

Proff. Giuseppe Falini e Giorgio Sartor

Tecniche per lo studio della struttura delle macromolecole biologiche

Cristallografia a raggi X

Copyright © 2009 by Giuseppe Falini & Giorgio Sartor
All rights reserved.

B30 - Versione 1.0 - nov 2009

Tecniche per lo studio della struttura delle macromolecole biologiche

Cristallografia a raggi X

il problema e' ottenere il cristallo

Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR)

il problema e' la dimensione ($\leq 30-50$ kD)

Microscopia elettronica

e' limitata ai casi in cui si possano ottenere
cristalli bidimensionali molto grandi

Homology Modelling

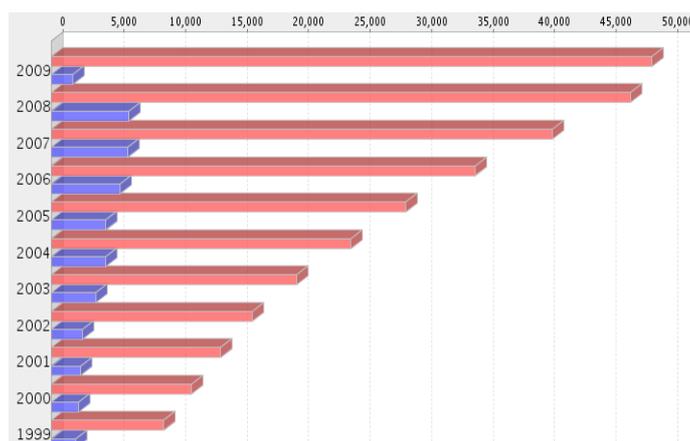
per proteine con $> 30-50\%$ identità

Strutture Depositare nel PDB

		Molecule Type				Total
		Proteins	Nucleic Acids	Protein/NA Complexes	Other	
Exp. Method	X-ray	45620	1137	2085	17	48859
	NMR	6801	845	144	7	7797
	Electron Microscopy	155	16	59	0	230
	Other	110	4	4	9	127
	Total	52686	2002	2292	33	57013

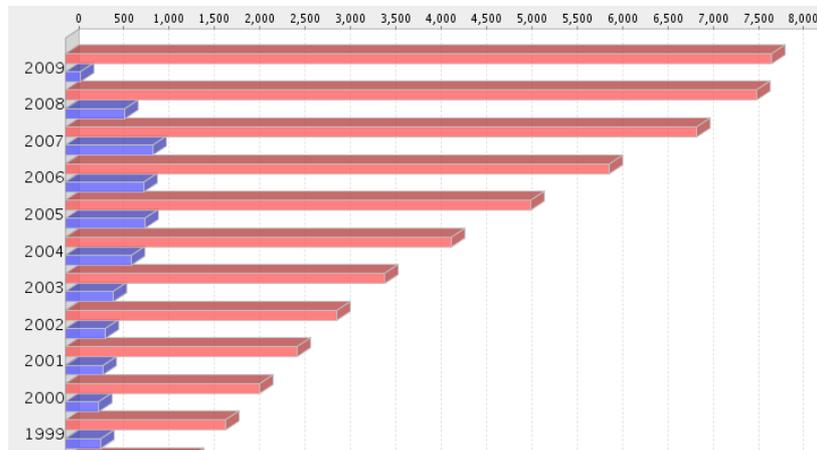
source: <http://www.pdb.org>

Crescita Annuale di Strutture Determinate Tramite XRD



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

Crescita Annuale di Strutture Determinate Tramite NMR



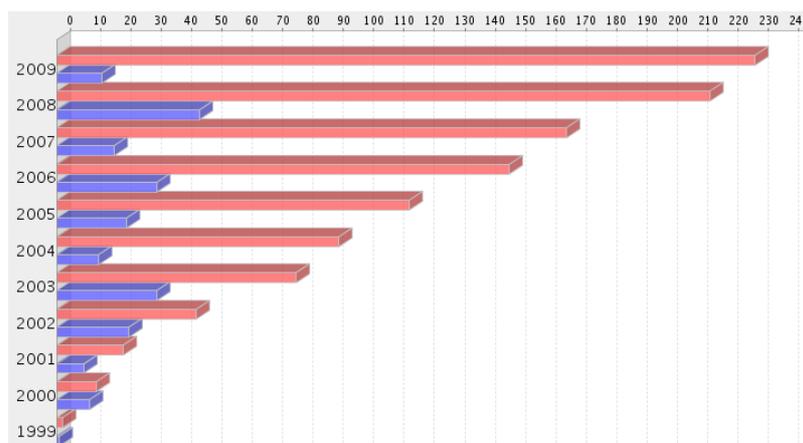
source: <http://www.pdb.org>

Prof. Giuseppe Falini

Cristallografia a raggi X

5

Crescita Annuale di Strutture Determinate Tramite EM



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

Prof. Giuseppe Falini

Cristallografia a raggi X

6

Cenni storici

- 1864 Viene cristallizzata l' emoglobina.
- 1912 Facendo attraversare dai raggi X un cristallo di solfuro di zinco Von Laue ottiene i primi diffrattogrammi. W.L. Bragg e W.H. Bragg propongono una correlazione semplice tra la figura di diffrazione ottenuta con i raggi X e la disposizione degli atomi nel cristallo che ha generato la figura (legge di Bragg).
- Anni '30 Bernal, Crowfoot, Bragg, ottengono i primi diffrattogrammi da cristalli di proteine (insulina, emoglobina, mioglobina).
- 1941 Atsbury ottiene il primo diffrattogramma ai raggi X del DNA.
- 1951 Pauling e Corey propongono la struttura di α -elica e foglietto β in base a considerazioni teoriche.
- 1953 Watson e Crick propongono la struttura a doppia elica del DNA sulla base delle analisi diffrattometriche ai raggi X di Franklin e Wilkins.
- 1954 Perutz e coll. elaborano i metodi basati sull' impiego dei metalli pesanti per risolvere il problema delle fasi nella cristallografia ai raggi X.
- 1960 Kendrew descrive la struttura della mioglobina a una risoluzione di 2 Å. Perutz propone la struttura della emoglobina, piú grande, ad una risoluzione inferiore.
- Anni '80 Hartmut Michel risolve la struttura (3 Å) della prima proteina di membrana (centro di reazione fotosintetico).
- 2000 Vengono risolte le strutture (3 Å) delle subunita' L e S del ribosoma (circa 1.5 e 1 MDa rispettivamente).

Che cos' è la cristallografia a raggi X

- Tecnica sperimentale che sfrutta il fatto che i raggi X sono diffratti dai cristalli.
- Dallo spettro di diffrazione dei raggi X dei cristalli, i cristallografi sono in grado di calcolare mappe di densità elettronica le quali, in pratica, sono immagini delle molecole che formano il cristallo ingrandite circa cento milioni di volte.
- Si esaminano le mappe di densità elettronica con la grafica computerizzata e se ne verifica l'accordo (fitting) con un modello molecolare.
- Dopo le fasi di affinamento si riesce ad ottenere un modello molecolare che ha un errore medio sulle coordinate di 0.3-0.5 Å che permette al ricercatore di esaminare molto dettagliatamente la struttura tridimensionale delle proteine.

Quale tipo di informazioni si ricavano dalla cristallografia di proteine

1. Determinazione di strutture non ancora note:

- È tuttora il principale obiettivo di questa tecnica ed è alla base di tutti gli studi che ne conseguono

2. Studi di meccanismi enzimatici:

- Gli enzimi possono essere cristallizzati in presenza di substrati, analoghi dei substrati o di prodotti di reazione, che consentono di identificare gruppi reattivi nel sito attivo nelle vicinanze del substrato.
- È possibile anche ricavare informazioni strutturali sugli stadi intermedi della reazione mediante co-cristallizzazione con analoghi dello stato di transizione, mediante arresto a metà della reazione enzimatica utilizzando basse temperature, mutanti inattivi, o spostando il pH, in grado di prevenire il completamento della reazione catalitica.
- Queste informazioni, combinate con dati biochimici e spettroscopici vengono utilizzate per postulare un meccanismo di reazione da verificare mediante, ad esempio, mutazioni di residui catalitici o sintetizzando e saggiando analoghi dello stato di transizione.

Quale tipo di informazioni si ricavano dalla cristallografia di proteine

3. Analisi delle interazioni enzima-ligando:

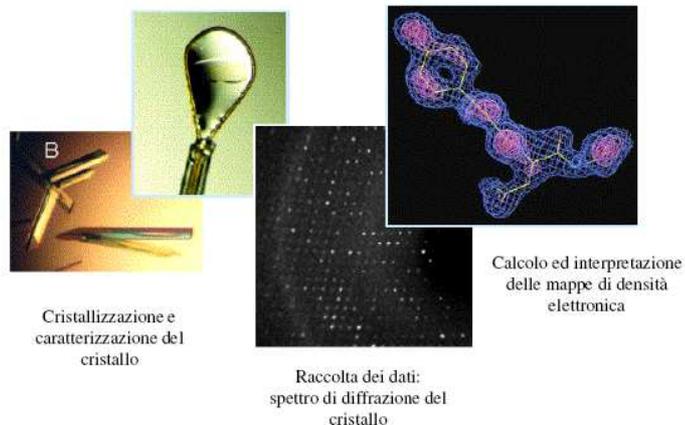
- Ligandi a basso peso molecolare come substrati, inibitori ed effettori spesso possono essere ospitati nella struttura cristallina senza provocare variazioni rilevanti nell'impacchettamento cristallino.
- Cristalli di complessi di proteine con altre macromolecole possono essere preparati per co-cristallizzazione.
- Le strutture cristalline di questi complessi mostrano in maniera molto dettagliata come la proteina interagisce con il, o i, suo(i) ligando(i) e, a differenza dei metodi che studiano il ligando isolato, mostrano la conformazione di legame biologicamente rilevante del ligando, fornendo così informazioni molto importanti, difficilmente ottenibili con altri metodi, ai fini della progettazione dei farmaci.

Quale tipo di informazioni si ricavano dalla cristallografia di proteine

4. Analisi di mobilità e variazioni conformazionali

- La cristallografia produce immagini statiche, ma una struttura cristallina rappresenta una media delle n molecole proteiche presenti nel cristallo, e la conformazione media di queste molecole nel tempo necessario per raccogliere uno spettro completo di diffrazione.
- Il movimento di molecole nel cristallo provoca elementi di perturbazione nella mappa di densità elettronica; in casi estremi ad esempio alcuni *loops* diventano totalmente invisibili nelle mappe di densità elettronica.
- I cristallografi devono non solo affinare le posizioni di ogni atomo nello spazio ma anche determinare un fattore che indica quanto ogni atomo si muove nel cristallo (*B factor*).
- Le regioni flessibili nel cristallo sono probabilmente flessibili in soluzione e spesso risultano importanti per la funzione biologica.

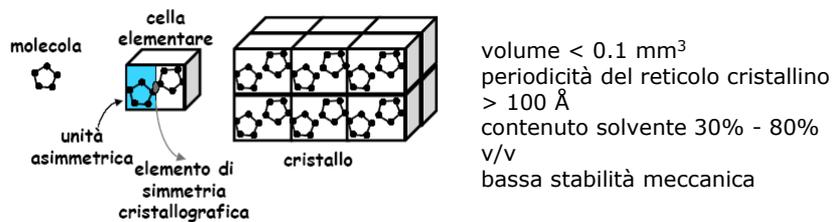
Key steps



Ottenere cristalli!!

Cristallizzazione: procedura empirica in cui si riduce lentamente la solubilità di una proteina: essa tende dunque a "precipitare" formando una struttura cristallina (non amorfa)

- interazioni intermolecolari di superficie
- purezza ed omogeneità del campione
- diminuzione della solubilità della proteina



Ottenere cristalli!!

Elemento fondamentale è la PROTEINA:

Requisito di assoluta importanza per il successo della cristallizzazione è una sufficiente quantità di proteina con "grado di cristallizzazione" puro.

Prima di iniziare è necessario controllare alcune cose basilari circa la proteina: È pura? La purezza della proteina è il più importante prerequisito per la sua cristallizzazione

È *folded* (ha la conformazione nativa)? Controllare l'attività della proteina

È "fresca"?

N.B. Quando le condizioni di cristallizzazione non sono note, sono necessari non meno di 100 mg di proteina per trovare le giuste condizioni per la cristallizzazione e per produrre cristalli.

N.B. Controllare sempre se qualcosa di simile alla proteina che volete cristallizzare sia già stato cristallizzato in precedenza!!

Individuare e ottimizzare le condizioni di cristallizzazione

Elevato numero di parametri variabili:

- pH
- Tampone
- Concentrazione della proteina
- Temperatura
- Precipitante
- ...

Sono stati messi a punto diversi "crystallization screens", che possono essere acquistati o preparati in laboratorio, che consentono di fare uno screening della proteina di interesse a diverse concentrazioni e "contro" diverse centinaia di condizioni di cristallizzazione.

Una volta individuate le condizioni di cristallizzazione queste devono essere ottimizzate per migliorare le dimensioni e la qualità dei cristalli.

Cristallizzazione attraverso 3 fasi

nucleazione (N):

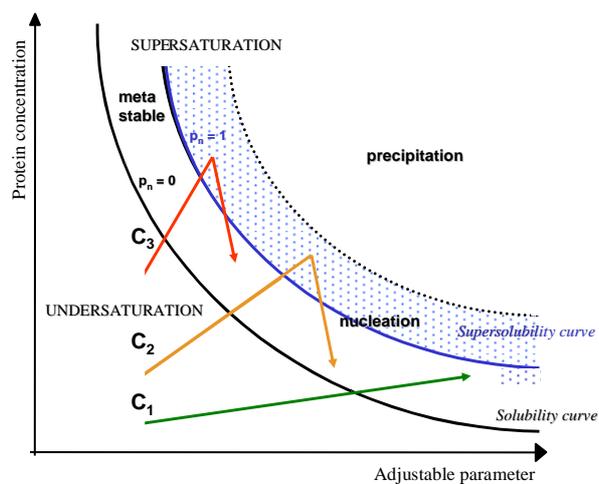
la soluzione è portata in condizione di supersaturazione

crescita (C):

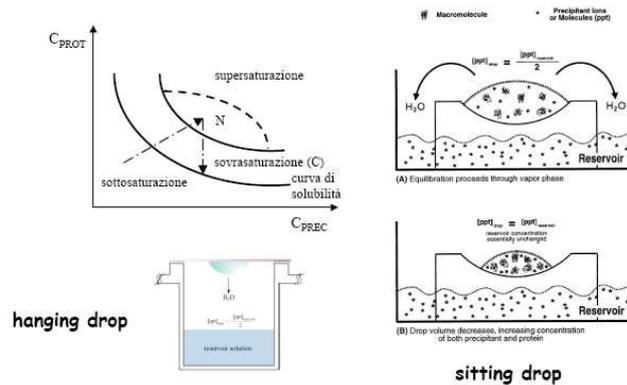
il grado di saturazione diminuisce (sovrasaturazione)

cessazione della crescita:

raggiungimento della curva di solubilità (equilibrio cristall-soluzione)

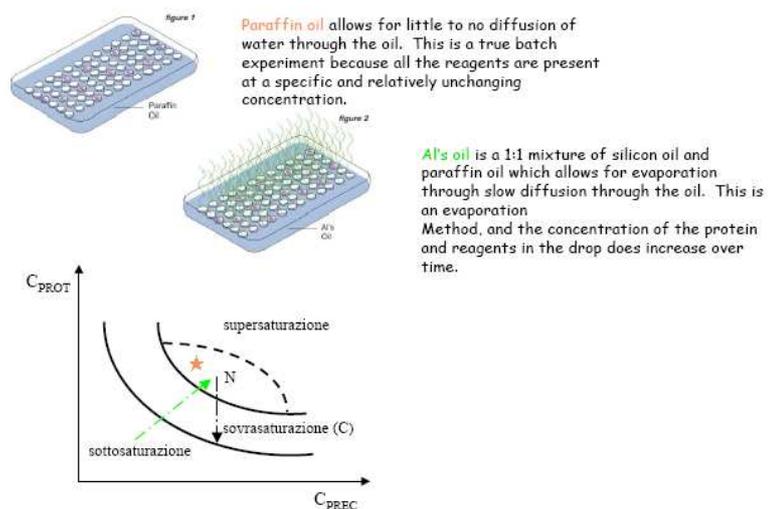


Metodo della Diffusione di vapore

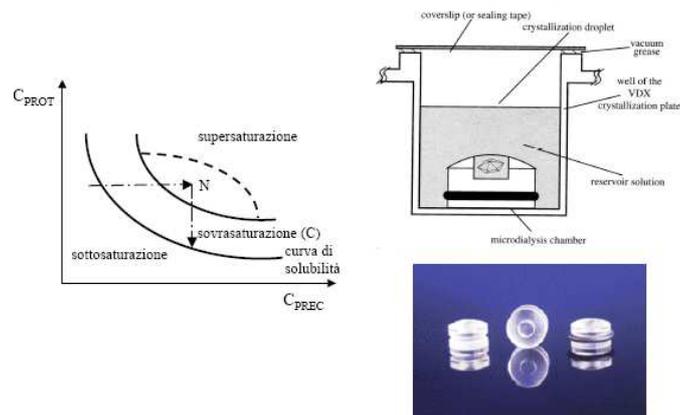


In generale: una goccia di una soluzione proteica contenente precipitante (circa 4-10 μ l) viene sospesa sopra un recipiente contenente una quantità maggiore (0,5-1 ml) di una soluzione più concentrata di precipitante e la goccia viene lasciata equilibrare con la soluzione contenuta nel recipiente. L'acqua evaporando passa dalla goccia di proteina, meno concentrata, alla soluzione contenuta nel recipiente, più concentrata, causando una contrazione della goccia.

Metodo micro-batch



Metodo della Dialisi



Prof. Giuseppe Falini

Cristallografia a raggi X

19

Preparazione di cristalli di complessi proteina-ligando

1) Soaking: consiste nell'immergere i cristalli della proteina nativa in una soluzione madre contenente l'inibitore. I cristalli di proteina contengono di solito canali di solvente sufficientemente larghi da permettere all'inibitore di diffondere all'interno dei cristalli

Vantaggi:

è relativamente rapida richiede piccole quantità di composto non causa variazioni nelle condizioni di cristallizzazione

Svantaggi:

il ligando deve essere un molecola relativamente piccola possibili cambiamenti conformazionali indotti dal *binding* del ligando potrebbero essere impediti dall'impacchettamento cristallino e passare quindi inosservati

il reticolo cristallino potrebbe essere incompatibile con il binding del ligando, provocando rottura e/o dissoluzione dei cristalli a seguito di impregnazione, oppure non legare affatto il ligando.

Prof. Giuseppe Falini

Cristallografia a raggi X

20

2) Co-cristallizzazione:

il complesso si forma in soluzione aggiungendo il ligando (conc \gg 1mM) alla soluzione della proteina e successivamente il complesso viene cristallizzato

Vantaggi:

- Si possono ottenere cristalli del complesso per ligandi ad alto peso molecolare
- eventuali variazioni conformazionali indotte dal ligando non sono ostacolate e si evidenzieranno nella struttura cristallina, poiché il complesso si forma in soluzione
- la qualità di diffrazione dei cristalli non è compromessa dalla procedura di soaking

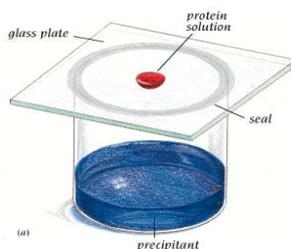
Svantaggi:

A volte le condizioni di cristallizzazione sono leggermente diverse o perfino completamente diverse dalle condizioni di cristallizzazione dei composti puri (proteina, ligando), costringendo a ricominciare daccapo la ricerca delle condizioni di cristallizzazione

La co-cristallizzazione dei complessi impiega da alcune settimane ad alcuni mesi e non tutti i ligandi sono stabili per tempi così lunghi

In generale

- Proteina pura $>$ 97% e in grande quantità.
- Lenta precipitazione da una soluzione sovrasatura \rightarrow metodo *hanging drop*.
- Giocano un ruolo molti parametri critici: pH, temperatura, concentrazione della proteina, natura del solvente e del precipitante, ligandi della proteina, etc.
- Alcuni cristalli non diffrangono affatto o troppo poco (disordine intrinseco), altri sono troppo piccoli o troppo fragili.



Set up trials

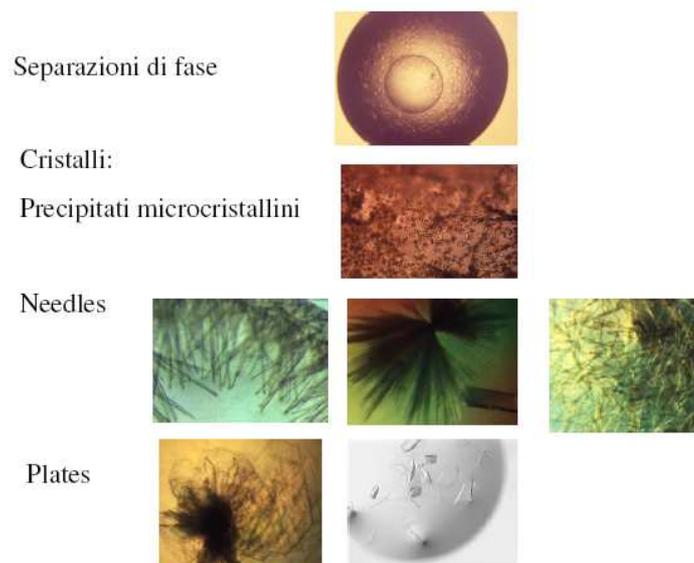
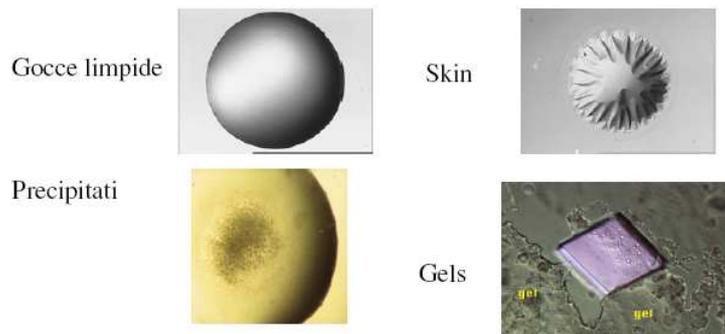
...just remember:

A watched crystal never grows
Crystallographer's fortune cookie



dopo aver lasciato il tempo ai cristalli di crescere si osservano le gocce al microscopio

sono diversi i fenomeni che si possono osservare:



If you see a crystal:



don't go running down the corridor screaming "URRA!!!" until...

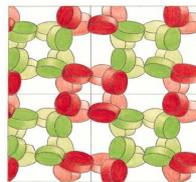


you know your crystal isn't salt...

and that it diffracts

Raccolta dei dati

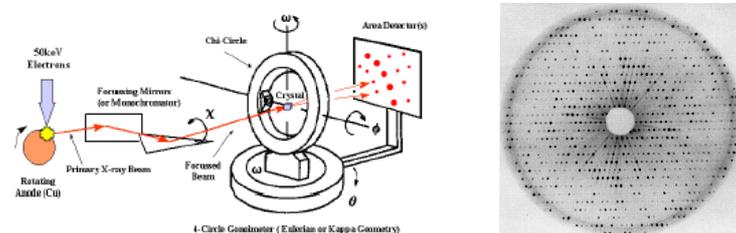
I cristalli proteici contengono mediamente il 50% di solvente e se esposti all'aria possono essicarsi e disintegrarsi completamente



Impaccamento della glicolato ossidasi

I cristalli di proteine vengono per ciò montati in capillari ermeticamente chiusi, contenenti un piccolo volume di liquido madre in modo da mantenerli alla stessa umidità che si ha durante la cristallizzazione.

I cristalli proteici normalmente sono non più grandi di 0.3-0.5 mm e il diametro del fascio di radiazioni viene selezionato in modo da eguagliare le dimensioni del cristallo, minimizzando così la dispersione di fondo. Il cristallo viene ruotato lentamente in modo da portare tutti i riflessi nelle condizioni di diffrazione.



Il generatore di raggi X produce un potente fascio di radiazioni. Il monocromatore seleziona raggi X di singola lunghezza d'onda (1.54 \AA per bersagli di Cu) e il collimatore limita il diametro del fascio a 0.3-0.5 mm. Il fascio di radiazioni colpisce il cristallo e alcuni dei raggi X incidenti sono diffratti dal cristallo. Buona parte del fascio di raggi X attraversa il cristallo e viene arrestata da una piastra di piombo. I raggi X diffratti sono registrati mediante un rivelatore ad area, *imaging plate*. Questi rivelatori sono in grado di raccogliere routinariamente serie di dati di diffrazione ai raggi X di alta qualità da cristalli singoli in 1-5 giorni. Le immagini di diffrazione prodotte da questi rivelatori vengono analizzate direttamente dal computer che fornisce una lista delle intensità dei riflessi. In funzione della qualità del cristallo e della grandezza della cella elementare, vengono registrate da diecimila a diverse centinaia di migliaia di riflessi per cristallo.

Oggi l'utilizzo del **Sincrotrone** come generatore di intensi fasci di raggi X monocromatici ed a lunghezza d'onda variabile ha portato notevoli vantaggi:



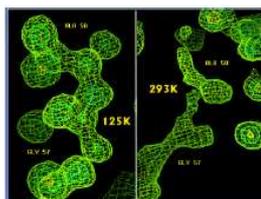
Il tempo di raccolta dei dati si è ridotto da 1-5 giorni a 1-3 ore. La qualità dei dati è notevolmente migliorata.

Introduzione di una nuova tecnica di preparazione dei cristalli per l'esposizione ai raggi X che ha molti vantaggi, primo fra tutti l'eliminazione di tutti i "radiation damage".



Flash cooling protein crystals to cryogenic temperature ($\approx 100 \text{ K}$)

Riduzione del disordine a bassa temperatura



La microscopia ottica e la cristallografia a raggi X si fondano sullo stesso principio di base

Il microscopio ottico consente di studiare molto dettagliatamente oggetti di piccole dimensioni, come insetti o preparati cellulari, ma non riesce a risolvere dettagli più piccoli della metà della lunghezza d'onda utilizzata. (es. luce blu \approx 200 nm).

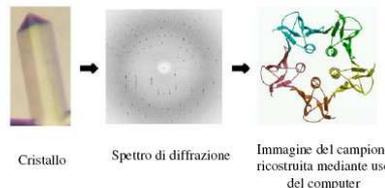
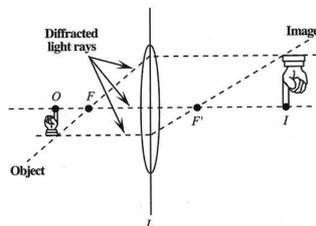
Per risolvere dettagli atomici, che sono dell'ordine di 1-5 Å (0.1-0.5 nm), è necessaria una radiazione elettromagnetica con una lunghezza d'onda molto più bassa delle radiazioni visibili: **i raggi X**.

Un microscopio ottico ed un dispositivo a raggi X si fondano sugli stessi principi di base, sebbene le applicazioni pratiche siano del tutto differenti, date le differenti proprietà dei raggi X e della luce visibile.

In un microscopio, la luce proveniente da una sorgente luminosa irradia l'oggetto e viene diffusa in tutte le direzioni. Per generare dalla luce diffusa (cioè dalle onde della luce riflesse dall'oggetto) un'immagine allargata dell'oggetto originale, viene impiegata una serie di lenti.

In un esperimento coi raggi X, un fascio di raggi X proveniente da una sorgente colpisce il cristallo e i raggi vengono diffusi in tutte le direzioni, proprio come succede con la luce di un microscopio ottico.

Tuttavia, fino ad oggi non vi sono lenti in grado di focalizzare i raggi X diffusi per ricostruire un'immagine allargata del campione. Ciò che il cristallografo può fare è registrare direttamente i raggi X diffusi (lo spettro di diffrazione del cristallo) e ricostruire un'immagine allargata del campione mediante uso del computer.



I raggi X sono diffusi dagli elettroni

Sebbene i raggi X interagiscano solo debolmente con la materia, essi sono occasionalmente assorbiti dagli elettroni, che cominciano ad oscillare. Questi elettroni oscillanti funzionano a loro volta come sorgenti di raggi X che possono inviare fotoni di raggi X in ogni direzione. I fotoni di radiazioni X, diffusi da differenti parti del cristallo devono sommarsi costruttivamente per produrre un'intensità misurabile.

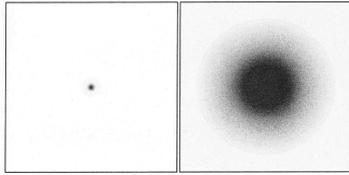


Figure 2.7 Sphere (cross-section, on left) and its diffraction pattern (right). Images for Figures 2.7-2.10 were generously provided by Dr. Kevin Cowtan.

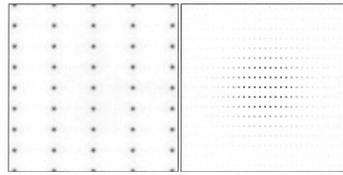
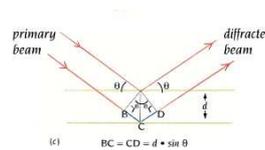
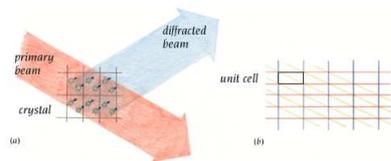


Figure 2.8 Lattice of spheres (left) and its diffraction pattern (right). If you look at the pattern and blur your eyes, you will see the diffraction pattern of a sphere. The pattern is that of the average sphere in the real lattice, but it is sampled at the reciprocal lattice points.

La condizione sotto cui i raggi diffusi si sommano costruttivamente è dettata dalla legge di Bragg; che tratta i cristalli come famiglie di piani paralleli (piani reticolari).



© 1999 GARLAND PUBLISHING INC.
A member of the Taylor & Francis Group

I raggi X sono riflessi da serie di piani paralleli, separati da una distanza d , che formano il cristallo

La diffrazione è osservata soltanto nelle seguenti condizioni:

- l'angolo formato dal raggio incidente con i piani paralleli è identico all'angolo del raggio riflesso con gli stessi piani. Quest'angolo è indicato con θ .
- la differenza di cammino per i raggi riflessi dai piani successivi (cammino ABC in figura) deve essere uguale ad un numero intero di lunghezze d'onda ($AB+BC=n\lambda$), in modo che i differenti raggi rimangano in concordanza di fase.
- Quindi le condizioni per cui si ha interferenza costruttiva del raggio per l'angolo θ sono:

$$n\lambda = 2d \sin\theta \text{ (legge di Bragg)}$$

Quando i raggi X diffratti da famiglie di piani reticolari di diverse celle elementari diffondono in concordanza di fase, si ha uno diffrattogramma caratteristico di macchie di diffrazione

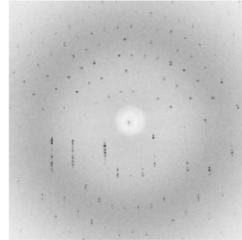
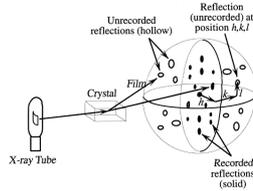


Figure 2.11 Crystallographic data collection, showing reflections measured at one particular crystal orientation (solid, on film) and those that could be measured at other orientations (hollow, within the sphere but not on the film). The relationship between measured and unmeasured reflections is more complex than shown here (see Chapter 4).

Ciascuna macchia di diffrazione è causata dalla riflessione dei raggi X da parte di una particolare serie di piani nel cristallo. Se il cristallo contiene strati di atomi aventi spaziatura ed orientamento identici in modo da formare una famiglia di piani reticolari, la macchia di diffrazione corrispondente risulterà intensa.

La struttura complessa presente nel cristallo è trasformata mediante il processo di diffrazione in una serie di macchie di diffrazione corrispondenti a serie di piani (più precisamente onde sinusoidali di densità).

Questa conversione di una funzione complessa in una serie di funzioni più semplici è

chiamata **trasformata di Fourier**.

Serie di Fourier

$$f(x) = \sum_{n=0}^m F_n \cos 2\pi(nx + \alpha_n)$$

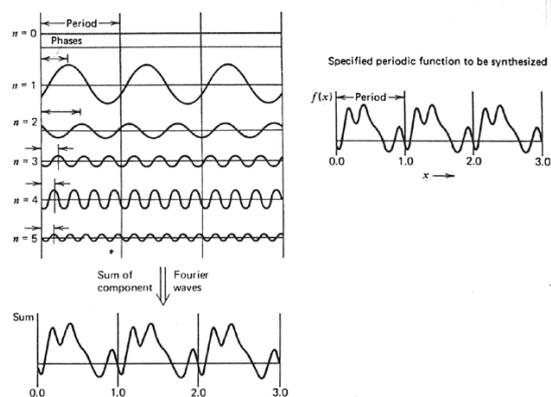
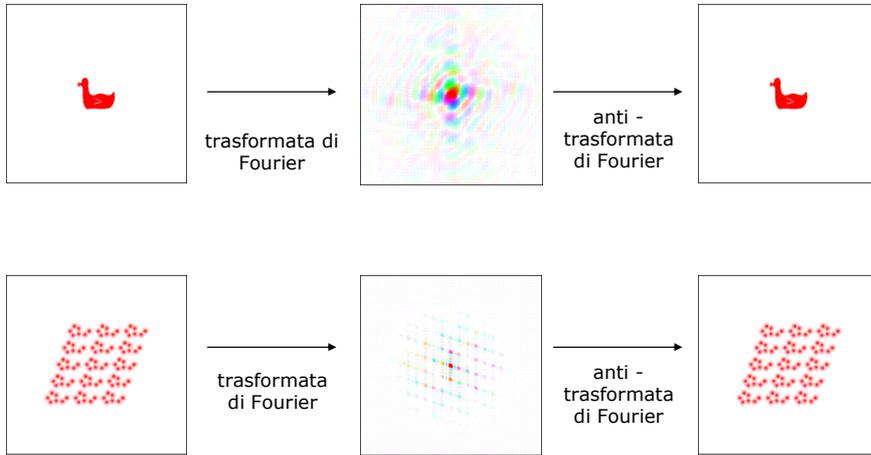


FIGURE 22-4. Fourier synthesis of a given periodic function (upper right), from a sum of the waves whose periods are $(1/n)$ of the period of the original function, $n = 0, 1, 2, \dots$ [From J. Waser, *J. Chem. Educ.* 45, 446 (1968).]

Diffrazione e trasformate di Fourier

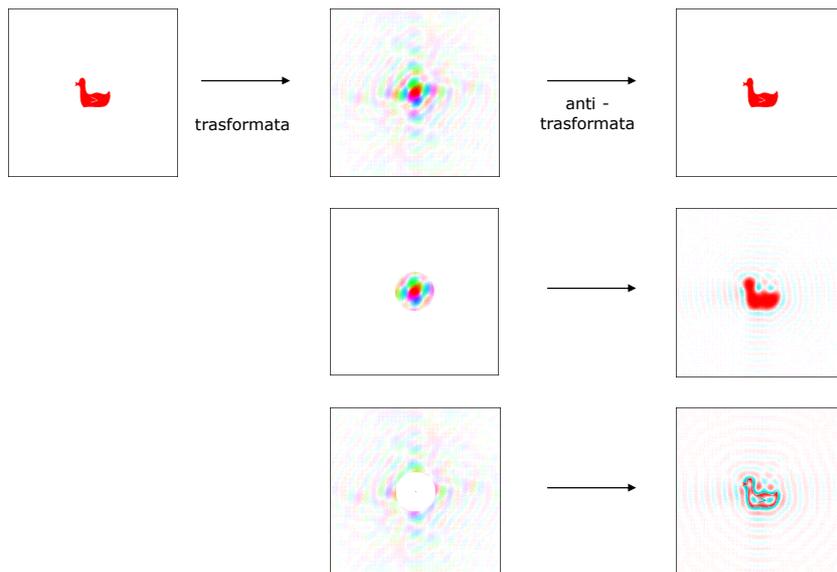


Prof. Giuseppe Falini

Cristallografia a raggi X

35

Riflessioni a bassa ed alta risoluzione



Prof. Giuseppe Falini

Cristallografia a raggi X

36

Mappe di densità elettronica

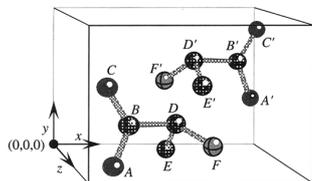


Figure 2.15 Every atom contributes to every reflection in the diffraction pattern, as described for this unit cell by Eq. (2.3).

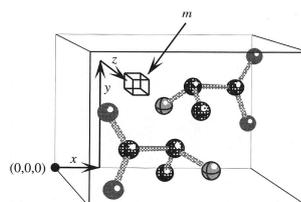
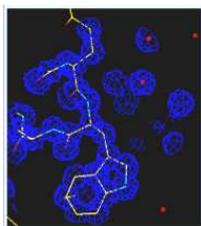


Figure 2.16 Small volume element m within the unit cell, one of many elements formed by subdividing the unit cell with planes parallel to the cell edges. The average electron density within m is $\rho_m(x,y,z)$. Every volume element contributes to every reflection in the diffraction pattern, as described by Eq. (2.4).

Problema delle fasi

La funzione originale, nel nostro caso la distribuzione di densità elettronica nel cristallo, può essere rigenerata dal computer eseguendo l'antitrasformata di Fourier, cioè sommando le corrispondenti onde di intensità per tutti i riflessi.

Comunque per operare questa addizione è necessario conoscere non solo l'ampiezza dell'onda diffusa ma anche la sua posizione relativa rispetto alle altre onde di densità (la fase).

L'ampiezza può essere misurata, perché calcolata dall'intensità della corrispondente macchia di diffrazione, ma non vi è attualmente alcun mezzo per misurare le fasi.

$$f(x) = \sum_{n=0}^m F_n \cos 2\pi(nx + \alpha_n)$$

Metodi per ottenere le fasi

Direct Methods

Solo per piccole proteine con dati ad elevata risoluzione

Multiple Isomorphous Replacement

Sono necessari due o più derivati di metalli pesanti, che abbiano la stessa struttura.

Multiwavelength Anomalous Diffraction

A rendere possibile questo modo di ottenere le fasi sono stati alcuni sviluppi recenti: luce di sincrotrone (lunghezza d'onda variabile), criocristallografia, e la produzione di proteine contenenti selenocisteina.

Molecular Replacement

Come modelli per stimare inizialmente le fasi, si usano le strutture di proteine che si sanno (o si suppongono) simili, in struttura e conformazione, alla proteina target.

Metodo della sostituzione molecolare (MR):

Può essere utilizzato quando è disponibile un modello adeguato di una struttura cristallina non nota (sequence identity > 30%).

Esempi di applicazione di questo metodo sono l'uso della struttura della trombina umana per risolvere la struttura della trombina bovina, l'uso di una struttura di un enzima puro per risolvere la struttura di un complesso con un inibitore in una forma cristallina differente.

Il modello viene orientato e posizionato nella cella elementare di un cristallo a struttura non nota mediante l'uso di funzioni di rotazione e traslazione, e il modello orientato viene successivamente utilizzato per calcolare le fasi e una mappa di densità elettronica.

È il metodo più rapido; di solito impiega meno di un mese, ma esige che sia disponibile la struttura di una proteina simile.

Costruzione del modello e affinamento

Una volta ottenuta la mappa di densità elettronica, questa viene **interpretata** dal cristallografo.

Nel caso di una mappa MIR/MAD, alla mappa di densità elettronica deve essere adattato un modello completo della proteina. Gli atomi Ca sono fissati per primi e successivamente vengono costruite la catena principale e le catene laterali.

Nel caso di una mappa MR, il modello utilizzato per risolvere il problema della fase deve essere ricostruito in modo da riflettere la molecola presente nel cristallo. Il modello di solito è quello di una proteina simile e le variazioni implicano sostituzioni di amminoacidi, inserzioni e cancellazioni, cambi di orientazioni di *loops* ecc.ecc.

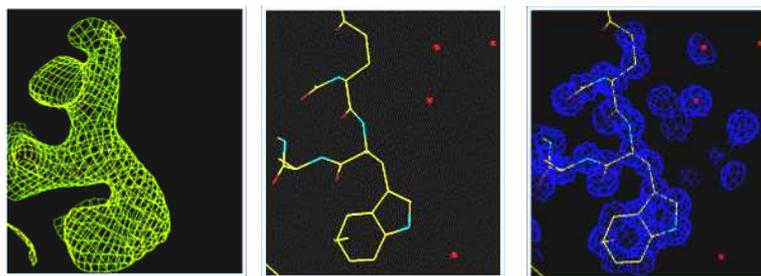
Dopo la sua (ri) costruzione il modello viene affinato, cioè le differenze tra le ampiezze di diffrazione osservate (F_o) e le ampiezze di diffrazione calcolate dal modello (F_c) vengono minimizzate, ottimizzando così la geometria del modello

L' affinamento viene effettuato tramite programmi di calcolo, sia con il metodo dei minimi quadrati (spesso riferito come minimizzazione energetica), che con la dinamica molecolare. Le fasi calcolate dal modello affinato consentono il calcolo di mappe di densità elettronica migliorate, le quali vengono analizzate dal cristallografo per ricostruire di nuovo (migliorare) il modello.

Cicli di affinamento e ricostruzione vengono ripetuti finché non si raggiunge la convergenza e si ottiene una serie di coordinate da depositare nel *Protein Data Bank*

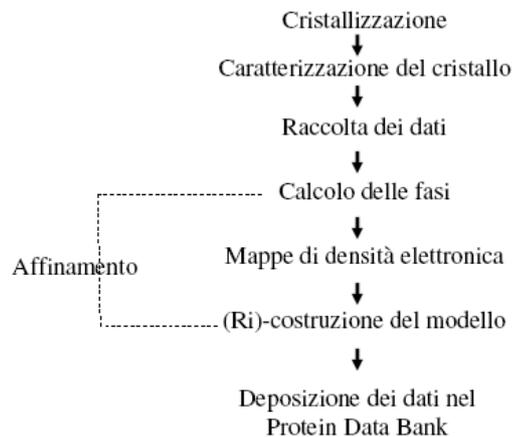
Confronto tra dati sperimentali e modello

Una volta ottenuti i dati iniziali sulle fasi, un modello di proteina (ciò che lo sperimentatore pensa sia vero) viene adattato nella mappa di densità elettronica iniziale.



What you see + What you think = What you get

Schema degli steps di risoluzione di una
struttura cristallina



Cosa in realtà state guardando quando osservate
la struttura tridimensionale di una proteina

*Il risultato sperimentale diretto di un'analisi
cristallografica è una mappa di densità
elettronica e non il modello atomico che voi
state osservando!!!*

*Se vi sono errori nelle strutture cristalline
questi sono dovuti all'interpretazione
(soggettiva) delle mappe elettroniche da parte
del cristallografo!!*

Errori

La teoria della diffrazione dei raggi X e della trasformata di Fourier è rigorosa ed esatta; non implica alcuna approssimazione. Le strutture cristalline hanno dimostrato di essere molto attendibili e gli errori sono rari.

Se vi sono errori questi molto spesso si manifestano nella fase di interpretazione (soggettiva) delle mappe di densità elettronica da parte del cristallografo.

Un serio problema, soprattutto se si lavora a bassa risoluzione (oltre 3.0 Å), è il cosiddetto *bias* di modello.

Per calcolare una mappa di densità elettronica occorrono:
Ampezze: sono determinate sperimentalmente
Fasi: non possono essere misurate direttamente

Nelle ultimi stadi di affinamento le fasi sono calcolate dal modello, il che significa che se il modello contiene errori, le fasi contengono gli stessi errori. Poiché le fasi costituiscono il 50% dell'informazione utilizzata per calcolare le mappe di densità elettronica, posizioni atomiche inesatte potrebbero ancora avere una ragionevole densità elettronica, a causa di questi errori di fase.

Questo effetto è chiamato *bias* di modello

1) Risultato totalmente privo di valore (complete garbage)

Strutture completamente inesatte possono derivare da inesatte assegnazioni di gruppi spaziali, errori nel segno delle mappe di densità elettronica e interpretazioni di mappe oggettivamente non interpretabili.

2) Errori localizzati (loops e connettività)

I *loops* molecolari sono spesso flessibili e, in questi casi, debolmente definiti nelle mappe di densità elettronica. Questi tipi di errori si verificano più frequentemente quando si lavora con le cosiddette "strutture calde", quando cioè ci si precipita a risolvere una struttura nel più breve tempo possibile, per vincere la competizione.

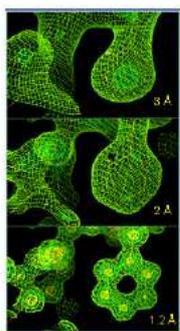
3) Errori negli angoli diedri della catena principale e nelle conformazioni delle catene laterali

Quando si confrontano due strutture della stessa proteina, risolte in maniera indipendente da persone diverse, si osservano spesso discrepanze negli angoli dei diedri della catena principale e nelle conformazioni delle catene laterali. Le mappe di densità elettronica, soprattutto se a bassa risoluzione, non mostrano singoli atomi, quanto piuttosto la forma globale della catena principale e delle catene laterali. A partire da queste mappe non risulta sempre chiaro l'orientamento del piano di un peptide, o quale conformazione di catena laterale scegliere.

Qualità dei dati sperimentali

La qualità di una struttura cristallina non può essere migliore della qualità dei dati sperimentali su cui si basa

(1) **Risoluzione:** corrisponde alla minore distanza (d) tra i piani reticolari i cui riflessi sono usati nel calcolo della mappa e nell'affinamento. Minore è d , più nette e dettagliate saranno le mappe di densità elettronica.



Immagini della densità elettronica della stessa regione della molecola a differenti risoluzioni

Non ci sono dubbi che il modello della fenilalanina sia correttamente posizionato all'interno della densità elettronica del dato a 1.2 Å di risoluzione

Lo stesso si può dire per il modello posizionato nella densità elettronica calcolata per il dato a 2 Å di risoluzione.

A 3 Å di risoluzione si può invece vedere come il centro dell'anello aromatico sia deviato dalla posizione corretta

Prof. Giuseppe Falini

Cristallografia a raggi X

47

(2) **Completezza dei dati:** è possibile calcolare il numero totale di riflessi ad una certa risoluzione e, idealmente, si vorrebbe misurarli tutti. Nella pratica questo non è possibile. Se manca solo una piccola frazione di riflessi (circa il 10%), e quelli mancanti sono deboli, le mappe di densità elettronica ne risultano debolmente influenzate.

(3) **R-sym:** è l'errore tra misure multiple dello stesso riflesso e i suoi equivalenti per simmetria. L'R-sym deve avere il valore più basso possibile. Sono tollerabili valori di R-sym fino al 10%

Flessibilità e fattori di temperatura

La maggior parte delle proteine sono flessibili e molte proteine anche allo stato cristallino contengono delle zone flessibili.

La mobilità degli atomi in un cristallo è espressa in termini di fattori di temperatura, o fattori B, i quali vengono ottimizzati durante le fasi di affinamento. Lo spostamento medio di atomi con fattori B maggiori di 60 \AA^2 supera 1.5 \AA . Questi atomi sono generalmente poco definiti nelle mappe di densità elettronica.

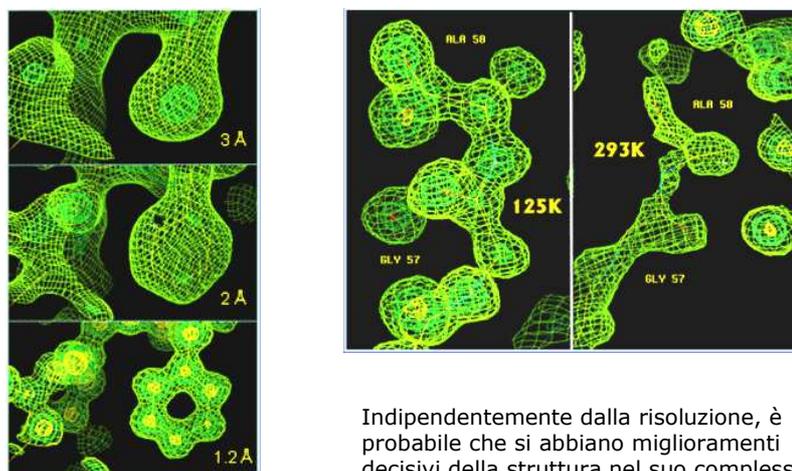
ATOM	502	N	LYSA	67	32.412	0.150	15.464	1.00	19.26	N
ATOM	503	CA	LYSA	67	33.651	0.929	15.561	1.00	18.54	C
ATOM	504	C	LYSA	67	34.712	0.214	16.386	1.00	18.79	C
ATOM	505	O	LYSA	67	35.906	0.508	16.227	1.00	20.59	O
HETATM	6065	O	HCH	484	13.468	-20.961	7.983	1.00	50.83	O

Prof. Giuseppe Falini

Cristallografia a raggi X

48

Importanza di risoluzione + ordine

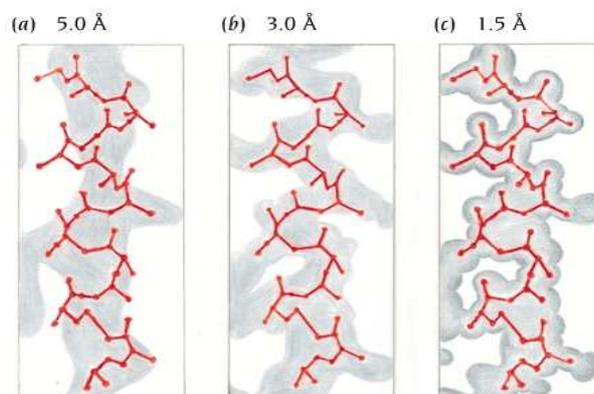


Prof. Giuseppe Falini

Cristallografia a raggi X

49

Adattamento del modello alla mappa di densità elettronica a diverse risoluzioni



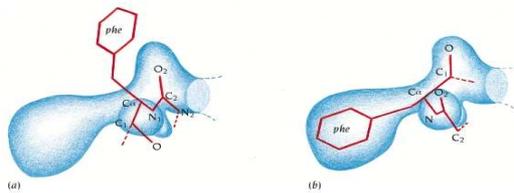
©1999 GARLAND PUBLISHING INC.
A member of the Taylor & Francis Group

Prof. Giuseppe Falini

Cristallografia a raggi X

50

Esempio di rifiniture nell' adattamento del modello alla mappa di densità elettronica



La bontà del fit è espressa dal cosiddetto **R Factor** :

$$R = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|}$$

Il modello viene sottoposto a continue rifiniture fino a quando non si riscontrano ulteriori miglioramenti nell' R factor.

$$0 < R < 0.59$$

In generale $R = 0.15 \pm 0.20$ per una struttura ben determinata.

Un R factor maggiore di 0.30 per una struttura a risoluzione media (3 Å) significa che si possono essere errori anche grossolani nella struttura.

Come si legge un articolo di cristallografia

Materials and methods

Crystal growth. Co-crystals of AmpC in complex with compounds **16** and **21** were grown by vapor diffusion in hanging drops equilibrated over 1.7 M potassium phosphate buffer (pH 8.7) using micro-seeding techniques. The initial concentration of the protein in the drop was 3.8 mg/ml, and the concentration of compounds **16** and **21** were 705 μM and 588 μM, respectively. The compounds were added to the crystallization drops in a 1.2% DMSO, 1 M potassium phosphate buffer (pH 8.7) solution. Crystals appeared in 5-7 days after equilibration at 23°C. Before data collection, crystals were immersed in a cryoprotectant solution of 25% sucrose, 1.7 M potassium phosphate, pH 8.7, for about 30 seconds, and flash cooled in liquid nitrogen.

Table. X-ray data collection and refinement statistics.

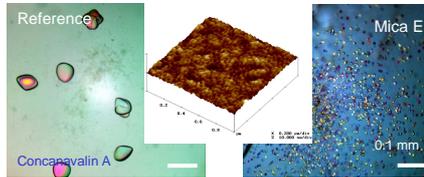
	AmpC/16 complex	AmpC/21 complex
Cell constants (Å; °)	a=117.96 b=77.49 c=96.91 β=115.78	a=118.20 b=76.70 c=97.66 β=116.31
Space group	C2	C2
Resolution (Å)	1.83	1.72
Unique reflections	66946	82138
Total observations	257829	350811
R _{int} (%)	6.0 (42.5) ^a	4.0 (12.0) ^a
Completeness (%)	96.5 (91.0) ^a	99.2 (96.0) ^a
<I>/<σ</I>	19.5 (2.7) ^a	30.0 (11.2) ^a
Resolution range for refinement (Å)	20.0-1.83 (1.87-1.83) ^a	20.0-1.72 (1.76-1.72) ^a
Number of protein residues	716	716
Number of water molecules	468	567
RMSD bond lengths (Å)	0.010	0.014
RMSD bond angles (°)	1.57	1.76
R _{free} (%)	18.7	16.7
R _{work} (%)	21.4	18.9
Average B-factor, protein atoms (Å ²)	34.8 ^b	22.7 ^b
Average B-factor, inhibitor atoms (Å ²)	44.5 ^b	36.1 ^b
Average B-factor, water molecules (Å ²)	39.1	34.1

Structure determination. Data were measured on DND-CAT beam line (5IDB) of the Advance Photon Source at Argonne National Lab, at 100 K using a Mar-CCD detector. Both data sets were measured from single crystals. Reflections were indexed, integrated, and scaled using the HKL software package.³⁵ For both structures the space group was C2, with two molecules in the asymmetric unit, each containing 358 residues. The initial phasing model was an AmpC/boronic acid complexed structure (PDB entry 1FSY), with inhibitor, water molecules, and ions removed, which was positioned by rigid body refinement. The model was refined using the maximum likelihood target in CNS³⁶ and included simulated annealing, positional minimization, and individual B-factor refinement, with a bulk solvent correction. Sigma A-weighted electron density maps were calculated using CNS and used in further steps of manual model rebuilding and placement of water with the program O.³⁷ The inhibitors were built into the 2[Fo]-|Fc| and |Fo|-|Fc| difference density maps in each active site of the asymmetric unit. Subsequent refinements consisted of positional minimization and B-factor refinement in CNS.

Recent advances: 1. Crystallization of Protein



High-throughput protein crystallization



Crystallization on nucleating substrates

Recent advances: 2. Synchrotrons Sources of X-ray radiation



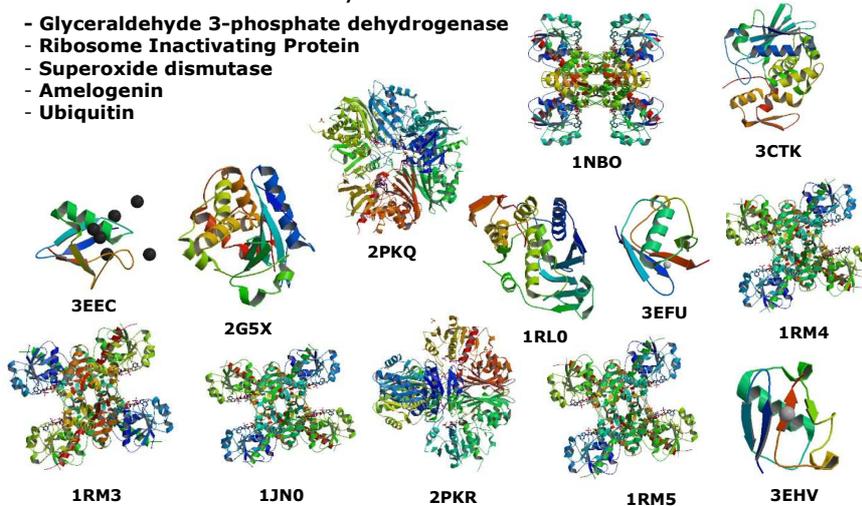
1995: 3rd generation synchrotron: ESRF, Grenoble.

- Used to solve protein structure
- Large central service units
- Use magnets that bend the electrons
- Wavelength range, typically 0.5-3.0 Å
- Faster measurement due to up to 1000 fold higher energy



Crystal Structures Solved at the Laboratory of Environmental and Biological Structural Chemistry

- Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
- Ribosome Inactivating Protein
- Superoxide dismutase
- Amelogenin
- Ubiquitin



Crediti e autorizzazioni all'utilizzo

- Questo ed altro materiale può essere reperito a partire da:
<http://www.ambra.unibo.it/giorgio.sartor/>
- Il materiale di questa presentazione è di libero uso per didattica e ricerca e può essere usato senza limitazione, purché venga riconosciuto l'autore usando questa frase:
Materiale ottenuto dai Proff. Giuseppe Falini e Giorgio Sartor
Università di Bologna a Ravenna

Giorgio Sartor - giorgio.sartor@unibo.it