

TÓPICOS EN
CRIOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA
Y CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X
DE PROTEÍNAS

Métodos dispersivos
Dispersión a bajos ángulos (SAS)

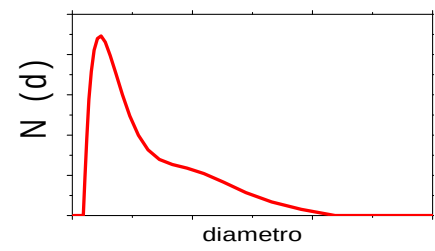
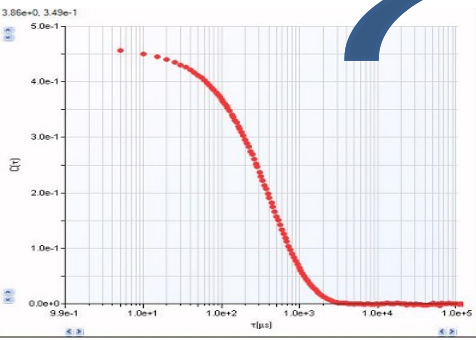
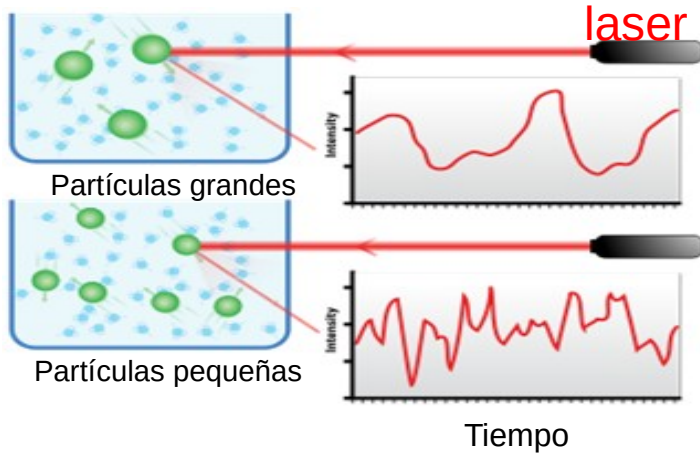
Resumen teórica

- Conceptos básicos
 - Dispersión
 - ¿Qué obtenemos de un experimento SAS?
 - Principios físicos
- Sección Experimental
- Análisis de Datos
 - Introducción
 - Ejemplos
- Presente y Futuro de las técnicas dispersivas

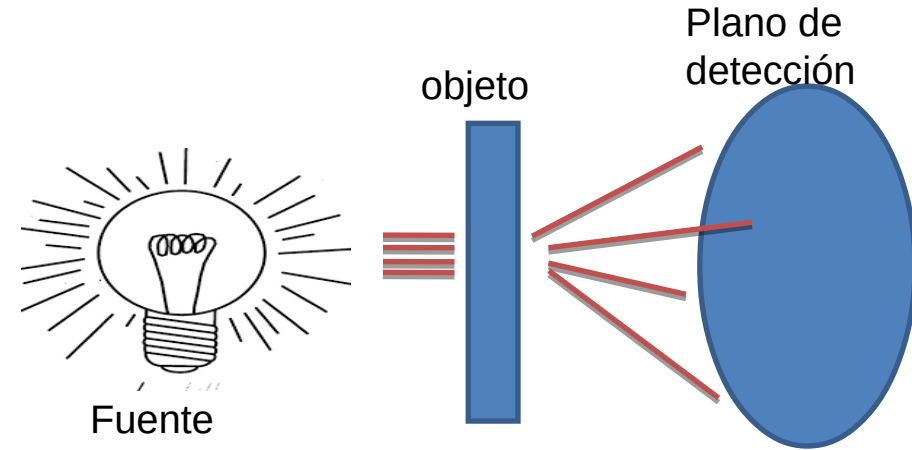
Dispersión dinámica vs dispersión estática

Espectroscopia de correlación

Propiedades de difusión

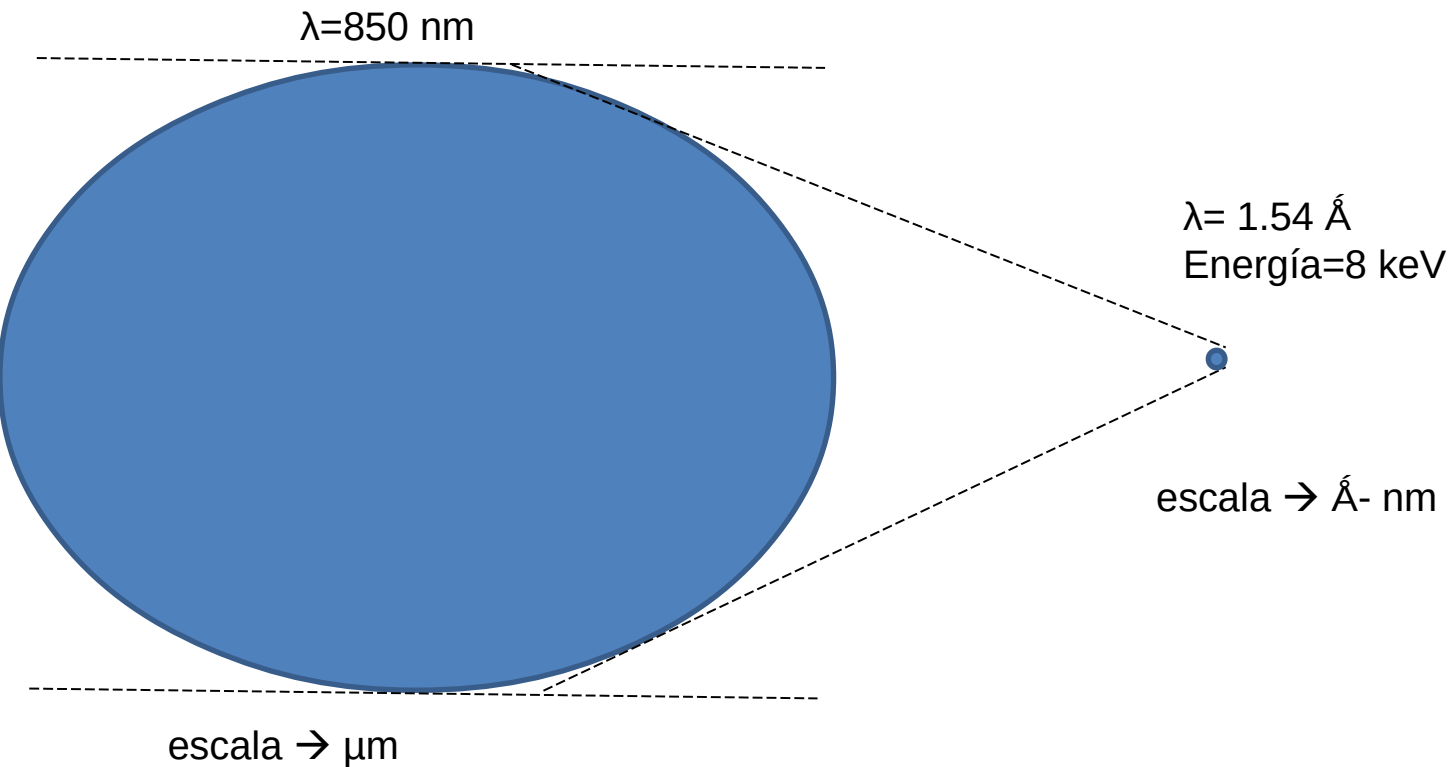


Dispersión estática



Se recolecta la intensidad de “partículas” (fotones, neutrones, etc) durante un periodo temporal.

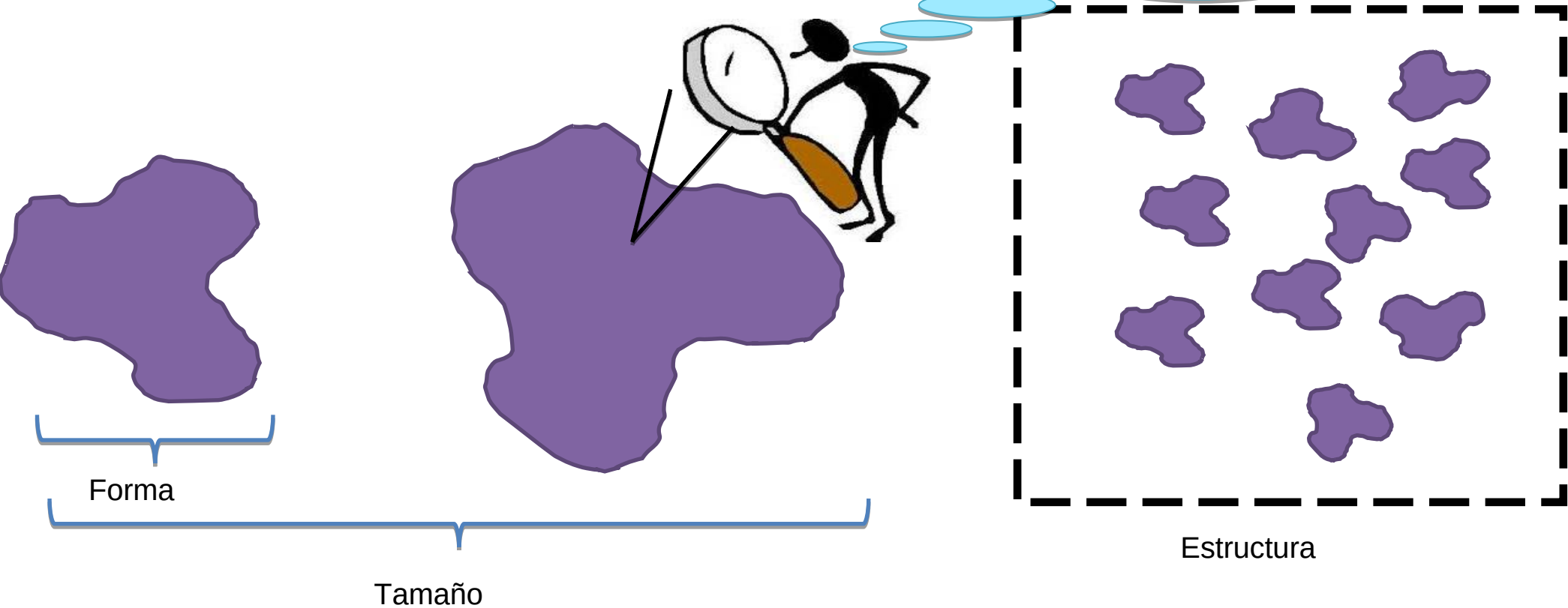
Dispersión: ¿con qué longitud de onda queremos “ver”?



Dispersión a bajo ángulo (SAS)

Debería complementar con otras técnicas

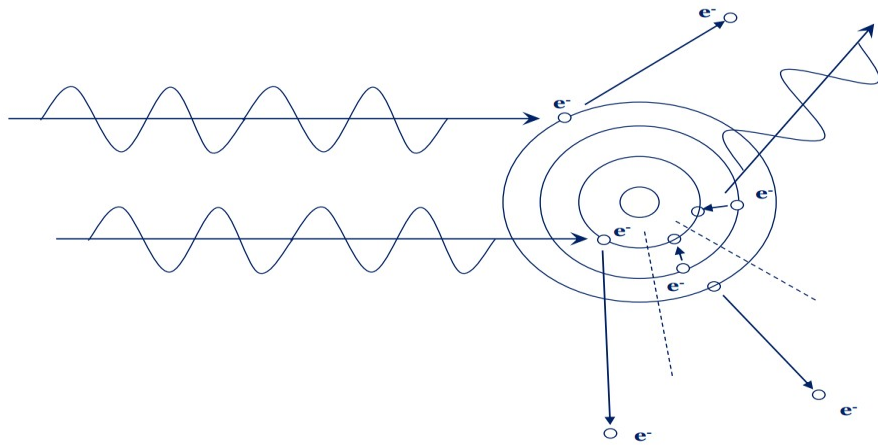
La dispersión a bajo ángulo es un grupo de técnicas de baja resolución espacial (nm- μ m)



Dispersión a bajo ángulo (SAS)

Rayos X:

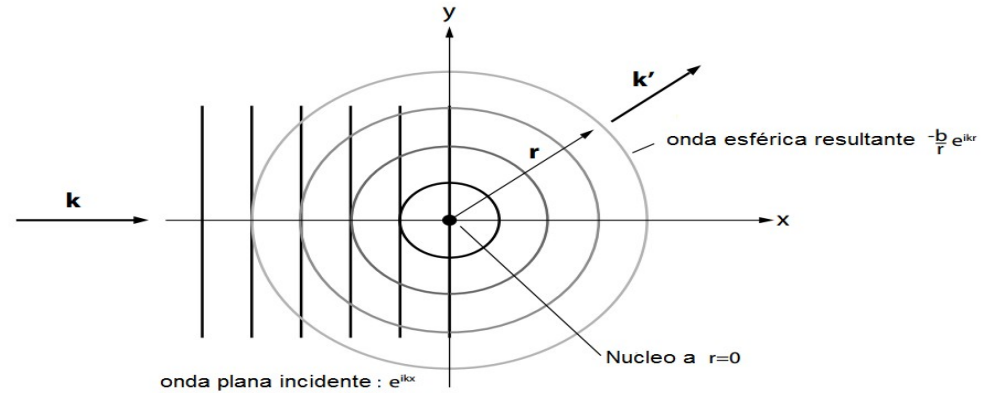
Small angle X-ray scattering (SAXS)



En radiación X, los fotones interactúan con los electrones.

Neutrones:

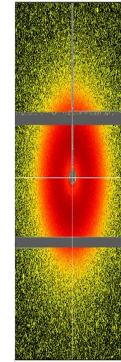
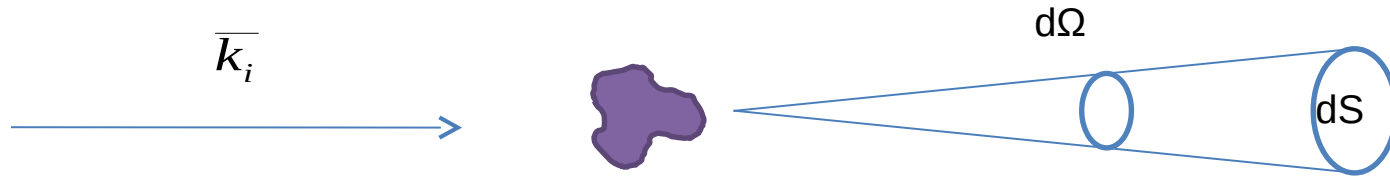
Small angle neutron scattering (SANS)



En neutrones, la dispersión está dada por los núcleos o por electrones desapareados que interactúan con el campo magnético del neutrón (dispersión magnética)

Dispersión a bajo ángulo (SAS)

¿Qué medimos?



Sección eficaz (cross section) diferencial

$$\frac{\partial \Sigma}{\partial \Omega} = \frac{\text{N}^\circ \text{ Fotones/Neutrones dispersados por segundo en } d\Omega}{\Phi d\Omega}$$

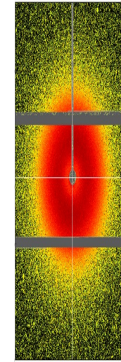
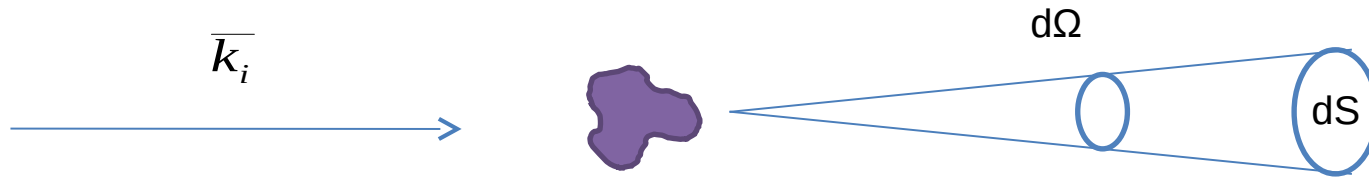
Sección eficaz total

$$\sigma_t = \int \frac{d\Sigma}{d\Omega} d\Omega = \frac{\text{N}^\circ \text{ Fotones/Neutrones dispersados por segundo en } d\Omega}{\Phi}$$

Φ = numero de fotones/neutrones incidentes por unidad de área y por segundo

Dispersión a bajo ángulo (SAS)

¿Qué medimos?



Contribución de interés en el presente curso

$$\sigma_t = \sigma_{elástico} + \sigma_{inelástico} + \sigma_{absorción}$$

Tener en cuenta en el diseño experimental

estructura electrónica.
Importante cuando hay metales

Información: Fonones y estructura electrónica (RX)

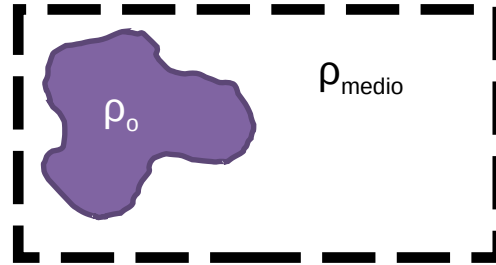
Contribución importante en neutrones, en RX no tanto (cae con Z^{-2})

Es función de la energía de la onda incidente

Dispersión a bajo ángulo (SAS)

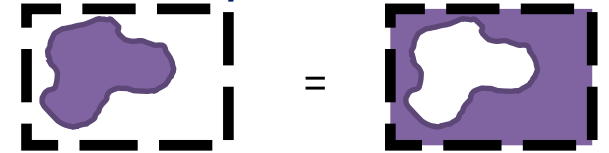
¿Por qué hay dispersión?

La dispersión se debe a inhomogeneidades en el sistema



Se denomina contraste a la diferencia de densidades entre el objeto dispersor y el medio $\Delta\rho^2$

Principio de Babinet



Rayos X:

Small angle X-ray scattering (SAXS)

ρ = densidad electrónica

$$\rho \propto Z$$

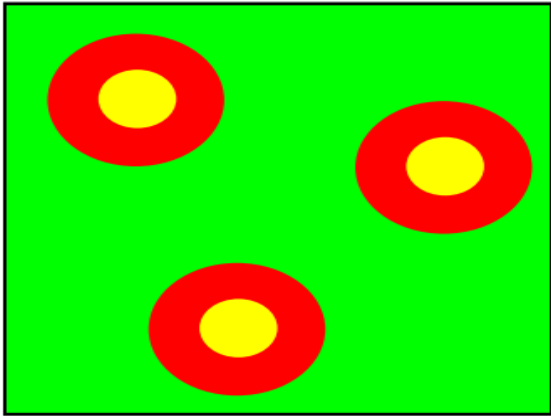
Neutrones:

Small angle neutron scattering (SANS)

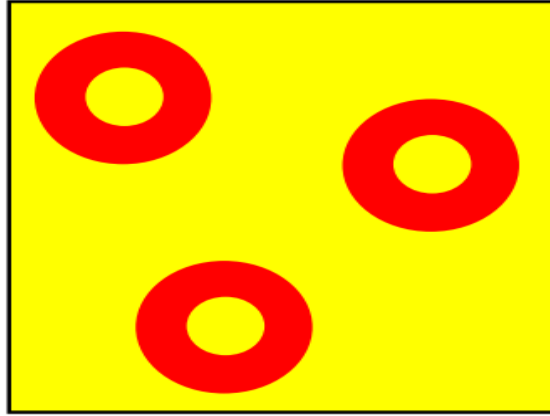
Elemento	ρ_c ($\times 10^{-15}$ m)
H	-3.73
D	6.67
C	6.64
Si	4.15
O	5.80

Dispersión a bajo ángulo (SAS)

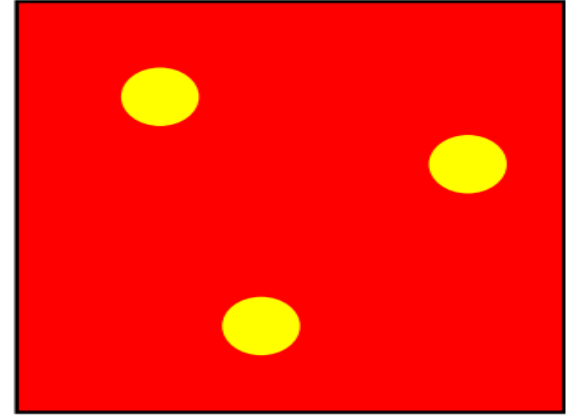
Trabajar con neutrones permite variar fácilmente el contraste entre objeto dispersor con el medio.



Muestra original



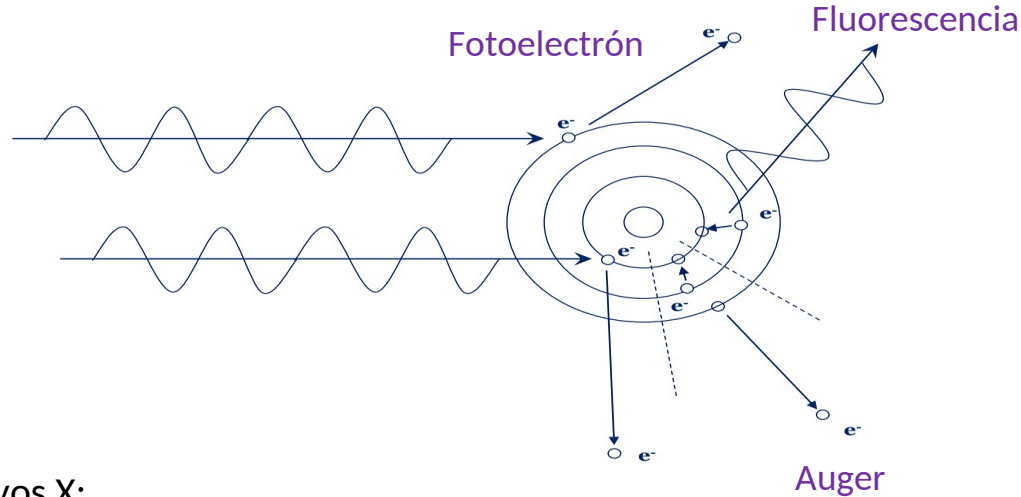
$\rho_{\text{solvente}} = \rho_{\text{core}}$



$\rho_{\text{solvente}} = \rho_{\text{shell}}$

Técnicas basadas en la interacción de la radiación x con la materia

Procesos Resonantes

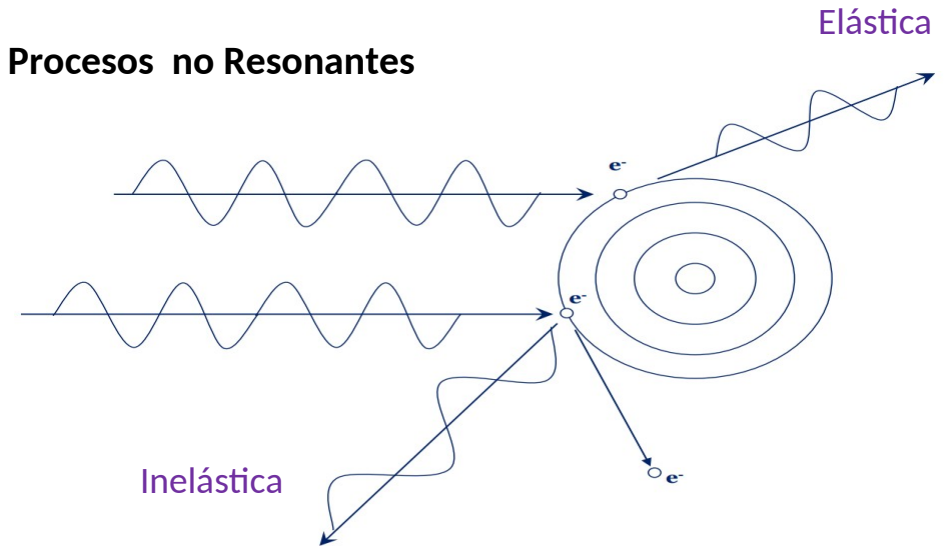


Rayos X:
Radiación electromagnética

$E \sim 1-100 \text{ keV}$
 $\lambda \sim 1-0.01 \text{ nm}$

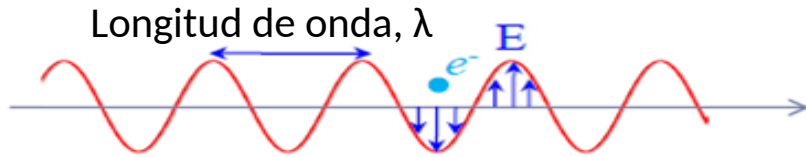
Existen diversas técnicas asociadas a la interacción de la radiación X con la materia. Entre ellas se destacan las técnicas de absorción, fluorescencia, XPS, dispersión elástica o inelástica, difracción, etc.

Procesos no Resonantes



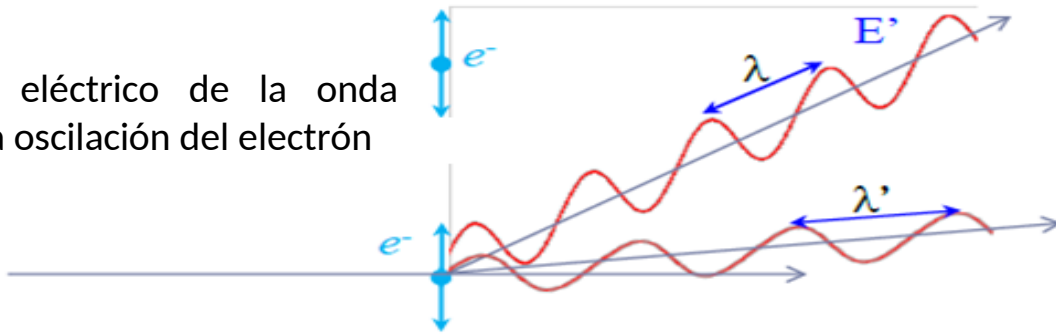
Dispersión de Rayos X

Los rayos X son ondas propagantes



$$E(t) = E_0 \exp i[2\pi\nu t + \phi_0]$$

El campo eléctrico de la onda genera una oscilación del electrón



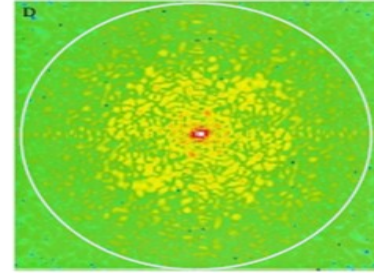
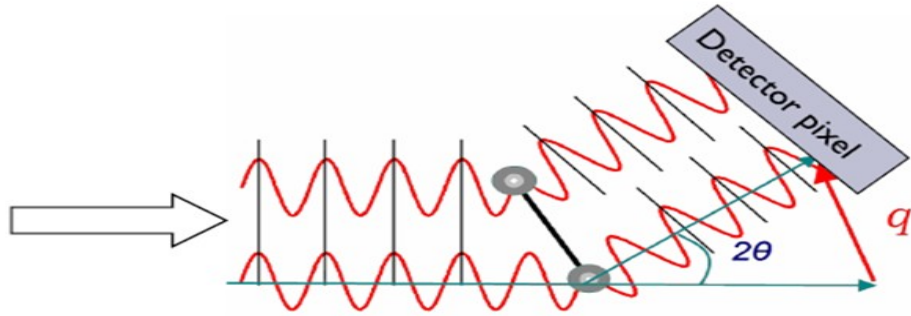
Dispersión elástica:

$$E_i = E'$$

Dispersión inelástica:

$$E_i \neq E'$$

Dispersión de Rayos X



$$\frac{\partial \Sigma}{\partial \Omega}$$

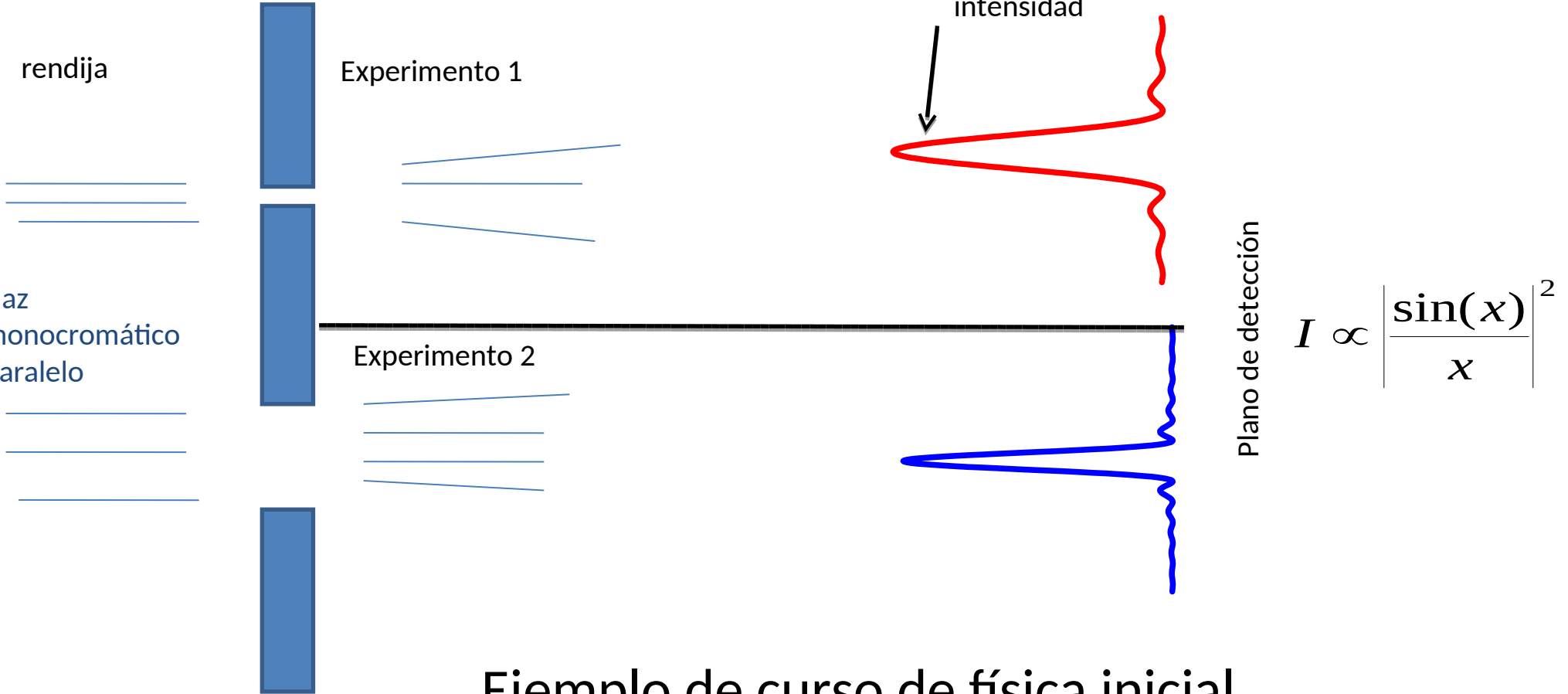
La física involucrada en la técnica de dispersión de rayos X a bajos ángulos, al igual difracción de rayos X, se expresa con un formalismo matemático descrito por Fourier.

El “espacio recíproco” o “espacio de Fourier” está relacionado por con el espacio real por una transformación matemática: Transformada de Fourier

$$F(q) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} f(r) e^{-iqr} dr$$

Dispersión de Rayos X

Propiedades de la transformada de Fourier



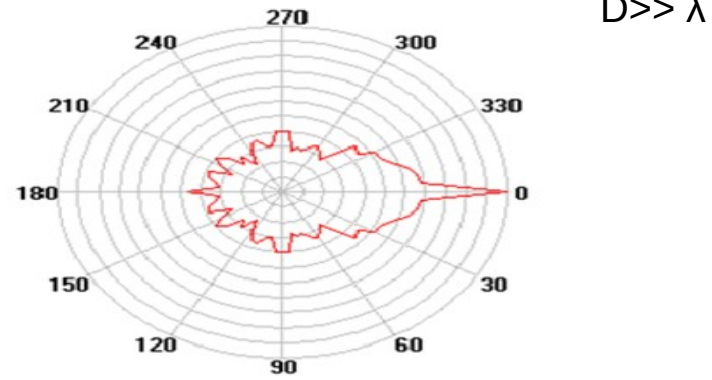
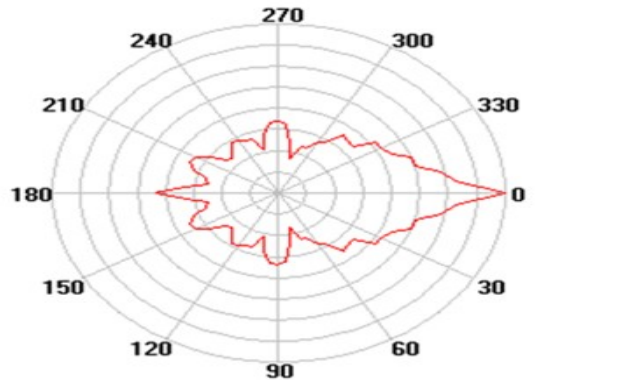
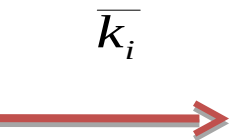
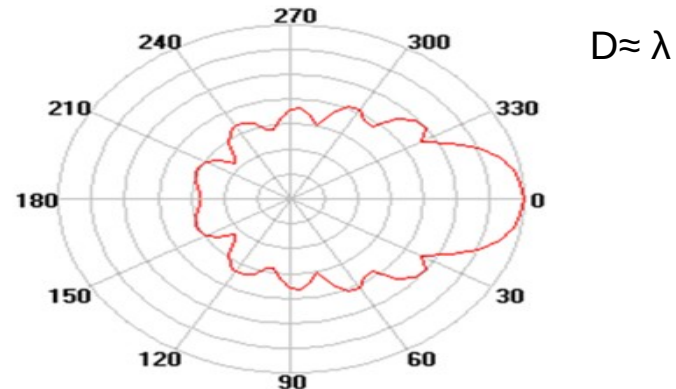
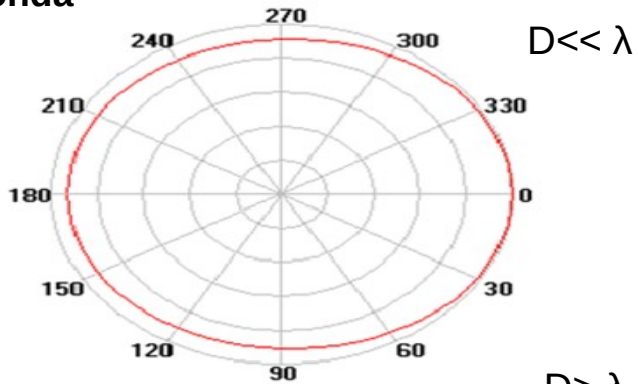
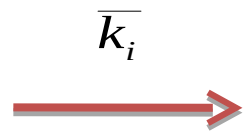
Ejemplo de curso de física inicial

Dispersión de Rayos X

Propiedades de la transformada de Fourier

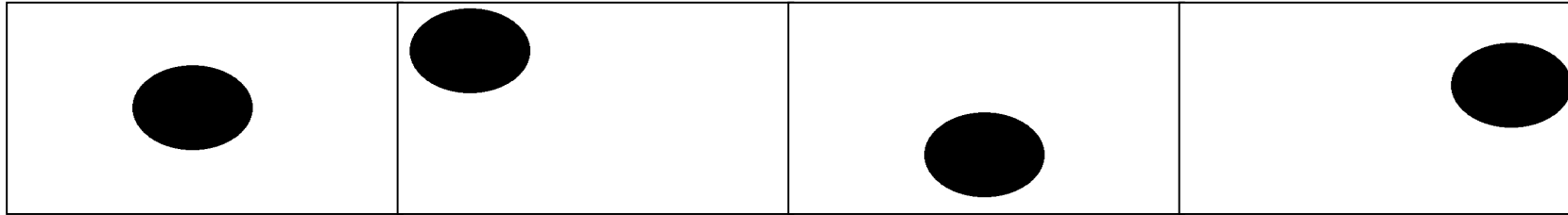
D: Diametro partícula

λ : Longitud de onda

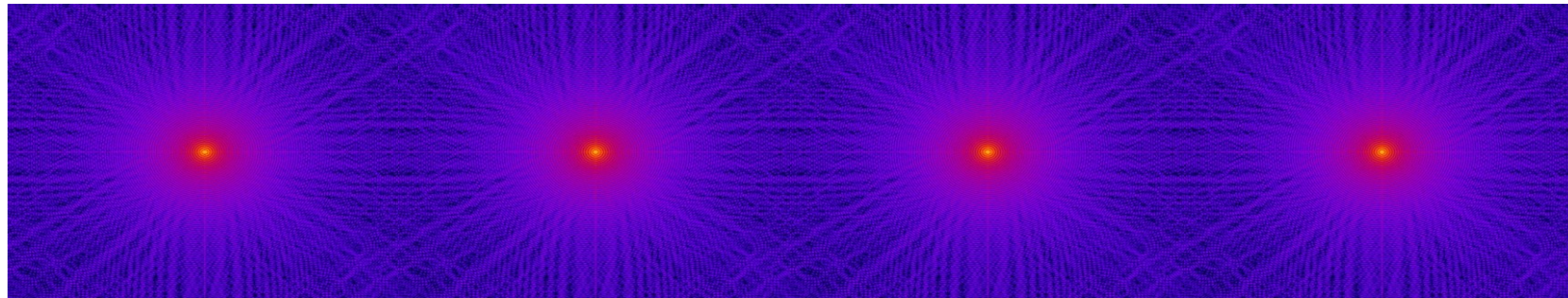


Dispersión de Rayos X

Propiedades de la transformada de Fourier



¡Invariante frente a traslaciones!

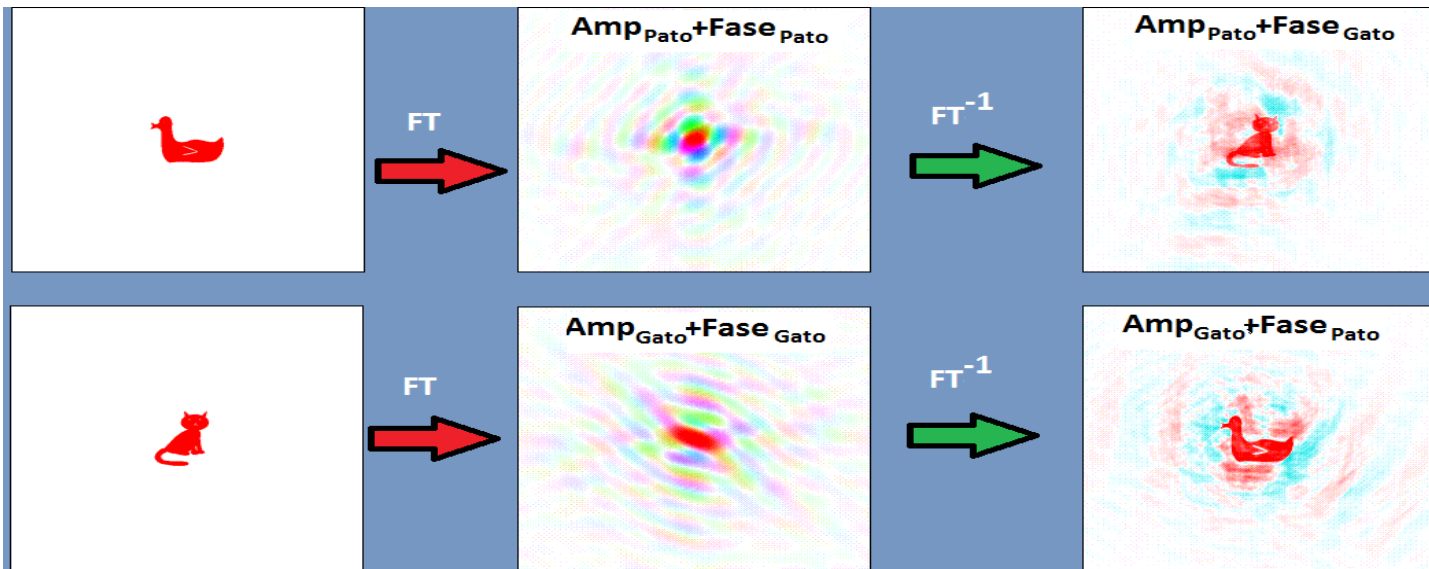


Problema de las fases

Instrumentalmente solo se puede medir cantidad de fotones. Es decir intensidad dispersada. La intensidad se relaciona con el cuadrado de la amplitud de la onda. Es decir se pierde la fase.

$$\Psi = A \cdot \exp(i\phi) \quad \text{Descripción genérica de una onda}$$

$$I = \Psi \cdot \Psi^* = A \cdot \exp(i\phi) \cdot A \cdot \exp(-i\phi) = A^2$$

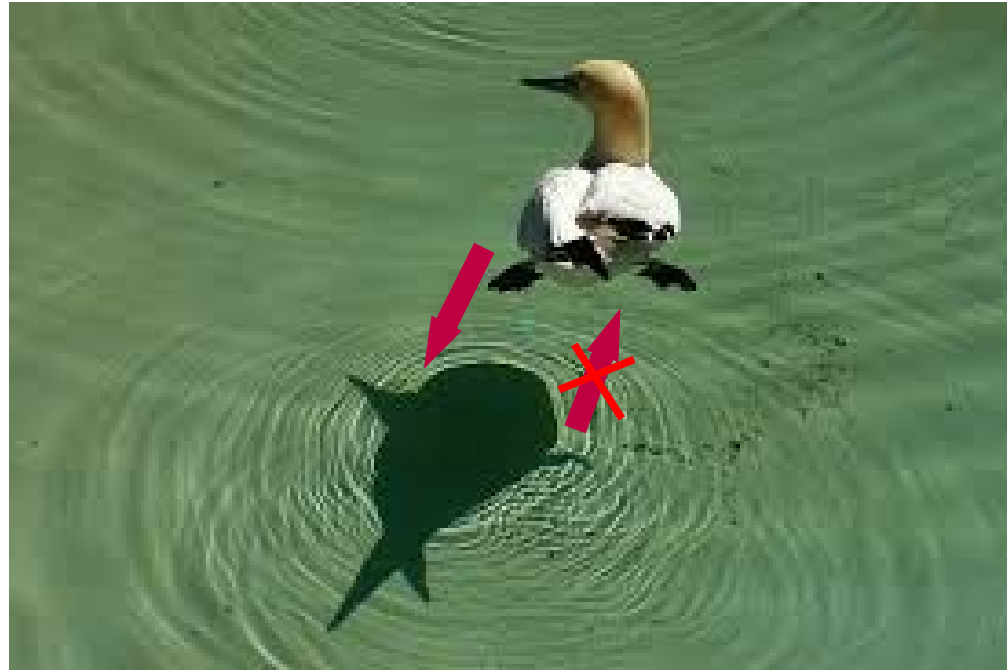


PROBLEMA: Como se observa en el ejemplo la fase contiene la mayoría de la información.

En consecuencia los resultados que se obtienen por SAS no poseen interpretación única. Conocimientos previos de la muestra son necesarios.

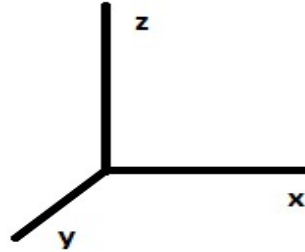
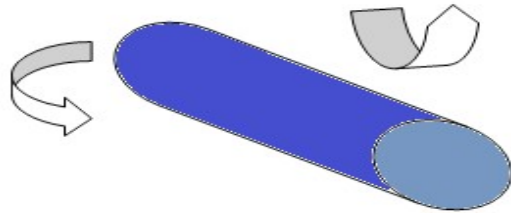
Consecuencias en la determinación estructural (problema mal condicionado)

De manera similar, es muy difícil de reconstruir la estructura real a través de la sombra de un objeto (existen múltiples soluciones posibles)

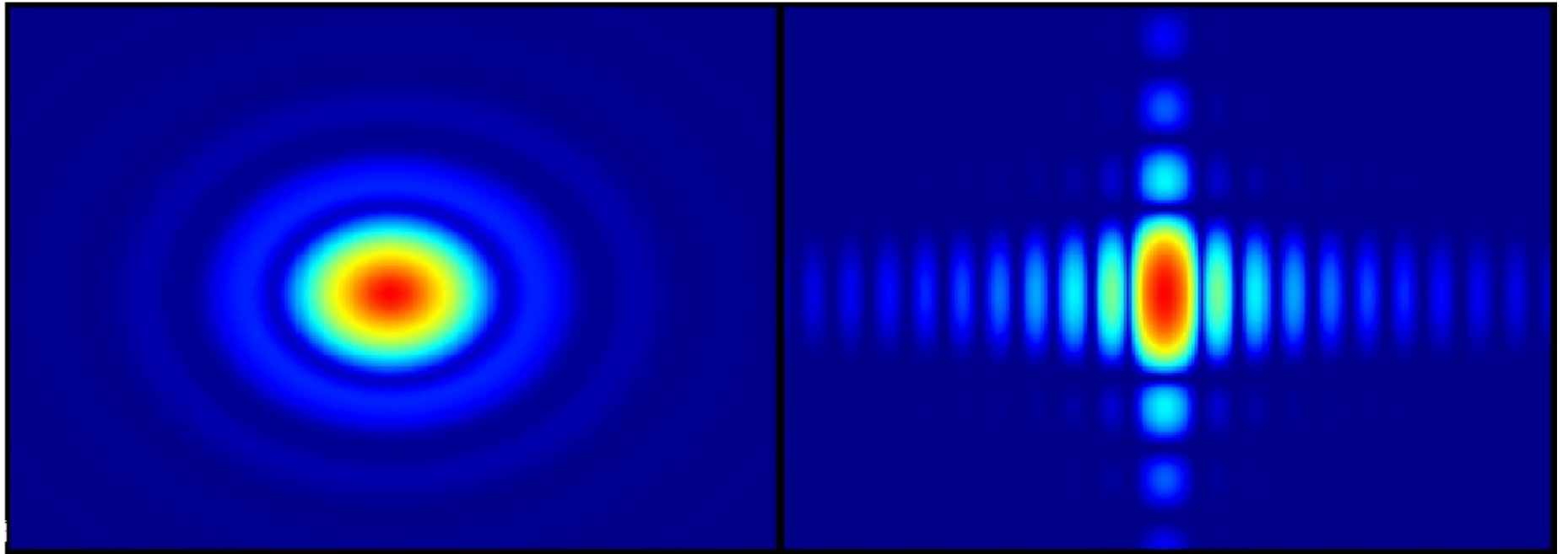
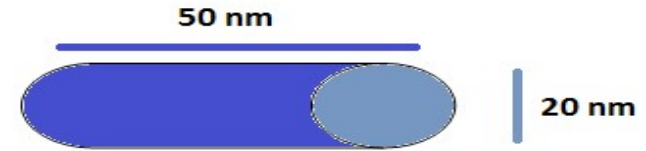


Dispersión isotrópica y anisotrópica

Cilindro con Libre Rotación



Cilindro con Orientación Fija en la dirección "x"

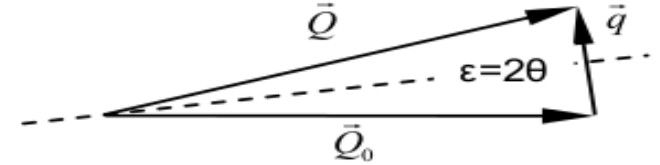
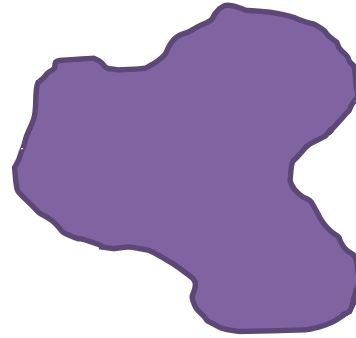


Dispersión de Rayos X

Dispersión de un objeto aislado (o diluido)

Factor de forma: transformada de Fourier del objeto:

$$r_x, r_y, r_z \longrightarrow q_x, q_y, q_z$$



Estructura

Transformada de Fourier

Experimental

$$\rho(\vec{r})$$



$$A(\vec{q}) = \int \rho(\vec{r}) \cdot e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}} d\vec{r}$$



$$I(\vec{q}) = |A(\vec{q})|^2$$

En caso de muestras isotrópicas

$$\langle e^{-i\vec{q} \cdot \vec{r}} \rangle = \frac{\sin qr}{qr}$$

$$|\vec{q}| = q = \frac{4\pi \text{sen}(\theta)}{\lambda}$$

$$I(q) = 4\pi \int p(r) \frac{\text{sen}(qr)}{qr} dr$$

$$I(q) = NP(q)$$

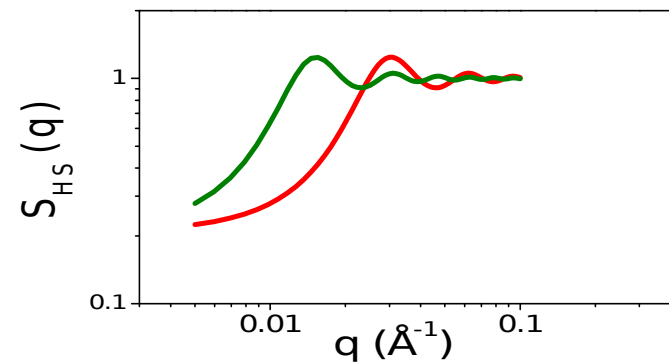
Donde N: # partículas

P(q): Factor de forma

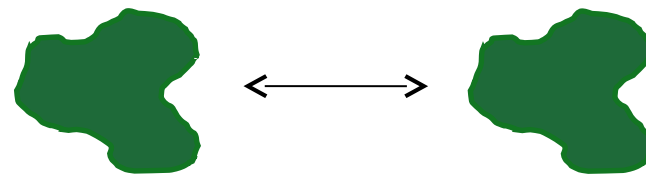
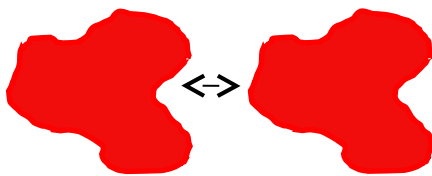
Dispersión de Rayos X

Sistemas concentrados Muestras monodispersas

$$I(q) = NP(q)S(q)$$



Aparece una nueva función llamada factor de estructura: $S(q)$
 $S(q)$: Fenómenos de interferencia
Existen pocos factores de estructura analíticos.



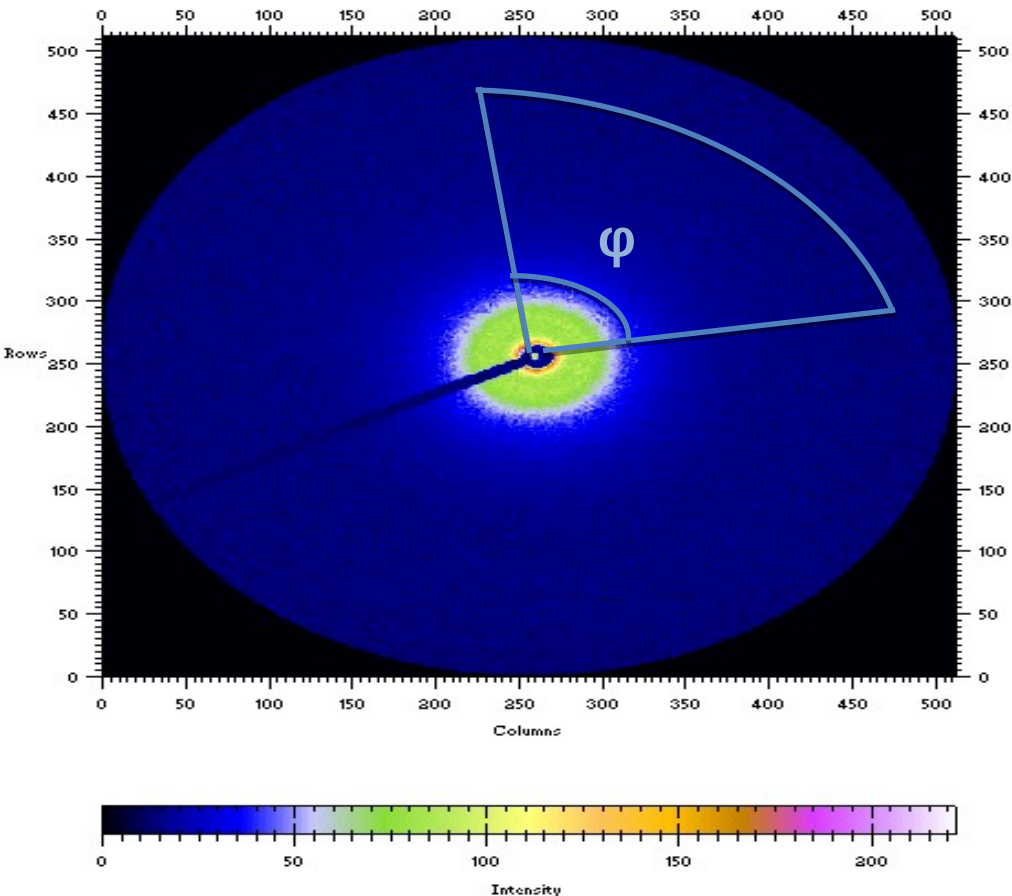
$$\begin{aligned} S(q) &\rightarrow 1 \\ N &\rightarrow 0 \\ q &\rightarrow \infty \end{aligned}$$

Para el estudio de proteínas en solución se debe estudiar en condiciones diluidas.

Muestras Polidispersas o con anisotropía geométrica

Existen aproximaciones adecuadas para tomar en cuenta el factor de estructura en sistemas con diversos grados de polidispersidad y/o anisotropía geométrica.

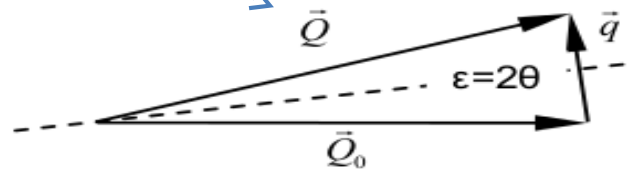
Reducción de datos



Contraste: la diferencia entre la densidad electronica del solvente y de la fase dispersa genera el fenomeno

$$\Delta\rho = \rho_{disperso} - \rho_{continuo}$$

Vectores de onda



← Vector de dispersion

$$\vec{P} = h\vec{Q}$$

$$|\vec{q}| = q = \frac{4\pi s \sin(\theta)}{\lambda}$$

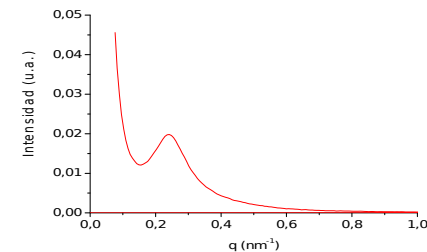
Módulo del vector de dispersion



Integrando en función del ángulo φ



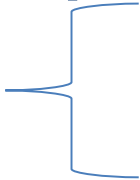
$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = I(q)$$



Dispersión de Rayos X

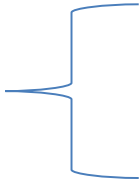
¿ En qué consiste un experimento de SAS completo?

Ejecución del experimento



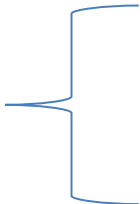
- Tipo de muestra
- Preparación de muestra
- Geometría adecuada

Reducción de los datos



- Normalización
- Sustracción parásito
- Escala absoluta

Interpretación



- Análisis cualitativo
- Cálculo de invariantes
- Propuesta de modelos
- Extracción de información útil

¿Qué podemos obtener de un experimento SAS?

SAS son técnicas **no destructiva** que se emplean para caracterizar diversos sistemas condensados

Información estructural

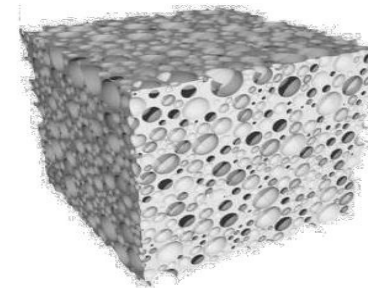
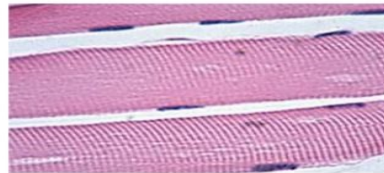
Sistemas diluidos:

- Forma y tamaño (distribución de tamaño)
- Volumen de objetos dispersores
- Área
- Masa molecular

Sistemas concentrados:

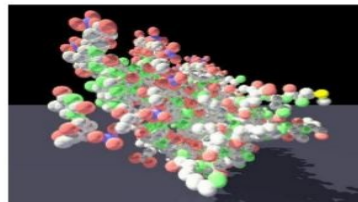
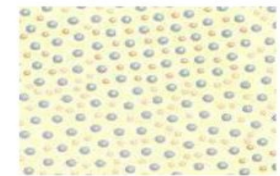
- Estructuras periódicas largo alcance
- Arreglos supra moleculares
- distancia entre dispersores
- etc

Fibras



Material poroso

Coloides



Proteínas en solución



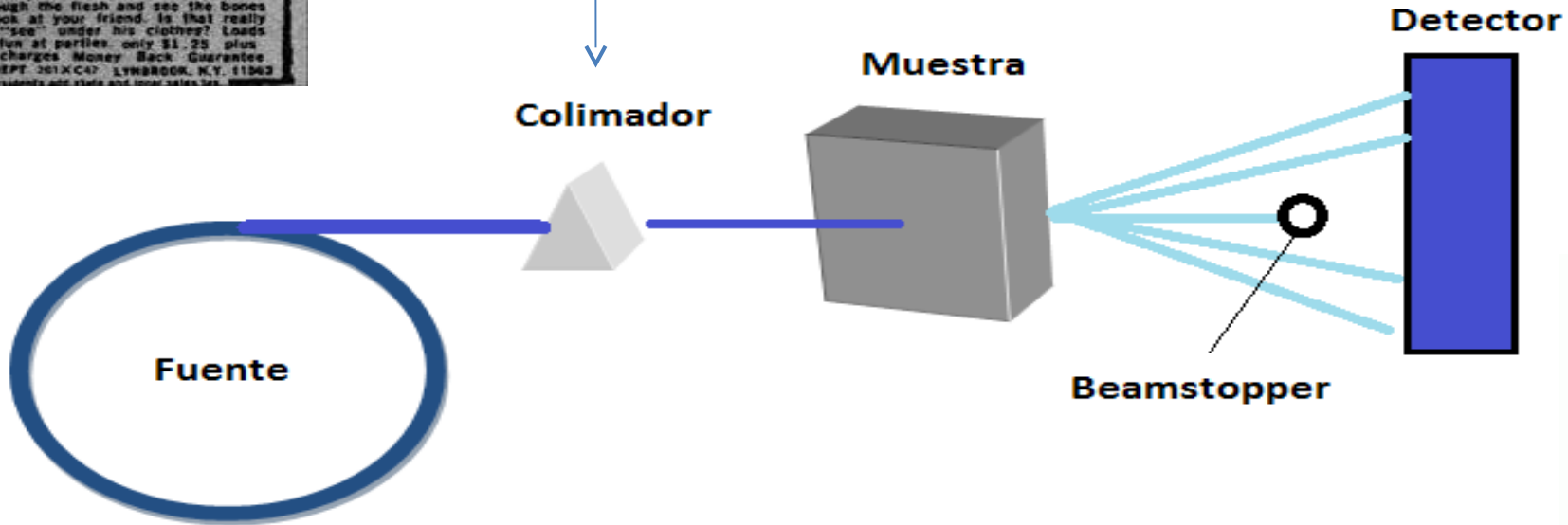
Morfología de polímeros

Experimental

Dispersión: Diseño experimental



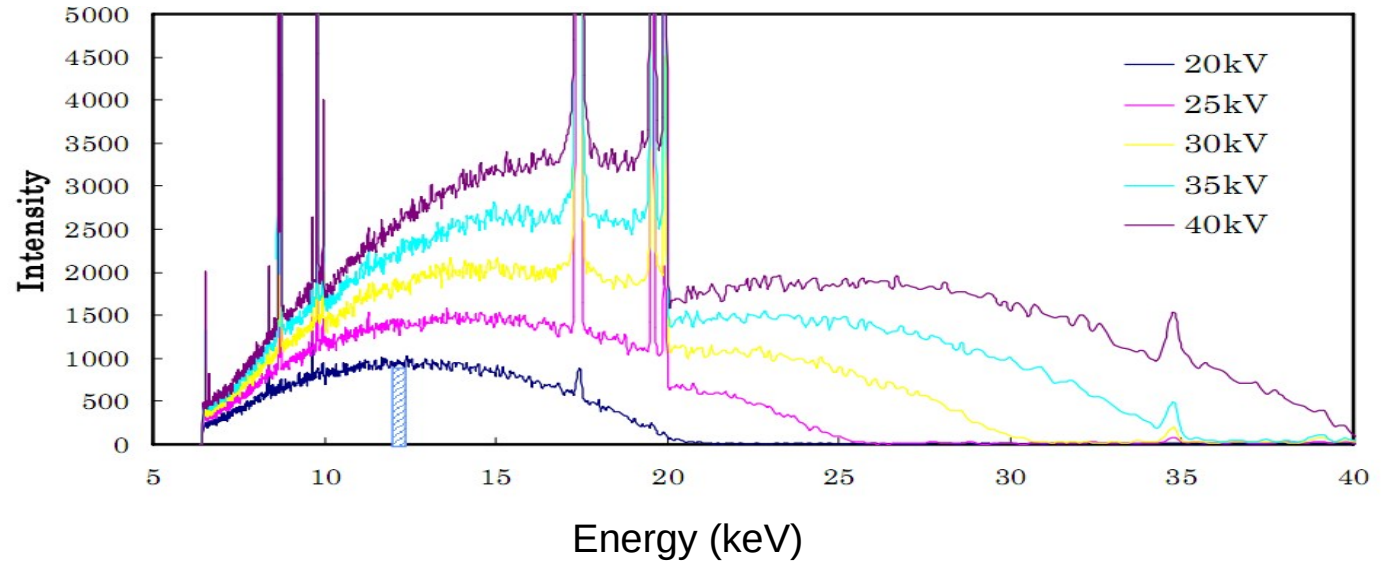
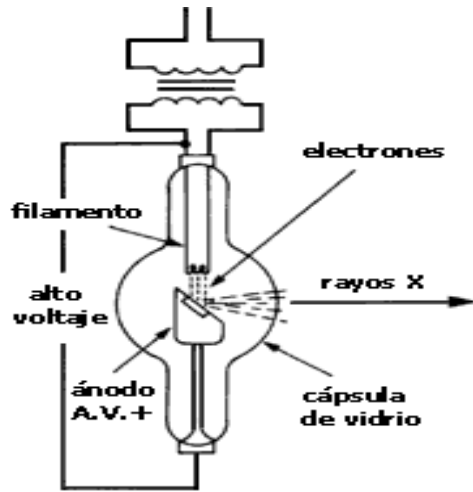
Pinholes
Espejos
Monocristales
etc



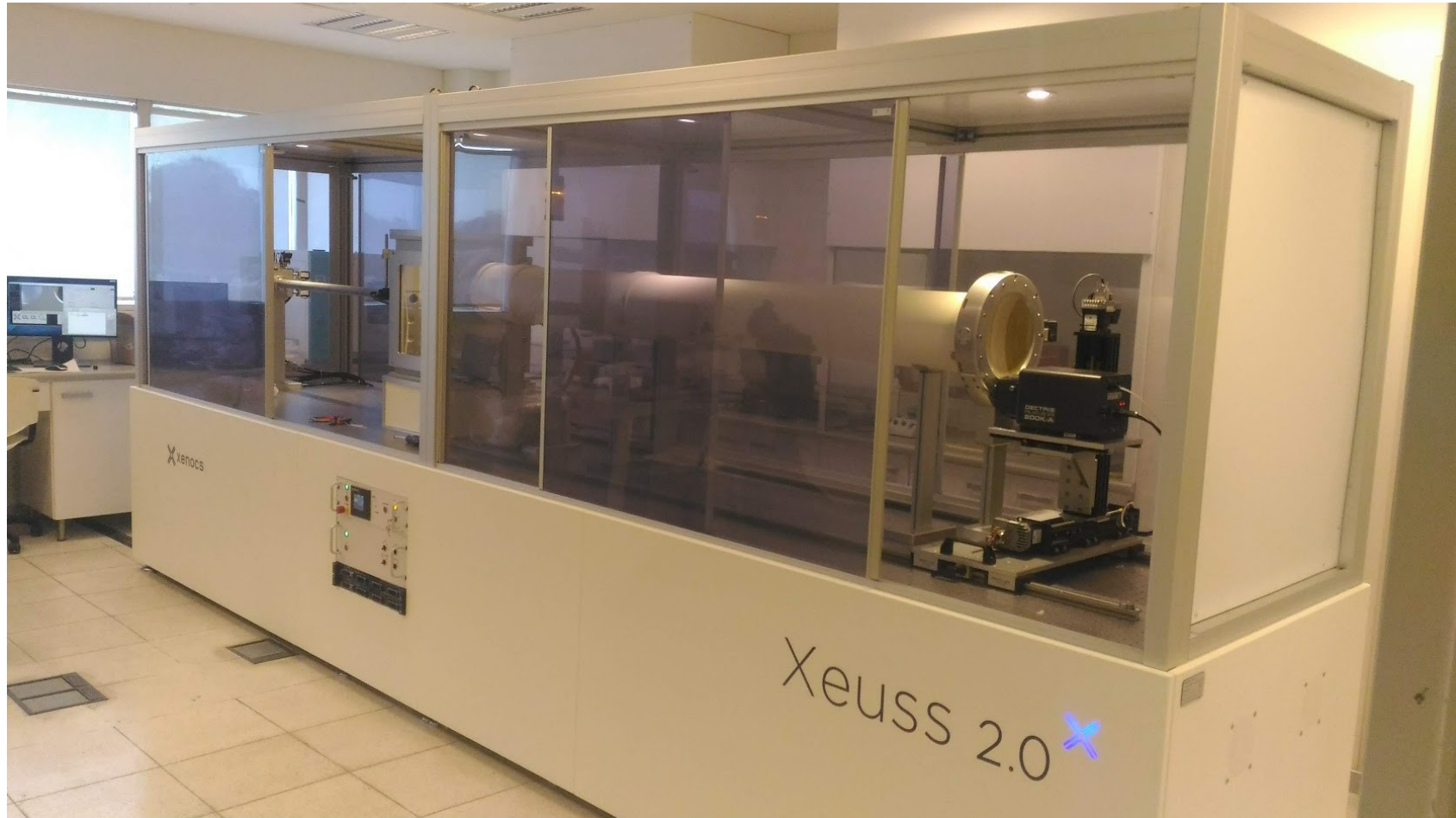
Neutrones: Reactores nucleares (de reacciones en cadena o subcríticos)
Rayos X: Fuentes convencionales (ánodos metálicos) y sincrotrones

Fuentes de Radiación X

Fuentes convencionales: Emisión de Rayos X por acelerar electrones sobre un target metálico.



Equipos de laboratorio



Fuentes radiación x

Fuente de Luz Sincrotrón:

Una partícula cargada acelerada emite radiación electromagnética.

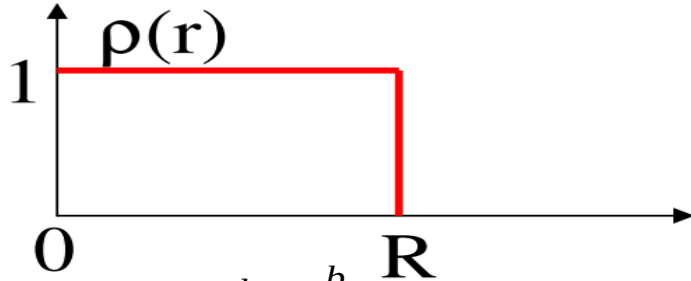
Los sincrotrones son grandes facilidades. Generan radiación de alta energía como consecuencia de acelerar electrones a velocidades cercanas a la velocidad de la luz.

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



Dispersión de objetos homogéneos

SAXS: figuras geométricas homogéneas



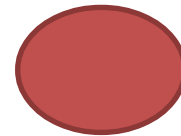
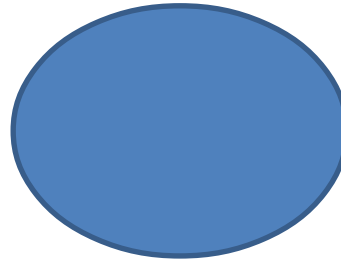
En coordenadas esféricas

$$A(q, R) = 4\pi \int_0^R \rho(r) r^2 \frac{\sin qr}{qr} dr = 4\pi \int_0^R r^2 \frac{\sin qr}{qr} dr$$

$$\int_a^b v' u dx = uv \Big|_a^b - \int_a^b vu' dx \longrightarrow$$

$$A(q, R) = 3V_{esf}(R) \frac{\sin(qR) - qR \cos(qR)}{(qR)^3}$$

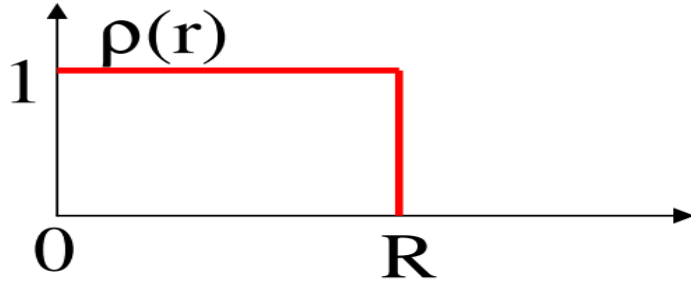
$$I(q) = N(\rho_1 - \rho_2)^2 |A(q, R)|^2$$



El objeto más sencillo de representar es una esfera homogénea. La amplitud es una función analítica sencilla.

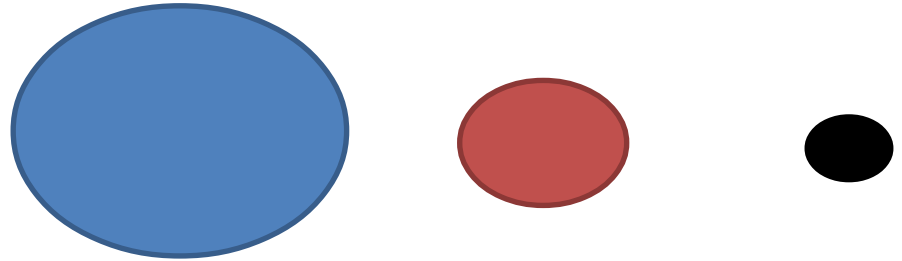
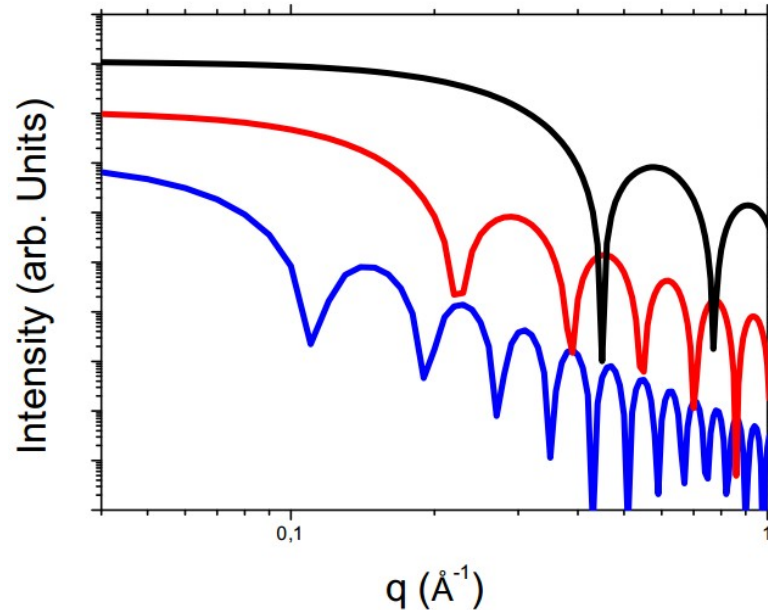
Un incremento en el radio de la esfera desplaza el patrón la dispersión a ángulos menores.

SAXS: figuras geométricas homogéneas



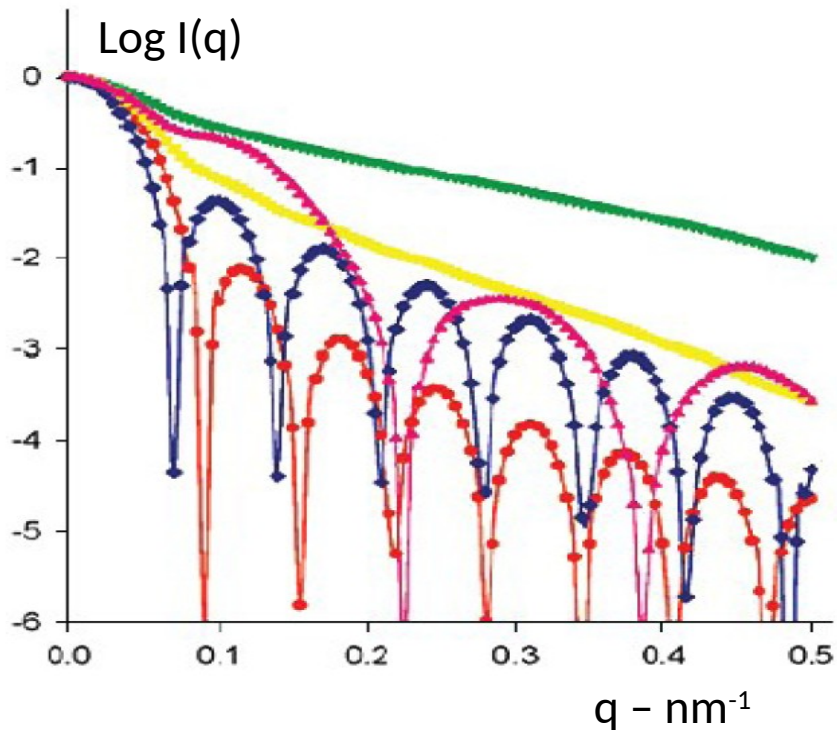
$$A(q, R) = 3V_{esf}(R) \frac{\sin(qR) - qR \cos(qR)}{(qR)^3}$$

$$I(q) = N(\rho_1 - \rho_2)^2 |A(q, R)|^2$$



SAXS: figuras geométricas homogéneas

Intensidad relativa de SAXS para diversas figuras geométricas.



Ecuaciones en Pedersen (2002)

SAXS: Efecto de polidispersidad de tamaños

Caso de estudio: Esferas homogéneas con distribución de tamaños Gaussiano

$$A(q, R) = 3 \frac{\sin(qR) - qR \cos(qR)}{(qR)^3}$$

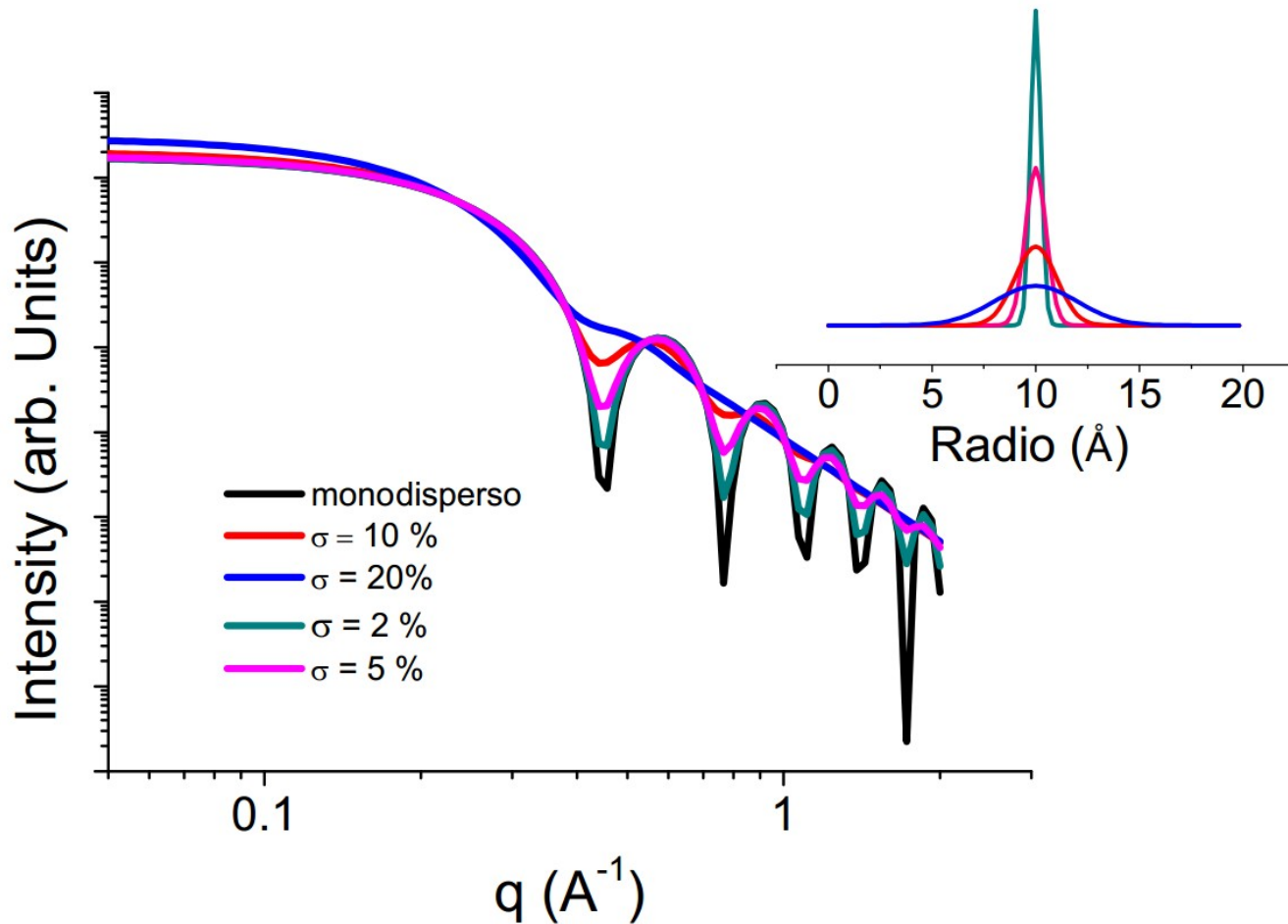
$$V_{esf}(R) = \frac{4\pi}{3} R^3$$

$$N(R) = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{(R - \langle R \rangle)^2}{2\sigma^2}\right]$$

Partículas grandes poseen mayor peso

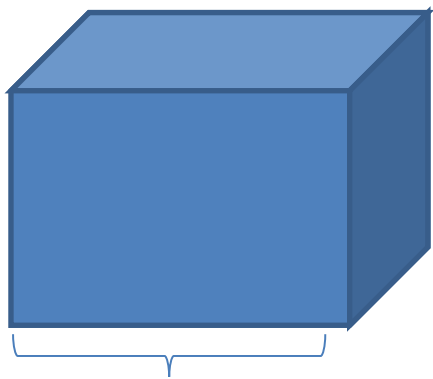
$$I(q) \propto \int_0^{\infty} N(R) V_{esf}^2(R) |A(q, R)|^2 dR$$

SAXS: Efecto de polidispersidad de tamaños



¿Es una figura homogénea una buena representación de una nanopartícula?

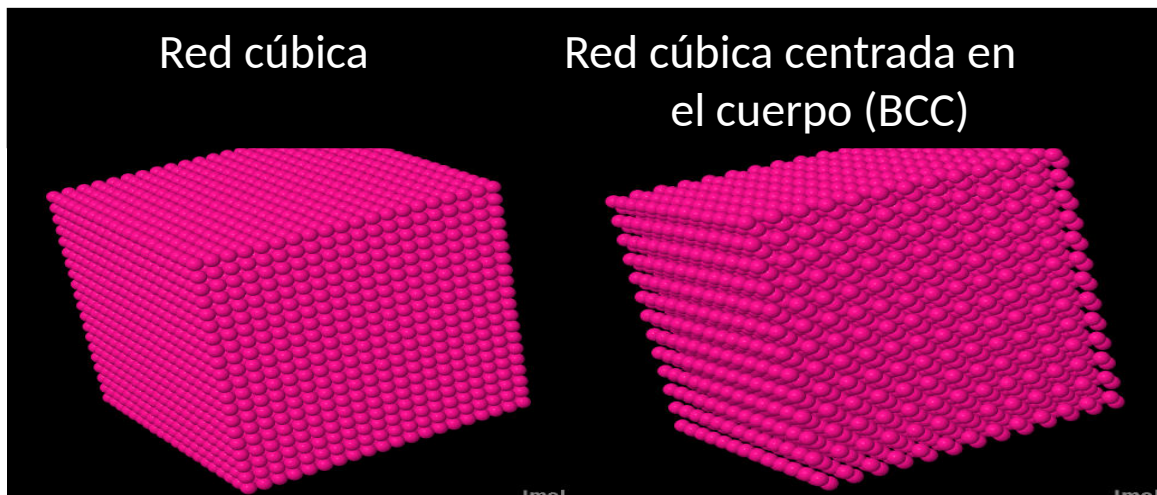
$$P_{cubo} = \frac{2}{\pi} \int_0^{\pi/2} \int_0^{\pi/2} \left[\frac{\sin(q.a/2.\sin\alpha\cos\beta)}{q.a/2.\sin\alpha\cos\beta} \frac{\sin(q.a/2.\sin\alpha\sin\beta)}{q.a/2.\sin\alpha\sin\beta} \frac{\sin(q.a/2.\cos\alpha)}{q.a/2.\cos\alpha} \right]^2 \sin\alpha.d\alpha d\beta$$



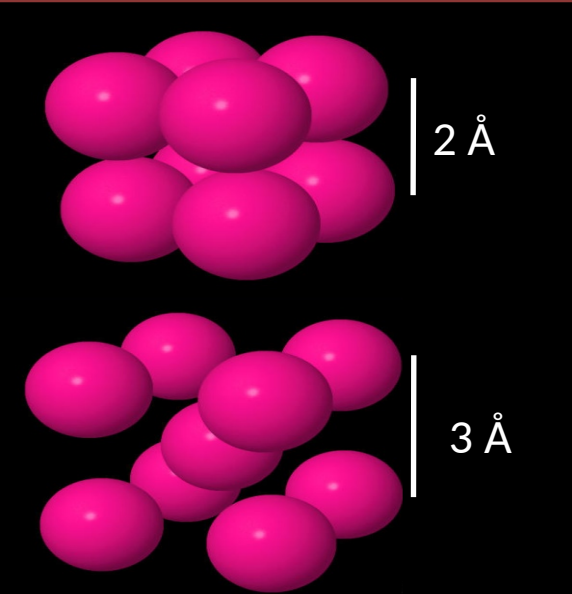
a = 4 nm

Las partículas, coloides, proteínas, están compuestos por átomos (sistemas discretos). Los modelos de dispersión calculados anteriormente exhiben los patrones de dispersión para figuras geométricas homogéneas (continuo).

Se proponen dos cubos (a=b=c) de similar tamaño con motivos diferentes de partículas esféricas (¿átomos?)



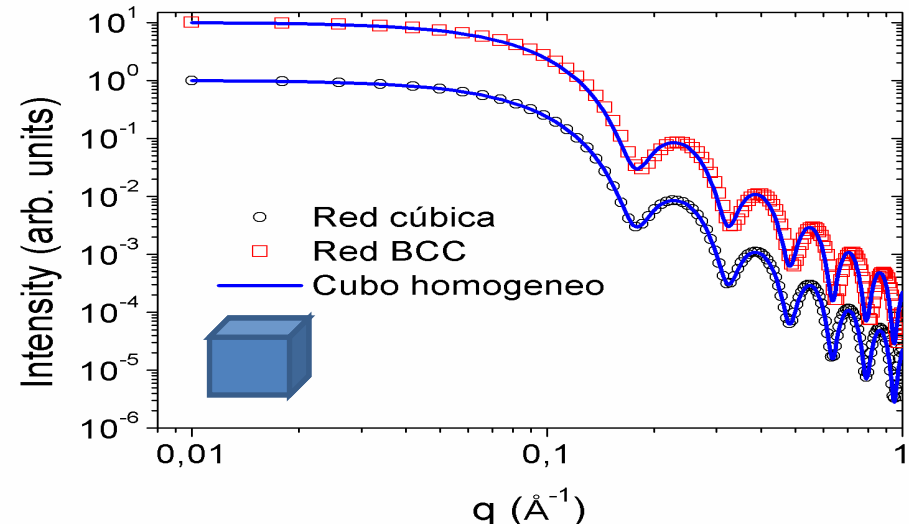
¿Es una figura homogénea una buena representación de una nanopartícula?



Se simularon partículas nanométricas cúbicas compuestas por esferas de 1 Å de radio cada una.

Hay que tener en cuenta que la simetría en cada caso es diferente, pero sobre todo la distancia entre unidades esféricas.

Los patrones de dispersión son similares en ambos casos y el cubo homogéneo ajusta perfectamente las curvas.

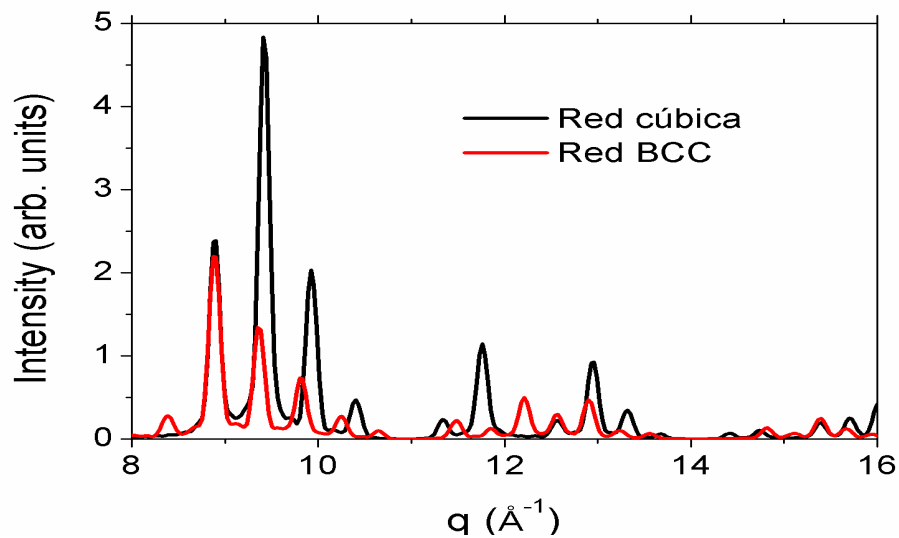
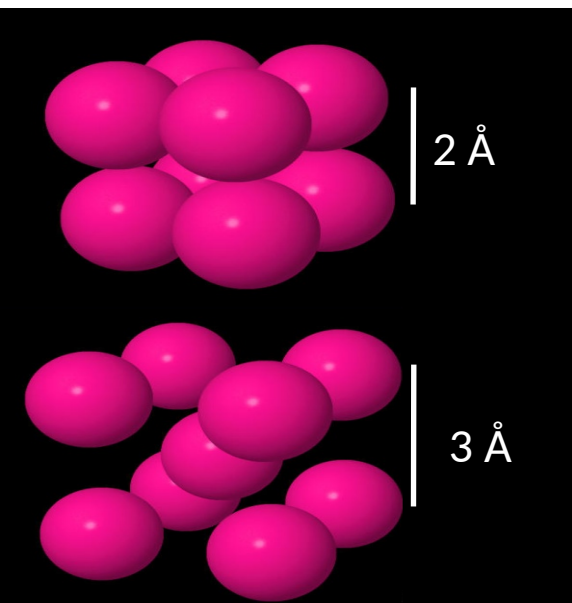


¿Es una figura homogénea una buena representación de una nanopartícula?

En un experimento de dispersión de rayos X a bajos ángulos se analizan las frecuencias espaciales bajas ($q \rightarrow 0$). Para poder estimar las diferencias entre las nanopartículas habría que estudiar la intensidad registrada a ángulos altos (experimento de difracción).

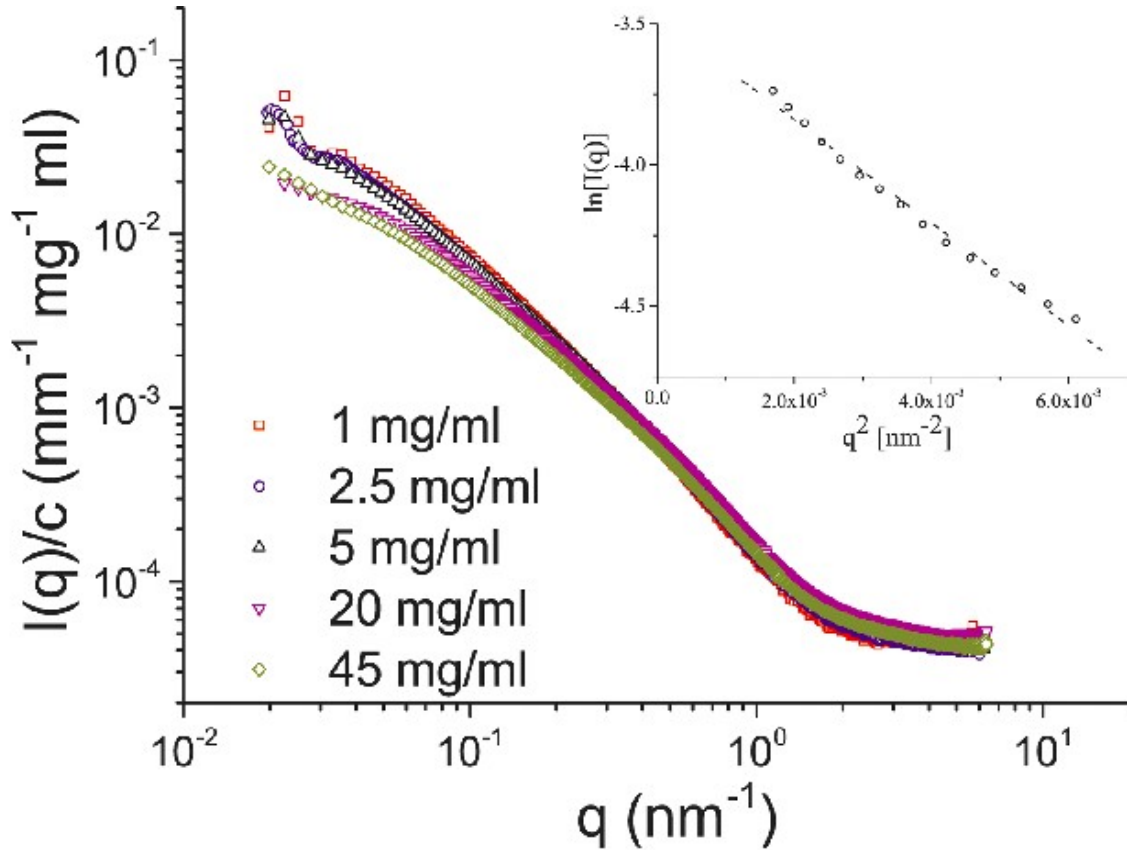
Conclusión:

En un experimento de dispersión se analiza la densidad electrónica media!



Algunos cuidados experimentales

Efectos de la concentración

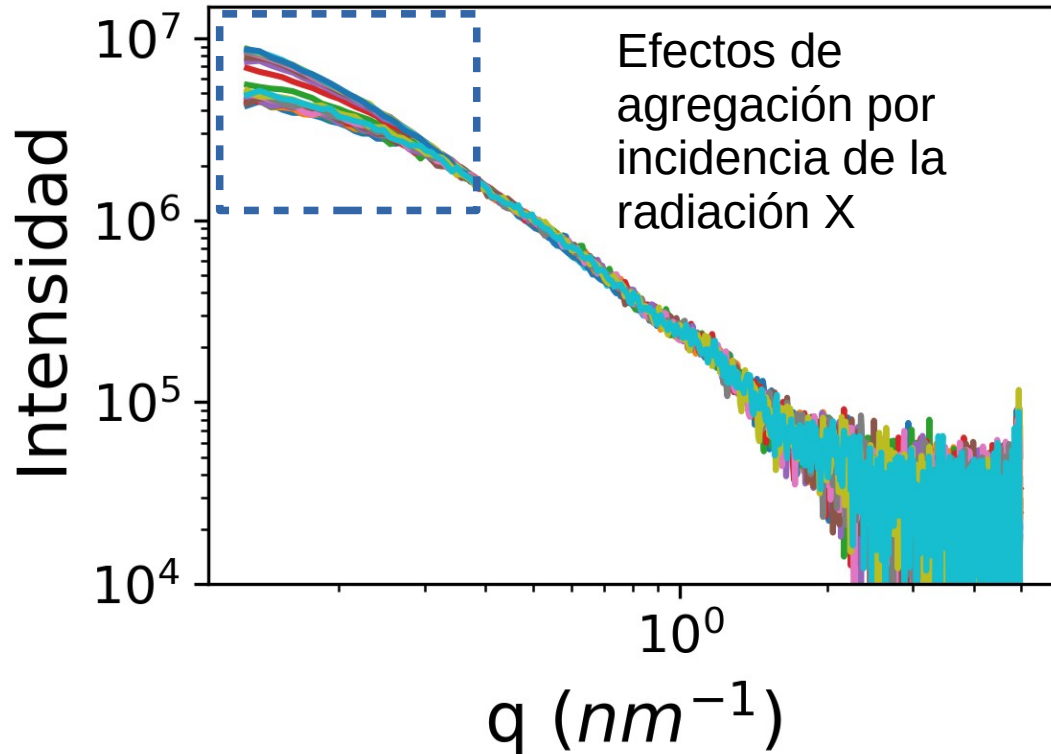


¿Qué concentración emplear?

$$I(q) \propto N \cdot M_w^2$$

Depende de varios factores instrumentales, características de la muestra, etc

Daños por radiación



Otra vez la zona de porod no se ve afectada. Como el error experimental va como:

$$\sigma_i = \sqrt{I_i}$$

Se puede promediar la zona de altos angulos para mejorar la calidad del patrón de dispersión

Análisis de Datos

Estrategias de análisis: Modelos físicos- Ajuste por mínimos cuadrados

Extraer información de los patrones de SAXS a través de modelos físicos implica generalmente optimizar ecuaciones no lineales.

La figura de mérito que suele emplearse para calcular la bondad del ajuste es el χ^2

$$\chi^2 = \frac{1}{N - M} \sum_j \left(\frac{I(q_j, \nu) - F(q_j, \nu)}{\varepsilon_j} \right)^2$$

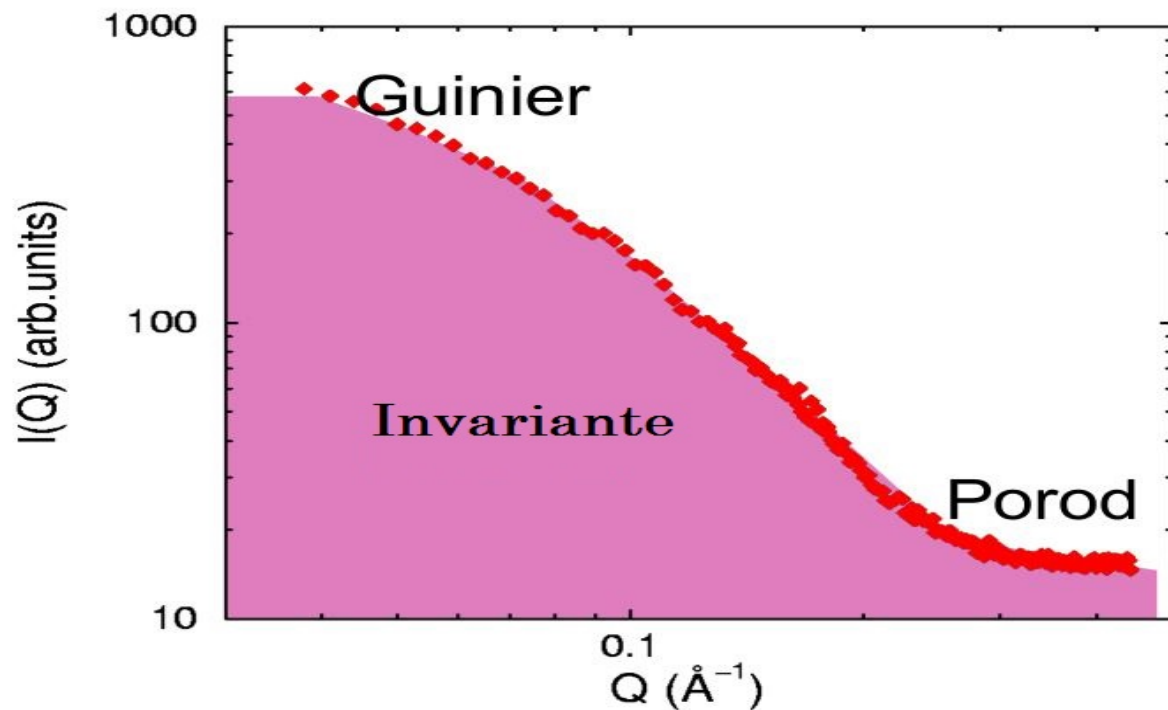
Existen diversos programas disponibles para realizar el análisis de los patrones de dispersión:
SASfit, SASview, Irena (plataforma Igor), IsGISAXS, etc.

Para sistemas biológicos: **ATSAS**



Estrategias de análisis: Invariantes

Primer análisis sobre curvas SAXS



$$Q = \frac{1}{V} \int_0^{\infty} q^2 I(q) dq = 2\pi^2 \phi_1 \phi_2 (\Delta\rho)^2$$

Fracción de volumen

Constraste

Estrategias de análisis: Invariantes

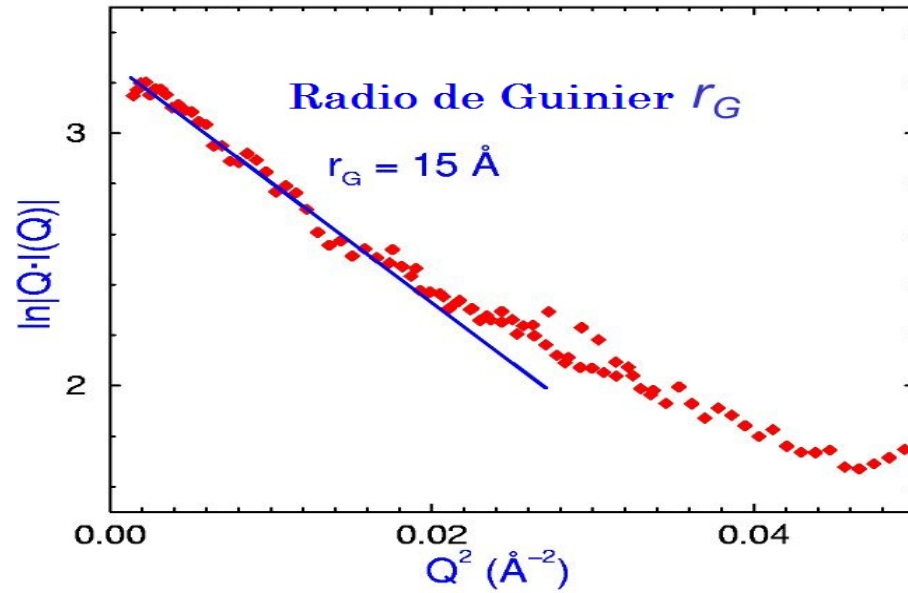
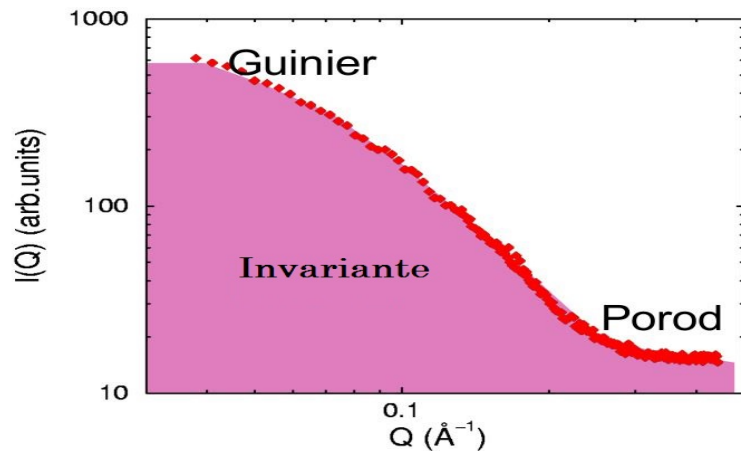
Guinier (1938): En ángulos muy pequeños, la dispersión es independiente de la forma de la partícula; solo depende del tamaño.

Para la condición:

$$q \cdot r_G \ll 1$$

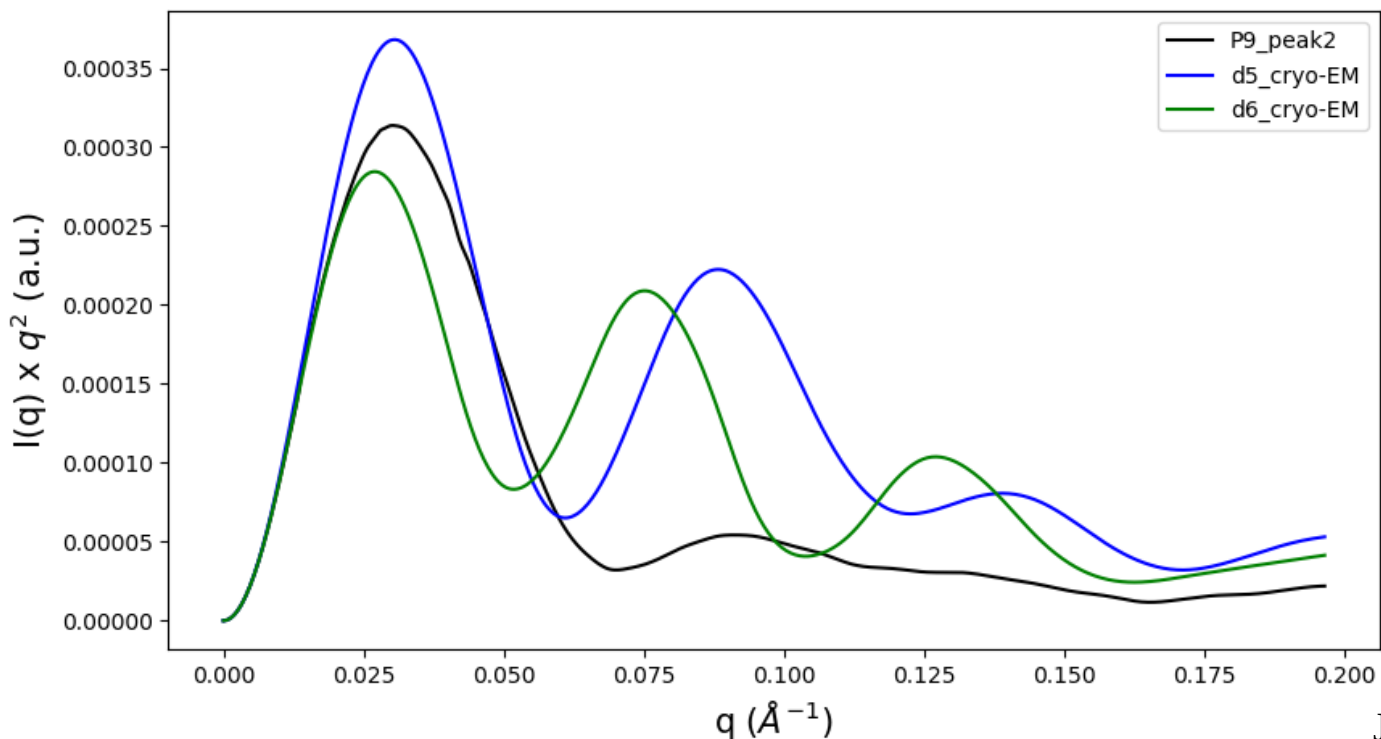
$$I(q) = I_0 \exp\left(-\frac{q^2 r_G^2}{3}\right)$$

OJO SI LA MUESTRA ES
POLIDISPERSA



Estrategias de análisis: Mw

Una de las estrategias (hay otras)



$$Q = \int_0^{q^{max}} I(q) q^2 dq$$

Obtenido de
GNOM (ATSAS)



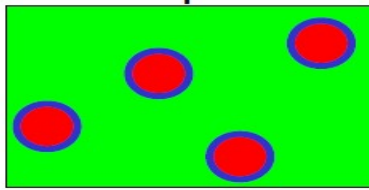
$$V' = 2\pi^2 \frac{I(0)}{Q}$$

$$V = A + B * V'$$

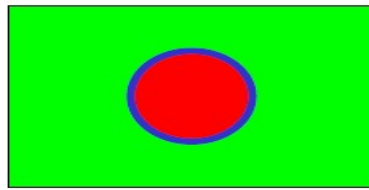
Estrategias de análisis: Invariantes

Límite de porod

$$q^4 I(q) \xrightarrow{q \rightarrow \infty} 2\pi (\Delta\rho)^2 V \cdot A$$



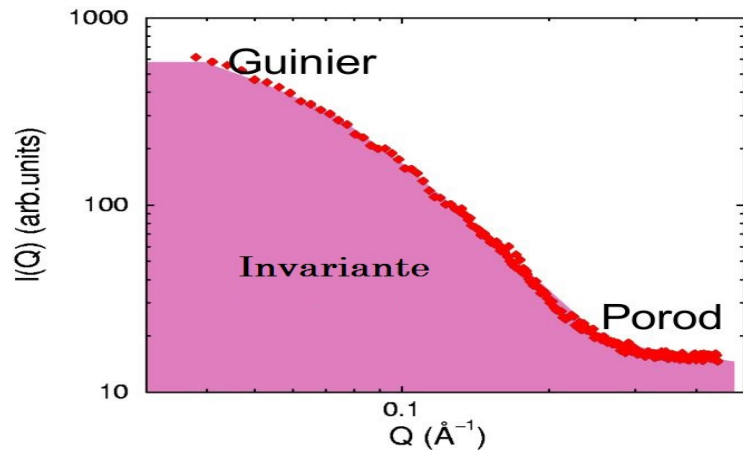
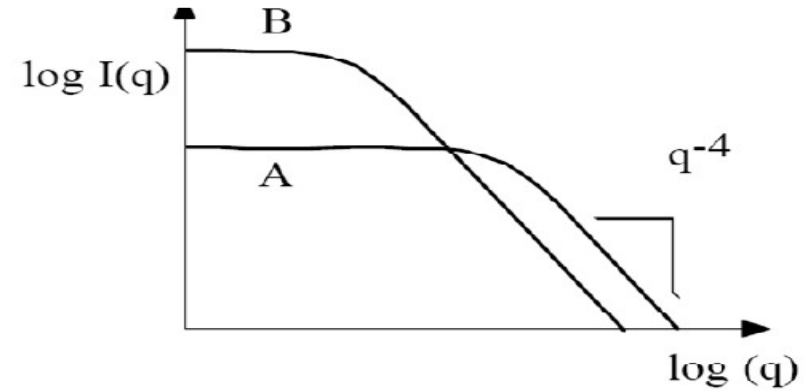
A



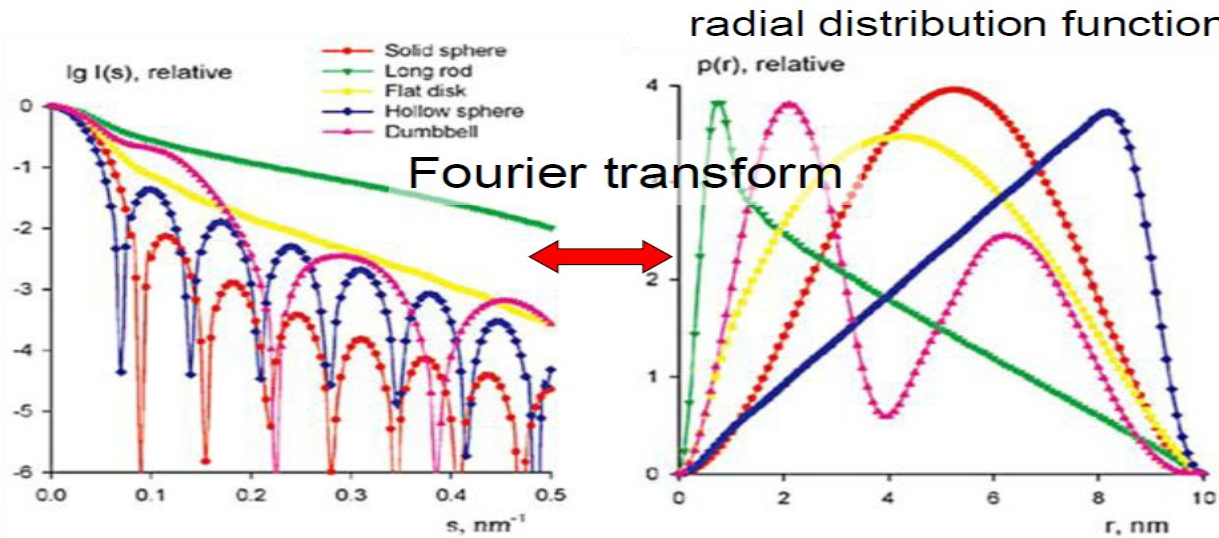
B



A posee mayor límite de Porod que B



Estrategias de análisis: $p(r)$



Se invierte la ecuación:

$$I(q) = 4\pi \int p(r) \frac{\text{sen}(qr)}{qr} dr$$

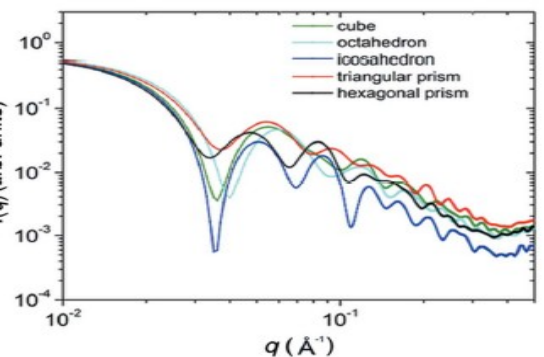
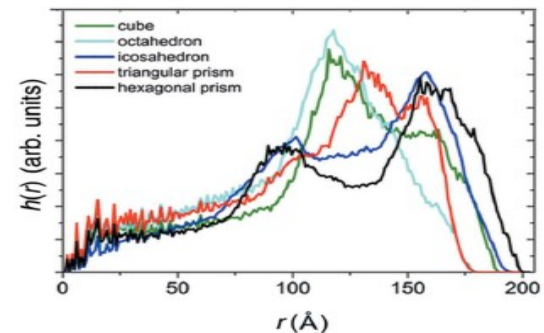
El fin es obtener la función de distribución radial $p(R)$

Estrategias de análisis: Construcción de partículas

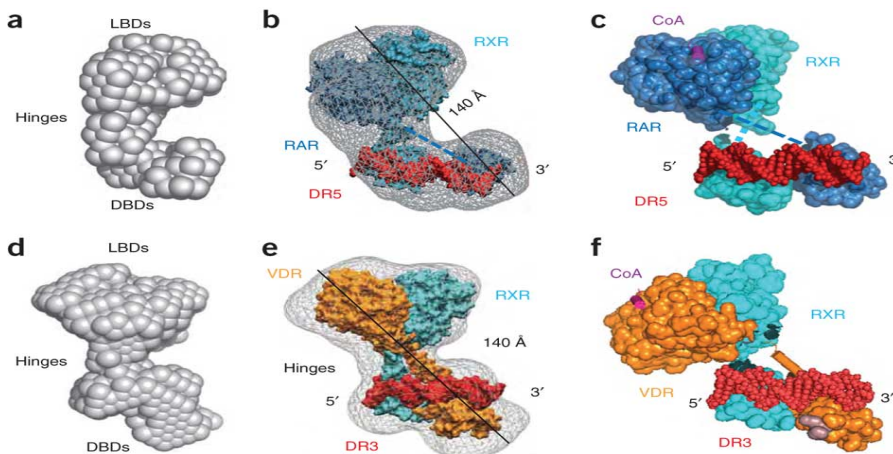
Es posible construir partículas a través de elementos más pequeños que lo constituyan. (como el ejemplo del cubo).

$$I(q) = A_{sph}(q)^2 \left[N + 2 \sum_{i \neq j} \frac{\sin(qR_{ij})}{qR_{ij}} \right]$$

Esta estrategia es muy empleada en programas como el DAMMIN que se emplea para determinar la forma de proteínas en solución



Programa DAMMIN

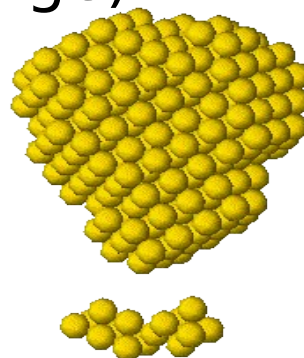
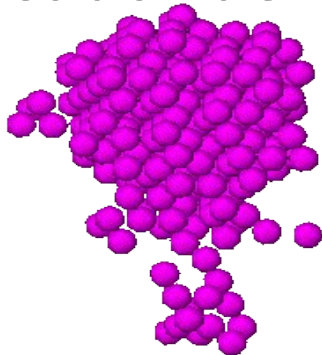
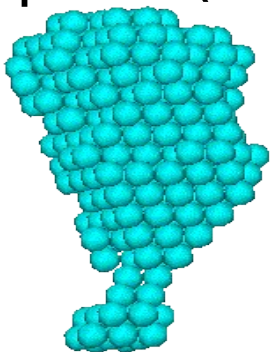


Ab initio program DAMMIN

Se emplean algoritmos de Montecarlo (simulated annealing) que busca la forma compacta que minimiza:

$$f(X) = \chi^2 [I_{\text{exp}}(s), I(s, X)] + \alpha P(X)$$

Donde χ es la figura de mérito a minimizar, $P(X)$ es la penalidad que asegura que la figura sea compacta, $\alpha > 0$ el peso (multiplicador de Lagrange)

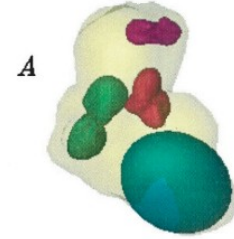
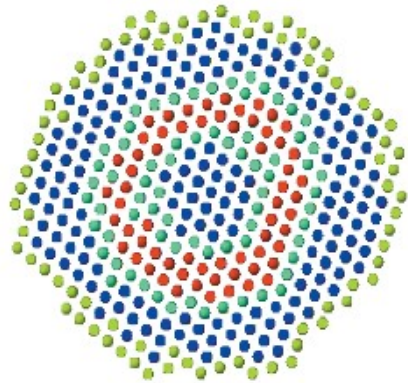
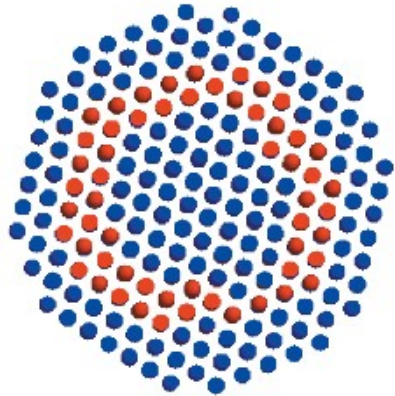
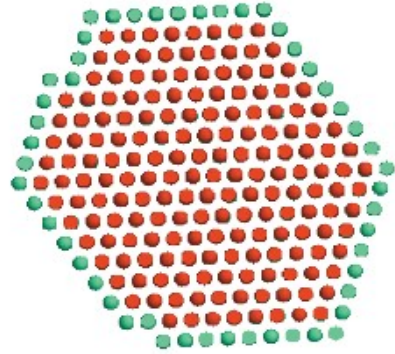
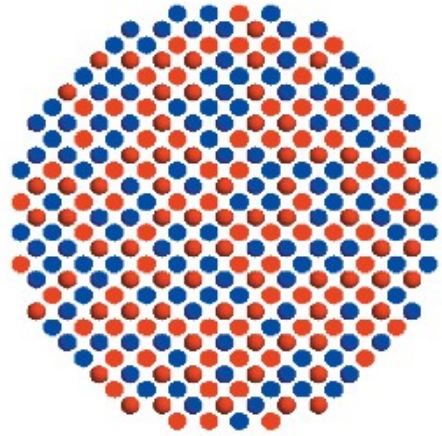


compact

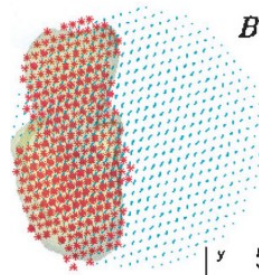
loose

disconnected

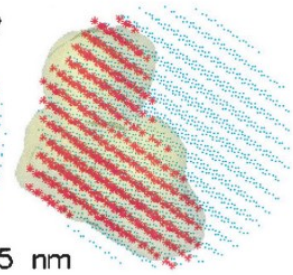
Ab initio program DAMMIN



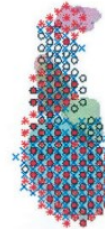
A



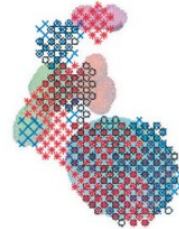
B



5 nm
y
z x

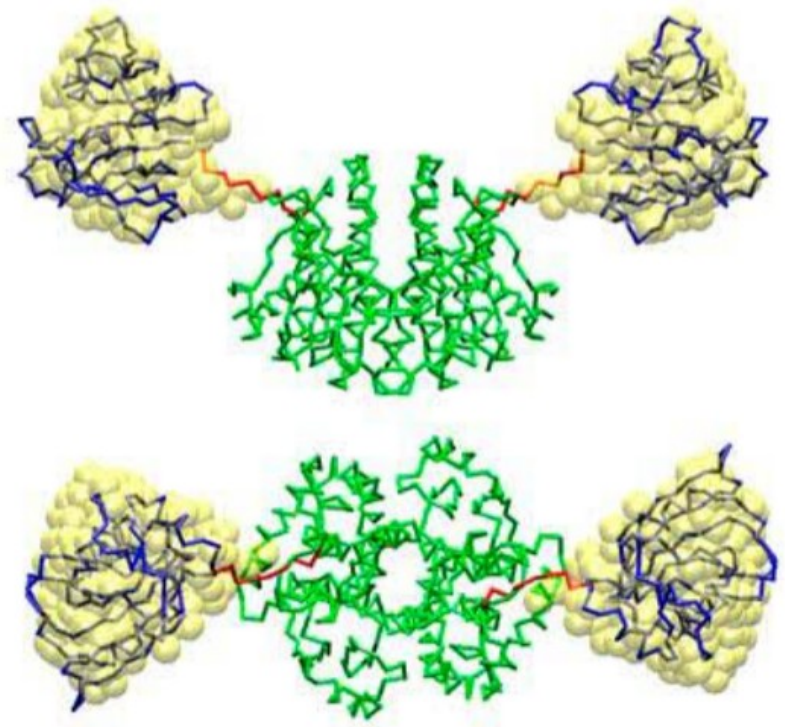
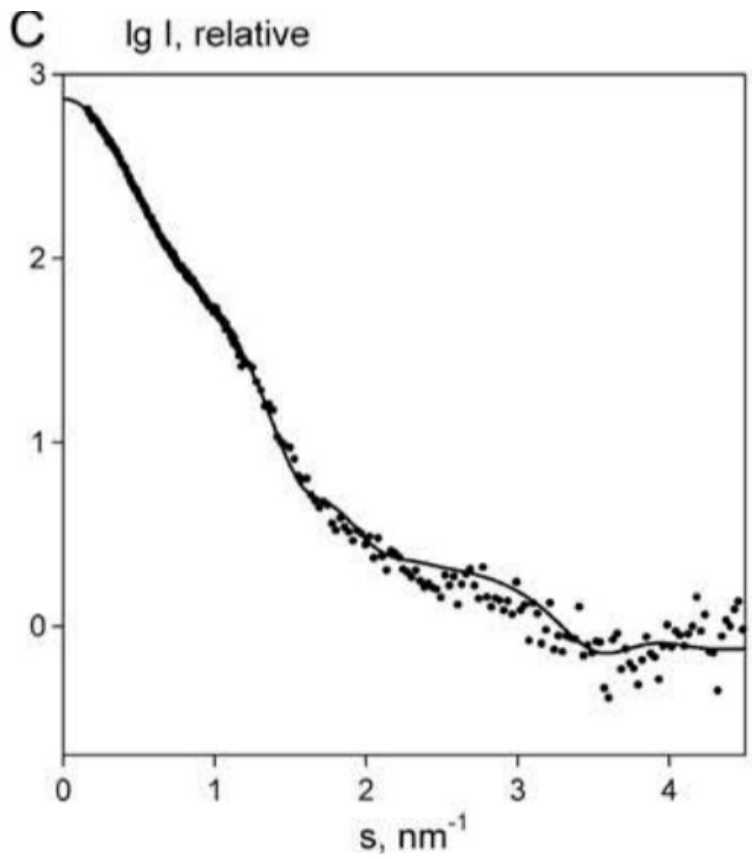


C



Ejemplos

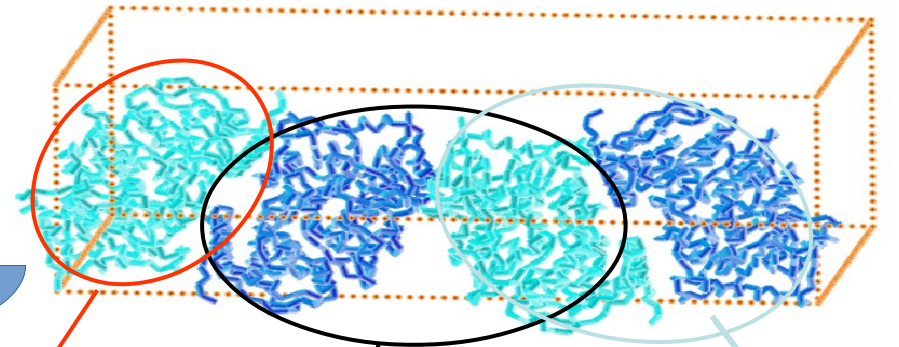
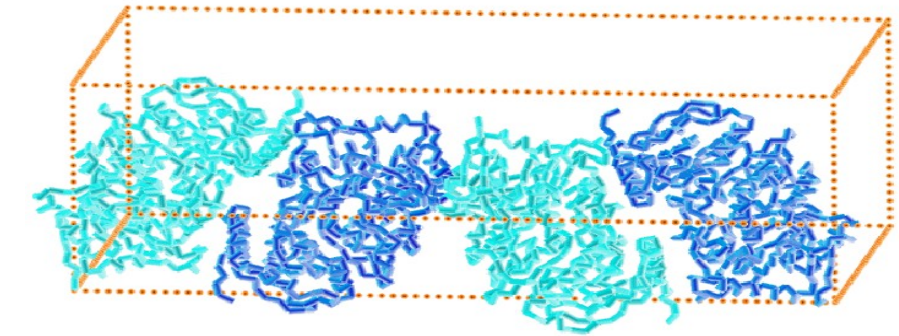
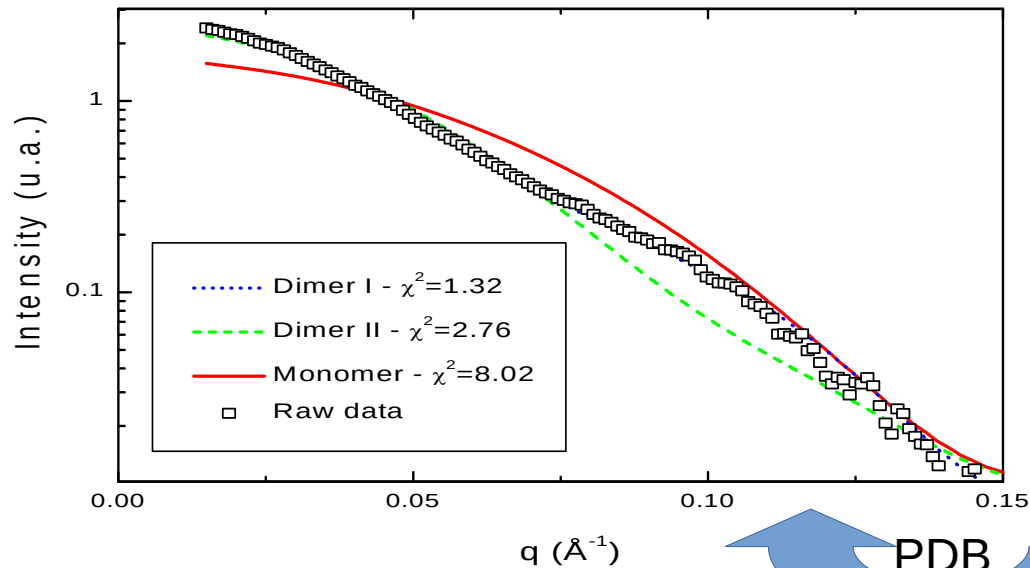
Global Rigid Body Modeling of Macromolecular Complexes against Small-Angle Scattering Data



Crystal Structure of the Dimeric Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PEPCK) from *Trypanosoma cruzi* at 2 Å Resolution

Stefano Trapani, Jutta Linss, Samuel Goldenberg, Hannes Fischer, Aldo F. Craievich and Glaucius Oliva

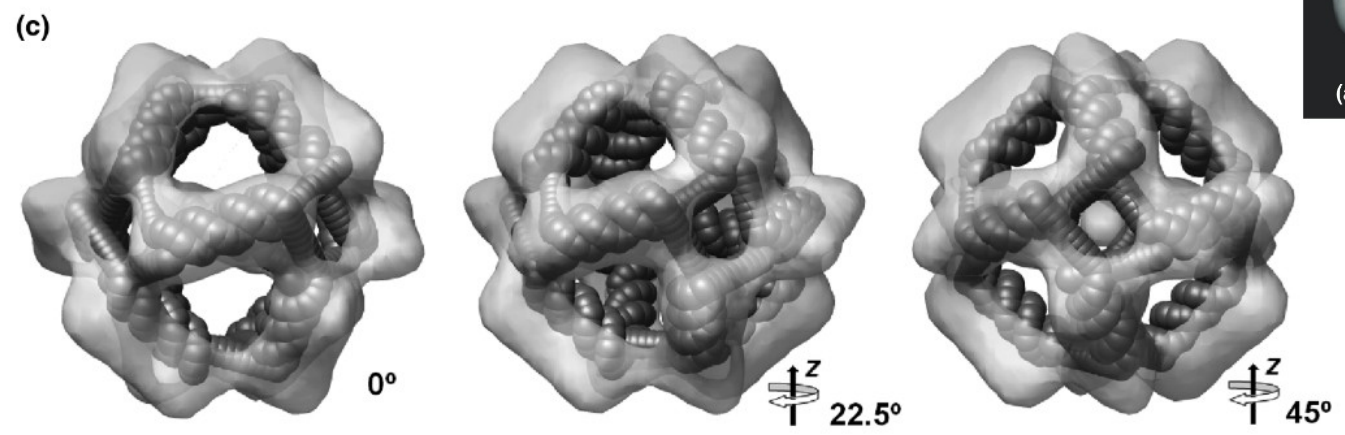
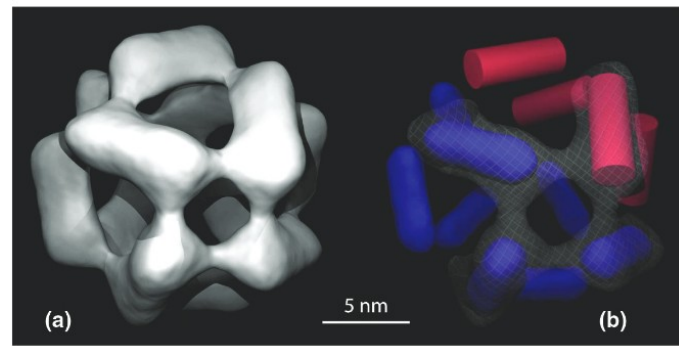
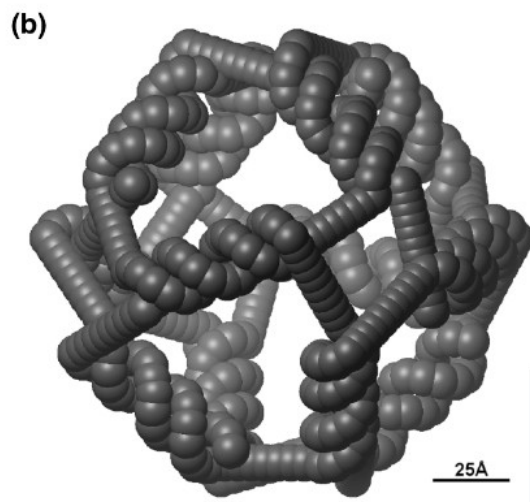
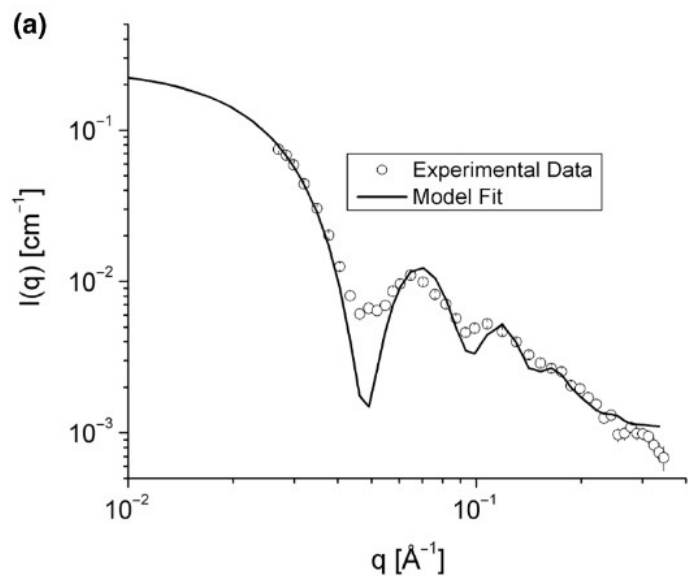
J. Mol. Biol. (2001) 313, 1059-1072



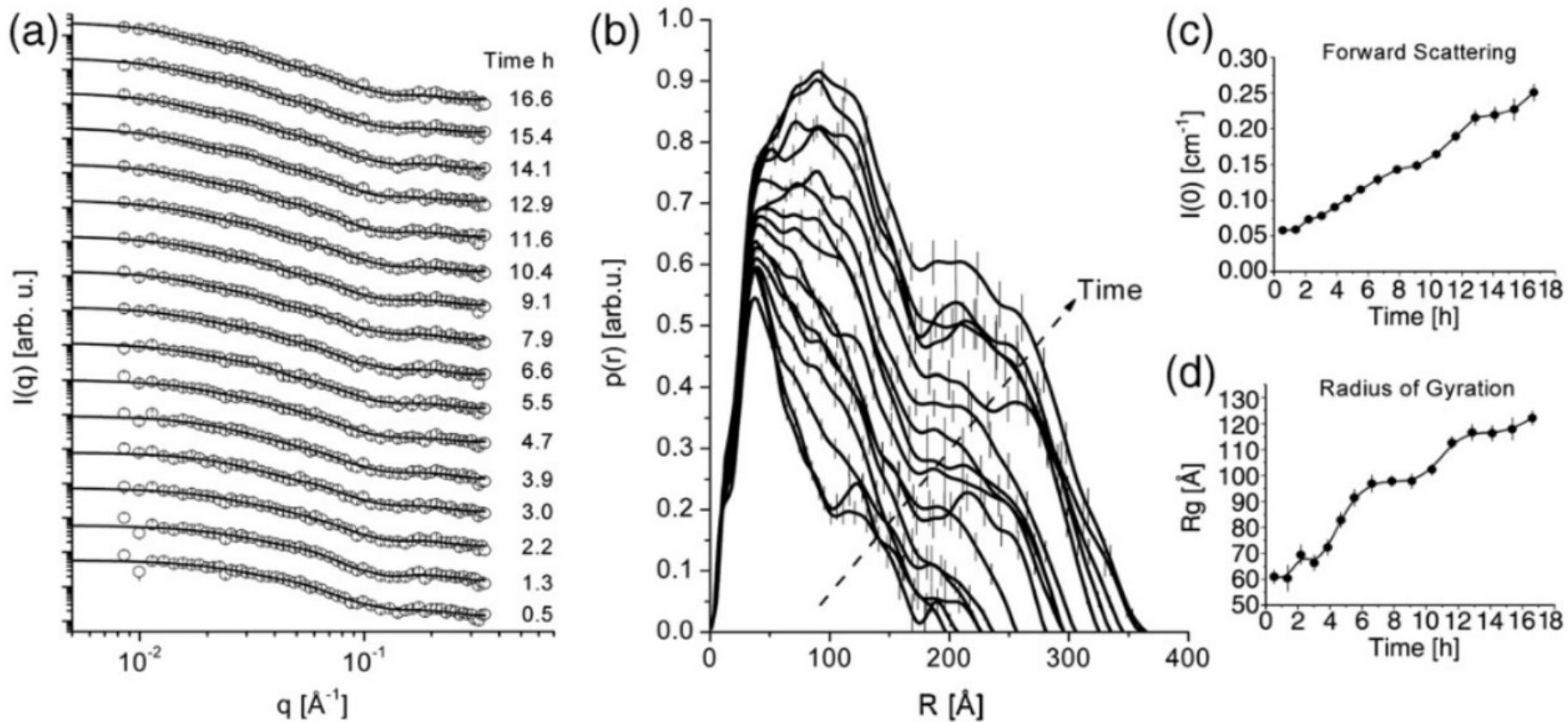
Monomer

Dimer I

Dimer II

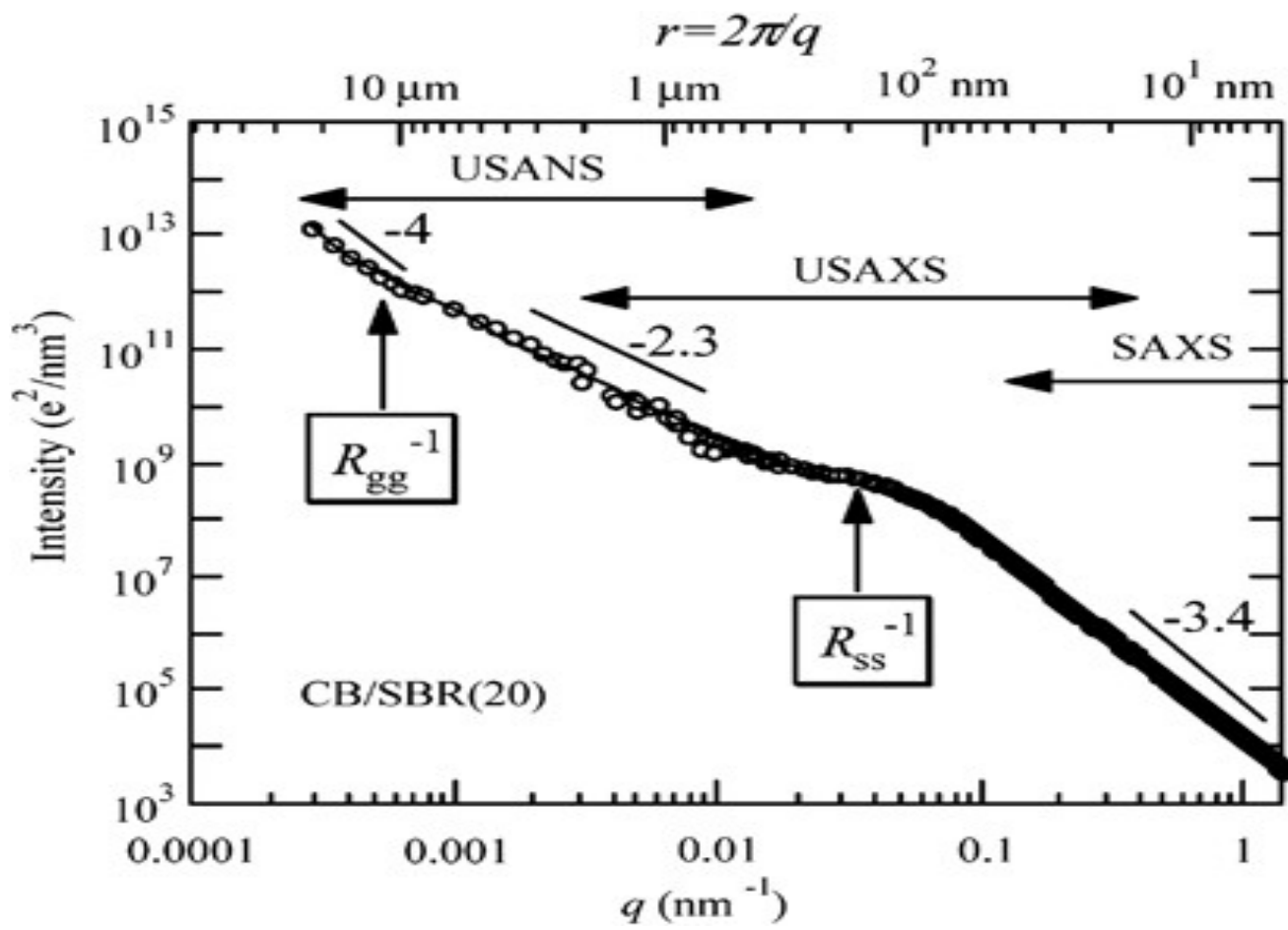


SDS-Induced Fibrillation of α -Synuclein: An Alternative Fibrillation Pathway



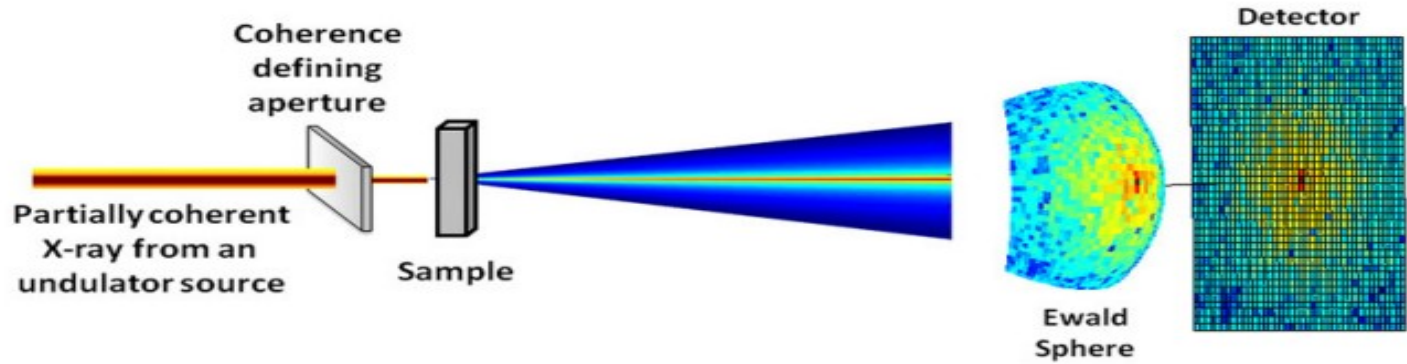
Presente y Futuro de las técnicas dispersivas

Ultra Small Small Angle Scattering USAS

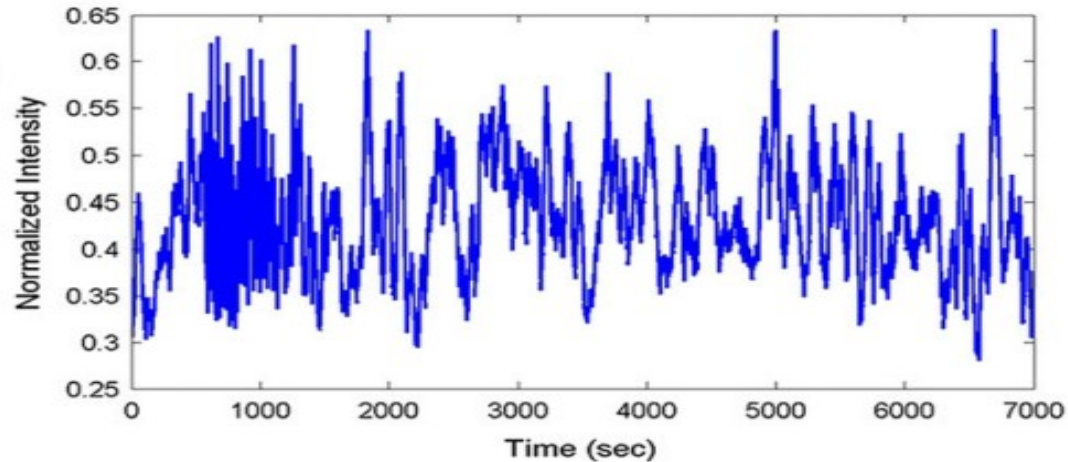
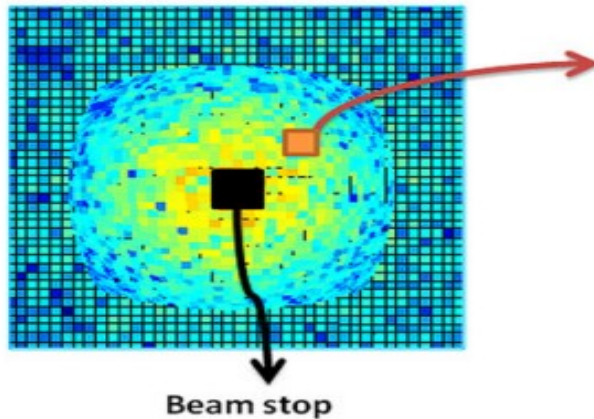


SAXS coherente

X-Ray Photon Correlation Spectroscopy (XPCS)



$$g_2(q, t) = \frac{\langle I(q, t + t') I(q, t') \rangle_E}{\langle I(q, t') \rangle_E^2}$$



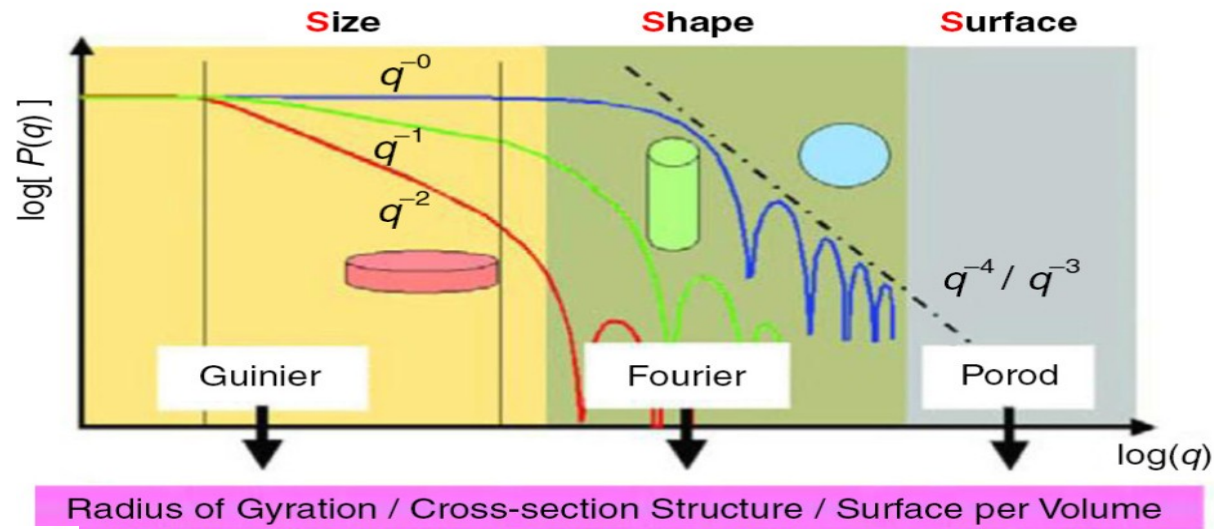
Conclusiones

- SAS es un grupo de herramientas muy útiles y Complementarias de otras técnicas: RMN, DRX, CryoEM
- SAXS es una técnica robusta y no requiere muchos recaudos para realizar un experimento.
- Se pueden obtener información de la forma, tamaño, peso molecular.
- La técnica es flexible como para adoptar diversas simetrías y en un amplio espectro de muestras.

Contacto

Cristián Huck Iriart : chuck@unsam.edu.ar

Laboratorio de Cristalografía Aplicada: lca@unsam.edu.ar



Curso de postgrado:

“Large scale structures using SANS and reflectometry: from bio-sciences to solid state”

Dra. Giovanna Fragneto (ILL-Francia)

Dr. Michael Fitzsimmons (Oak Ridge National Laboratory, USA)

28 de octubre al 8 de noviembre de 2019. UNSAM