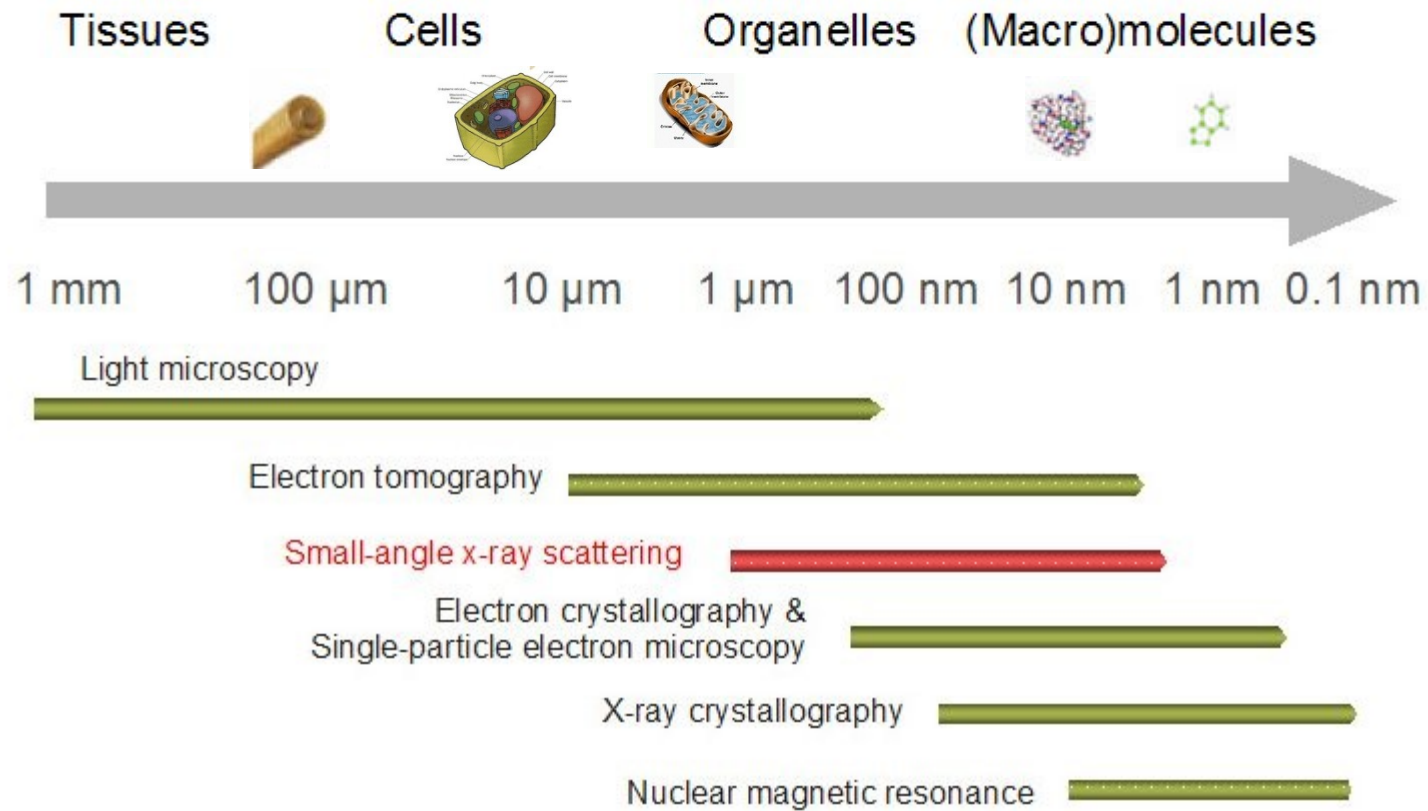


# Studi strutturali: BioSAXS

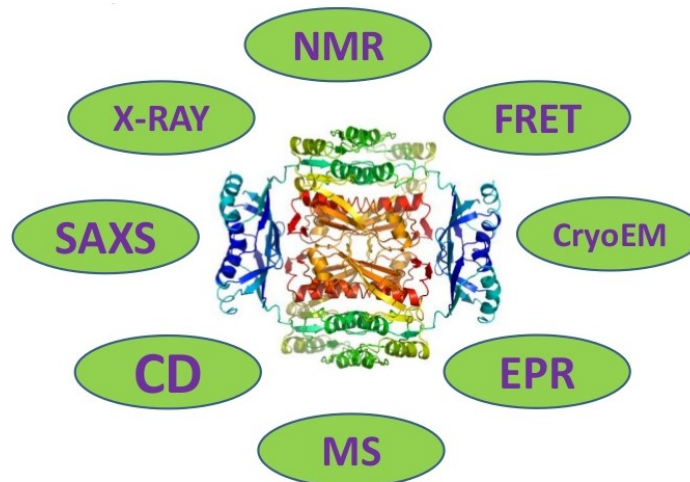
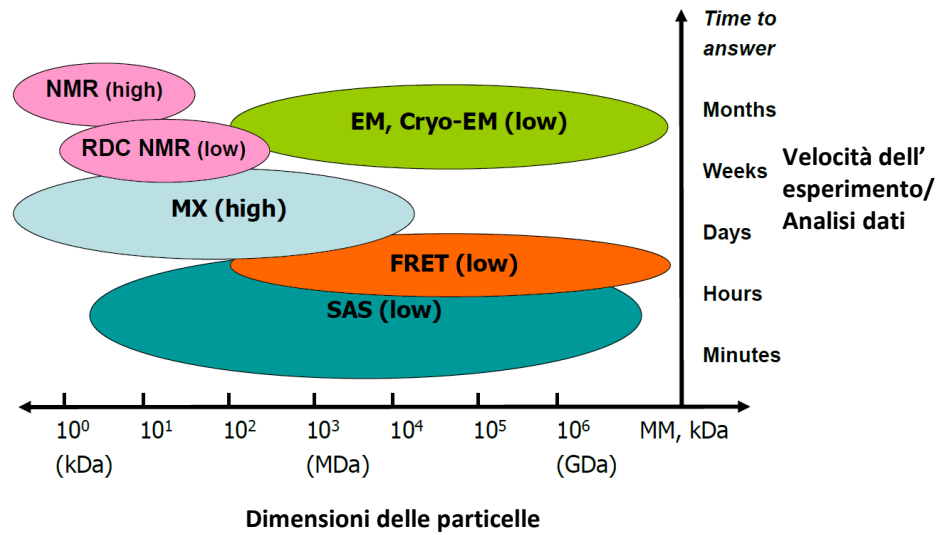
# BioSAXS:



**SAXS:** livello di risoluzione compreso tra circa 1 e 10 nm

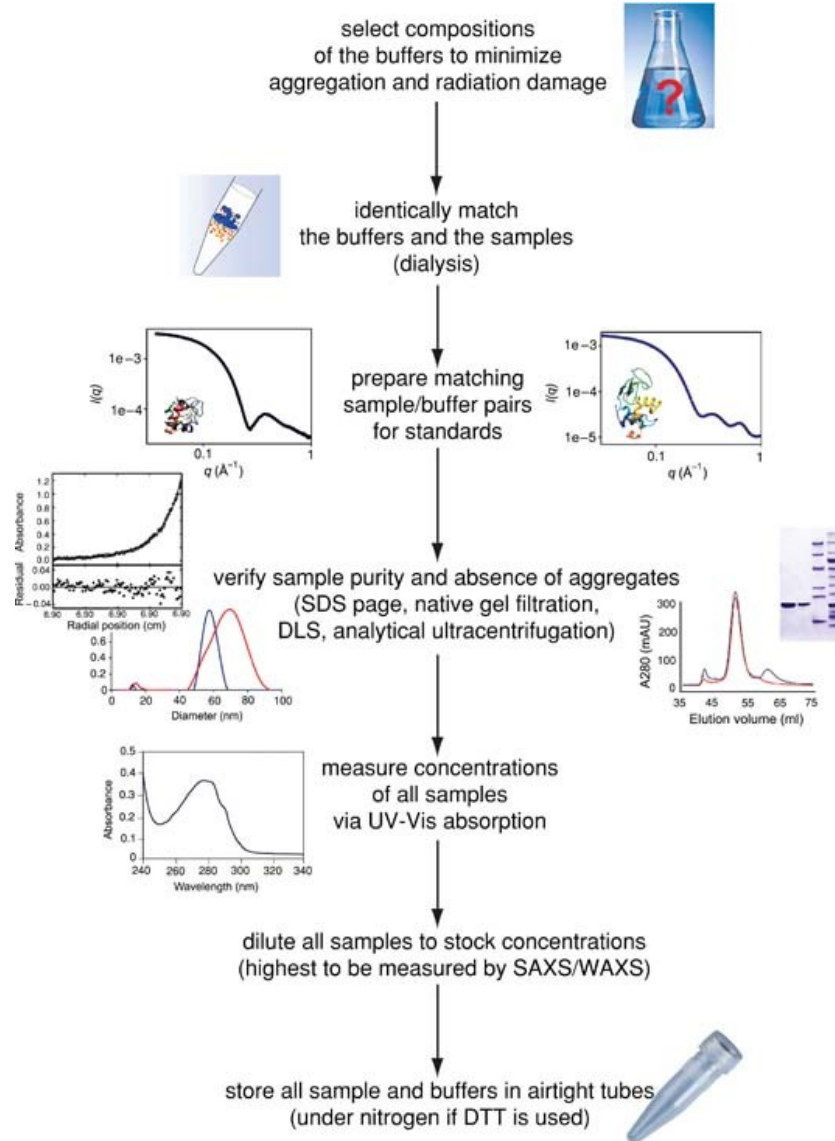
# BioSAXS:

Perché preoccuparsi della bassa risoluzione?



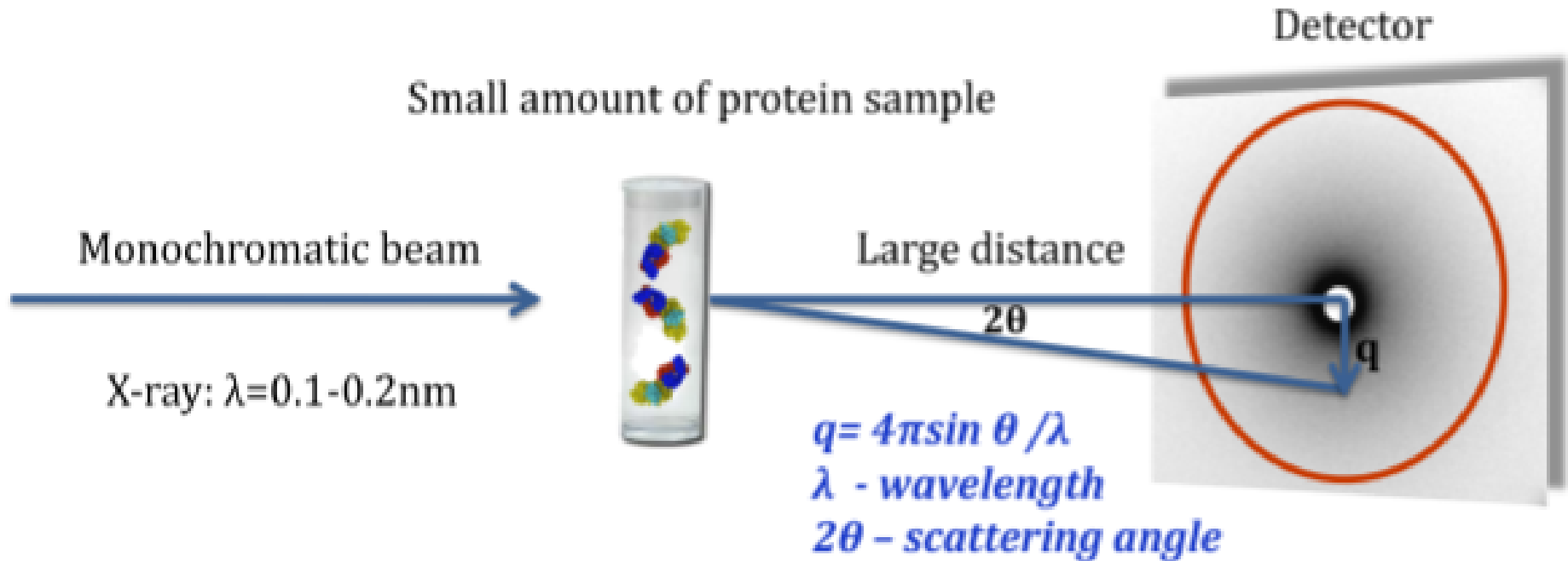
# BioSAXS:

## Preparazione del campione



# BioSAXS:

Set up sperimentali:



## Sorgenti:

Generatore di X-ray ( $\lambda = 0.1 - 0.2 \text{ nm}$ )

Sincrotrone ( $\lambda = 0.03 - 0.35 \text{ nm}$ )

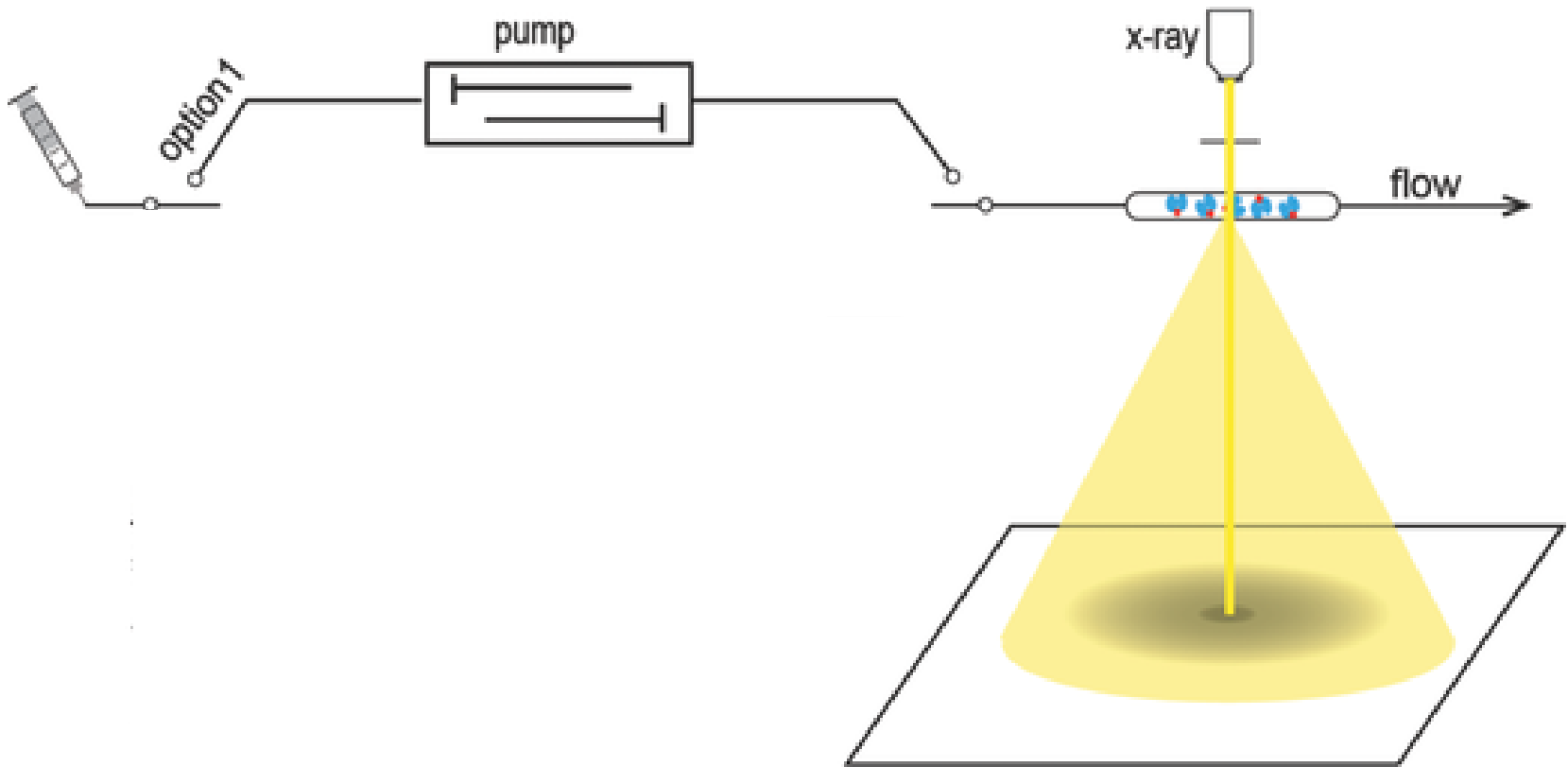
Neutroni ( $\lambda = 0.2 - 1 \text{ nm}$ )

$$s = 4\pi \sin \theta / \lambda = q$$

(anche  $S = 2 \sin \theta / \lambda = 2\pi s = s (!) = \mu \dots$ )

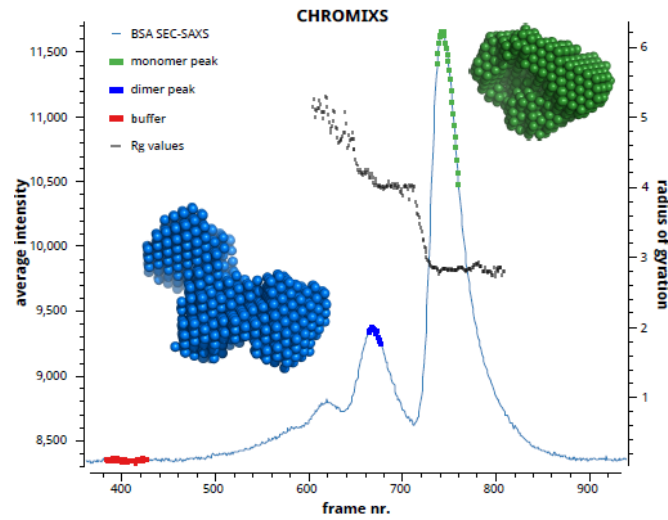
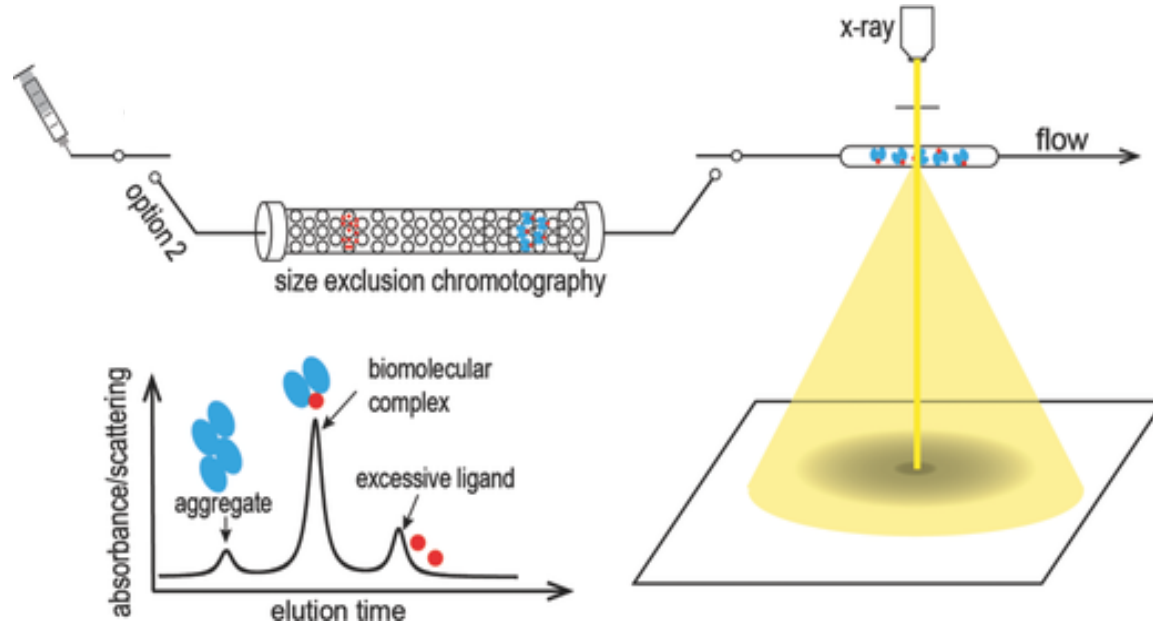
# BioSAXS:

Set up sperimentali: STANDARD BATCH MODE



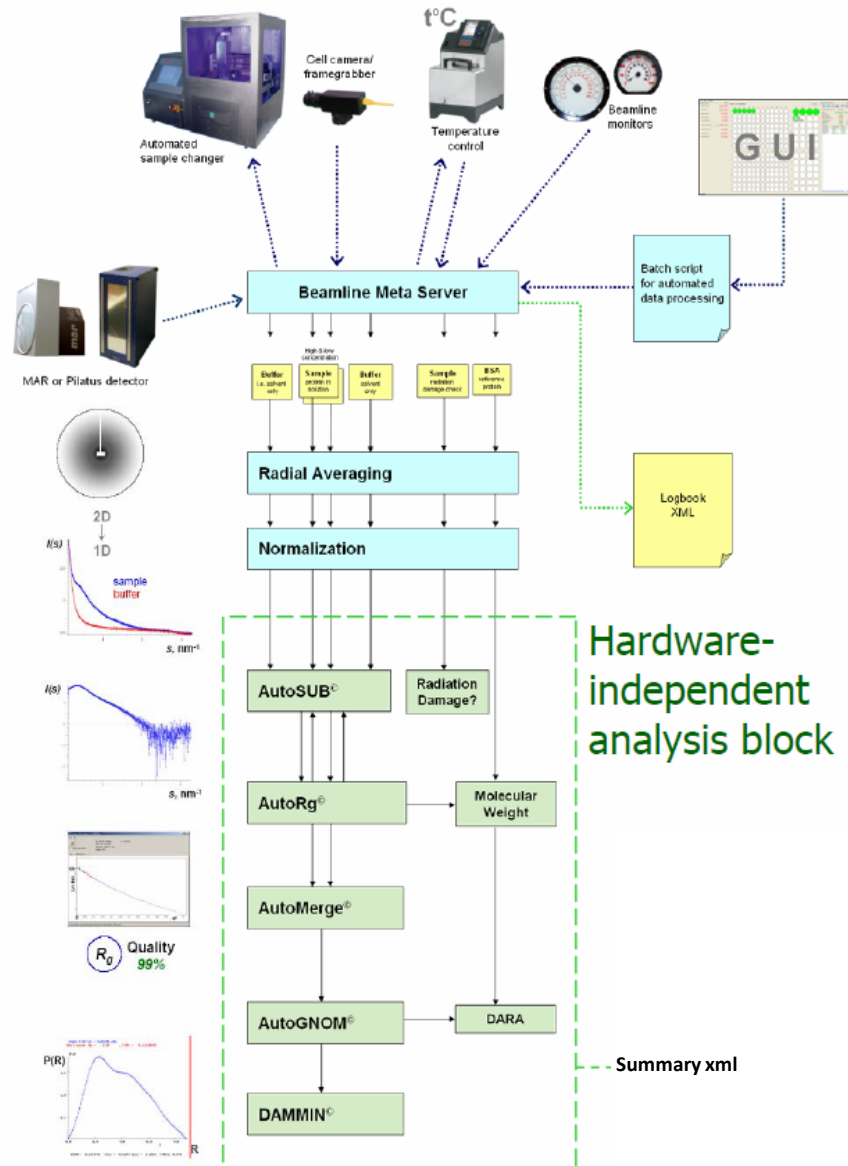
# BioSAXS:

## Set up sperimentali: SEC-SAXS



# BioSAXS:

## Set up sperimentale automatizzato

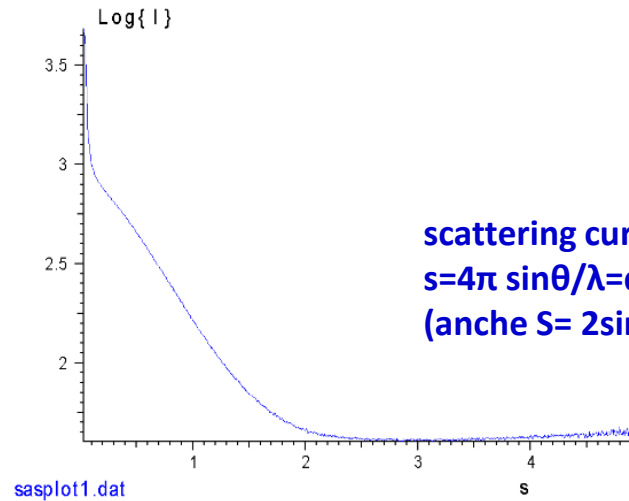
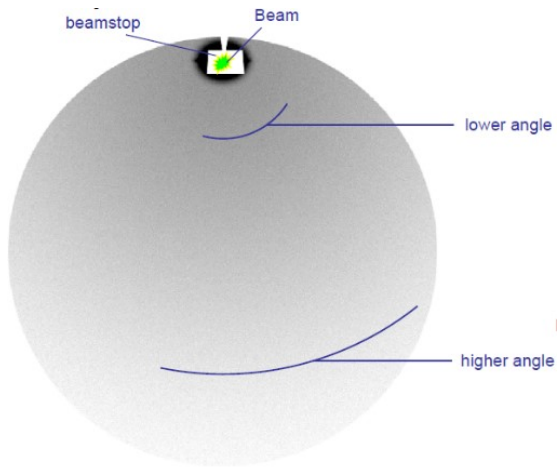




# BioSAXS:

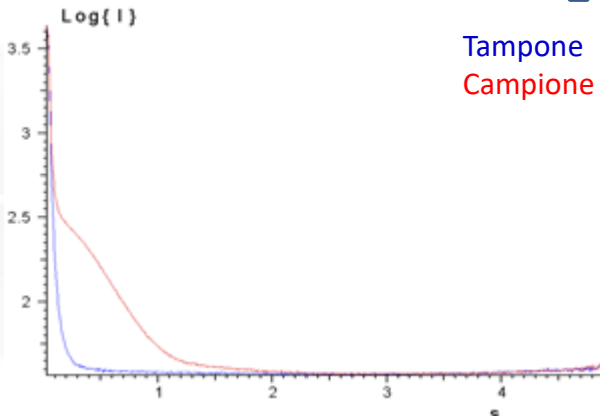
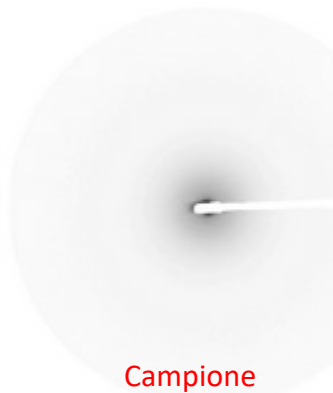
## Analisi dei dati

### 1) Data reduction: integrazione radiale delle immagini 2D a una curva 1D

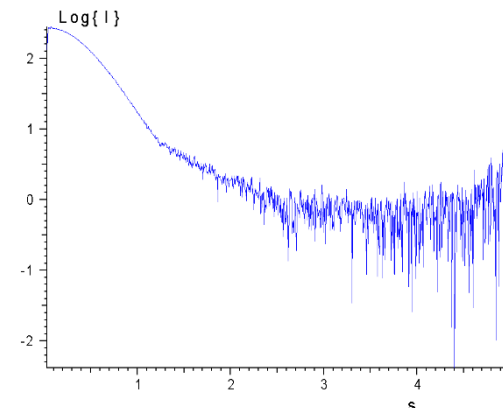


scattering curve:  $s$  vs  $\text{Log}(s)$   
 $s = 4\pi \sin\theta/\lambda = q$   
(anche  $S = 2\sin\theta/\lambda = 2\pi s = s (!) = \mu \dots$ )

### 2) Averaging and Buffer subtraction



Tampon  
Campione



# BioSAXS:

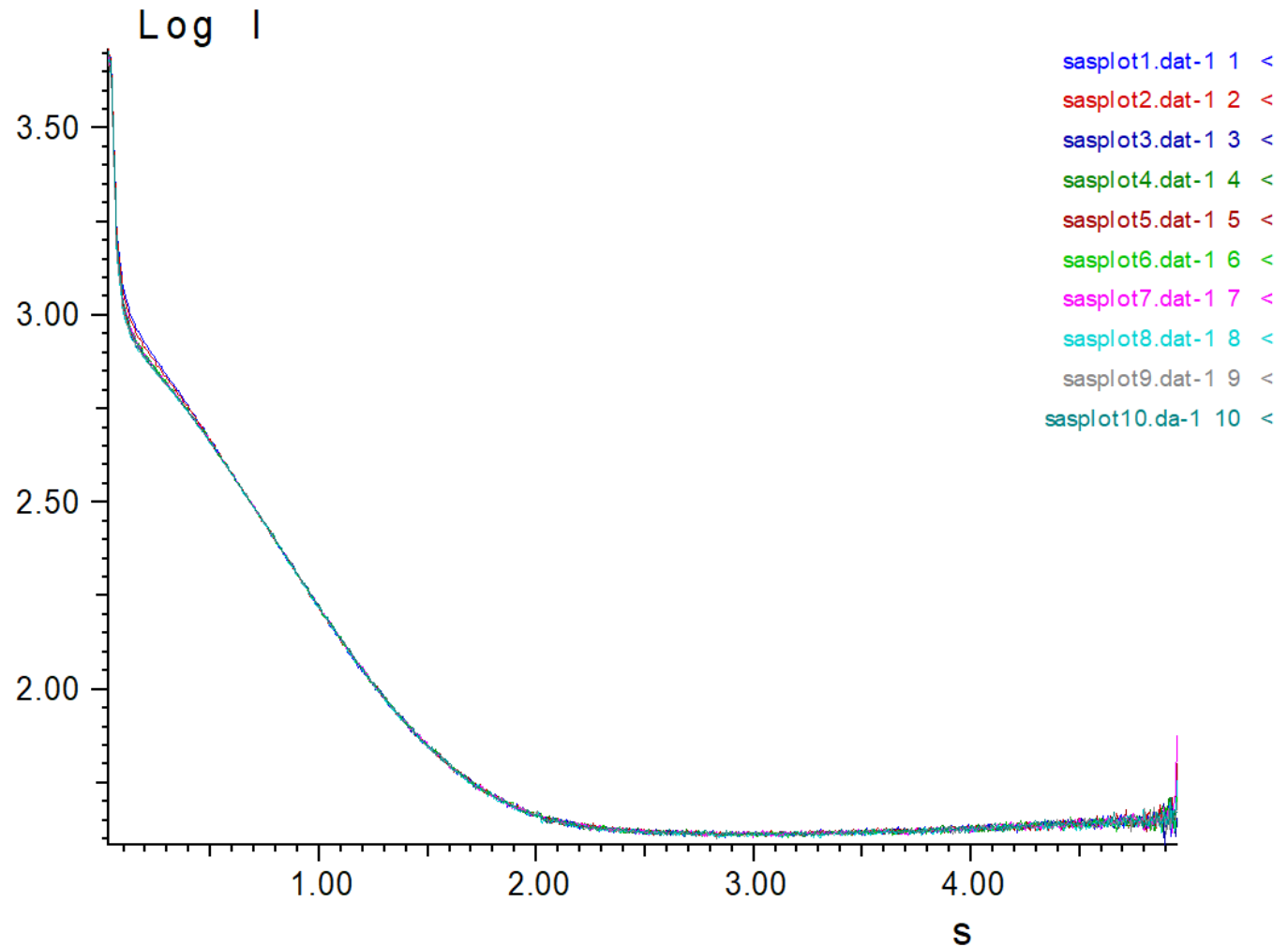
## Qualità dei dati

### 1) Confronto diverse esposizioni e la media:

#### Danno da Radiazione

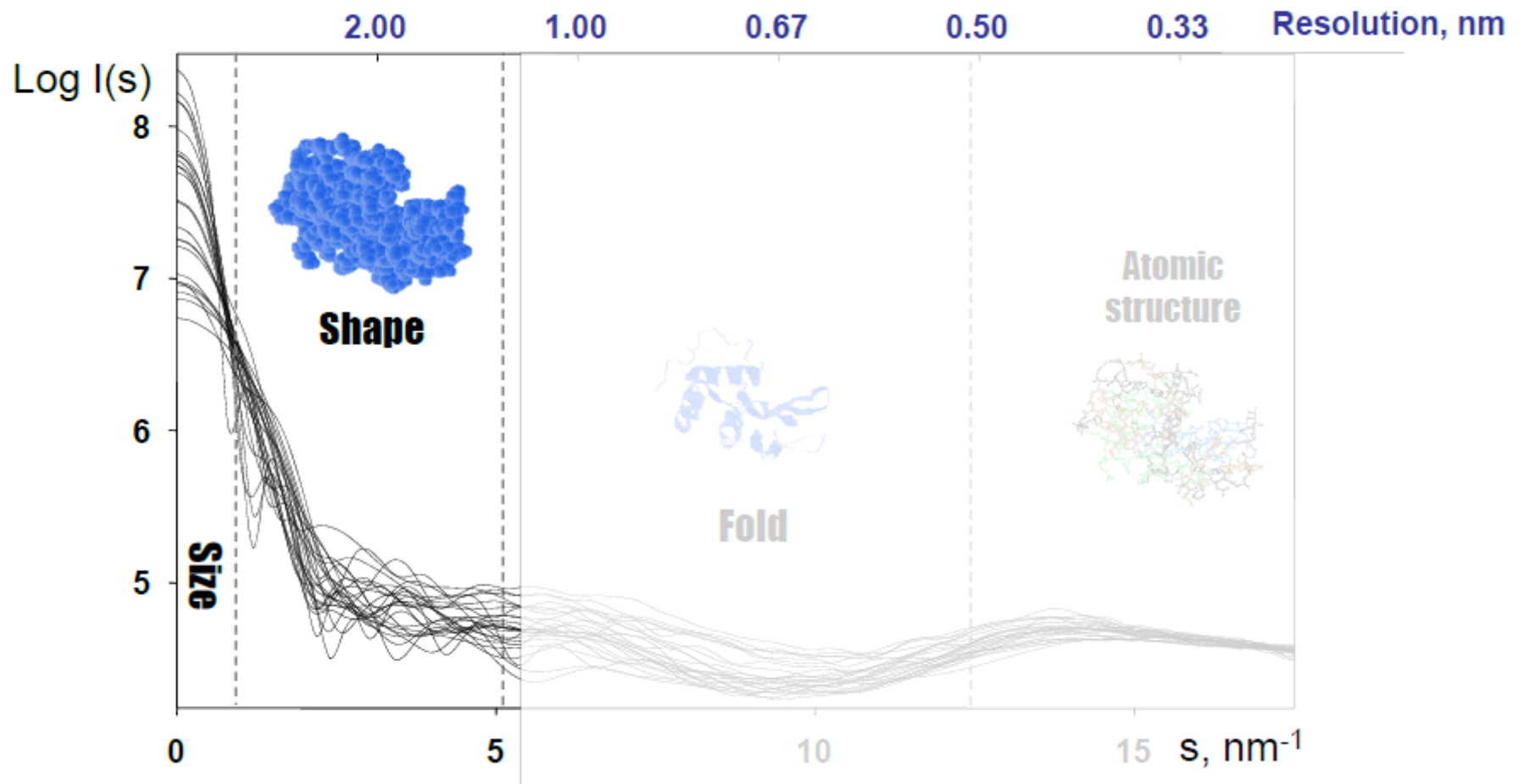
Riducibile mediante

- Addittivi
- **Attenuazione del fascio**



# BioSAXS:

## SISTEMI IDEALI MONODISPERSI

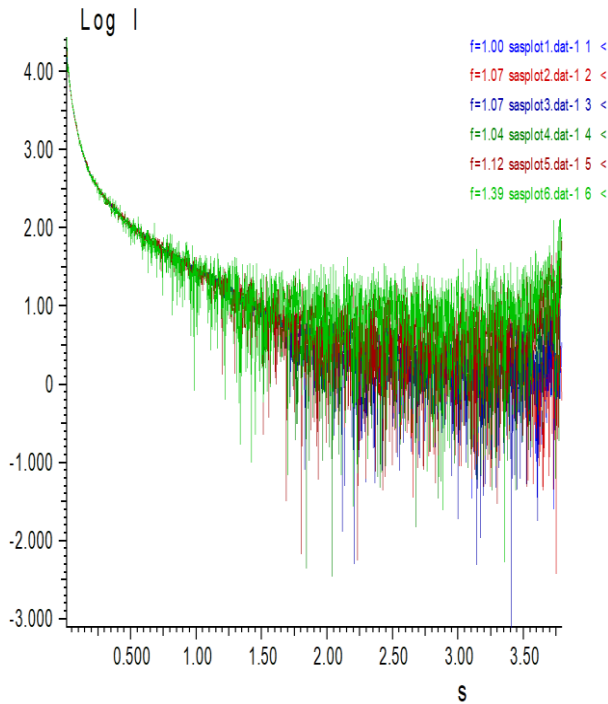


# BioSAXS:

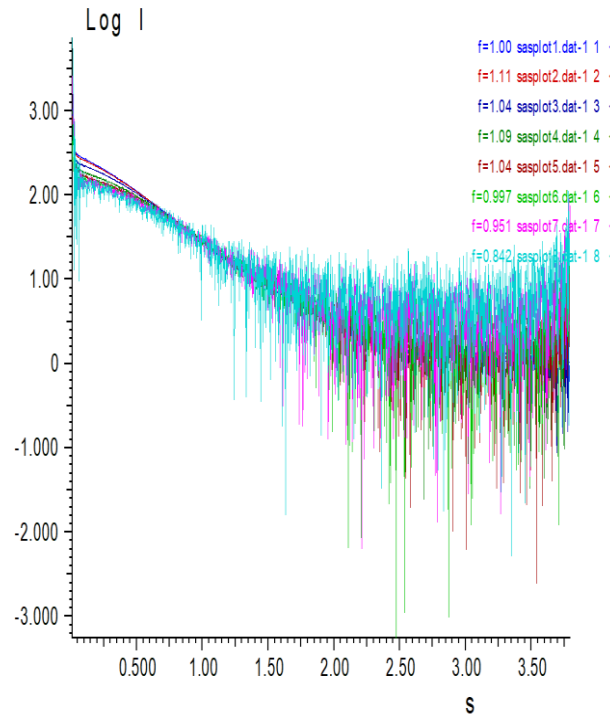
## Qualità dei dati

### 2) Confronto curve di scattering misurate a diverse []:

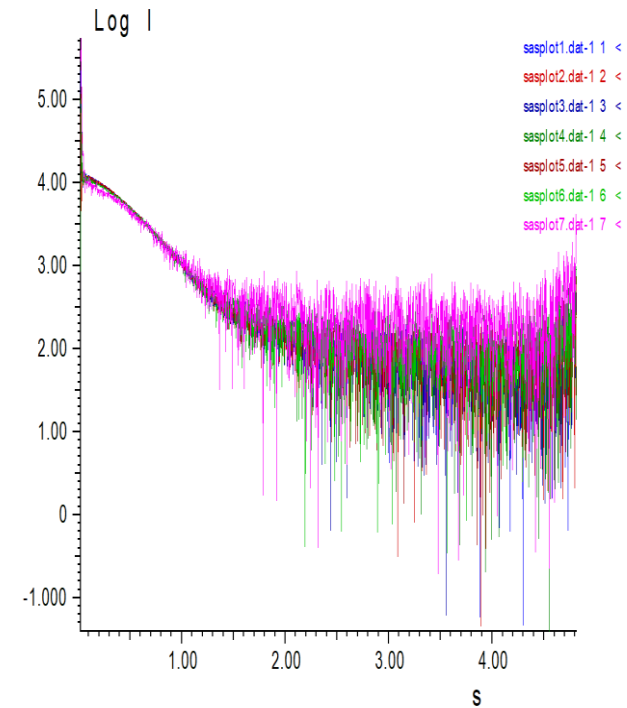
Aggregazione



Dipendenza da []



Interazioni fra particelle  
(attrattive/repulsive)



# BioSAXS:

Domande a cui SAXS può rispondere se NIENTE è noto

## 1) Informazioni su forma, dimensioni e conformazione

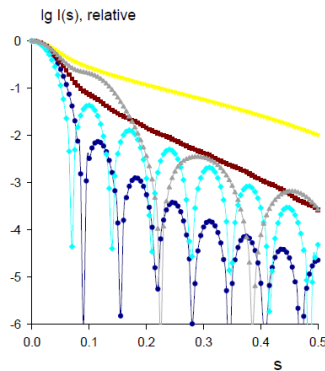
### Shape



Solid sphere



Hollow sphere



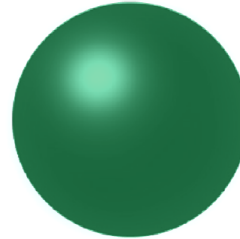
Dumbbell



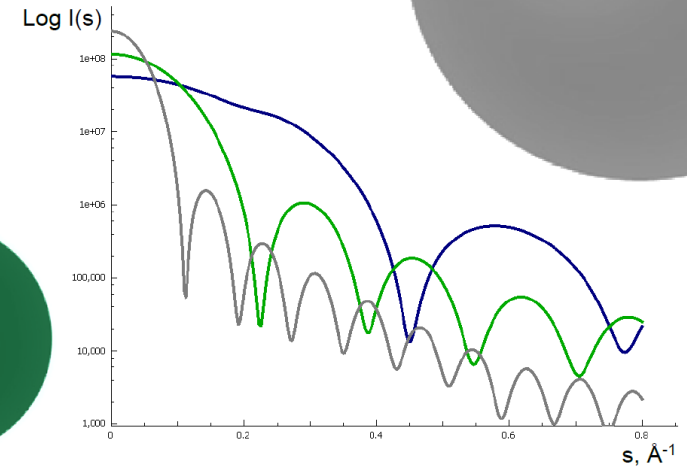
Long rod



Flat disc



### Size



# BioSAXS:

Domande a cui SAXS può rispondere se NIENTE è noto

## 1) Informazioni su forma, dimensioni e conformazione

Dalla **legge di Guinier** :

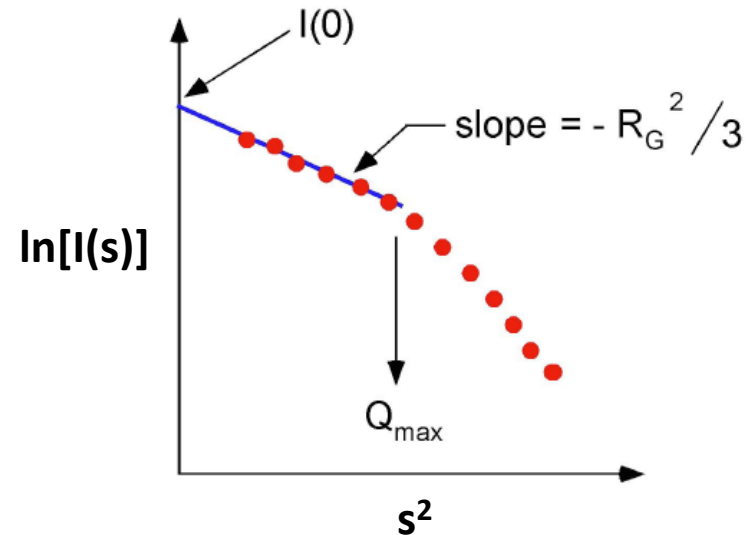
$$\ln[I(s)] \approx \ln[I(0)] - s^2 R_g^2 / 3$$

Intervallo di validità:  $0 < sR_g < 1.3$

**Raggio di girazione (Rg)**

**Peso Molecolare (MM)**

I (0) conoscendo:  $[\eta]$ ,  
V parziale specifico,  
I assoluta



In pratica, determinato su scala relativa :

$$MM_{\text{sample}} = MM_{\text{reference}} * (I(0)_{\text{sample}} / I(0)_{\text{reference}})$$

# BioSAXS:

Domande a cui SAXS può rispondere se NIENTE è noto

## 1) Informazioni su forma, dimensioni e conformazione

Dalla **legge di Porod** :

$$I(s) \sim S s^{-4}$$

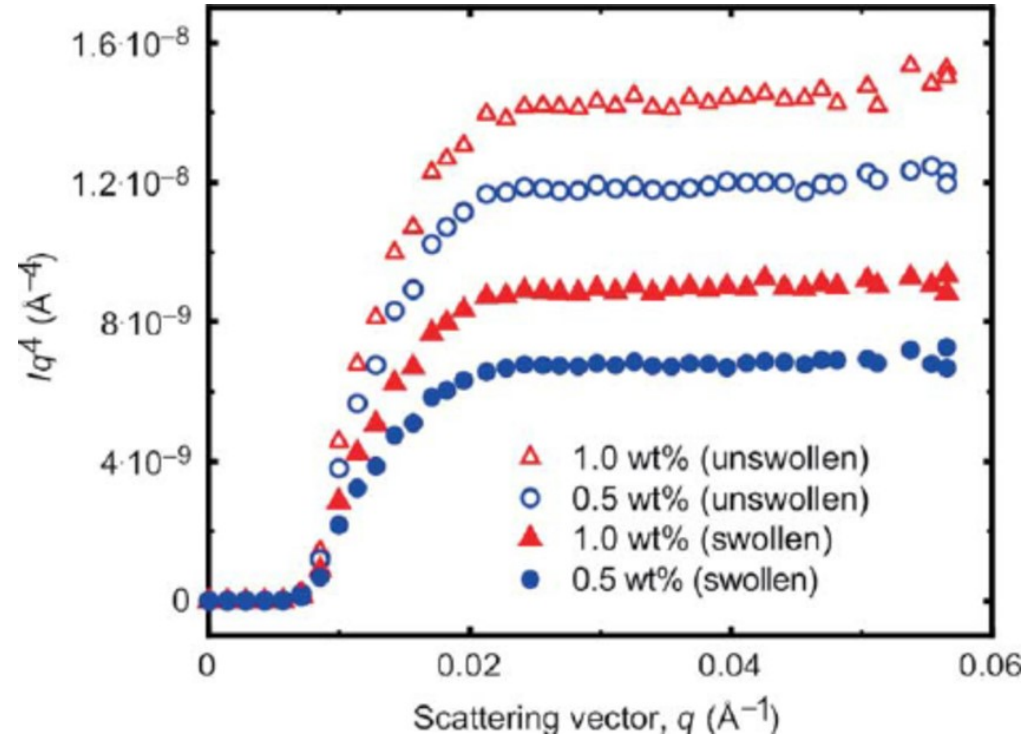
S area superficiale

**Volume escluso della particella idrata (Vp)**

$$V_P = \frac{2\pi^2 I(0)}{\int_0^\infty [I(s) - K_4] s^2 ds}$$

$K_4$  costante che assicura che il calo asintotico di I sia proporzionale a  $s^{-4}$  ad alti angoli

→ stima del **Peso molecolare** (MM)



# BioSAXS:

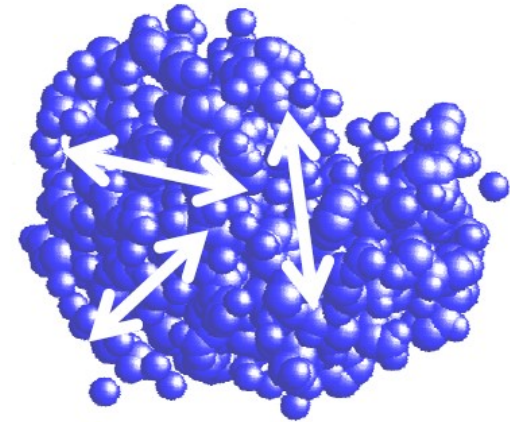
Domande a cui SAXS può rispondere se NIENTE è noto

## 1) Informazioni su forma, dimensioni e conformazione

Dalla **Distance distribution function**  $p(r)=r^2\gamma(r)$

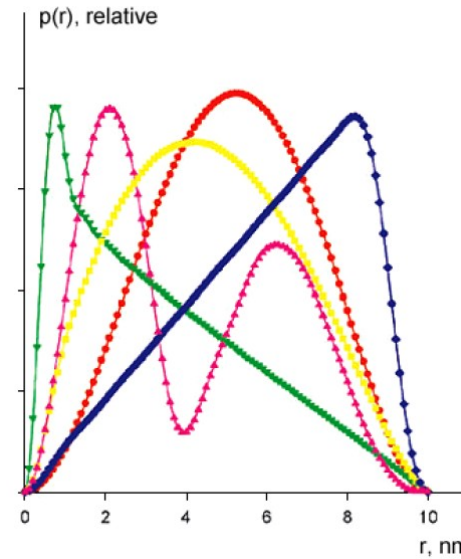
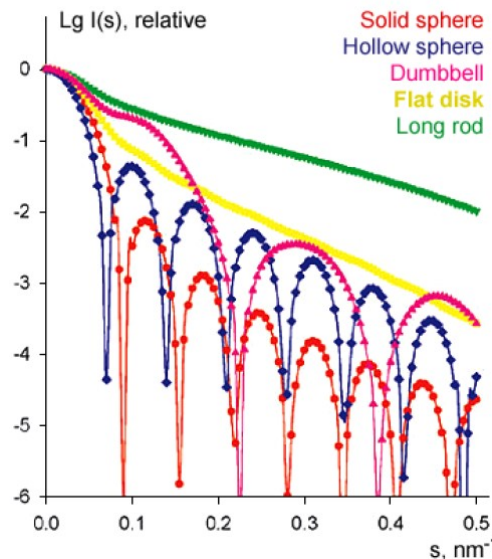
$$\gamma_0(r)=\gamma(r)/\gamma(0)$$

$$I(s) = 4\pi \int_0^{D_{\max}} p(r) \frac{\sin(sr)}{sr} dr \iff p(r) = \frac{r^2}{2\pi^2} \int_0^\infty \frac{s I(s) \sin(sr)}{sr} ds$$



Trasformata di Fourier indiretta

$D_{\max}$  = dimensione massima della particella



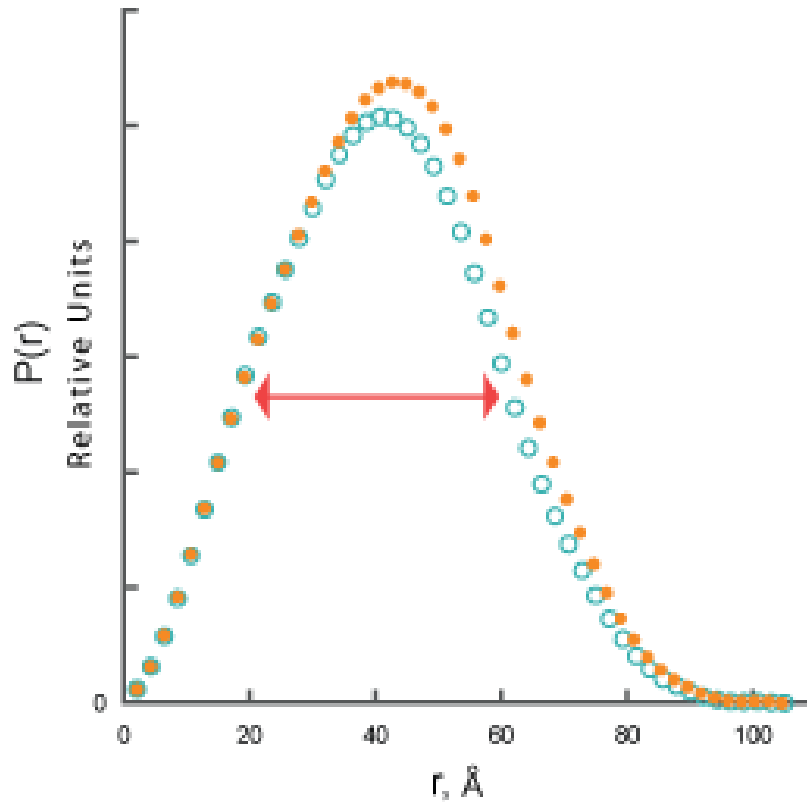


# BioSAXS:

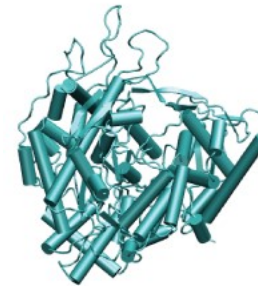
Domande a cui SAXS può rispondere se NIENTE è noto

## 1) Informazioni su forma, dimensioni e conformazione

Dalla **Distance distribution function**  $p(r)=r^2\gamma(r)$



T7 Promoter Complex



T7 Promoter-Transition Complex



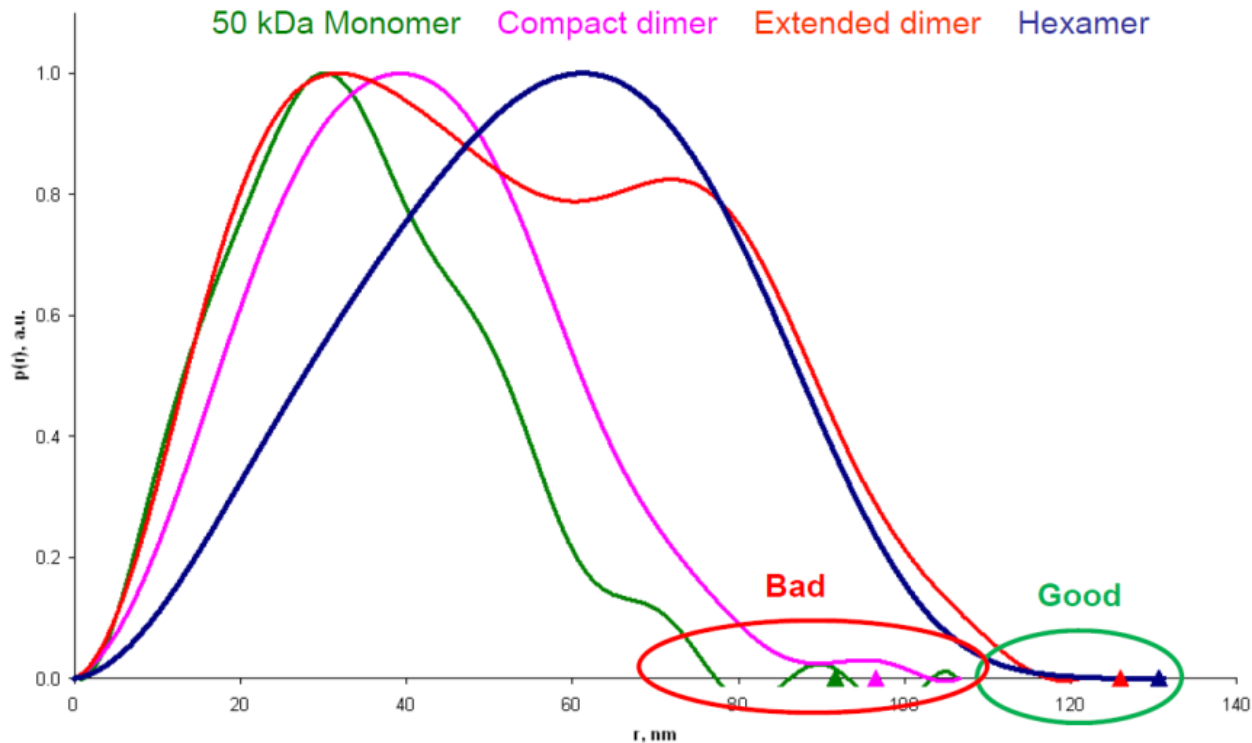
**Raggio di girazione (Rg)** («Real Space" Rg)

# BioSAXS:

Domande a cui SAXS può rispondere se NIENTE è noto

## 1) Informazioni su forma, dimensioni e conformazione

Distance distribution function  $p(r)=r^2\gamma(r)$

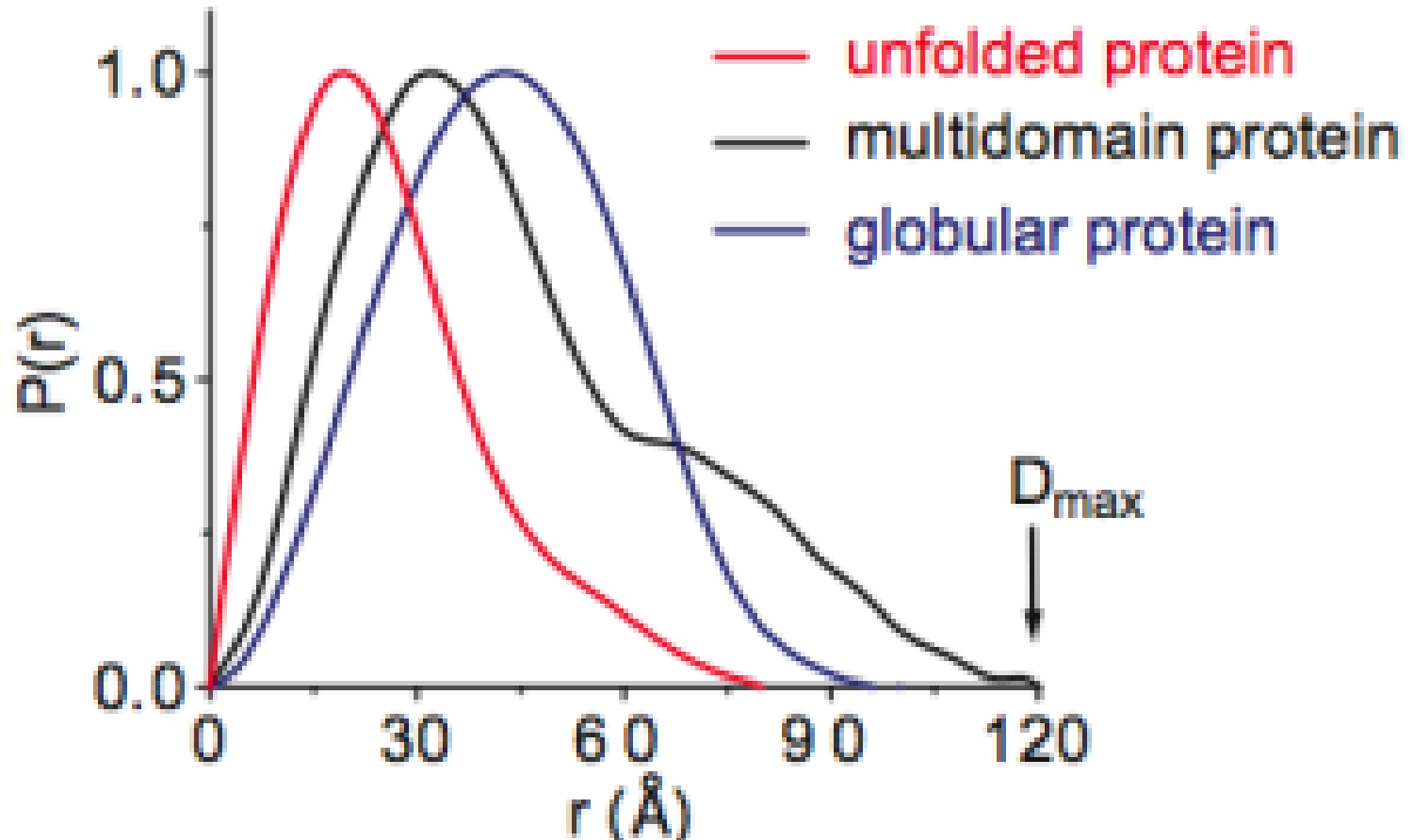


# BioSAXS:

Domande a cui SAXS può rispondere se NIENTE è noto

## 1) Informazioni su forma, dimensioni e conformazione

Dalla **Distance distribution function**  $p(r)=r^2\gamma(r)$



# BioSAXS:

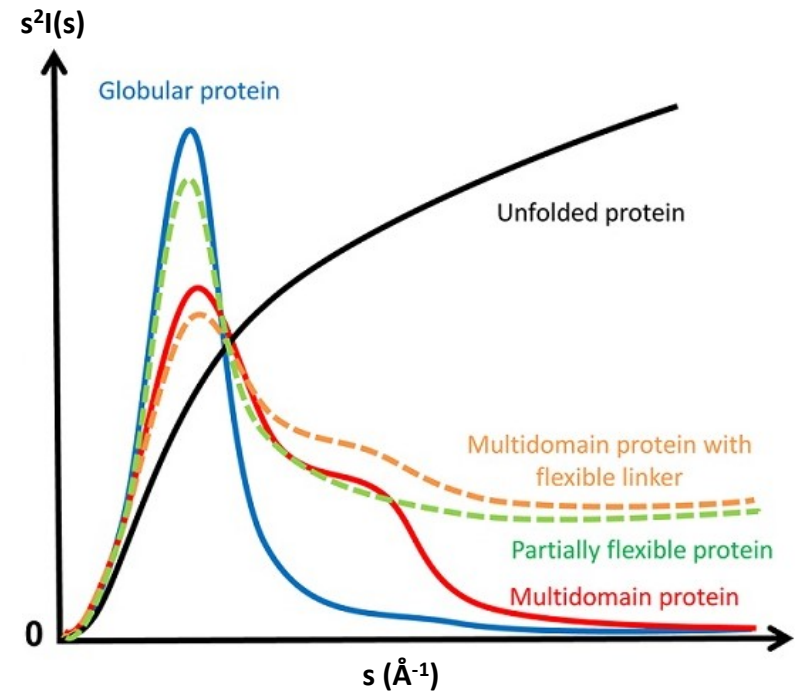
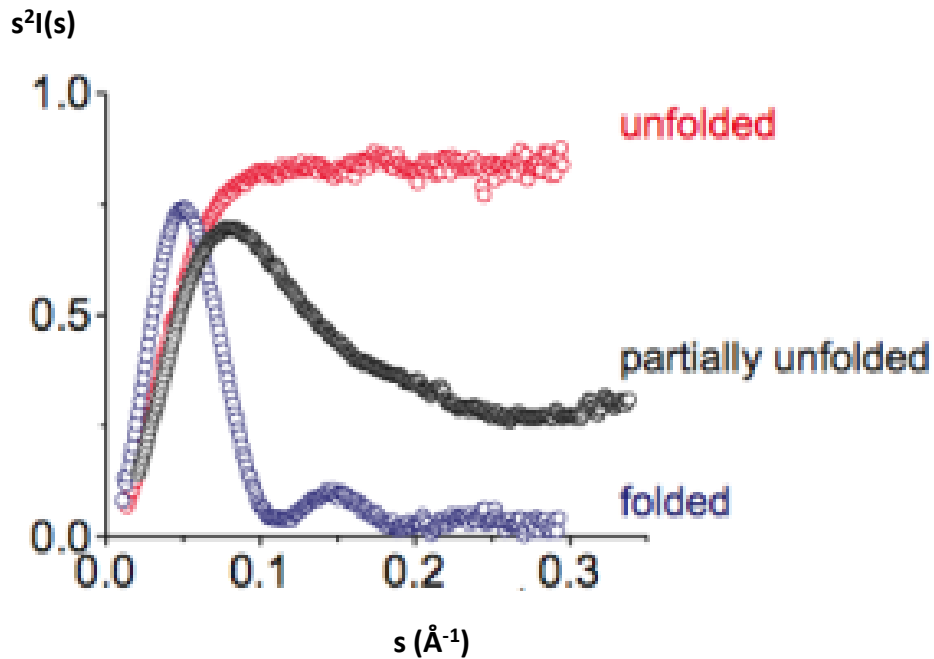
Domande a cui SAXS può rispondere se NIENTE è noto

## 1) Informazioni su forma, dimensioni e conformazione

Dal **Kratky plot**:  $s$  vs  $s^2I(s)$

Grado di compattezza / flessibilità

Stato del Folding



# BioSAXS:

Domande a cui SAXS può rispondere se NIENTE è noto

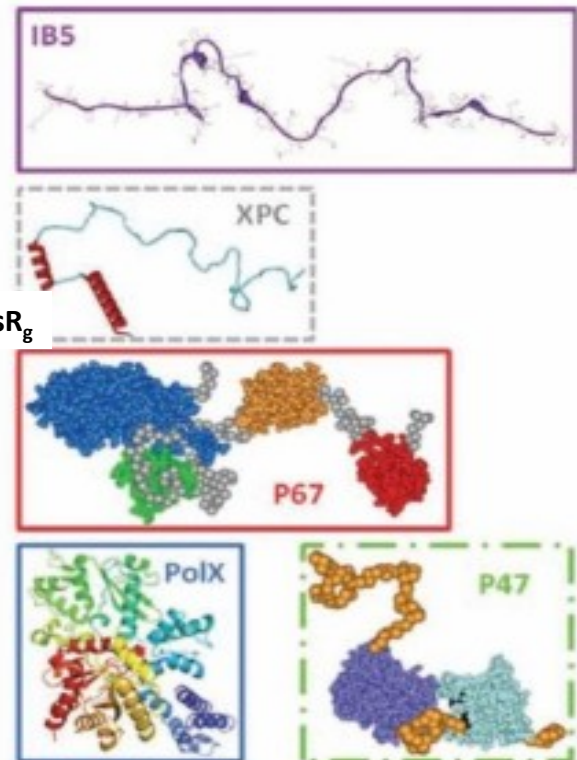
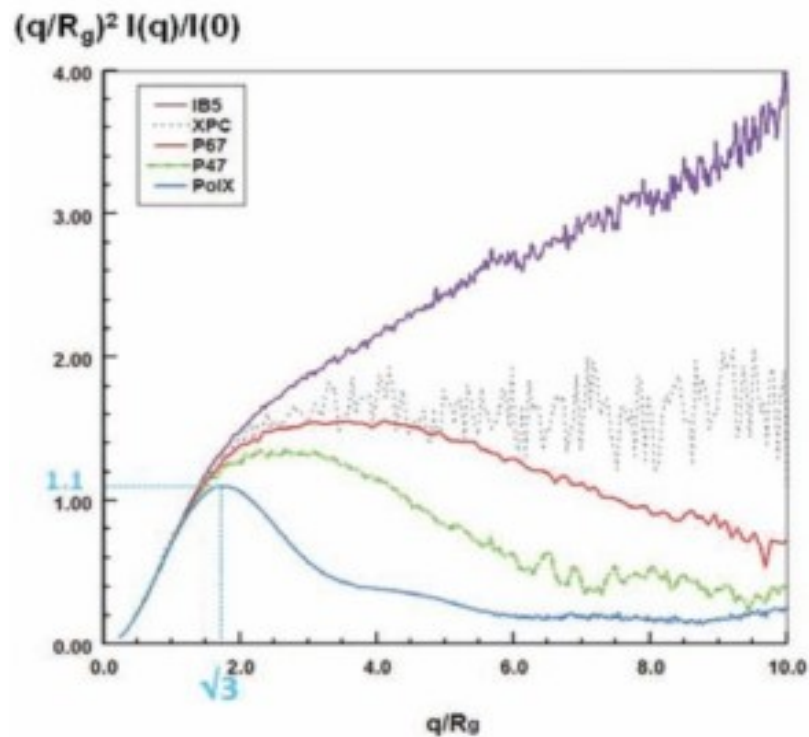
1) Informazioni su forma, dimensioni e conformazione

$$(sR_g)^2 \times I(s)/I(0)$$

dal Dimension-less Kratky plot :  $(sR_g)^2 \times I(s)/I(0)$

s Rg vs  $(s Rg)^2 I(s)/I(0)$

→normalizzare per massa e concentrazione



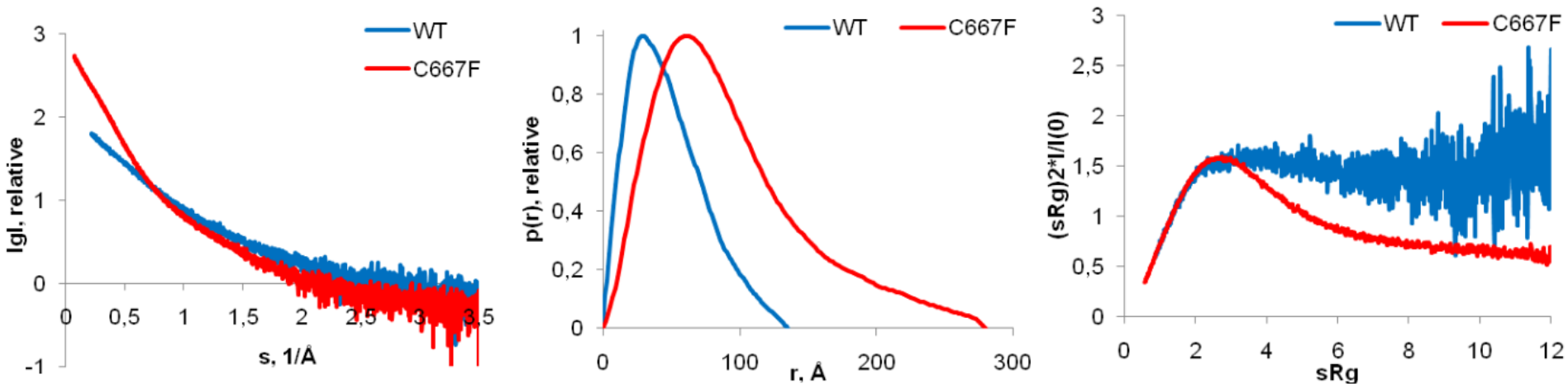
# BioSAXS:

Domande a cui SAXS può rispondere se NIENTE è noto:

Informazioni indipendenti dal modello:  
**Parametri strutturali**



Signorino G\*, Covaceuszach S\*, Bozzi M, Hübner W, Mönkemöller V, Konarev PV, Cassetta A, Brancaccio A, Sciandra F (2018) *Hum Mutat* 39(2):266-280



Oligomerization states of  $\beta$ -DG WT and C667F pathological mutant  
C667F missense mutation induces some degree of tertiary structures in  $\beta$ -DG.

# BioSAXS:

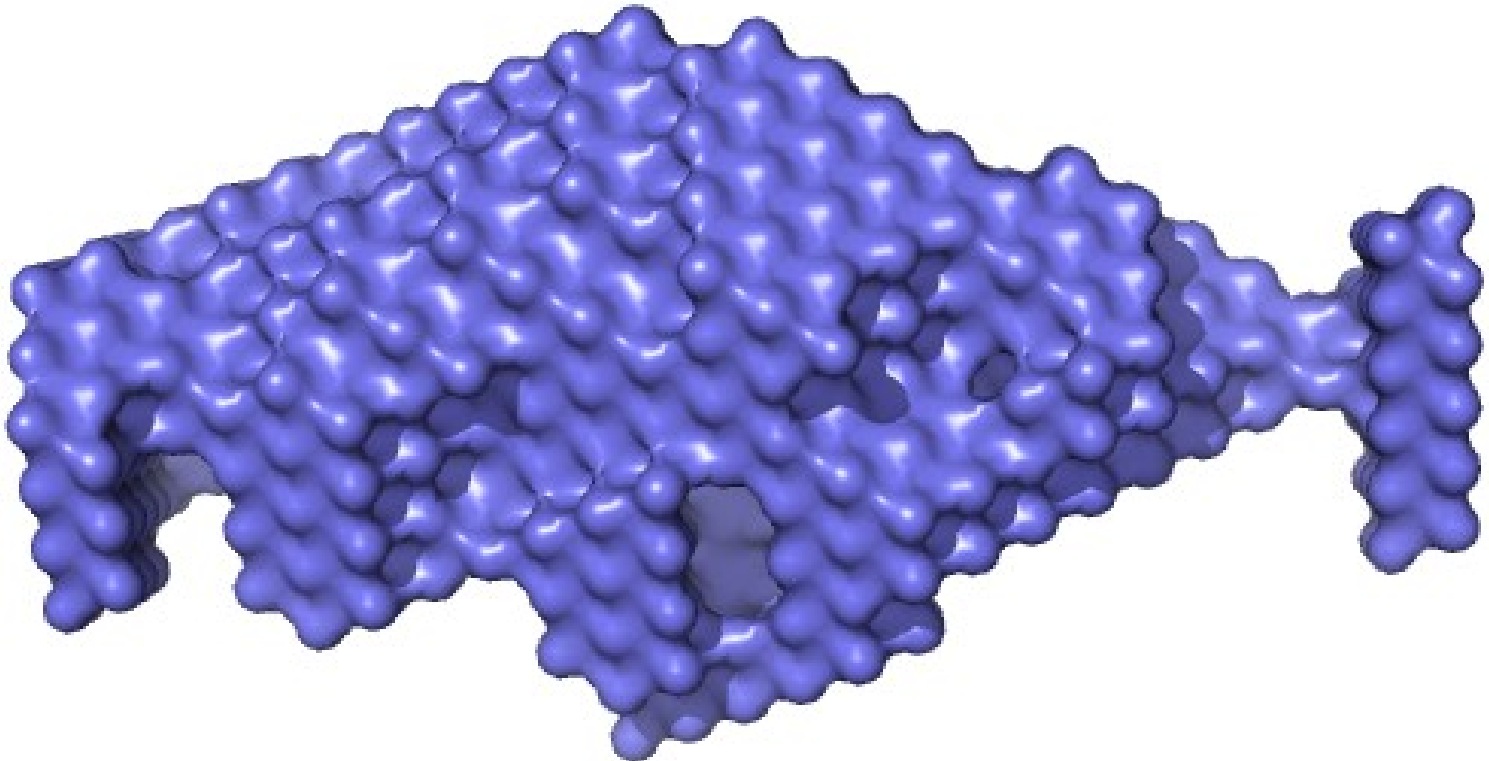
Domande a cui SAXS può rispondere se NIENTE è noto

## 2) Informazioni su forma e modelli ab-initio

### Bead Modelling:

**DAMMIN** (Svergun (1999) *Biophys J.* 76, 2879-2886)

**DAMMIF** (Franke & Svergun (2009) *J. Appl. Cryst.* 42, 342-346)

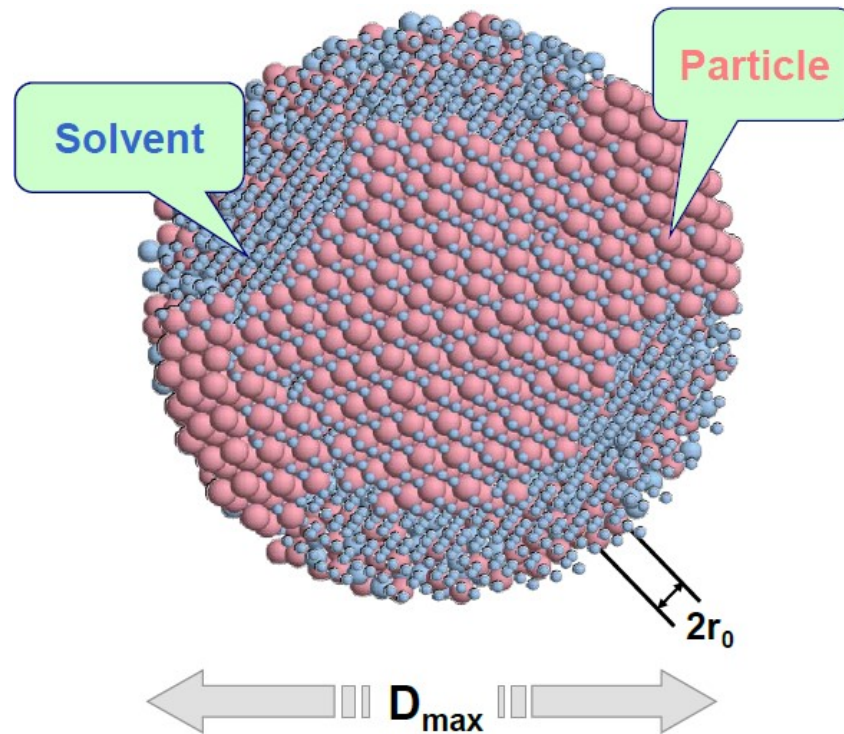


# BioSAXS:

Domande a cui SAXS può rispondere se NIENTE è noto

## 2) Informazioni su forma e modelli ab-initio

### Bead Modelling: DAMMIN



Target function

$$= \chi^2 [I_{exp}(s), I(X,s)] + \sum \alpha_i P_i(X)$$

Discrepanza dai  
dati sperimentali

Penalties per assicurare  
compattezza e connettività



# BioSAXS:

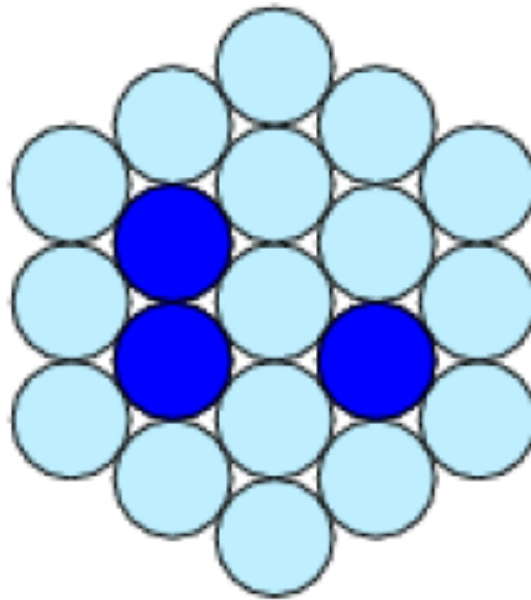
Domande a cui SAXS può rispondere se NIENTE è noto

## 2) Informazioni su forma e modelli ab-initio

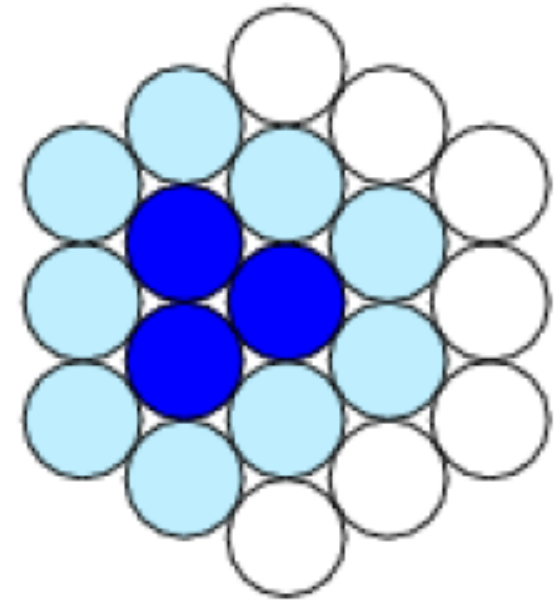
### Bead Modelling: DAMMIF

(25-40 volte più veloce)

### Single Phase Bead Models



DAMMIN



DAMMIF

# BioSAXS:

Domande a cui SAXS può rispondere se NIENTE è noto

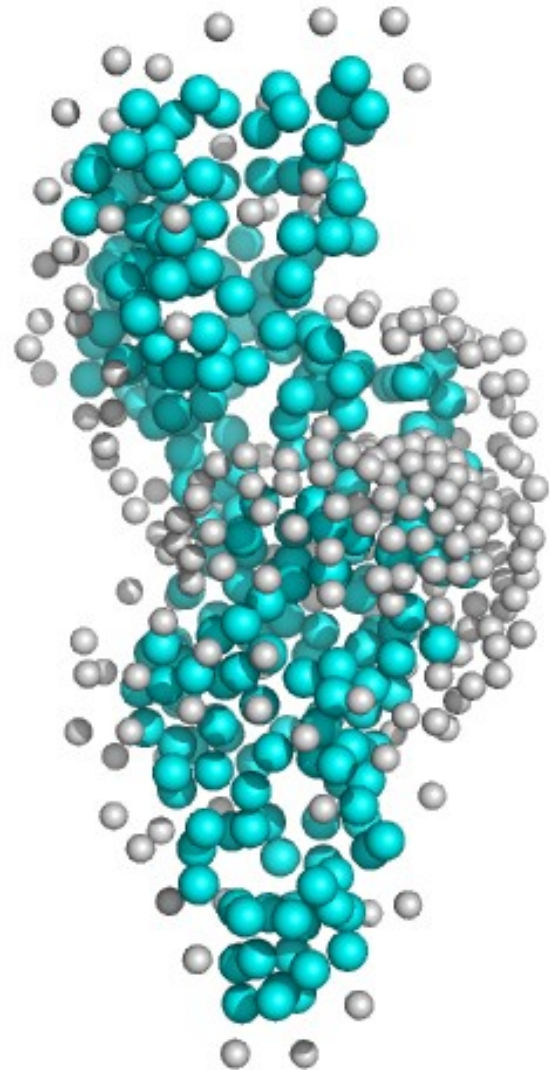
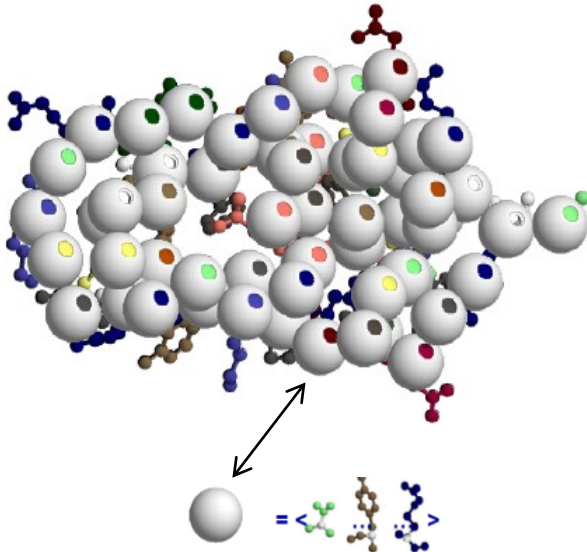
## 2) Informazioni su forma e modelli ab-initio

**Bead Modelling:**

**GASBOR** (Svergun et al. (2001) *Biophys J.* 80, 2946-2953)

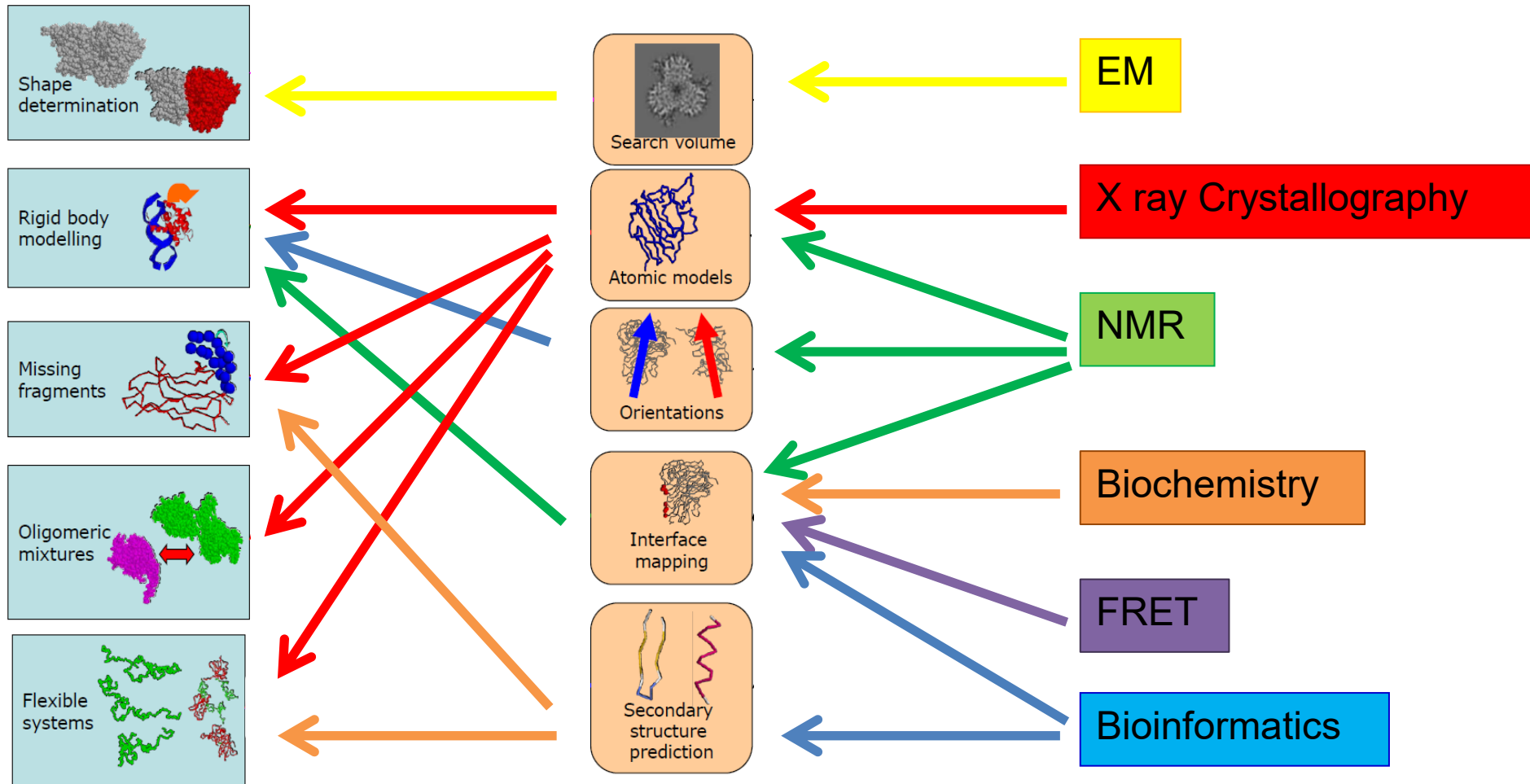
Applicabile per catene polipeptidiche fino a 5000aa

## 3) Caratterizzazione di sistemi polidispersi



# BioSAXS:

Domande a cui SAXS può rispondere se sono disponibili **informazioni strutturali ad alta risoluzione INCOMPLETE/COMPLETE**



# BioSAXS:

Domande a cui SAXS può rispondere se sono disponibili **informazioni strutturali ad alta risoluzione**  
**INCOMPLETE/COMPLETE**

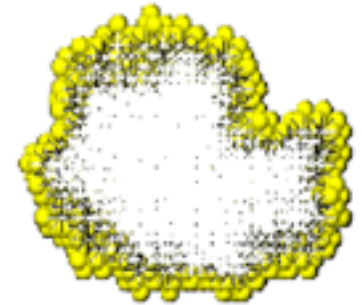
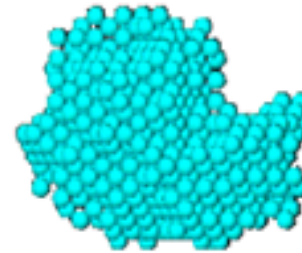
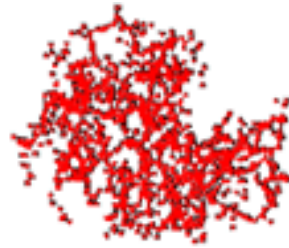
## 1) Validazione in soluzione di modelli cristallografici ad alta risoluzione /Identificazione di oligomeri biologicamente attivi

Intensità di Scattering :

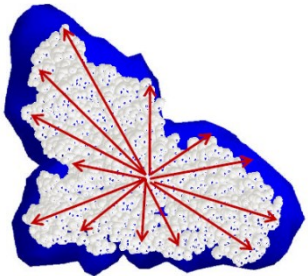
Scattering **Atomico in vacuo**

- Scattering dal **volume Escluso**

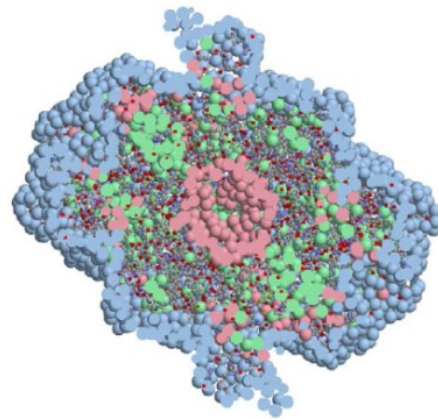
+ Scattering dalla **sfera di idratazione**



**CRYSOL:** (Svergun et al. (1995). J. Appl. Cryst.28, 768):



**CRYSOL 3.0:**  
per forme complesse

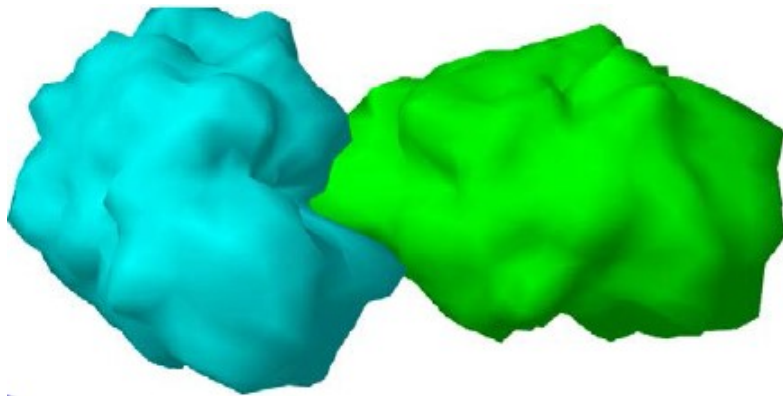


- Outer shell
- Internal shell
- Small cavities (excluded volume adjustment)

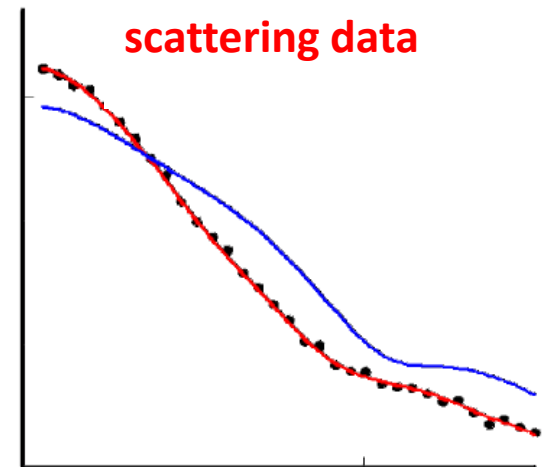
# BioSAXS:

Domande a cui SAXS può rispondere se sono disponibili **informazioni strutturali ad alta risoluzione INCOMPLETE/COMPLETE**

## 2) Strutture quaternarie mediante rigid body refinement



Trial and error



Ricerca non-lineare:

**SASREF:** (Petoukhov & Svergun (2005) *Biophys J.* 89, 1237; (2006) *Eur. Biophys. J.* 35, 567)

Per le glicoproteine, strumento integrato per la generazione di glicani

# BioSAXS:

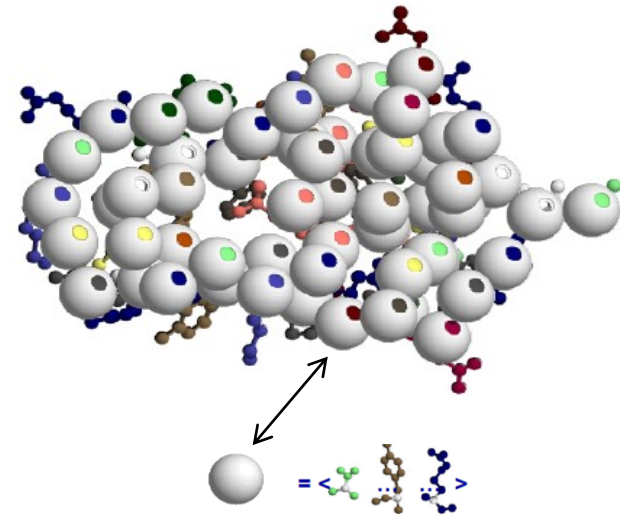
Domande a cui SAXS può rispondere se sono disponibili **informazioni strutturali ad alta risoluzione INCOMPLETE/COMPLETE**

## 3) Modelling di proteine multidominio / aggiunta di frammenti mancanti

probabile configurazione delle porzioni mancanti

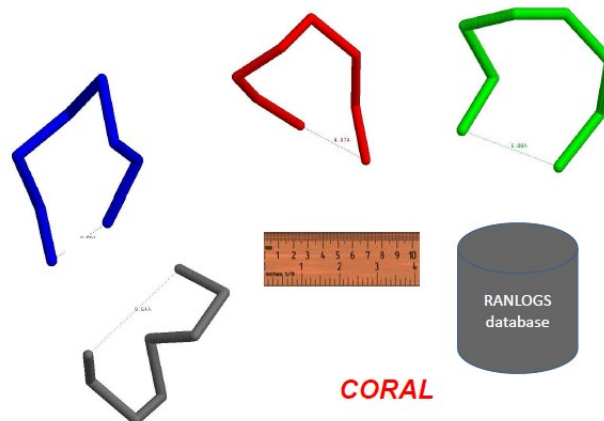
**BUNCH:** (Petoukhov & Svergun (2005) *Biophys J.* 89, 1237)

Può trattare solo una catena singola



**CORAL** (Complexes with RAndom Loops): (Petoukhov et al. (2012) *J. Appl. Cryst.* 45, 342-350)

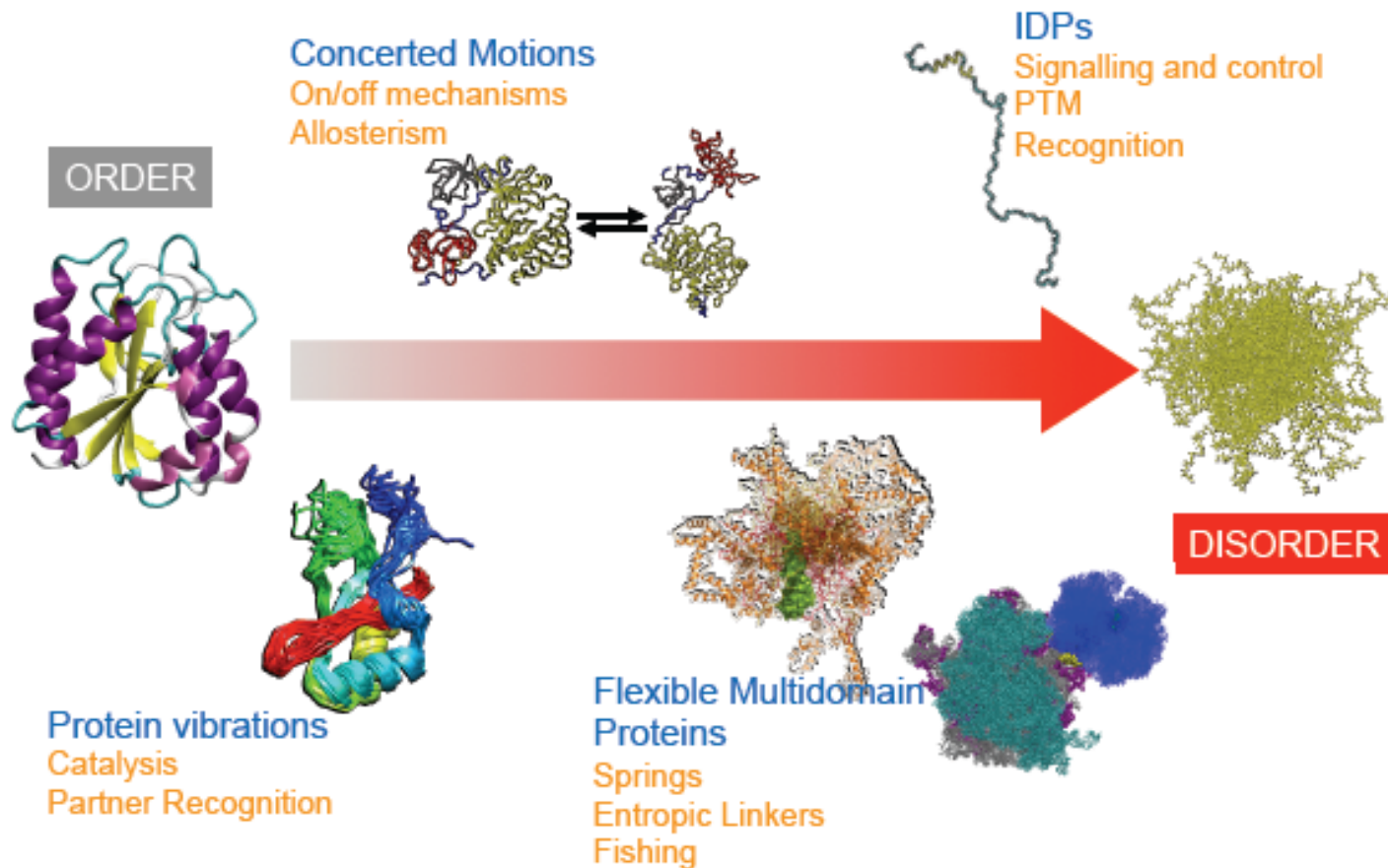
Combina SASREF (non ricostruisce regioni mancanti) e BUNCH (lavora su catene singole)



# BioSAXS:

## SISTEMI POLIDISPERSI

### 1) Polidispersione di forma



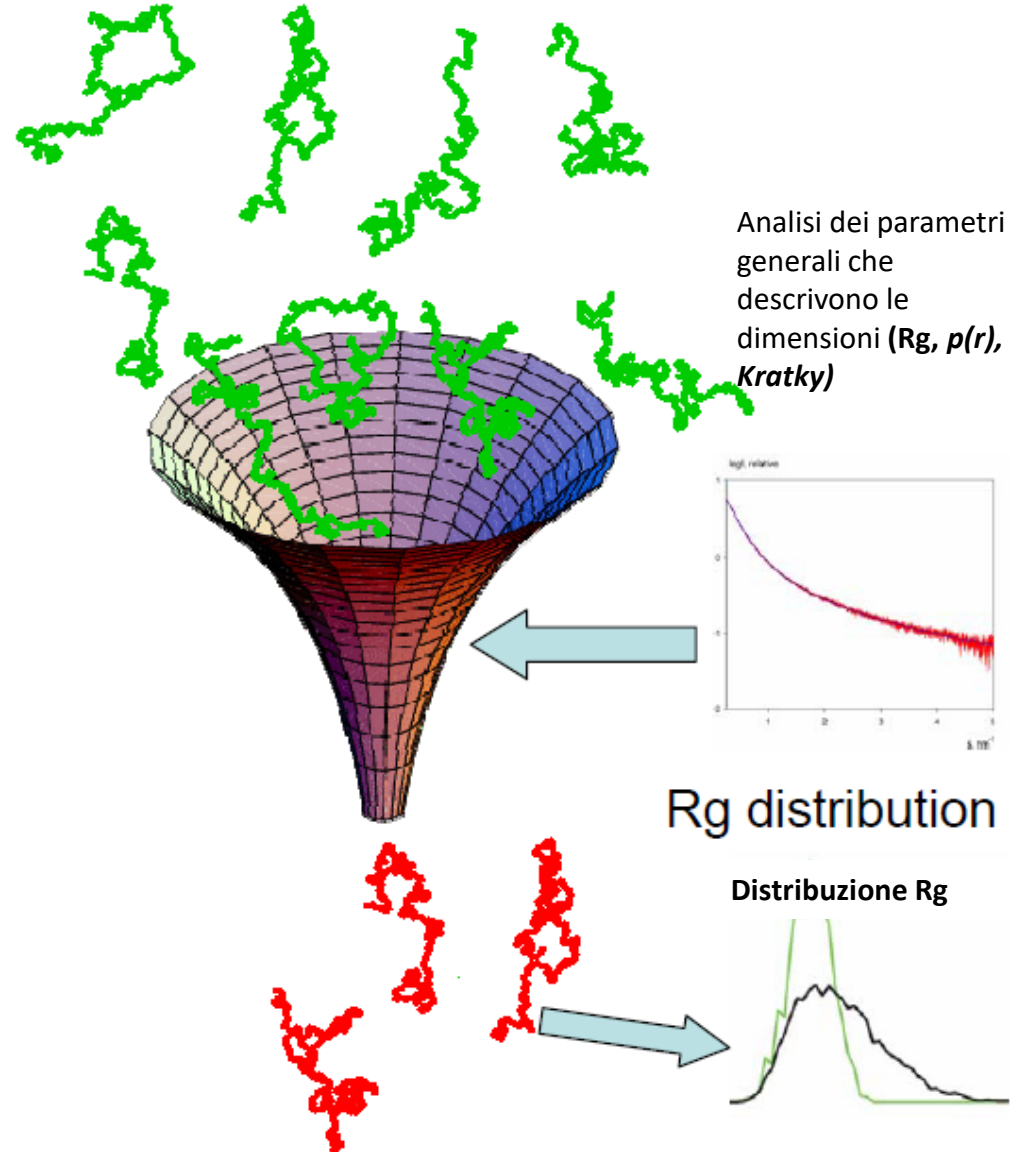
# BioSAXS:

## SISTEMI POLIDISPERSI

### 1) Polidispersione di forma

#### EOM (Ensemble optimization method):

(Tria et al. (2015) *IUCr* **2**, 207-217)





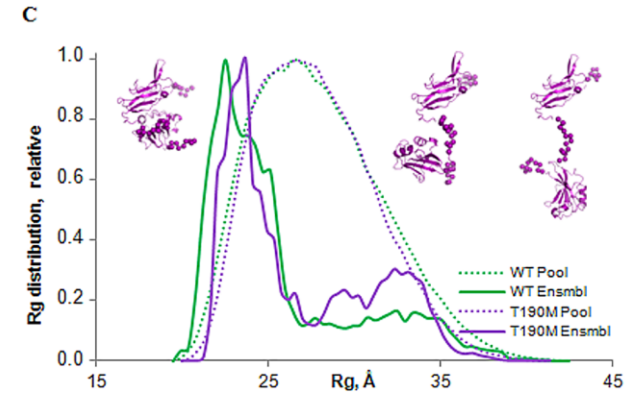
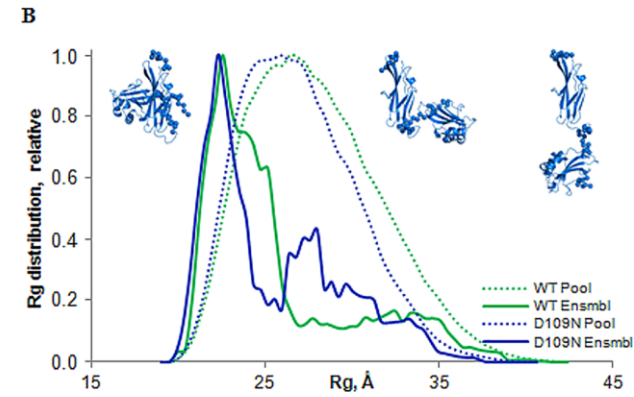
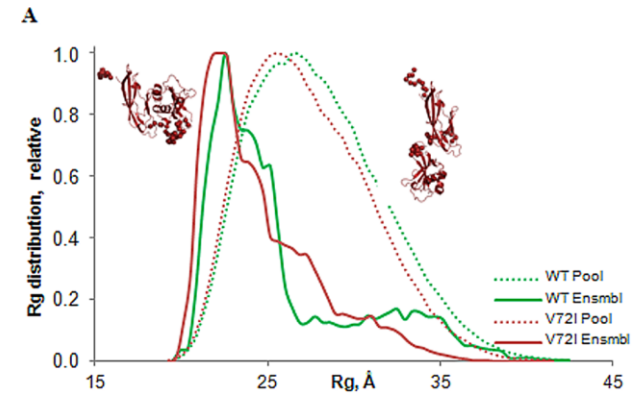
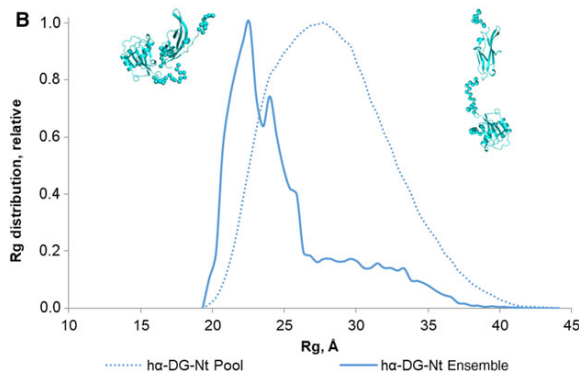
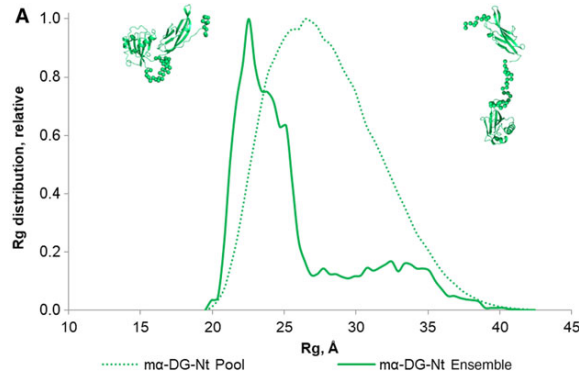
# BioSAXS:

## SISTEMI POLIDISPERSI

### 1) Polidispersione di forma

Covaceuszach S, Bozzi M, Bigotti MG, Sciandra F, Konarev PV, Brancaccio A, Cassetta A (2017)  
*PLoS One* 12(10):e0186110

Covaceuszach S, Bozzi M, Bigotti MG, Sciandra F, Konarev P, Brancaccio A, Cassetta A (2017)  
*FEBS Open Bio.* 17;7(8):1064



# BioSAXS:

## SISTEMI POLIDISPERSI

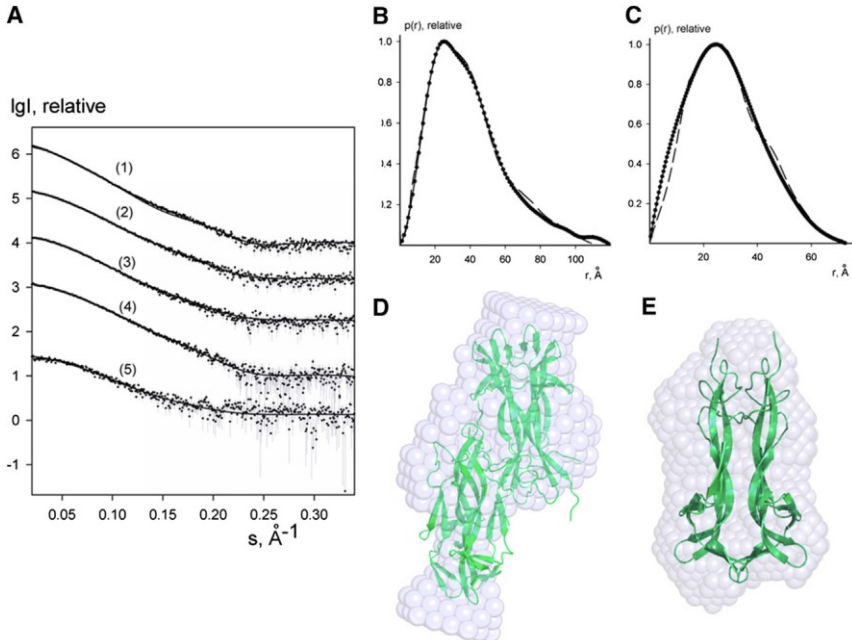
### 2) Polidispersione di dimensioni

Caratterizzazione quantitativa di assemblies/miscele

Miscele oligomeriche all'equilibrio

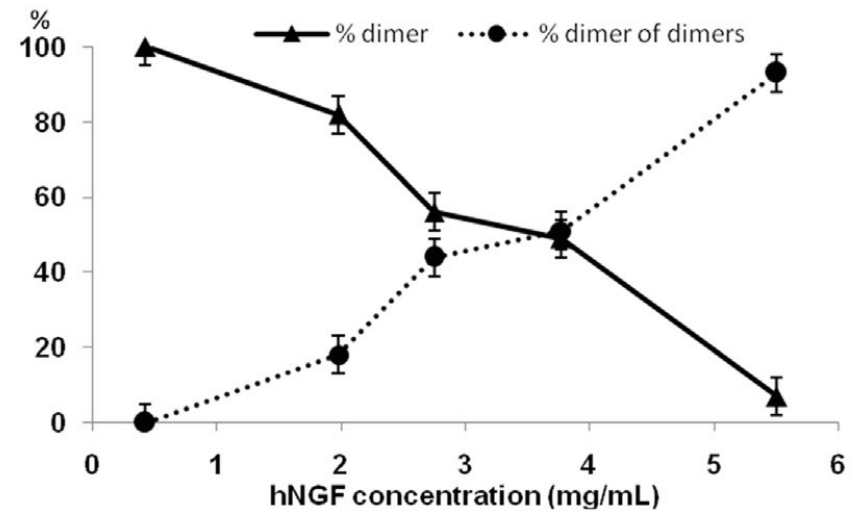
#### SVDPLOT

**OLIGOMER** (Konarev et al. (2003) *J. Appl. Cryst.* 36, 1277)



**Covaceuszach S, Konarev PV, Cassetta A, Paoletti F, Svergun D., Lamba D, Cattaneo A (2015)**

*Biophysical Journal* Volume 108 687–697



# BioSAXS:

## SISTEMI POLIDISPERSI

### 2) Polidispersione di dimensioni

Equilibri dinamici fra componenti liberi e in complesso (**complessi transienti a bassa affinità**):

- **Ab initio**

#### **GASBORMX**

(Petoukhov et al. (2013) *Biochemistry*, 52, 6844)

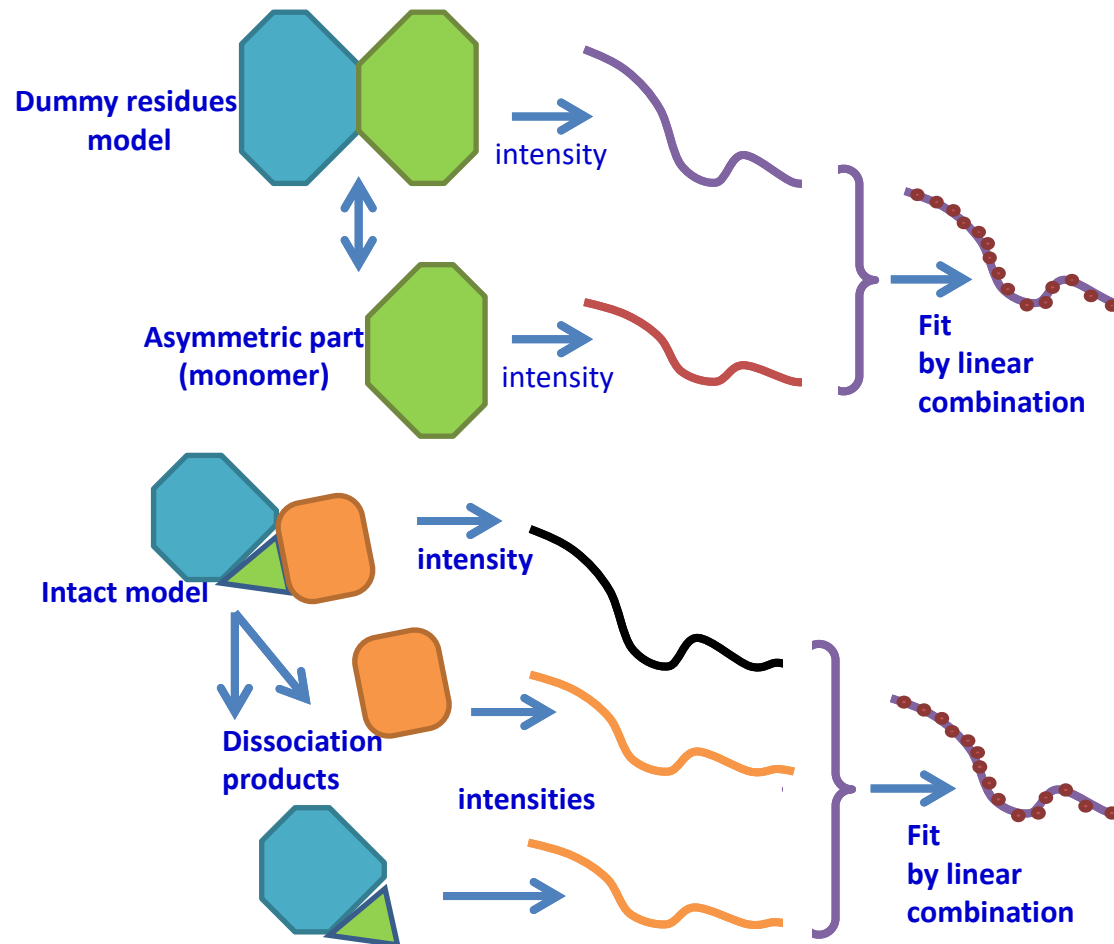
#### **DAMMIX**

(Konarev & Svergun. (2018) *IUCr Journal*, 5, 402)

- **Rigid body**

#### **SASREFMX (rigid body modelling)**

(Petoukhov et al. (2012) *J. Appl. Crystallogr.* 45,342)



# BioSAXS:

## Validazione dei dati sperimentali

### 1) Qualità del campione

### 2) Qualità dei dati

- Linearità del Guinier plot
- Confronto dei parametri
- Dipendenza dal tempo ( $R_g$  e  $I(0)$ )
- Dipendenza dalle []

# BioSAXS:

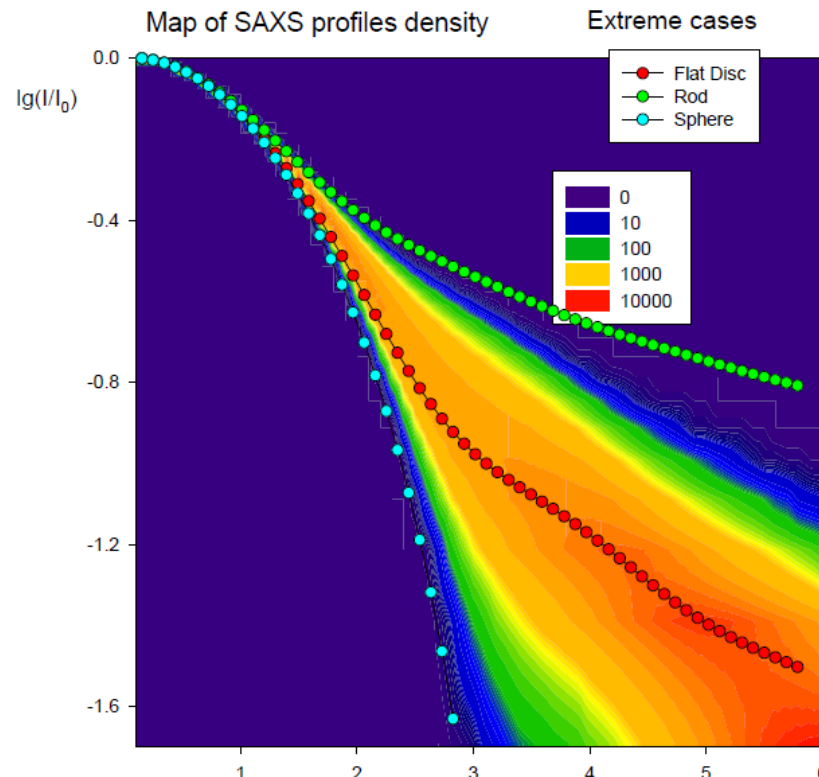
## Validazione del modello ab initio

ab initio modelling basato su dati unidimensionali è intrinsecamente ambiguo.

## Valutazione dell'ambiguità indipendente dal modello

**AMBIMETER** (Petoukhov et al. (2015). *Acta Cryst. D71*, 1051)

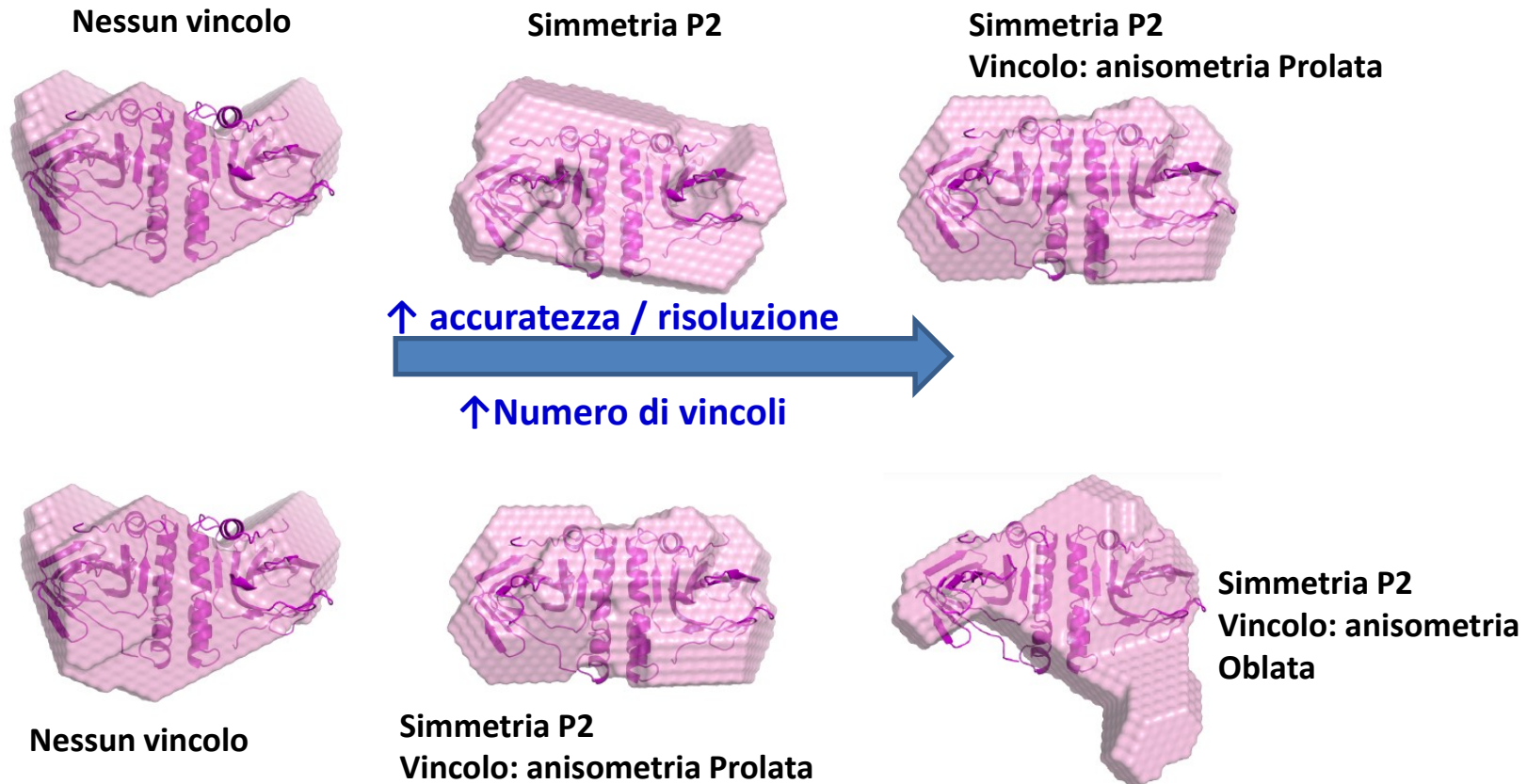
misura quantitativa dell'ambiguità associata a un profilo di scattering



# BioSAXS:

## Validazione del modello ab initio

ab initio modelling basato su dati unidimensionali è intrinsecamente ambiguo:



# BioSAXS:

## Validazione del modello ab initio

ab initio modelling basato su dati unidimensionali è intrinsecamente ambiguo:

In genere sono necessari da 10 a 20 runs indipendenti per ridurre l'ambiguità:

### Post processing: 1) Superimposition

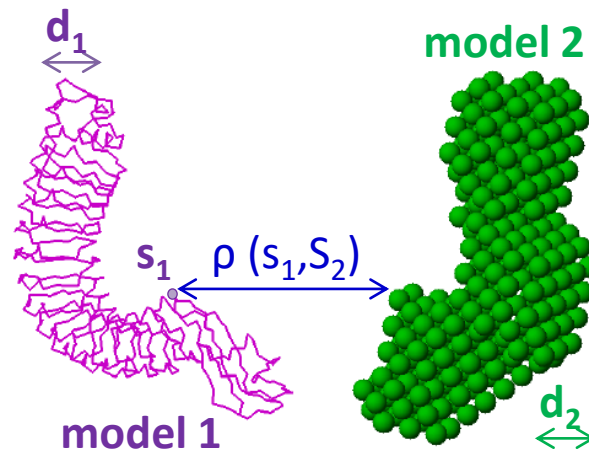
**SUPCOMB** (Kozin & Svergun (2000) J. Appl. Cryst.34, 33-41)

sovrappone strutture 3D

Per trovare il miglior allineamento di due modelli, rappresenta ciascuna struttura come un insieme di punti e minimizza una discrepanza spaziale normalizzata

$$\text{NSD}(S_1, S_2) = \left[ \frac{1}{2} \left( \frac{1}{N_1 d_2^2} \sum_{i=1}^{N_1} \rho^2(s_{1i}, S_2) + \frac{1}{N_2 d_1^2} \sum_{i=1}^{N_2} \rho^2(s_{2i}, S_1) \right) \right]^{1/2}$$

misura di somiglianza quantitativa tra insiemi di punti tridimensionali



# BioSAXS:

## Validazione del modello ab initio

### 2) Post processing: Averaging

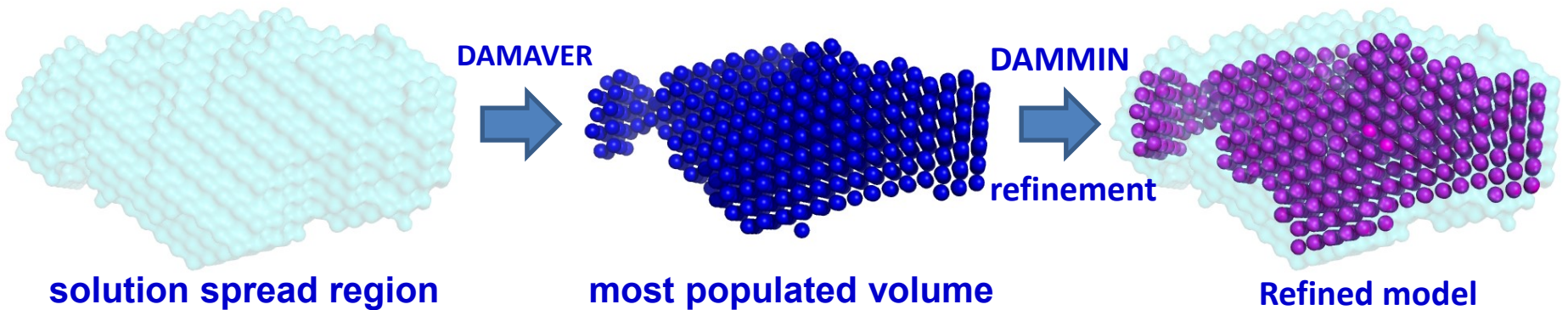
**DAMAVER** (Volkov & Svergun (2003) J. Appl. Cryst. 36, 860-864)

Sovrappone i modelli a coppie

Calcola le somiglianze tra i modelli: NSD < 1 per modelli simili

Media i modelli allineati

Ottiene la solution spread region





# BioSAXS:

## Validazione del modello ab initio

**DAMMIF**

**POSTPROCESSING:** **SUPCOMB**  
**DAMAVR**  
**SASRES**

**SASRES** (Tuukkanen et al. (2016) *IUCrJ.* 3, 440)

Valuta la risoluzione dei modelli *ab initio*.

## Validazione del modello da rigid body modelling

Analogamente va ripetuto più volte e seguito da un raggruppamento strutturale

# BioSAXS:

## APPLICAZIONI

