: pár nm vastag rétegek



Tartalom

Ismétlés

Önszerveződő rendszerek

Rendezett fázisok

Multilamellás és hexagonális fázisok

Unilamellás vezikulák

Micellák és bicellák

Kiterjedt – hierarchikus – rendszerek

Aktív szenek anizotrópiájának és porozitásának jellemzése

Arany-cisztein nanokomplex önszerveződésének in situ követése

Részecske-jellegű rendszerek

SiO₂ nanorészecskék méreteloszlása

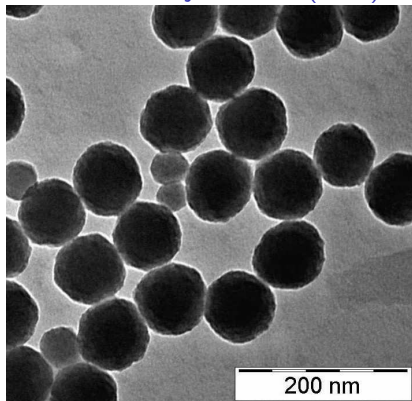
Fehéjék – biológiai makromolekulák

Összefoglalás

SiO₂ nanorészecskék méreteloszlása

Institute for Reference Materials and Measurements, Joint Research Centre of the European Commission: új SiO₂ méretstandard bevezetése. Minősítés több SAXS mérőhely együttműködésével

ERM FD-101b: új referencia (CRM)



► Méretmeghatározás módszerei:

1. Guinier illesztés:

$$I(q \ll 1/R) \approx I_0 e^{-\frac{q^2 R^2}{5}}$$

2. Gömb szórásának illesztése:

$$I(q) = \Phi_{\text{gömb}}(q, R) \equiv$$

$$V_R^2 \left[\frac{3}{(qR)^3} (\sin(qR) - qR \cos(qR)) \right]^2$$

3. Gömb méreteloszlás illesztése:

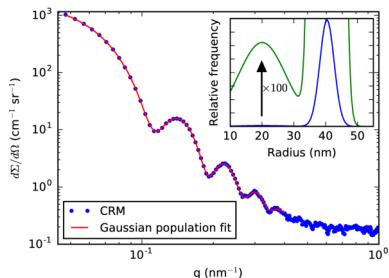
$$I(q) = \int_0^{\infty} p(R) \Phi_{\text{gömb}}(q, R) dR$$

4. Monte Carlo módszer: R_i populáció választása w_i súlyokkal, melyre $|I(q) - \sum_i w_i \Phi_{\text{gömb}}(q, R_i)|$ minimális

SiO₂ nanorészecskék méreteloszlása

Institute for Reference Materials and Measurements, Joint Research Centre of the European Commission: új SiO₂ méretstandard bevezetése. Minősítés több SAXS mérőhely együttműködésével

ERM FD-101b: új referencia (CRM)



► Méretmeghatározás módszerei:

1. Guinier illesztés:

$$I(q \ll 1/R) \approx I_0 e^{-\frac{q^2 R^2}{5}}$$

2. Gömb szórájának illesztése:

$$I(q) = \Phi_{\text{gömb}}(q, R) \equiv$$

$$V_R^2 \left[\frac{3}{(qR)^3} (\sin(qR) - qR \cos(qR)) \right]^2$$

3. Gömb méreteloszlás illesztése:

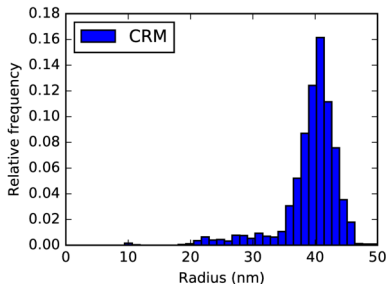
$$I(q) = \int_0^{\infty} p(R) \Phi_{\text{gömb}}(q, R) dR$$

4. Monte Carlo módszer: R_i populáció választása w_i súlyokkal, melyre $|I(q) - \sum_i w_i \Phi_{\text{gömb}}(q, R_i)|$ minimális

SiO₂ nanorészecskék méreteloszlása

Institute for Reference Materials and Measurements, Joint Research Centre of the European Commission: új SiO₂ méretstandard bevezetése. Minősítés több SAXS mérőhely együttműködésével

Monte Carlo méretmeghatározás



► Méretmeghatározás módszerei:

1. Guinier illesztés:

$$I(q \ll 1/R) \approx I_0 e^{-\frac{q^2 R^2}{5}}$$

2. Gömb szórásának illesztése:

$$I(q) = \Phi_{\text{gömb}}(q, R) \equiv$$

$$V_R^2 \left[\frac{3}{(qR)^3} (\sin(qR) - qR \cos(qR)) \right]^2$$

3. Gömb méreteloszlás illesztése:

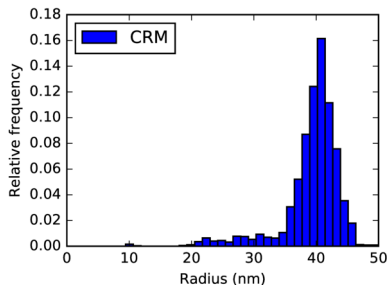
$$I(q) = \int_0^{\infty} p(R) \Phi_{\text{gömb}}(q, R) dR$$

4. Monte Carlo módszer: R_i populáció választása w_i súlyokkal, melyre $|I(q) - \sum_i w_i \Phi_{\text{gömb}}(q, R_i)|$ minimális

SiO₂ nanorészecskék méreteloszlása

Institute for Reference Materials and Measurements, Joint Research Centre of the European Commission: új SiO₂ méretstandard bevezetése. Minősítés több SAXS mérőhely együttműködésével

Monte Carlo méretmeghatározás



► Méretmeghatározás módszerei:

1. Guinier illesztés:

$$I(q \ll 1/R) \approx I_0 e^{-\frac{q^2 R^2}{5}}$$

2. Gömb szórásának illesztése:

$$I(q) = \Phi_{\text{gömb}}(q, R) \equiv$$

$$V_R^2 \left[\frac{3}{(qR)^3} (\sin(qR) - qR \cos(qR)) \right]^2$$

3. Gömb méreteloszlás illesztése:

$$I(q) = \int_0^{\infty} p(R) \Phi_{\text{gömb}}(q, R) dR$$

4. Monte Carlo módszer: R_i populáció választása w_i súlyokkal, melyre $|I(q) - \sum_i w_i \Phi_{\text{gömb}}(q, R_i)|$ minimális

A mérések eredményeképpen a CREDO tanúsított SAXS berendezés lett

Biological Small-Angle X-ray Scattering

BioSAXS

- ▶ Biological Small-Angle X-ray Scattering
- ▶ Biológiai szempontból fontos makromolekulák
- ▶ Elsődlegesen alakmeghatározás, homogén elektronsűrűség közelítéssel
- ▶ Kulcsparaméterek: R_g , $I_0 \equiv \lim_{q \rightarrow 0} I(q)$
- ▶ Nyerhető információ
 - ▶ A fehérje mérete, alakja (alacsony feloldás), térfogata, molekulatömege
 - ▶ A fehérje flexibilitása (rendezett/rendezetlen)
 - ▶ Kristályszerkezet validálása
 - ▶ Ismert szerkezetű domének relatív elhelyezkedése a fehérjében

A módszer buktatói

- ▶ Alacsony szórási kontraszt \Rightarrow rossz jel/zaj viszony
- ▶ Nem elég híg minta: a Guinier-közelítés nem érvényes
- ▶ Nem elég tiszta minta (különösen nagymolekulás szennyezők)
- ▶ Nem monodiszperz minta (pl. oligomerizáció)
- ▶ Jellegtelen szórási görbe: „túlillesztés”
- ▶ Háttérkivonás (oldószer szórása) bizonytalansága
- ▶ Fázisprobléma \Rightarrow a kapott szerkezet egyértelmű-e?

A BioSAXS módszere

- ▶ Jól kidolgozott algoritmusok, módszerek
- ▶ Alapfeltételezés: a fehérjék az oldatban egymástól független, azonos, belül homogén elektronsűrűségű nanorészecskék
 - független: az interferencia-tag eltűnik
 - azonos: nincs oligomerizáció, nincs szennyezés stb.
 - homogén: egyszerű alak-illesztés; SAXS nem lát atomi méretekben!



A BioSAXS mérések értelmezése

- ▶ Guinier közelítés: $I(q \ll R_g) \propto I_0 e^{-\frac{q^2 R_g^2}{3}}$; $I_0 = (\Delta\rho)^2 V^2$.
- ▶ Porod-féle invariáns: $Q \equiv \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty q^2 I(q) dq = 2\pi^2 (\Delta\rho)^2 V$
- ▶ Porod-térfogat: $V_{\text{Porod}} = 2\pi^2 I_0 / Q$
- ▶ Értelmezés első lépései:
 1. Oldószer-háttér kivonása a szórási görbéből (a fehérje térfogati hányadával korrigálva)
 2. Guinier-illesztés $\rightarrow I_0, R_g$
 3. Porod-invariáns $\rightarrow V_{\text{Porod}}$
 4. Inverz Fourier: $I(q) \rightarrow p(r)$ pártávolság-eloszlási függvény kiszámítása
 5. I_0, R_g számítása a $p(r)$ -ből:

$$I_0 = \int_0^\infty p(r) dr; \quad R_g^2 = \frac{\int_0^\infty p(r) r^2 dr}{2 \int_0^\infty p(r) dr}$$

6. A két módszerrel nyert I_0 és R_g összevetése
 7. További értelmezés...
- ▶ ATSAS: BioSAXS mérésiértékelés, adatfeldolgozás programcsomag (EMBL Hamburg, Svergun csoport)

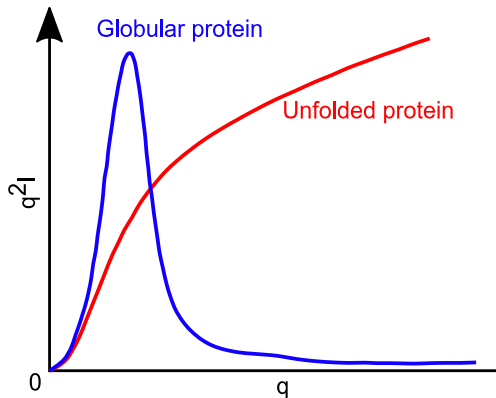
A Kratky plot

- ▶ Gauss-statisztikát követő polimerlánc szórásának kifutó szakasza:

$$I(q \rightarrow \infty) \propto \frac{2}{q^2 R_g^2}$$

- ▶ Kratky plot: $q^2 I - q$. Viselkedése a $q \rightarrow \infty$ határesetben:

- ▶ Rendezett fehérjéknél ($I \propto q^{-4}$) 0-hoz tart
- ▶ Rendezetlen fehérjéknél ($I \propto q^{-2}$) konstans vagy divergál



Source: <https://www-ssrf.slac.stanford.edu/~saxs/analysis/assessment.htm>

Fehérjék alakmeghatározása kisszögű szórásból

Geometriai alakok illesztése a szórási görbére vagy a PDDF-re

- ▶ BODIES program (ATSAS része)
- ▶ Gömb, gömbhéj, ellipszoid, súlyzó stb.
- ▶ Kevés számú paraméter

Dummy atom modell (DAM)

- ▶ A fehérje alakjának fölépítése szorosan (fcc vagy hcp rács) álló, azonos méretű gömbökből
- ▶ Monte Carlo illesztő algoritmus
 1. Véletlenszerű konfiguráció
 2. A konfiguráció módosítása (gömb hozzáadása / elvétele)
 3. Szórás számolása
 4. Mért és számolt szórás összehasonlítása
 - ▶ Jobb illeszkedés: a változás megtartva
 - ▶ Rosszabb illeszkedés: a változás *nagy valószínűséggel* elvetve
 5. Ismétlés 2-től
- ▶ Sok a paraméter: az egyértelműség/megbízhatóság kérdéses!

Fehérjék alakmeghatározása kisszögű szórásból

Geometriai alakok illesztése a szórási görbére vagy a PDDF-re

- ▶ BODIES program (ATSAS része)
- ▶ Gömb, gömbhéj, ellipszoid, súlyzó stb.
- ▶ Kevés számú paraméter

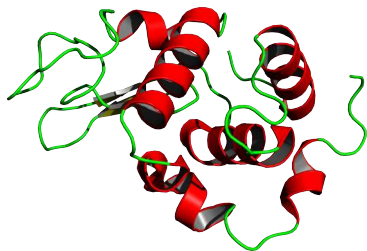
Dummy atom modell (DAM)

- ▶ A fehérje alakjának fölépítése szorosan (fcc vagy hcp rács) álló, azonos méretű gömbökből
- ▶ Monte Carlo illesztő algoritmus
 1. Véletlenszerű konfiguráció
 2. A konfiguráció módosítása (gömb hozzáadása / elvétele)
 3. Szórás számolása
 4. Mért és számolt szórás összehasonlítása
 - ▶ Jobb illeszkedés: a változás megtartva
 - ▶ Rosszabb illeszkedés: a változás *nagy valószínűséggel* elvetve
 5. Ismétlés 2-től
- ▶ Sok a paraméter: az egyértelműség/megbízhatóság kérdéses!

Lizozim – Egy „tipikus” BioSAXS kísérlet

Kristályszerkezet

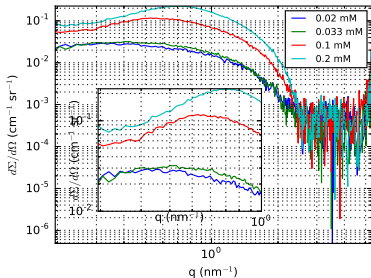
- ▶ Jól ismert fehérje („állatorvosi ló”)



Lizozim – Egy „tipikus” BioSAXS kísérlet

Koncentráció hatása

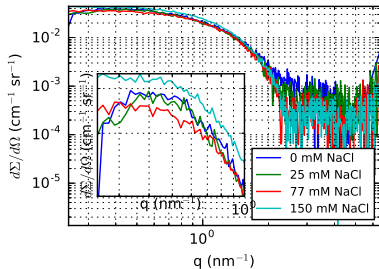
Lizozim



- ▶ Jól ismert fehérje („állatorvosi ló”)
- ▶ Korrelációs csúcs
 - ▶ Oka: fehérjemolekulák közti taszítás
 - ▶ A girációs sugár nem határozható meg!
 - ▶ Megszüntethető:
 - ▶ Hígítással (távolság növelése)

Lizozim – Egy „tipikus” BioSAXS kísérlet

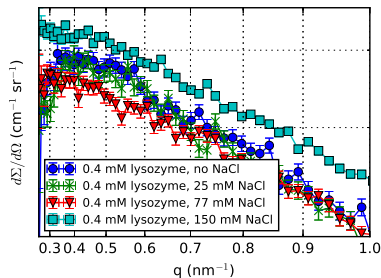
Ionerősség hatása



- ▶ Jól ismert fehérje („állatorvosi ló”)
- ▶ Korrelációs csúcs
 - ▶ Oka: fehérjemolekulák közti taszítás
 - ▶ A girációs sugár nem határozható meg!
 - ▶ Megszüntethető:
 - ▶ Hígítással (távolság növelése)
 - ▶ Sózással (kölcsonhatás árnyékolása)

Lizozim – Egy „tipikus” BioSAXS kísérlet

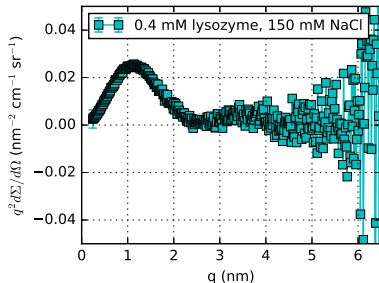
Guinier ábrázolás



- ▶ Jól ismert fehérje („állatorvosi ló”)
- ▶ Korrelációs csúcs
 - ▶ Oka: fehérjemolekulák közti taszítás
 - ▶ A girációs sugár nem határozható meg!
 - ▶ Megszüntethető:
 - ▶ Hígítással (távolság növelése)
 - ▶ Sózással (kölcsonhatás árnyékolása)
- ▶ Guinier plot ($\log I$ vs. q^2): az $I \propto \exp(-q^2 R_g^2/3)$ alak ellenőrzése

Lyozim – Egy „tipikus” BioSAXS kísérlet

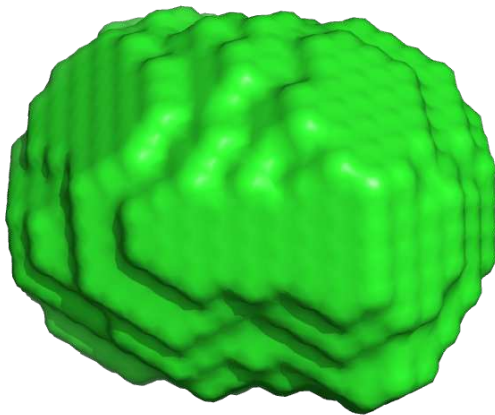
Kratky ábrázolás



- ▶ Jól ismert fehérje („állatorvosi ló”)
- ▶ Korrelációs csúcs
 - ▶ Oka: fehérjemolekulák közti taszítás
 - ▶ A girációs sugár nem határozható meg!
 - ▶ Megszüntethető:
 - ▶ Hígítással (távolság növelése)
 - ▶ Sózással (kölcsonhatás árnyékolása)
- ▶ Guinier plot ($\log I$ vs. q^2): az $I \propto \exp(-q^2 R_g^2/3)$ alak ellenőrzése
- ▶ Kratky plot ($q^2 I$ vs. q): egyértelműen rendezett fehérje

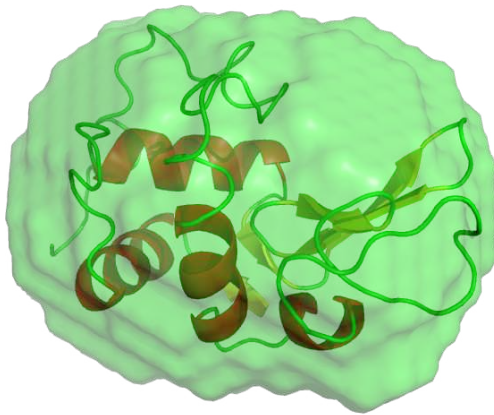
A lizozim alakja

„Dummy atom modell” – durvaszemcsés leírás



A lizozim alakja

„Dummy atom modell” – durvaszemcsés leírás

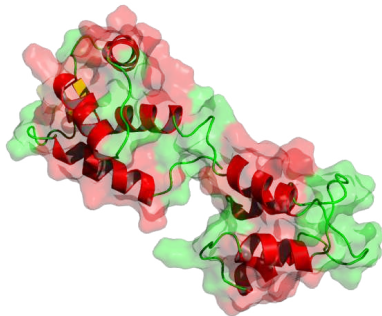


Jó egyezés a kristályszerkezettel!

Kalmodulin

- ▶ Eukarióta sejtek leggyakoribb plazmafehérjéje ($\approx 1\%$)
- ▶ Ca^{2+} -indukált jelátviteli útvonalak kulcsfontosságú eleme

Apo (Ca^{2+} -mentes)
konformáció (MX)

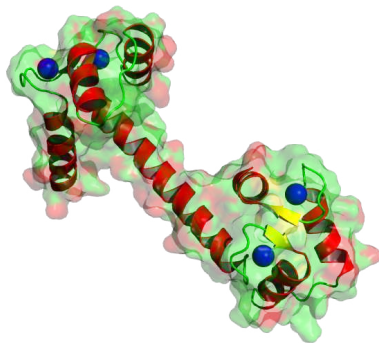


Burkoló alak: Van der Waals felület

Kalmodulin

- ▶ Eukarióta sejtek leggyakoribb plazmafehérjéje ($\approx 1\%$)
- ▶ Ca^{2+} -indukált jelátviteli útvonalak kulcsfontosságú eleme
- ▶ Ca^{2+} kötésével alakváltozás
 - ▶ Mindkét vég-doménben az „EF-hand” motívumok kinyílnak: hidrofób zsebek keletkeznek
 - ▶ Vég-domének eltávolodnak
 - ▶ Linker másodlagos szerkezete hurok \rightarrow hélix (kristályosítási műtermék!)

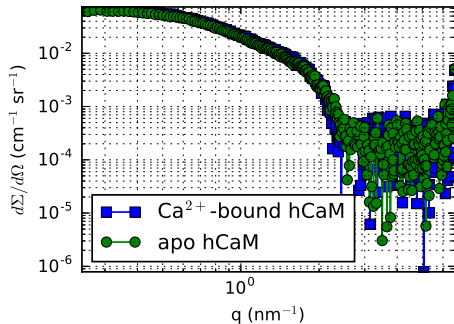
Ca^{2+} -kötött konformáció (MX)



Burkoló alak: Van der Waals felület

Kalmodulin – SAXS eredmények

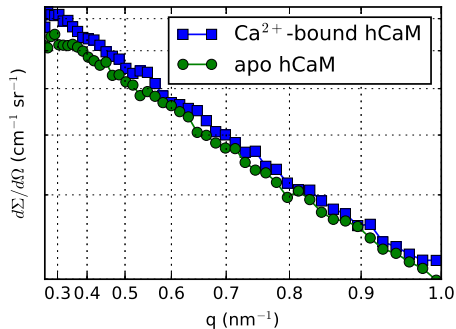
Szórési görbék



- ▶ Szórési görbék: nagyon hasonlóak
- ▶ Súlyzó alakú objektumok szórési görbéje

Kalmodulin – SAXS eredmények

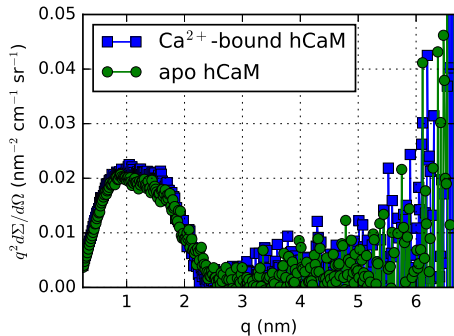
Guinier plot



- ▶ Szórési görbék: nagyon hasonlóak
- ▶ Súlyzó alakú objektumok szórési görbéje
- ▶ Hasonló girációs sugarak

Kalmodulin – SAXS eredmények

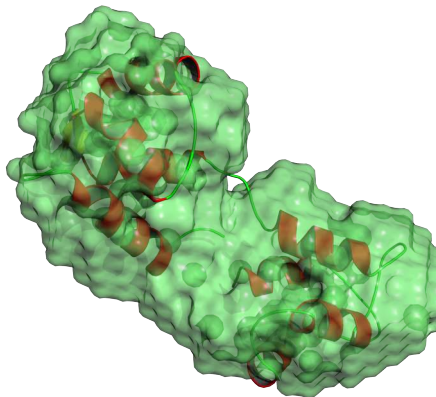
Kratky plot



- ▶ Szórési görbék: nagyon hasonlóak
- ▶ Súlyzó alakú objektumok szórési görbéje
- ▶ Hasonló girációs sugarak
- ▶ Részben rendezetlen (linker rész)

Kalmodulin – SAXS eredmények

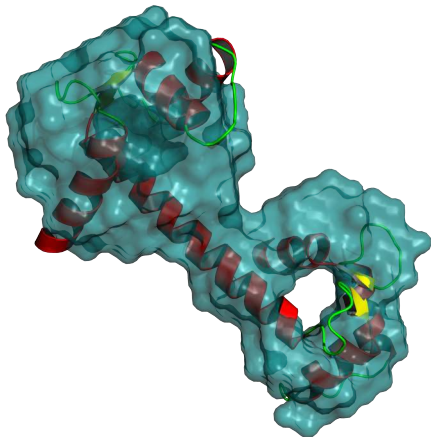
DAM: apo konformáció



- ▶ Szórési görbék: nagyon hasonlóak
- ▶ Súlyzó alakú objektumok szórési görbéje
- ▶ Hasonló girációs sugarak
- ▶ Részben rendezetlen (linker rész)
- ▶ Dummy atom modell:
 - ▶ Súlyzó alak
 - ▶ Apo konformáció „lazább”

Kalmodulin – SAXS eredmények

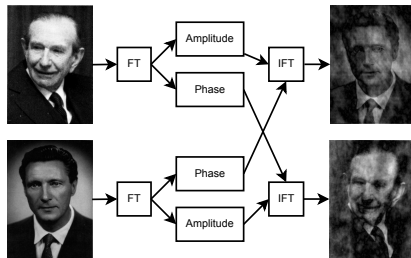
DAM: Ca^{2+} -kötött konformáció



- ▶ Szórási görbék: nagyon hasonlóak
- ▶ Súlyzó alakú objektumok szórási görbéje
- ▶ Hasonló girációs sugarak
- ▶ Részben rendezetlen (linker rész)
- ▶ Dummy atom modell:
 - ▶ Súlyzó alak
 - ▶ Apo konformáció „lazább”
 - ▶ Ca^{2+} kötődése után a szerkezet kimerevedik
 - ▶ Eltérések a kristályszerkezettől: kristályosítási műtermékek?

A dummy atom modellek megbízhatósága

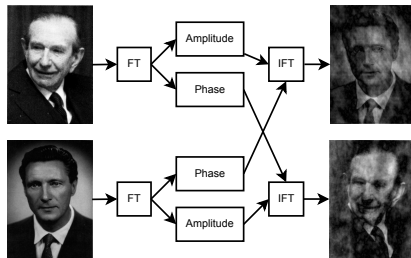
- ▶ Fázisprobléma!
- ▶ Módszerek a megbízhatóság növelésére
 - ▶ Több lehetséges alak generálása (Monte Carlo = Random!): DAMMIF
 - ▶ A szerkezetek csoportosítása / szűrése: DAMSEL
 - ▶ Átlagos szerkezet: DAMAVER
 - ▶ Az átlagos szerkezet finomítása: DAMMIN



Idea from Saldin et al. J. Phys.: Condens. Matter 13 (2001) 10699-10707

A dummy atom modellek megbízhatósága

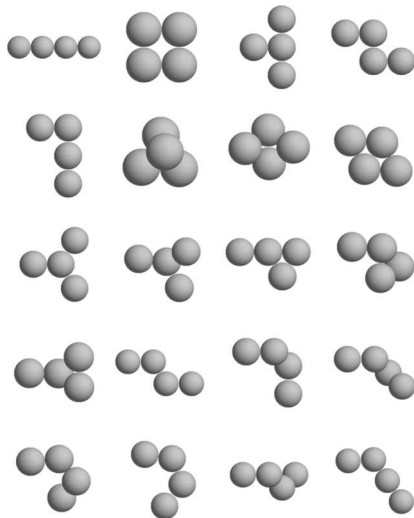
- ▶ Fázisprobléma!
- ▶ Módszerek a megbízhatóság növelésére
 - ▶ Több lehetséges alak generálása (Monte Carlo = Random!): DAMMIF
 - ▶ A szerkezetek csoportosítása / szűrése: DAMSEL
 - ▶ Átlagos szerkezet: DAMAVER
 - ▶ Az átlagos szerkezet finomítása: DAMMIN
- ▶ A megbízhatóság jellemzése (AMBIMETER)



Idea from Salán et al. J. Phys.: Condens. Matter 13 (2001) 10693-10707

A dummy atom modellek megbízhatósága

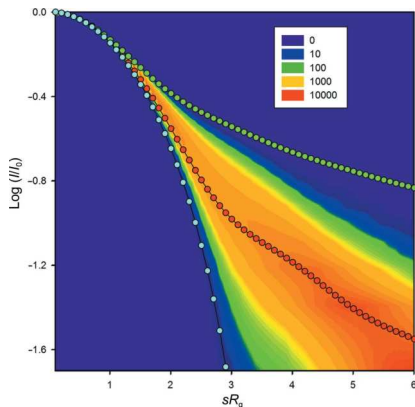
- ▶ Fázisprobléma!
- ▶ Módszerek a megbízhatóság növelésére
 - ▶ Több lehetséges alak generálása (Monte Carlo = Random!): DAMMIF
 - ▶ A szerkezetek csoportosítása / szűrése: DAMSEL
 - ▶ Átlagos szerkezet: DAMAVER
 - ▶ Az átlagos szerkezet finomítása: DAMMIN
- ▶ A megbízhatóság jellemzése (AMBIMETER)
 - ▶ Könyvtár készítése lehetséges szerkezetekből
 - ▶ Szórási görbék: $I(q)/I_0$ vs. qR_g



Petoukhov & Svergun, Acta Crystallographica D 2015, 71(5), 1051-1058

A dummy atom modellek megbízhatósága

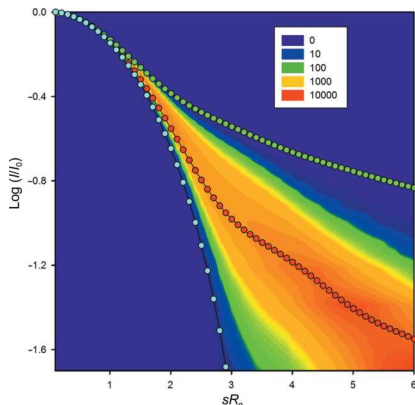
- ▶ Fázisprobléma!
- ▶ Módszerek a megbízhatóság növelésére
 - ▶ Több lehetséges alak generálása (Monte Carlo = Random!): DAMMIF
 - ▶ A szerkezetek csoportosítása / szűrése: DAMSEL
 - ▶ Átlagos szerkezet: DAMAVER
 - ▶ Az átlagos szerkezet finomítása: DAMMIN
- ▶ A megbízhatóság jellemzése (AMBIMETER)
 - ▶ Könyvtár készítése lehetséges szerkezetekből
 - ▶ Szórási görbék: $I(q)/I_0$ vs. qR_g
 - ▶ Kompatibilis modellek keresése a mért görbéhez



Petoukhov & Svergun, Acta Crystallographica D 2015, 71(5), 1051-1058

A dummy atom modellek megbízhatósága

- ▶ Fázisprobléma!
- ▶ Módszerek a megbízhatóság növelésére
 - ▶ Több lehetséges alak generálása (Monte Carlo = Random!): DAMMIF
 - ▶ A szerkezetek csoportosítása / szűrése: DAMSEL
 - ▶ Átlagos szerkezet: DAMAVER
 - ▶ Az átlagos szerkezet finomítása: DAMMIN
- ▶ A megbízhatóság jellemzése (AMBIMETER)
 - ▶ Könyvtár készítése lehetséges szerkezetekből
 - ▶ Szórási görbék: $I(q)/I_0$ vs. qR_g
 - ▶ Kompatibilis modellek keresése a mért görbéhez
 - ▶ Lizozim: 1; apo kalmodulin: 422;
Ca²⁺-kötött kalmodulin: 417



Petoukhov & Svergun, Acta Crystallographica D 2015, 71(5), 1051-1058

Tartalom

Ismétlés

Önszerveződő rendszerek

Rendezett fázisok

Multilamellás és hexagonális fázisok

Unilamellás vezikulák

Micellák és bicellák

Kiterjedt – hierarchikus – rendszerek

Aktív szenek anizotrópiájának és porozitásának jellemzése

Arany-cisztein nanokomplex önszerveződésének in situ követése

Részecske-jellegű rendszerek

SiO₂ nanorészecskék méreteloszlása

Fehéjék – biológiai makromolekulák

Összefoglalás

Irodalom és programok

Programok

- ▶ SASFit: modellillesztés
- ▶ ATSAS: BioSAXS adatkezelés, R_G , PDDF számítás, dummy atom illesztés stb.
- ▶ SANSView: ábrázolás, modellillesztés

Irodalom

- ▶ Boualem Hammouda: *Probing Nanoscale Structures: The SANS Toolbox* (http://www.ncnr.nist.gov/staff/hammouda/the_SANS_toolbox.pdf)
- ▶ J. Kohlbrecher, I. Breßler: *SASFit manual* (<http://kur.web.psi.ch/sans1/SANSSoft/sasfit.html>)
- ▶ L. A. Feigin és D. I. Svergun: *Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering* (http://www.embl-hamburg.de/biosaxs/reprints/feigin_svergun_1987.pdf)

Összefoglalás

SAXS mérések értelmezése

- ▶ Multilamellás vezikulák és rendezett lipid rendszerek: periódustávolság meghatározása
- ▶ Sztérikusan stabilizált vezikulák: kettősréteg radiális elektronsűrűség-eloszlása
- ▶ Micellák-bicellák: alak, mag-héj modell paraméterek
- ▶ Aktív szerek: anizotropia, fraktáltulajdonságok
- ▶ Arany-cisztein nanokomplex: a fotolumineszcens szerkezet időbeli kialakulása
- ▶ SiO₂ nanorészecskék (ismétlés): méret, méreteloszlás meghatározása
- ▶ BioSAXS: fehérjék méretének, alakjának, flexibilitásának meghatározása

Köszönet

Az előadásban bemutatott mérési eredmények az alábbi személyeknek köszönhetőek (mintakészítés, ötletek stb.):

- ▶ Bóta Attila
- ▶ Mihály Judith
- ▶ Varga Zoltán
- ▶ Jónás Andrea
- ▶ Bodor Andrea
- ▶ Dudás Erika
- ▶ Juhász Tünde
- ▶ Söptei Balázs

Köszönöm a figyelmet!

