

Fehérjekrisztallográfia - röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat

Harmat Veronika

ELTE Kémiai Intézet, Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium

Az előadás diái, segédanyagok a gyakorlathoz:

<http://harmatv.web.elte.hu/Bioanalitika-krisztallografia/>

Laborgyakorlat: ELTE-CrystalLAB, ELTE Északi Tömb 5.123-5.124

Érdeklődőknek:

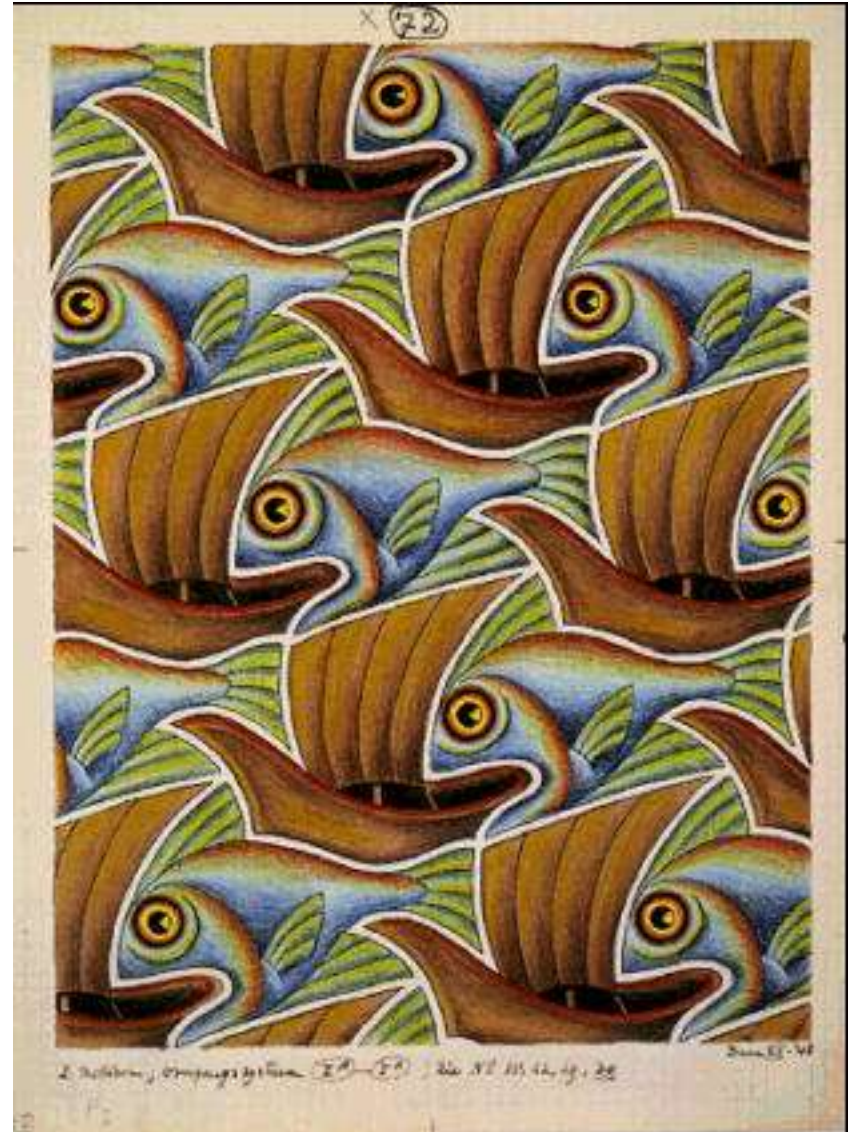
Magyar nyelvű jegyzet:

<http://harmatv.web.elte.hu/Rontgendiffrakcio-jegyzet/Rontgendiffrakc-szerk-vizsg.pdf>

„A fehérjekrisztallográfia módszerei” speciálkollégium

Tartalom

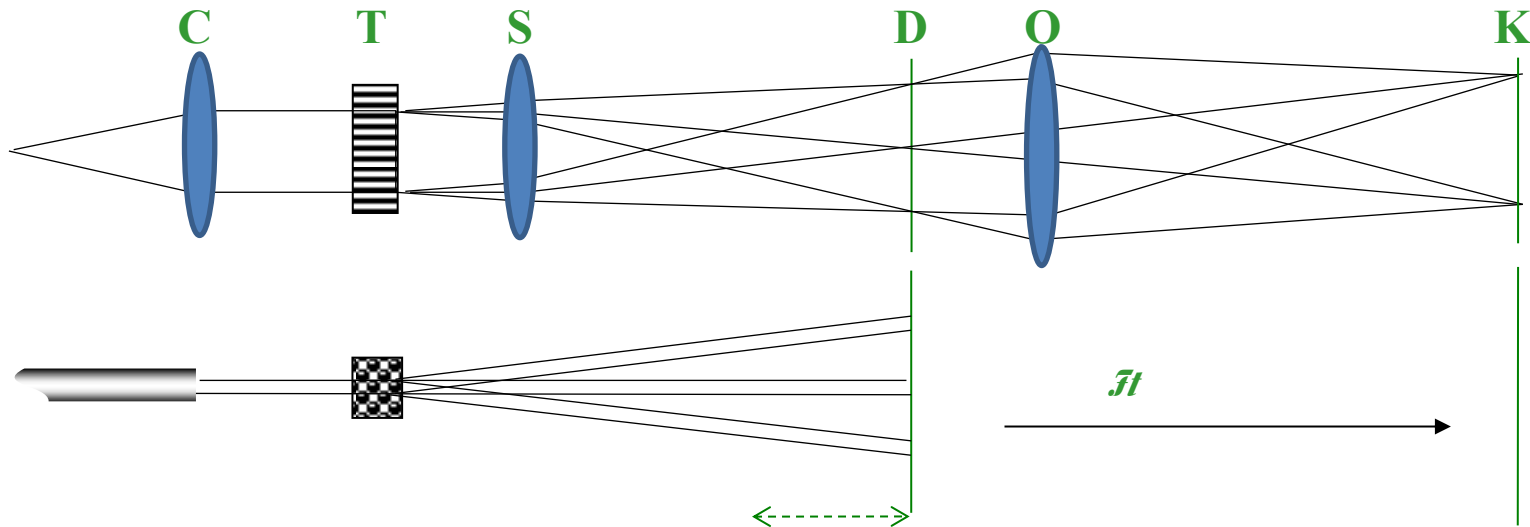
- Röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat – a módszer sajátosságai
- A szerkezetmegoldás menete
- Mire ad választ a fehérjék atomi felbontású szerkezete?
- Alkalmazások, érdekes példák



Maurits Cornelis Escher: Szimmetria E72.

Röntgendiffrakció, röntgenkristallográfia

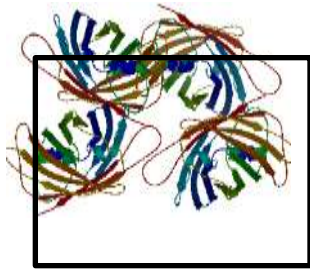
- Hasonlóan a mikroszkóphoz a vizsgált „tárgy” (kristályt alkotó molekulák, atomok, ionok) **részletes, nagyított képét** kapjuk meg
- A mintáról (rugalmasan) szóródott sugarak interferálnak egymással
DE: nem állíthatók elő megfelelő minőségű lencsék, ezért csak a diffrakciós képet tudjuk észlelni
- **Diffrakció:** a sugárzás rugalmas kölcsönhatása az anyaggal



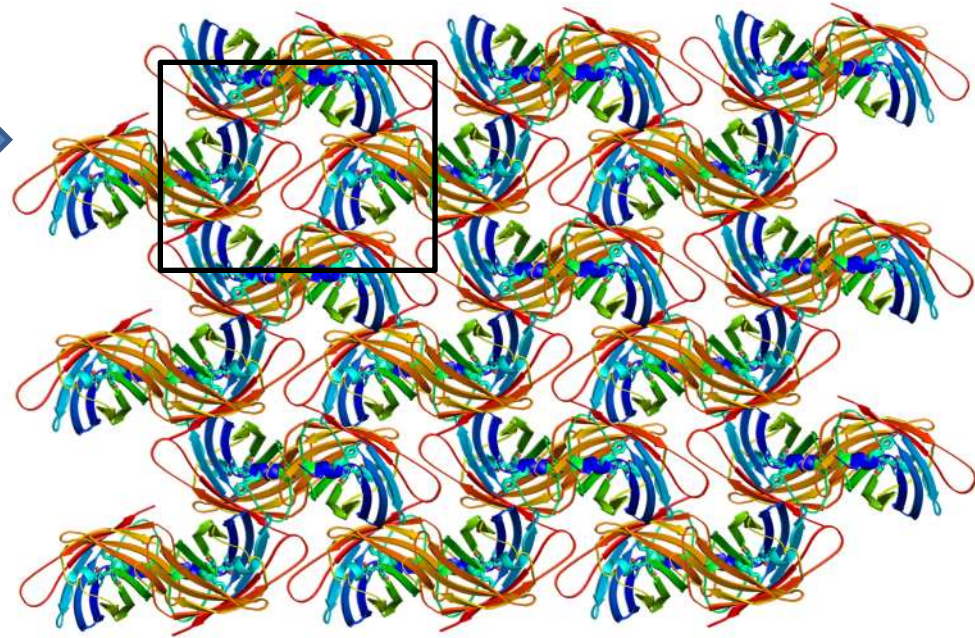
A módszer sajátosságai – egykristályok vizsgálhatók

„**Krisztallográfia**” - a legtöbb információt akkor tudunk kinyerni a diffrakciós képekből, ha egykristályt vizsgálunk

Egykristály: a tér három irányában folytonosan rendezett (periodikus) az atomok elrendeződése



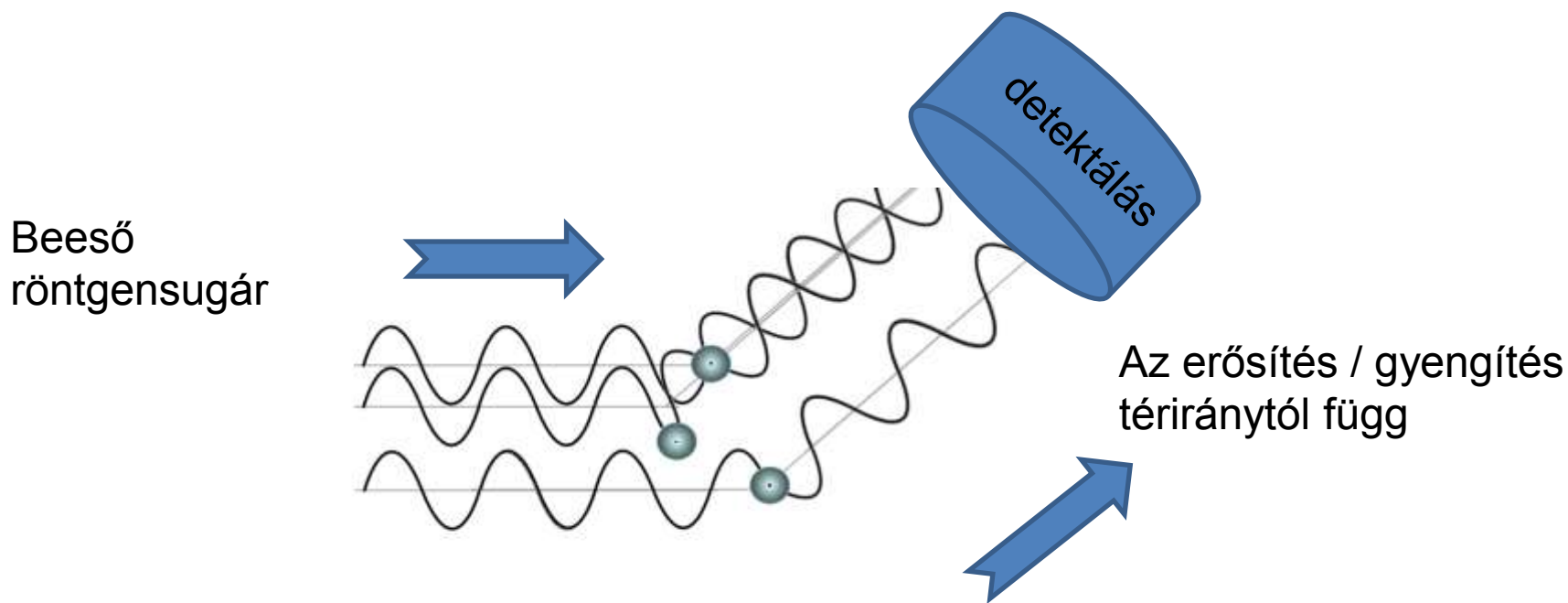
+



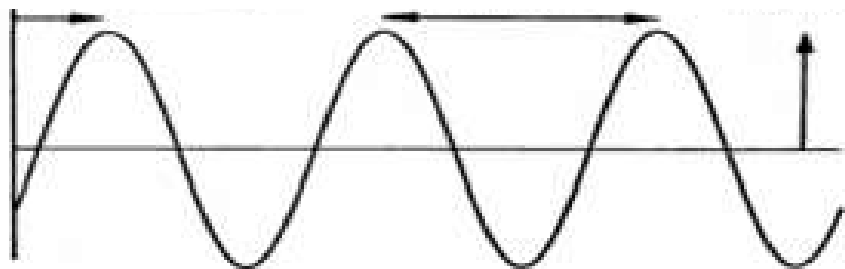
Zöld fluoreszcens fehérje kristályszerkezete

A diffrakció matematikai leírása

A különböző „objektumokról” szóródó hullámok különböző irányokban erősítik vagy gyengítik egymást. (A hullámhossz összemérhető a vizsgált távolságokkal.)



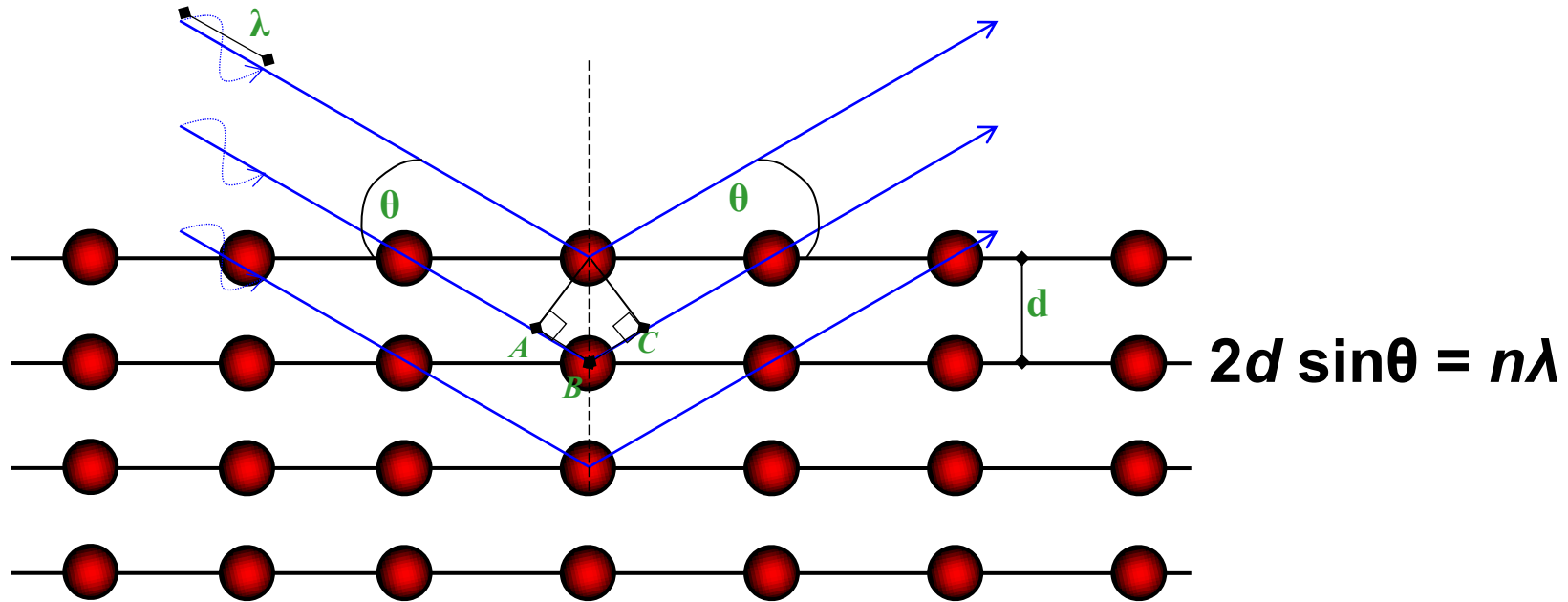
fázis az origóhoz képest hullámhossz amplitudó



Krisztallográfiai fázisprobléma: a diffrakciós képből a szórt sugarak fázisát nem kapjuk meg, csak az intenzitásukat, ezért nem számítható közvetlenül az elektronsűrűségi térkép.

A diffrakció geometriai feltétele: Bragg egyenlet (1 dimenzió)

A „térirány” meghatározott



A párhuzamos rácssíkokról szóródó sugármenetek útkülönbsége ($AB + BC = 2d \sin\theta$) a hullámhossz egész szám szorosa

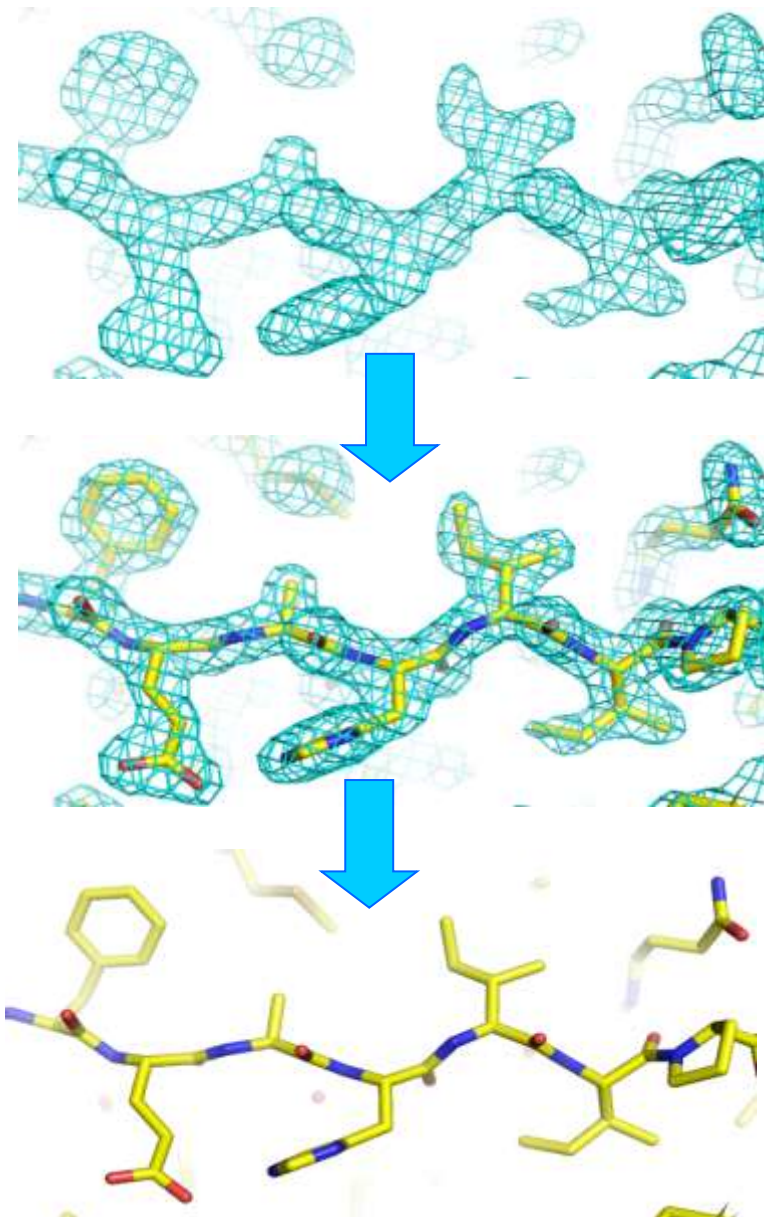
- ▶ Az egykristály diffrakciós képe diszkrét pontokból áll („reflexiók”)
- ▶ A reflexiók hozzárendelhetők a kristályrác síkseregeihez
- ▶ Monokromatikus sugárzás esetén a kristályt forgatni kell!

A módszer sajátosságai - elektronsűrűségi térképek

A kristálybeli molekulák nagyított képe:

A röntgensugár a molekula elektronfelhőjével hat kölcsön, ezért a mérés kiértékelésekor **elektronsűrűségi térképet** kapunk.

Ezért modellépítési lépés is szükséges: atomokat helyezünk a térkép maximumaiba.



A mért adatok információtartalma: felbontás

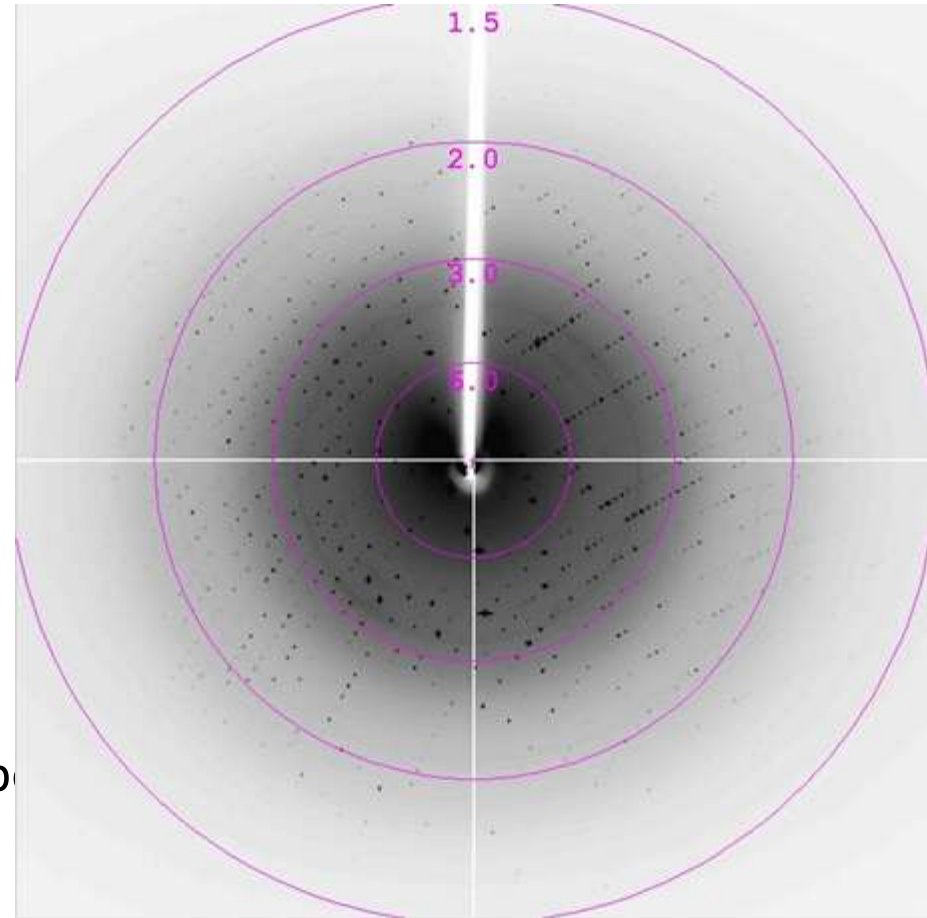
Kismolekulák: atomi felbontás (1-1,2Å).

Makromolekulák:

A kristály rendezetlenebb, egységnyi kristálytérfogatban kevesebb szóró egység (elemi cella) van. Általában a maximális felbontás 1,5-3Å.

Alacsonyabb felbontás esetén az elektronsűrűségi térkép részletgazdagsága kisebb (pl. nincs elektronsűrűségi maximum az atomok helyén).

A geometriát leíró paraméterek (pl. atomi koordináták) meghatározásához a mért adatokon kívül más ismereteket is figyelembe kell venni.



Felbontás:

1,2 Å

1,8 Å

2,8 Å

4,0 Å

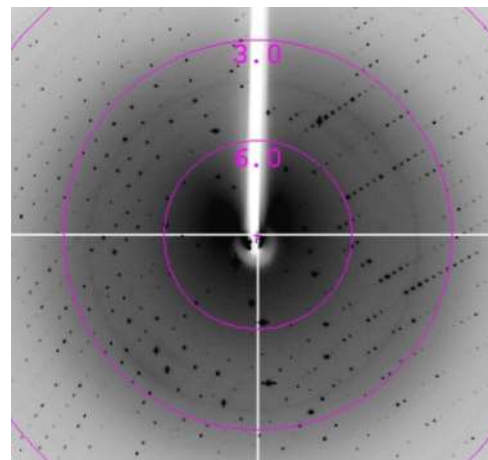


A szerkezetmegoldás lépései

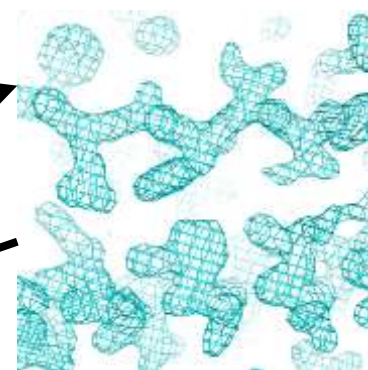
Kristályosítás



Adatgyűjtés

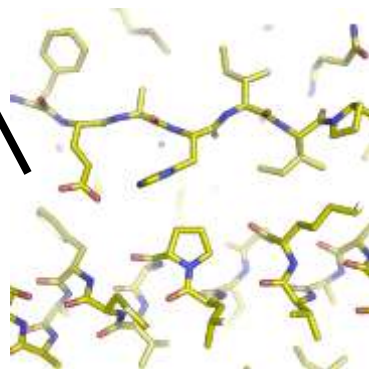


A fázisprobléma megoldása

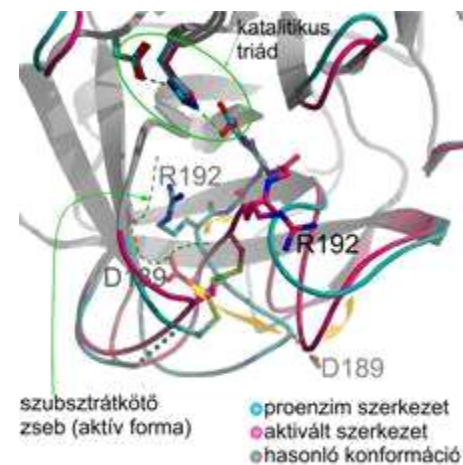


Finomítás

Modellépítés



Validálás,
interpretálás



1. Kristályosítás

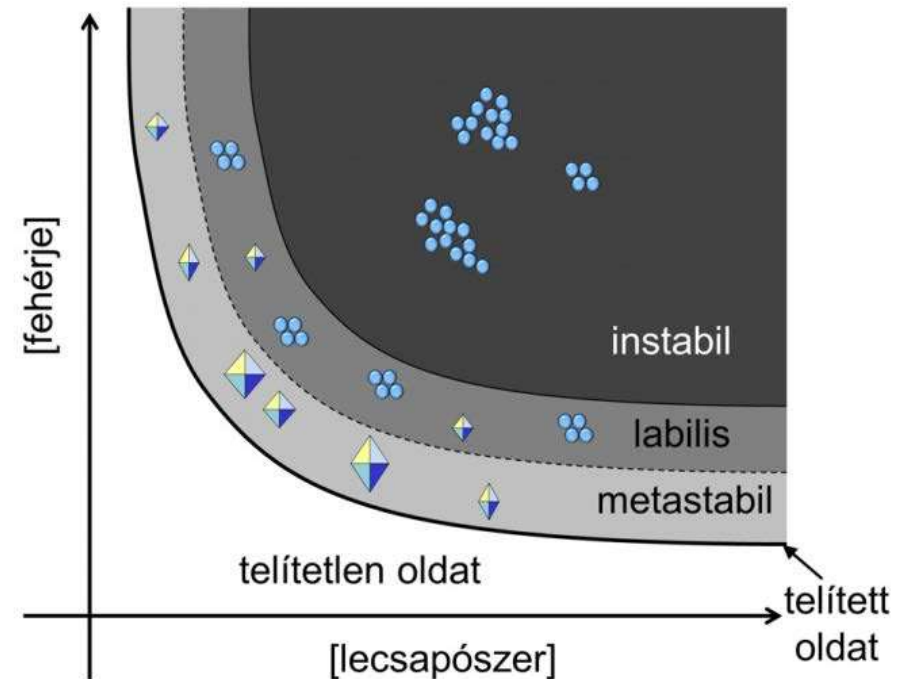
Kb. 0,1-0,3 mm nagyságú egykristály szükséges

Makromolekulák (fehérje, fehérje-nukleinsav):

Nagy tisztaságú oldat (>99%)

Viszonylag nagy koncentrációban (1-10 mg/ml, kb. 1 mM)

1. Sok, nagyon különböző kristályosítási körülmény tesztelése
2. Az ígéretes körülmények optimalizálása: pH, adalékok, kristályosítószer koncentráció, hőmérséklet ...
3. Kristályok minőségének javítása: tiszta oldat beoldása kristálygócokkal, adalékok



1. Kristályosítás

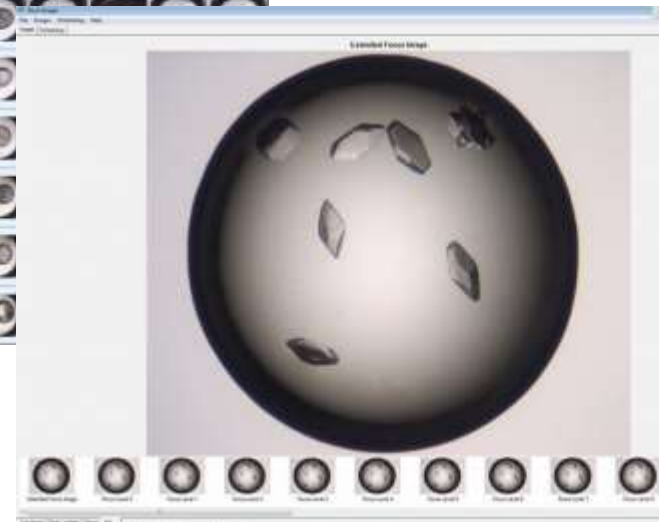
Kb. 0,1-0,3 mm nagyságú egykristály szükséges

1. Sok, nagyon különböző kristályosítási körülmény tesztelése
AUTOMATIZÁLÁS!

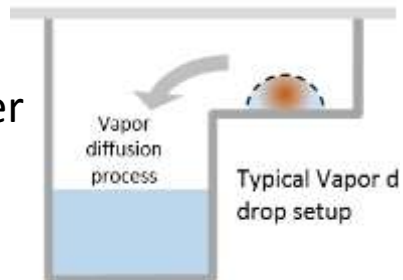
Mosquito LCP pipettázó robot



Kristálynövekedés monitorozása: Rock Imager2



Ülő csepp módszer

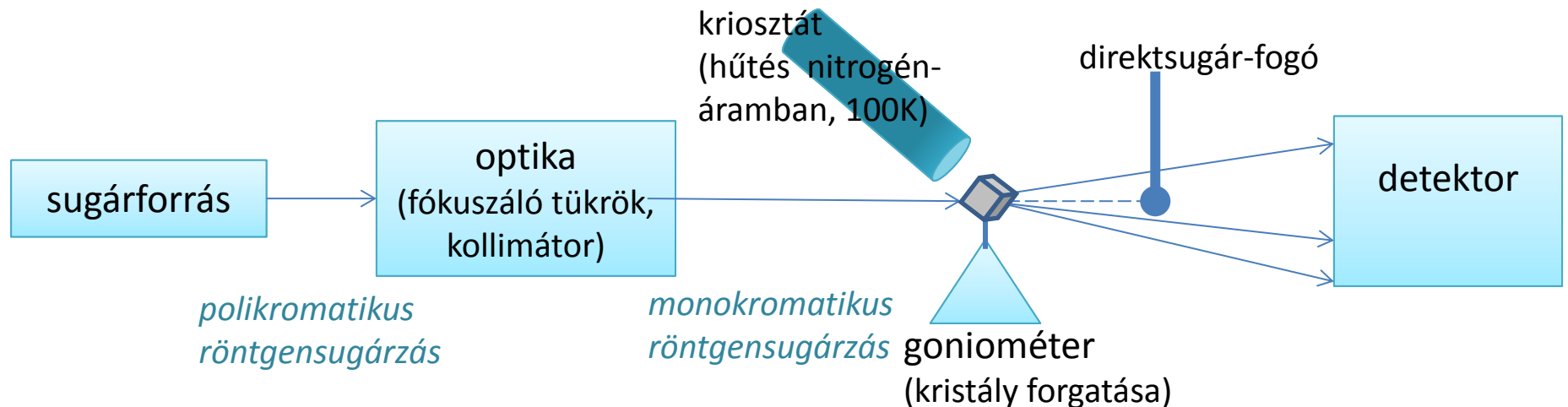


2. Adatgyűjtés (a röntgendiffrakciós mérés)

XTALab Synergy-R röntgendiffraktométer

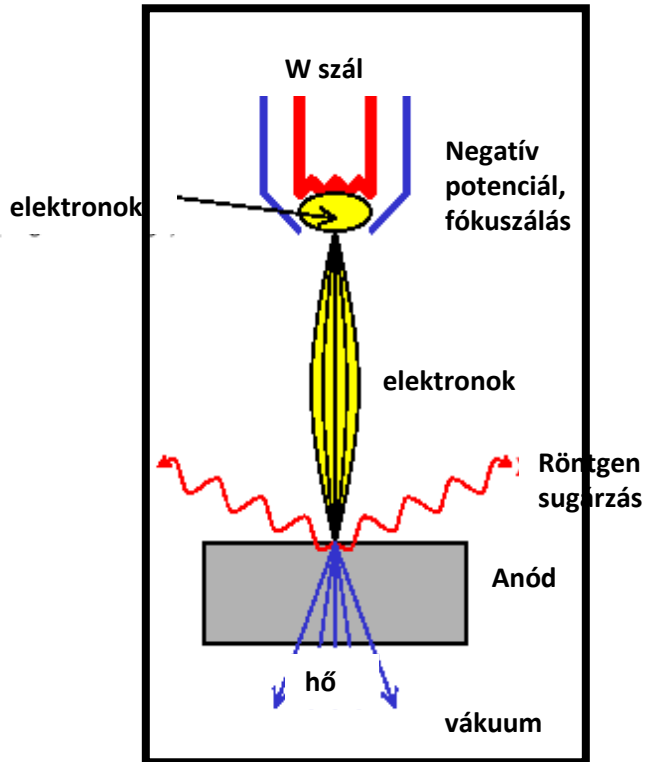
Cél:

- Az összes reflexió megmérése
- A legrövidebb idő alatt (sugárzás általi károsodás minimalizálása)
- Jel/zaj viszony növelése (expozíciós idő)
- Redundancia növelése (többszörös mérés)
- A reflexiók ne fedjenek át a detektoron!



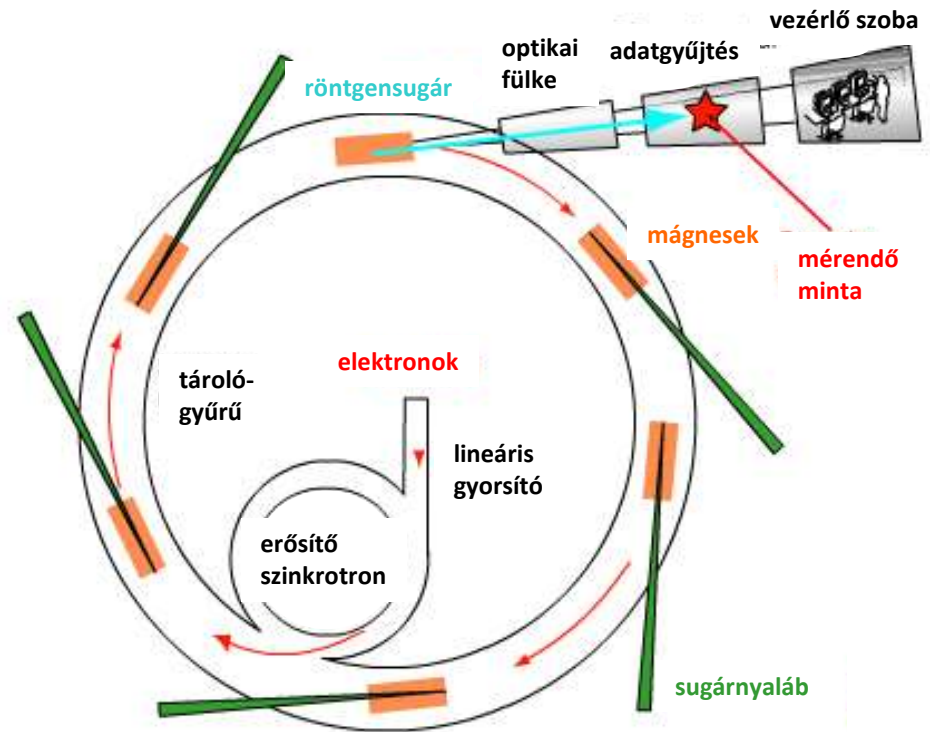
Röntgen sugárforrások

Hagyományos sugárforrás (katódsugárcső):
karakterisztikus röntgensugárzás



Szinkrotron:

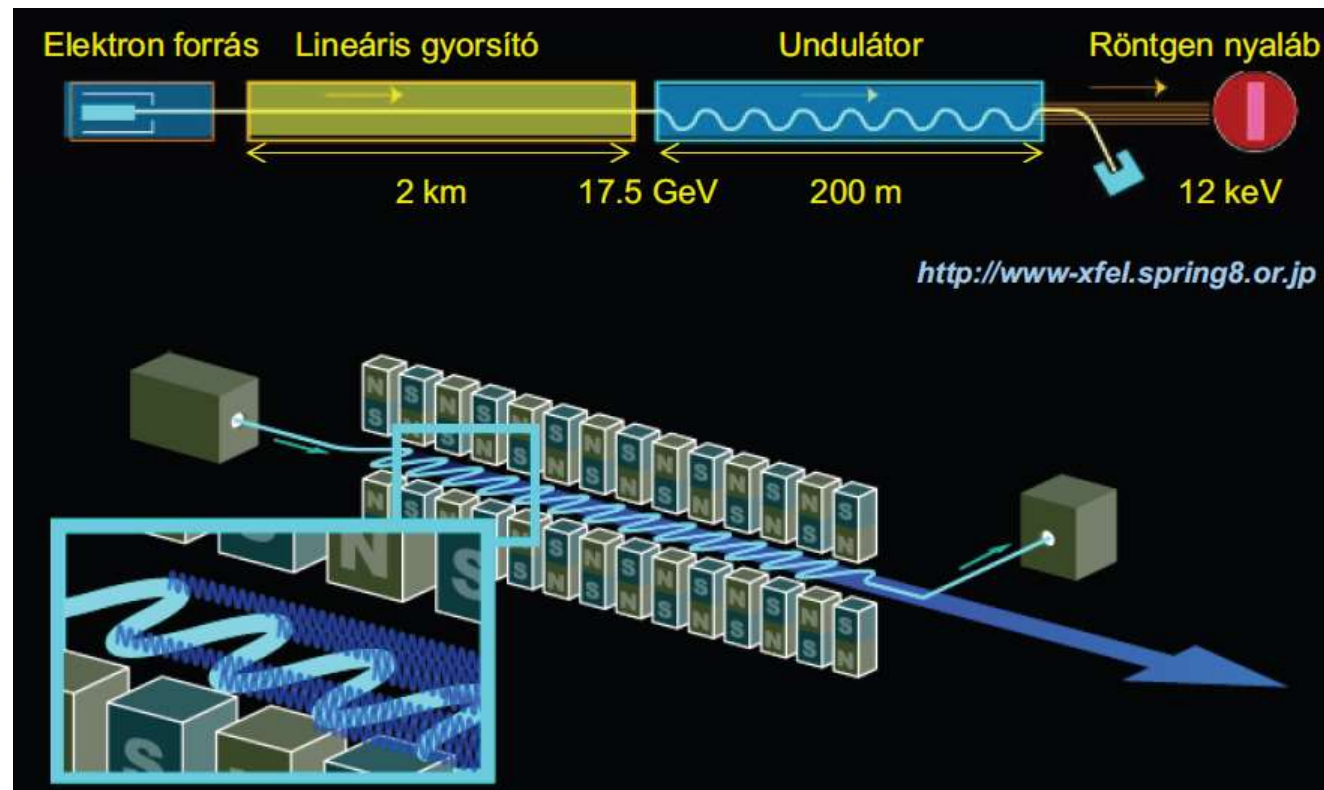
- ▶ Nagy intenzitás
- ▶ Jól fókuszált
- ▶ Változtatható hullámhossz
- ▶ Időfelbontásos felvételek



Röntgen sugárforrások

Röntgen szabad elektron lézerek (XFEL)

	Szinkrotron	XFEL
Fényesség:	10^{20}	10^{25}
Hullámhossz	változtatható	nem változtatható
Fókuszáltság		10-100* jobb
Adatgyűjtés módja	1 kristály	soros egykristálydiffrakció
Sugárzás általi károsodás	jelentős lehet	elhanyagolható

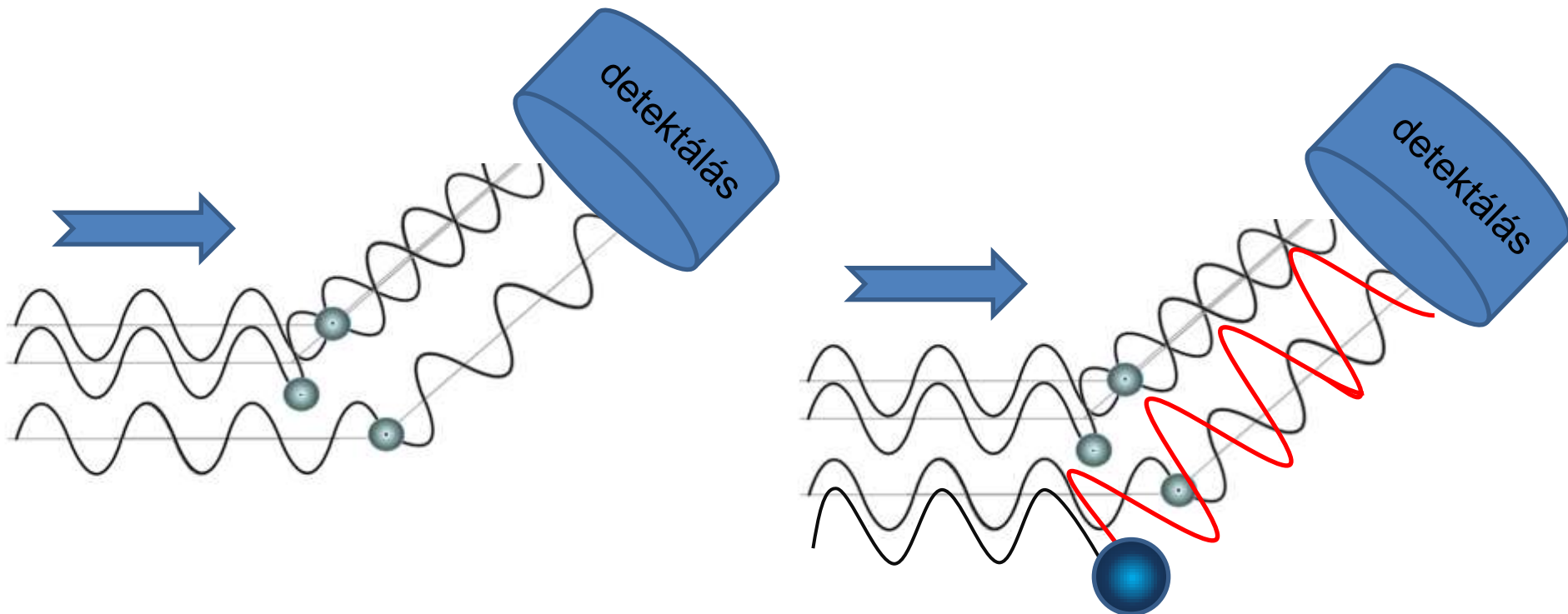


3. A fázisprobléma megoldása

A szórt röntgensugár intenzitását detektáljuk - amplitúdókat megkapjuk a mérésből
Amplitúdókra és fázisokra is szükség van az elektronsűrűségi térkép kiszámításához

Izomorf helyettesítés és anomális szórás módszere

A fehérjemolekulához jól definiált helyzetben speciális szórási tulajdonságú atomokat kötünk. Az amplitúdó-változás felhasználható az eredeti fehérjekristály szórási fázisainak meghatározásához.



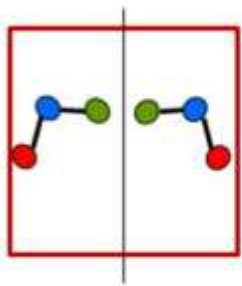
3. A fázisprobléma megoldása

A szórt röntgensugár intenzitását detektáljuk - amplitúdókat megkapjuk a mérésből
Amplitúdókra és fázisokra is szükség van az elektronsűrűségi térkép kiszámításához

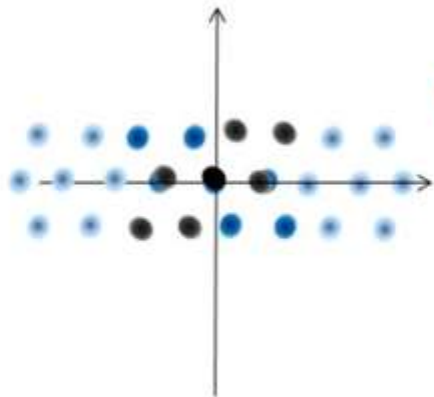
Molekuláris helyettesítés

Egy ismert szerkezetű, homológ fehérjemolekulát kell elhelyezni az elemi cellában (a vizsgált fehérje helyére és orientációjában).

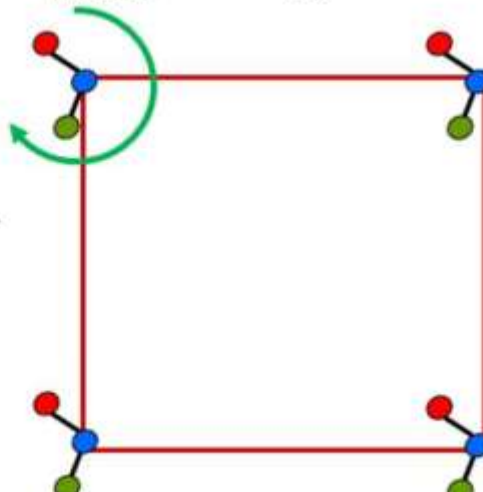
Vizsgált szerkezet



és Patterson függvénye

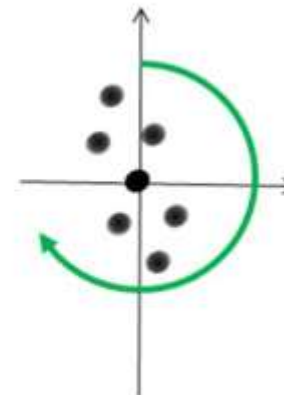


Modell

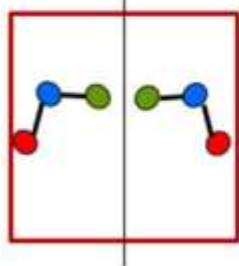


és

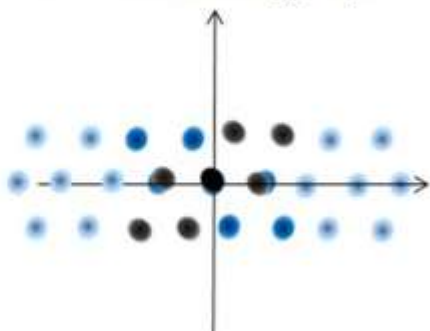
Patterson függvénye



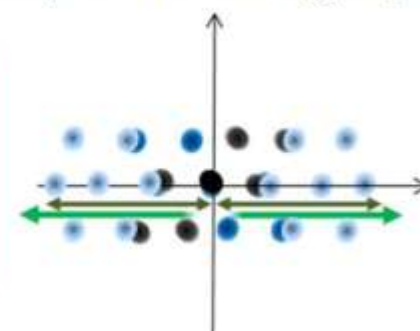
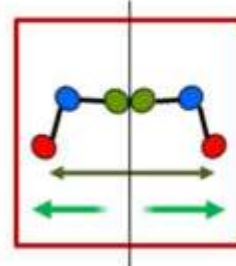
Vizsgált szerkezet



és Patterson függvénye



Modell (helyes orientációban) és Patterson függvénye

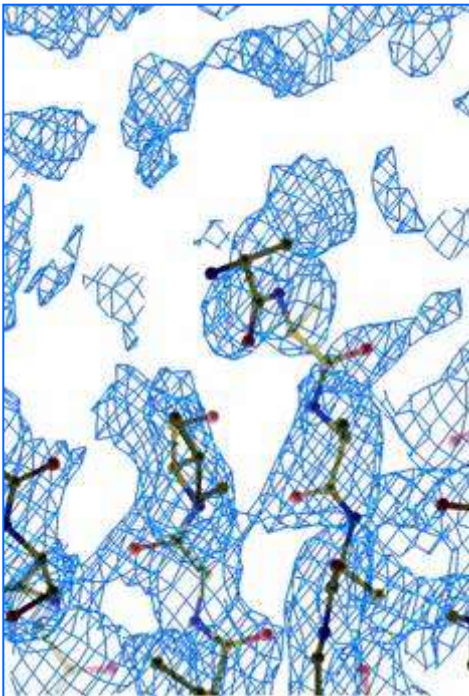


4. Modellépítés - finomítás

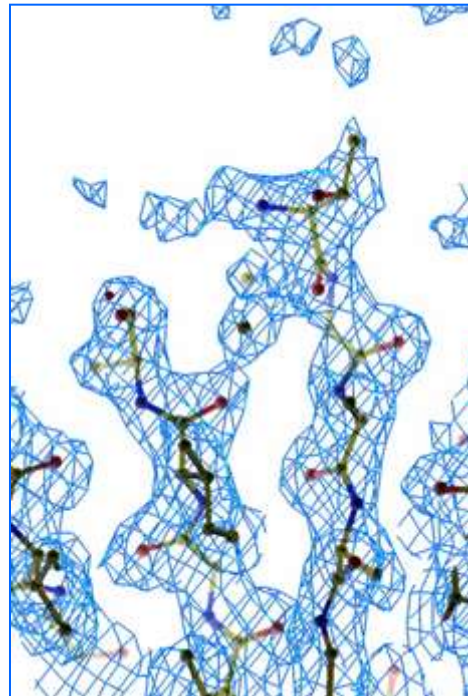
Iteratív eljárás, eredménye az elektronsűrűségi térkép javulása, ami egyre pontosabb modell építését teszi lehetővé.

Modell: a molekula térszerkezete (atomi koordináták és atomi mozgástényezők), amivel a mérési adatokat minél pontosabban próbáljuk leírni

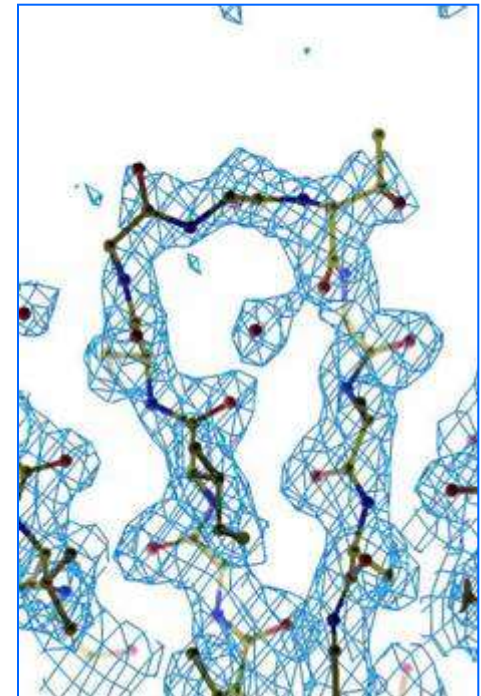
Finomítás 0. köre



6. köre



11. köre után:



5. A fehérjeszerkezet érvényessége - validálás

A műszeres szerkezetvizsgálati módszereknél (röntgendiffrakció, NMR, cryo-EM) a mérésből nem közvetlenül kapjuk meg a szerkezetet: értelmezési lépés

- ▶ Illeszkedés a mért adatokhoz: kristallográfiai jósági tényezők (R faktor, R_{free})
- ▶ Felbontás
- ▶ A mérési adatok minősége (teljesség, redundancia, az ekvivalens reflexiók egyezésének mértéke)
- ▶ Mért adatok (reflexiók) és változók (atomonként 3 koordináta és általában egy atomi mozgástényező) számának aránya
- ▶ Atomi mozgástényezők:
B>=100 körüli értékek esetén lehet, hogy a valóságban nem is ott van az atom
- ▶ Kémiai relevancia:
geometriai jellemzők, nemkötő kölcsönhatások, konformáció, felgombolyodás, Ramachandran térkép
- ▶ Biológiai relevancia: összhang az in vitro / in vivo eredményekkel?

R-faktor:

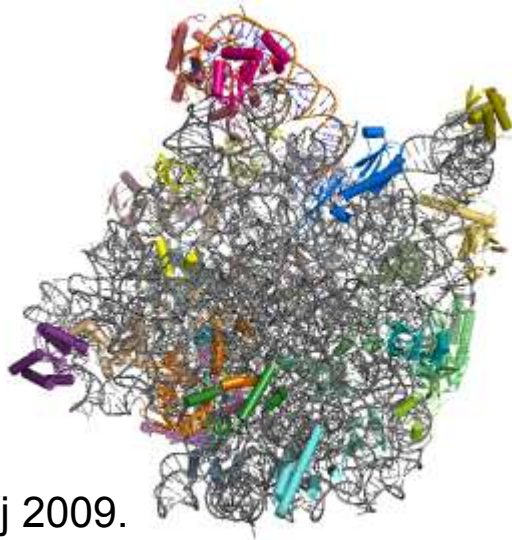
Makromolekuláknál túlillesztés veszélye miatt szabad R-faktor is

$$R = \frac{\sum_{h,k,l} |F_{obs}(h,k,l) - F_{calc}(h,k,l)|}{\sum_h F_{obs}(h,k,l)}$$

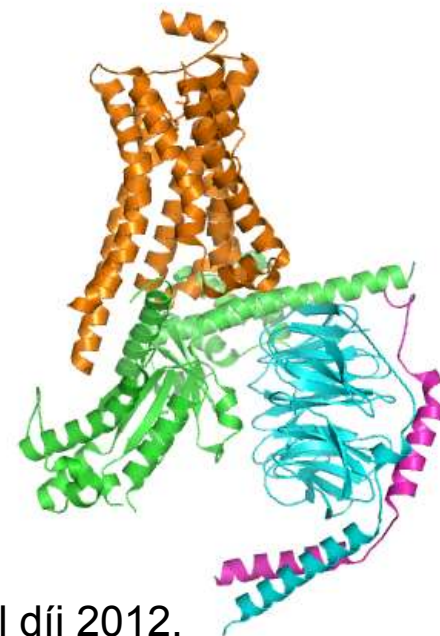
Validálás - Milyen kérdésekre ad választ a szerkezet?

Térszerkezet **kristályban** – mennyire releváns?

- Stabil konformációjú fehérjék vizsgálhatók (**globuláris fehérjék**)
DE: A globuláris fehérjék konformációja az oldatban és a kristályban általában hasonló
- Nincs elvi molekulaméretbeli korlát



Kémiai Nobel díj 2009.
Venkatraman Ramakrishnan,
Thomas A. Steitz , Ada E. Yonath
riboszóma

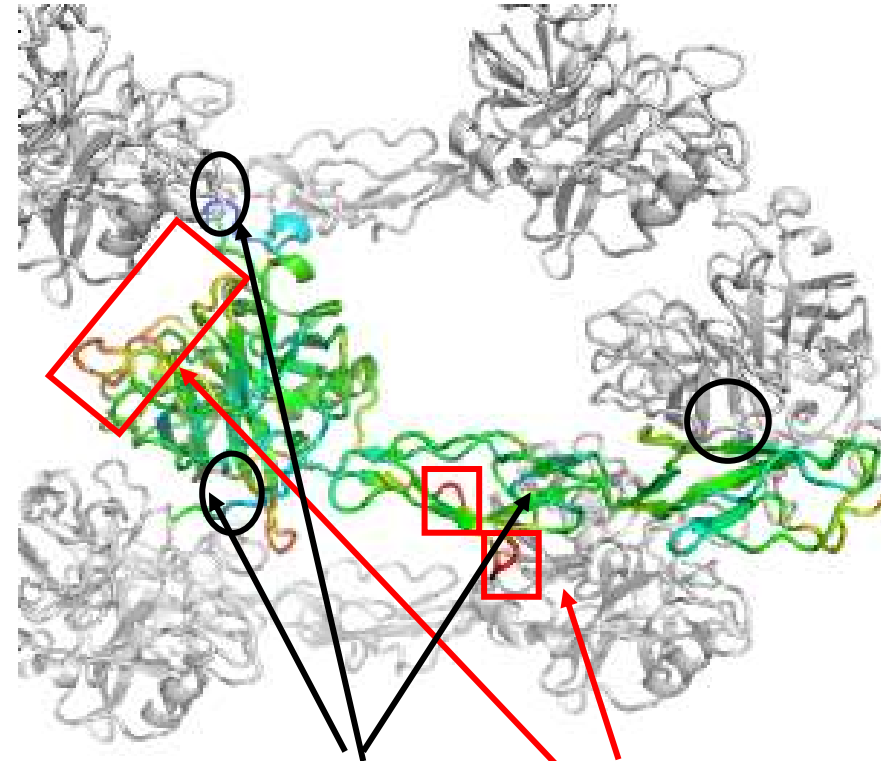


Kémiai Nobel díj 2012.
Brian Kobilka, Robert Lefkowitz
G-fehérje kapcsolt receptorok


Validálás - Milyen kérdésekre ad választ a szerkezet?

Kristálybeli kontaktusok (másodlagos kölcsönhatások a szomszédos molekulák között)

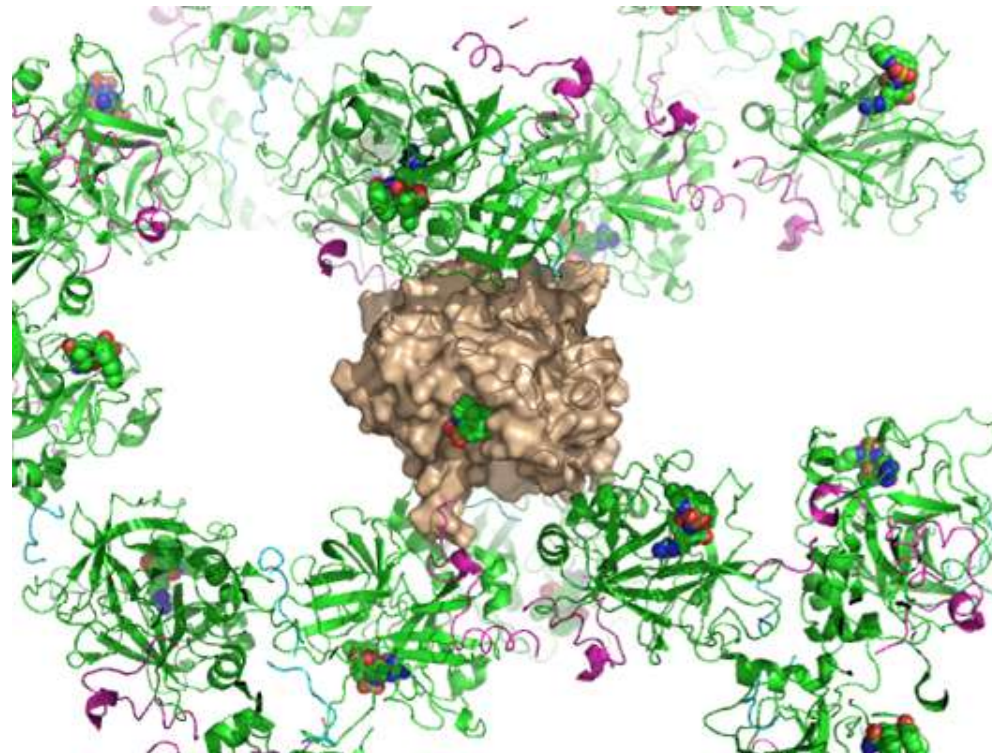
- Irreleváns konformációt stabilizálhatnak
- Elfedhetik az aktív helyet
- A kristálybeli mozgékonyaságból csak óvatos következtetések vonhatók le



kristály kontaktusok oldatban is mozgékony lehet

 -mozgékony/rendezetlen
-merev

Színezés: B-faktor



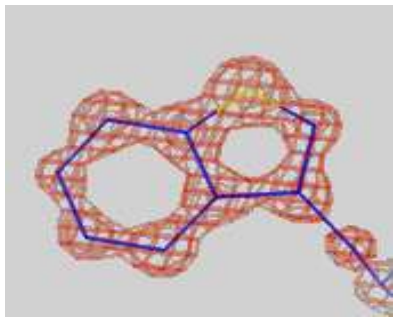
Trombin/Argatroban komplex
Banner et al J.Biol. Chem. 266, 20085 (1991)

Validálás - Milyen kérdésekre ad választ a szerkezet?

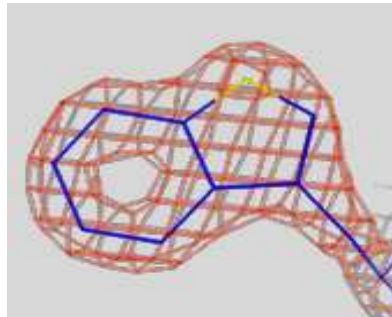
A mérési eredményből a kristálybeli **elektronsűrűség** térbeli és időbeli **átlaga** számítható ki

- A molekula konformációs változatai közül csak a kristályban nagy arányban jelen levők azonosíthatók a térképen.
- Az elektronsűrűségi térkép „információtartalma” és az atomi pozíciók hibája is függ a felbontástól.
- A mérésből származó információ a konformáció (torziós szögek)

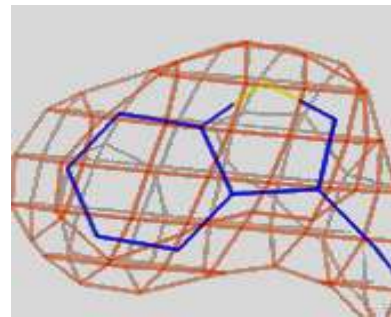
Triptofán indolgyűrűjének elektronsűrűsége különböző felbontásokon



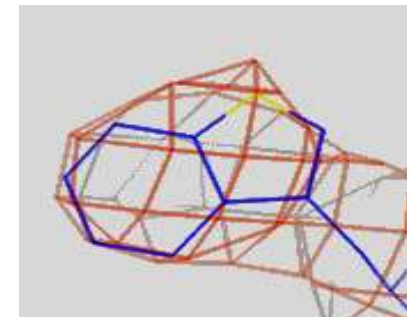
1,0 Å



1,8 Å



3,0 Å



4,0 Å

A fehérjeszerkezetek jelentősége

A funkció szerkezeti háttere

- Kémiai reakciók
- Feltekeredés (folding)
- Kölcsönhatások

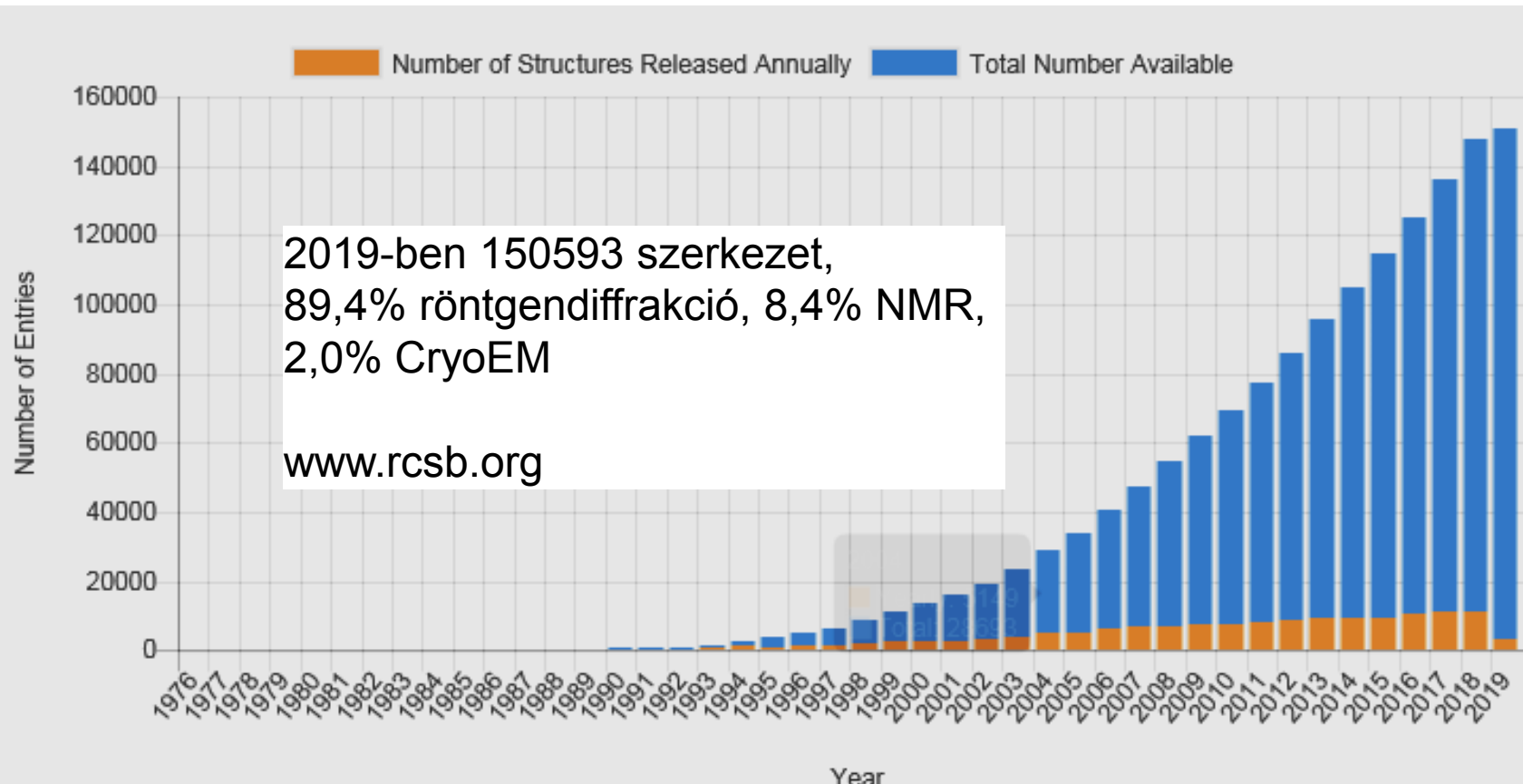


Max Ferdinand Perutz, John Cowdery
Kendrew
hemoglobin (1954.), mioglobin (1960.)
Nobel díj 1960.

A fehérjeszerkezetek jelentősége

A funkció szerkezeti háttere

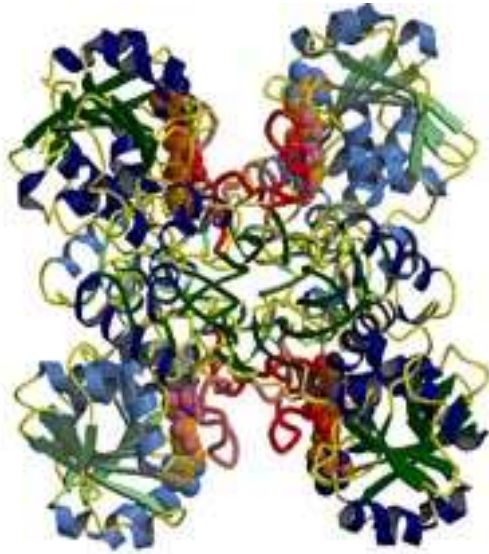
- Kémiai reakciók
- Feltekeredés (folding)
- Kölcsönhatások



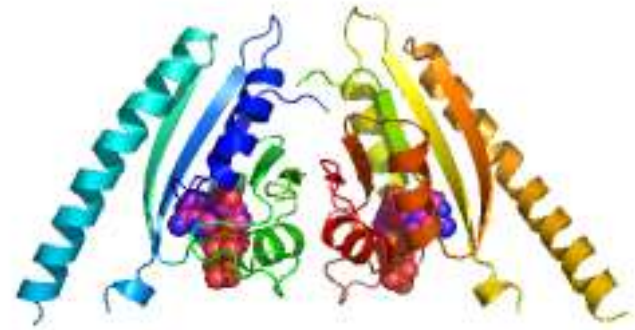
Térszerkezetek szerepe a fehérjeműködés feltárásában

- **Fehérje feltekeredés**

(napjainkban: szerkezeti genomika projektek,
~20 konzorcium világszerte (sg.pdb.org))



Plasmodium falciparum (malária)
glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz,
gyógyszertervezés



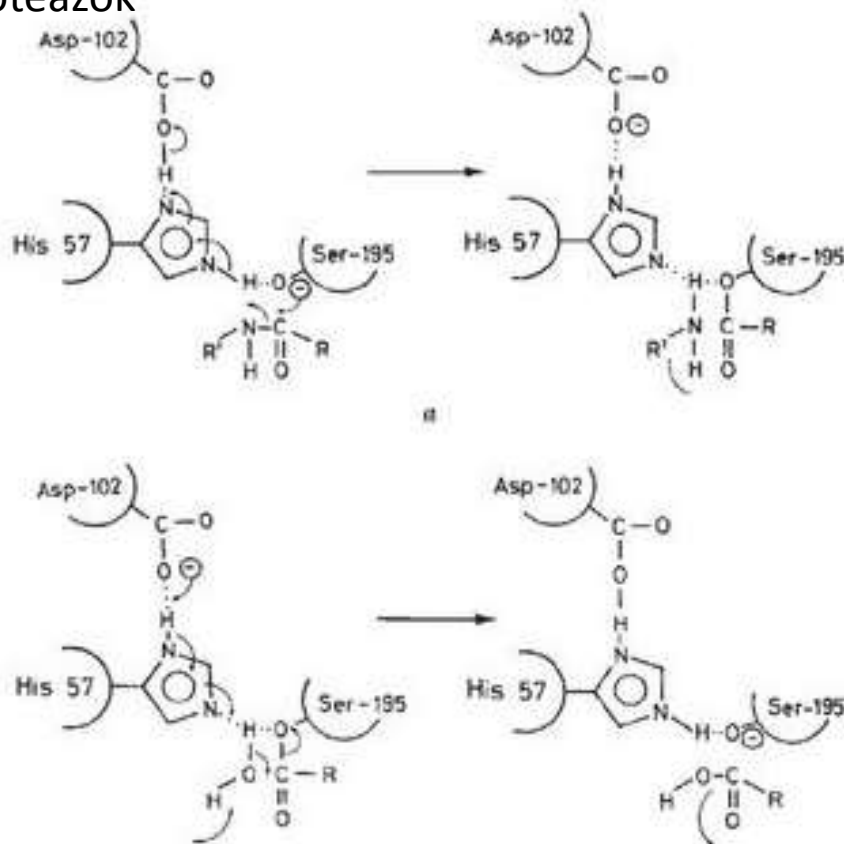
Funkció azonosítása a szerkezet alapján:
ATP-kötő fehérje, pdb:1mjh

Térszerkezetek szerepe a fehérjeműködés feltárásában

Enzim mechanizmus felderítése

- Fontos szerkezeti elemek szerepének megértése
- Mutációk hatása (patogén mutációk; tervezett mutációk)
- Komplexek a kémiai reakció szubsztrát/termék/átmeneti állapotának megfelelő ligandumokkal

Pl. szerin proteázok



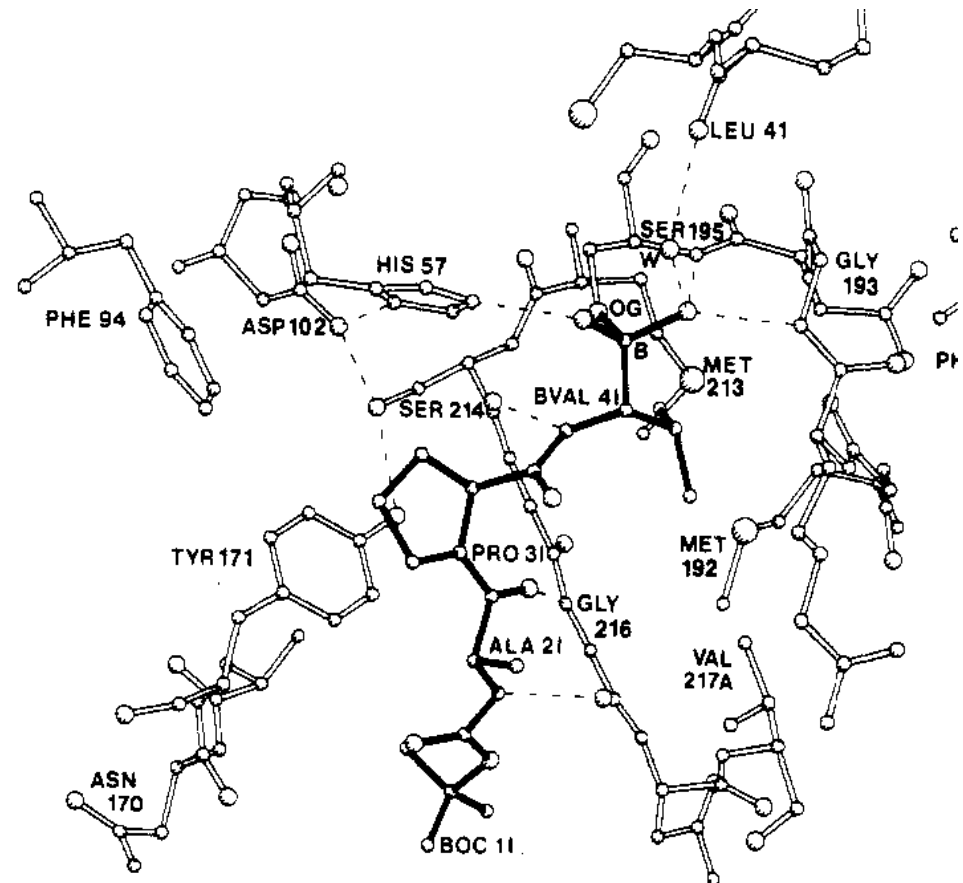
Blow, et al. *Nature* **221**, 33 1969 Craik et al *Science* **237**, 291,1985

Térszerkezetek szerepe a fehérjeműködés feltárásában

Enzim mechanizmus felderítése

- Fontos szerkezeti elemek szerepének megértése
- Mutációk hatása (patogén mutációk; tervezett mutációk)
- Komplexek a kémiai reakció szubsztrát/termék/átmeneti állapotának megfelelő ligandumokkal

Pl. szerin proteázok
alfalitikus proteáz komplexe bórsav-észter
átmeneti állapot analóg inhibitorral



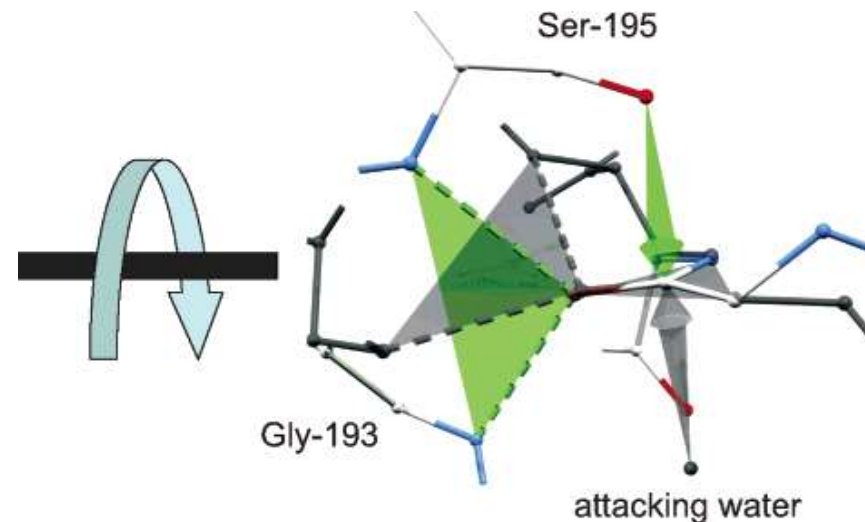
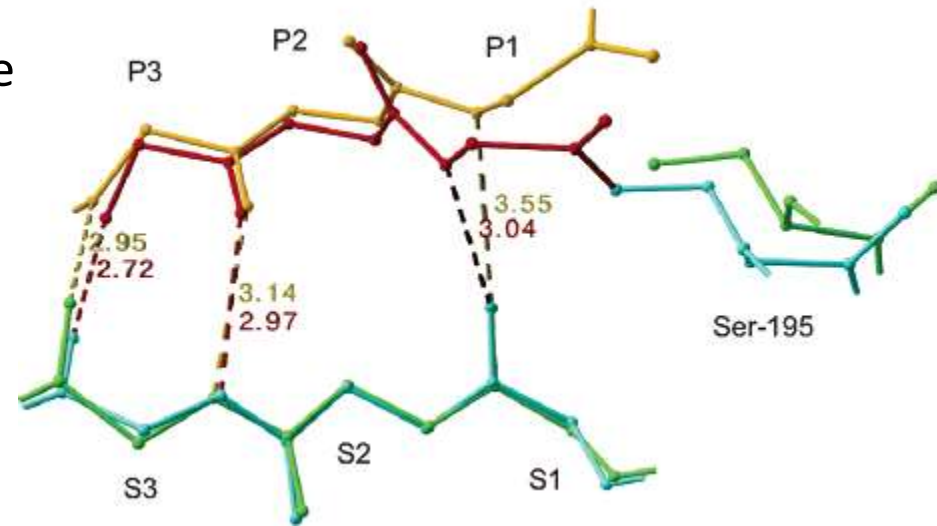
Bone et al, Biochemistry 26, 7609, 1987

Térszerkezetek szerepe a fehérjeműködés feltárásában

Enzim mechanizmus felderítése

Pl. szerin proteázok
atomi felbontású enzim-inhibitor szerkezete
összehasonlítása

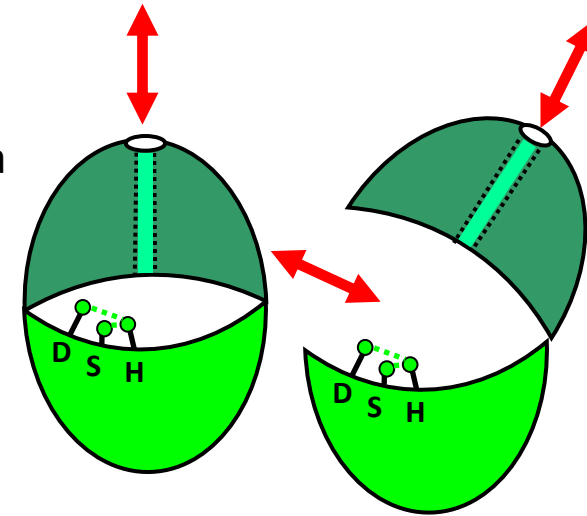
- Az acil-enzimet rövidebb enzim-szubsztrát hidrogénkötések stabilizálják
- Mindkét kémiai reakcióban a merőlegesen helyezkedik el a támadó csoport az amid-ill. észtercsoport síkjára



Térszerkezetek szerepe a fehérjeműködés feltárásában

Enzim mechanizmus felderítése

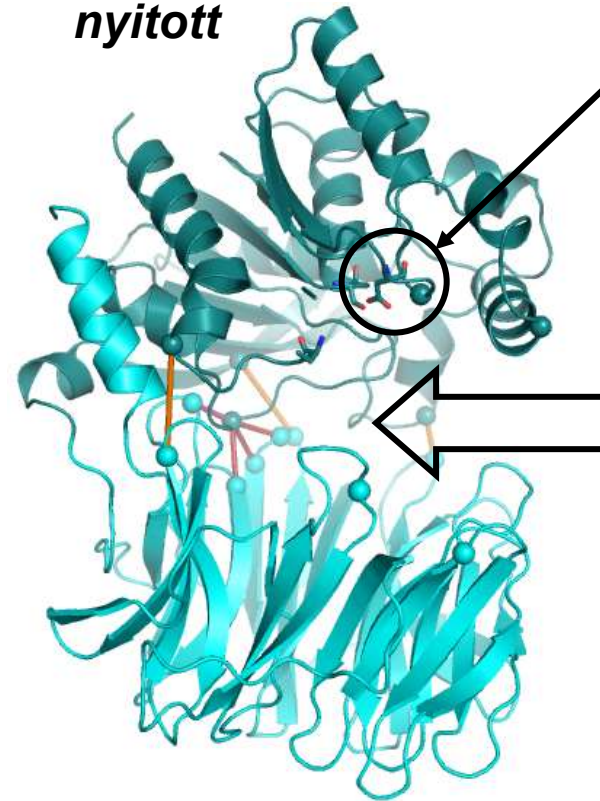
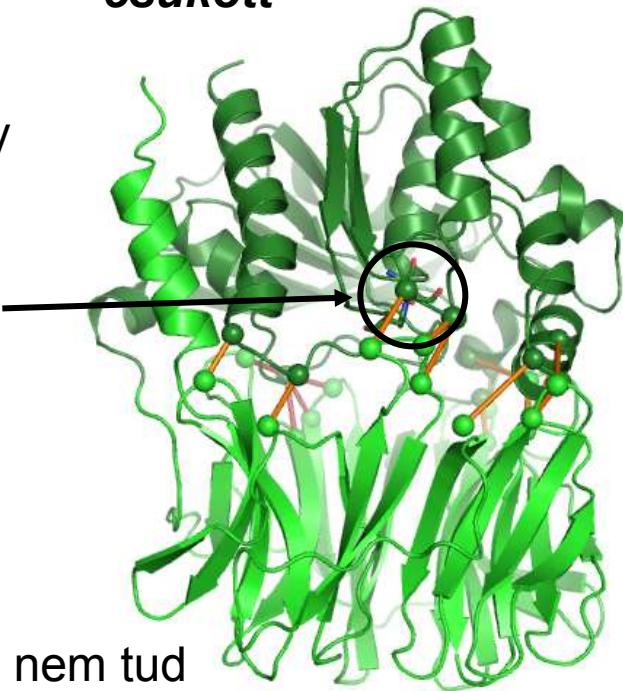
Pl. szerin proteázok, katalitikus reakció és méretszelekció csatolása oligopeptidázok



csukott

nyitott

Az aktív hely intakt, a reakció lejátszódhat



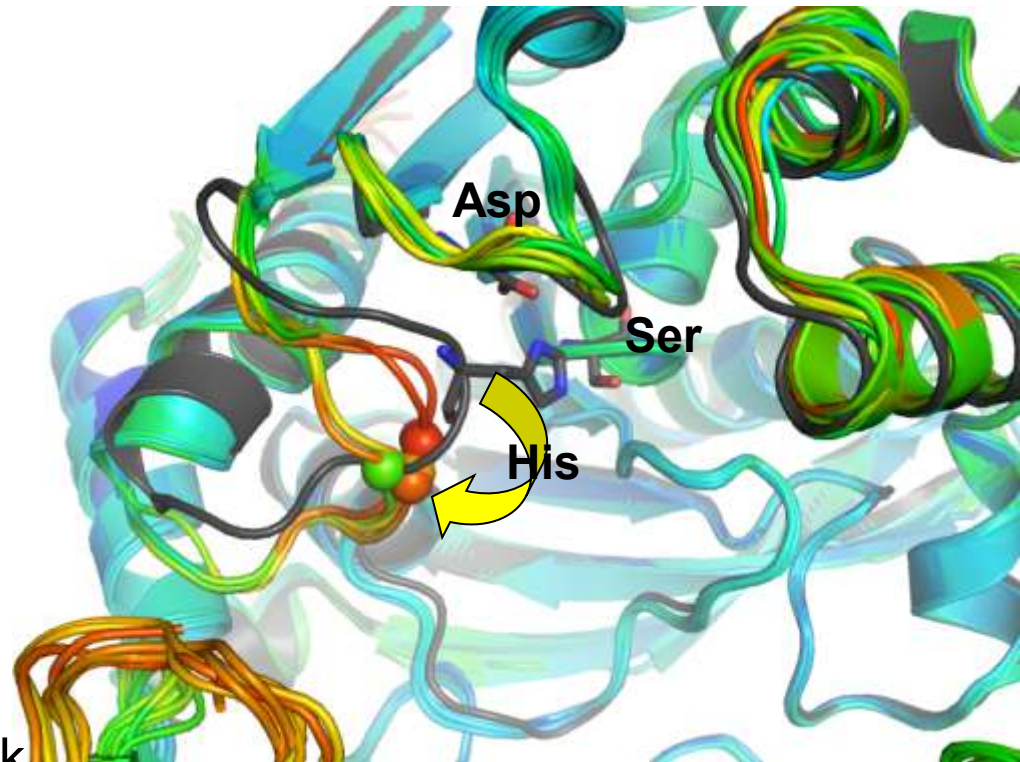
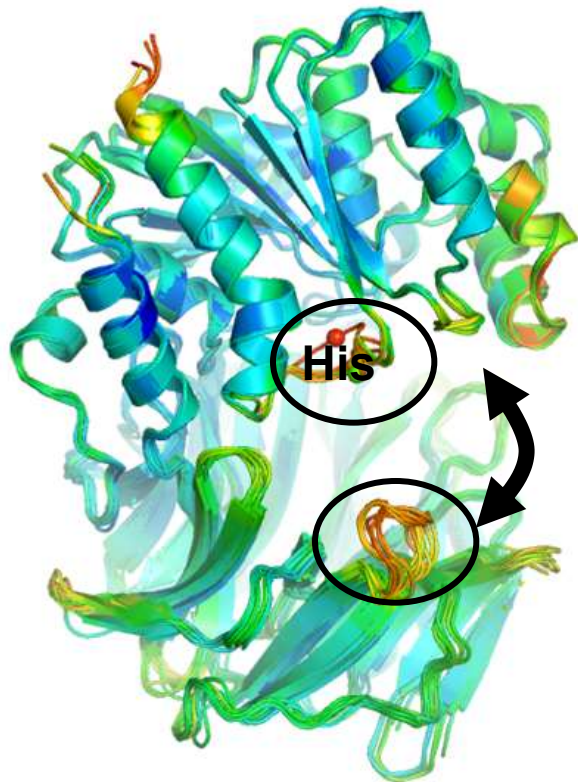
Katalitikusan inaktív konformáció

A szubsztrát bejutása lehetséges

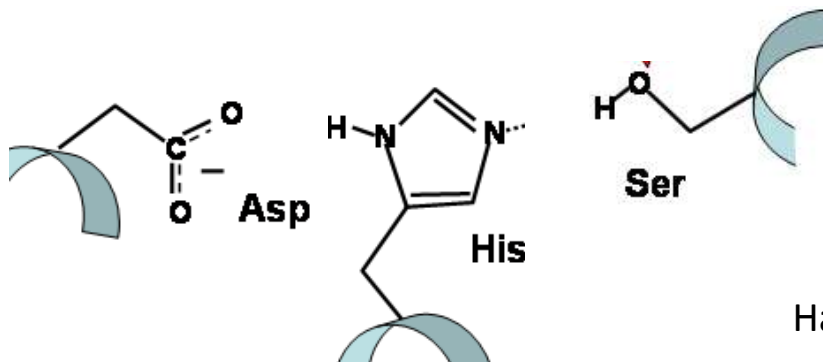
A szubsztrát nem tud bejutni az aktív helyhez

Térszerkezetek szerepe a fehérjeműködés feltárásában

Enzim mechanizmus felderítése



A His-hurok kinyíláskor destabilizálódik.



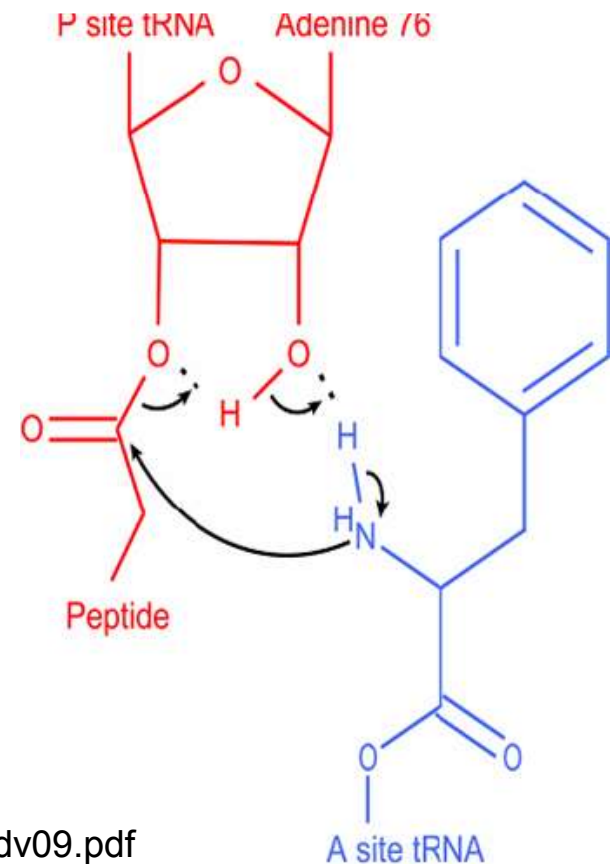
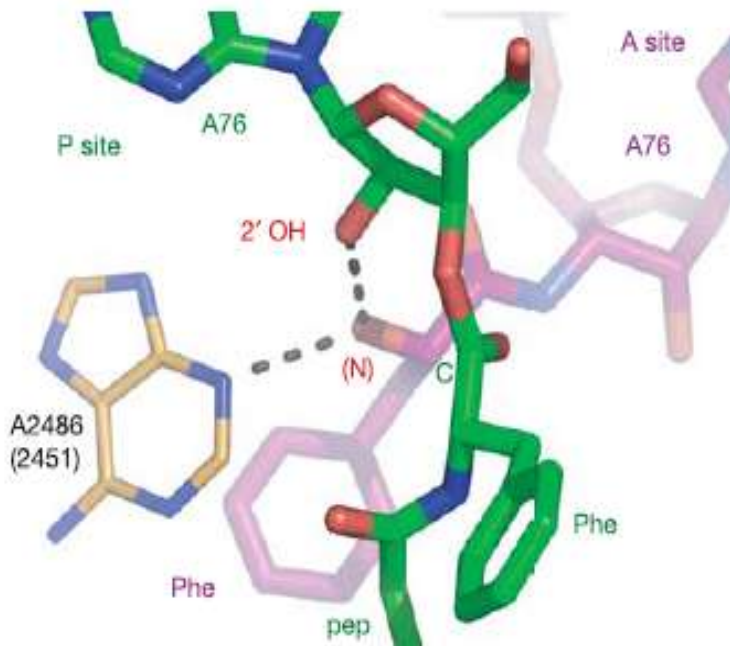
mozgékony
merev
csukott szerkezet

Térszerkezetek szerepe a fehérjeműködés feltárásában

Enzim mechanizmus felderítése:

A katalitikus lépés felderítése átmeneti állapot vagy szubsztrát analóg ligandummal és/vagy inaktív mutáns enzimmel

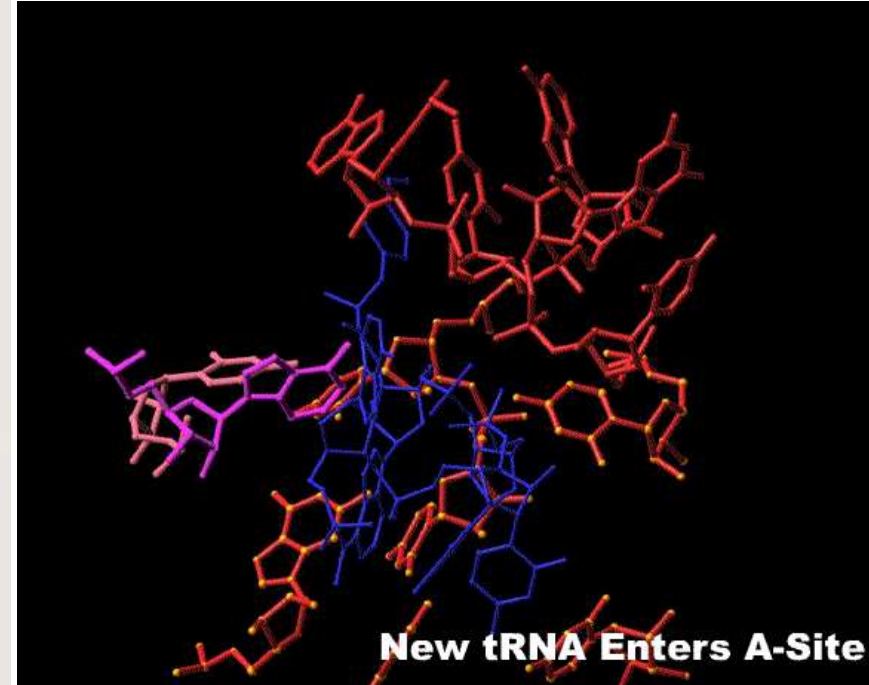
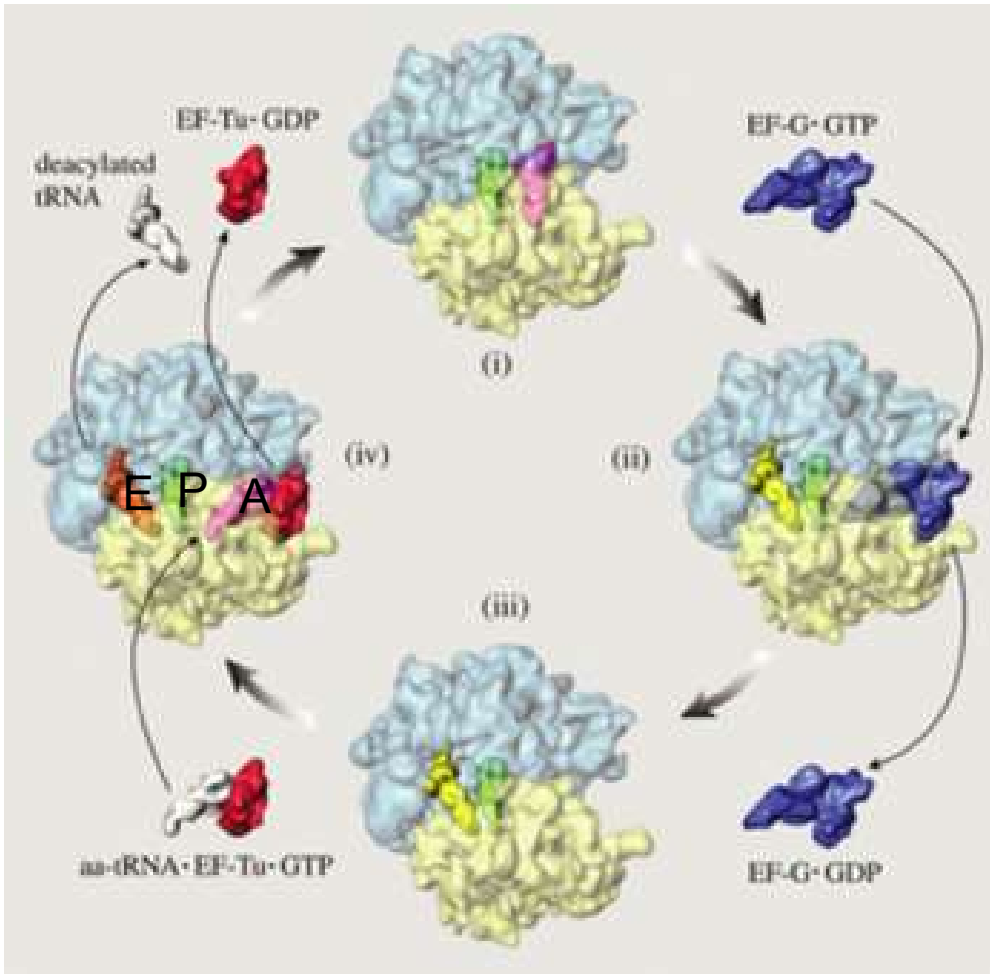
- Komplex a reakció szubsztrátjával analóg molekulával
Pl. riboszóma: a peptidkötés szintézise (helye: 50S alegység)
Katalizátor csoport: Adenin 2486



Térszerkezetek szerepe a fehérjeműködés feltárásában

Kölcsönhatások, molekuláris felismerés

- Fehérje-ligandum és fehérje-fehérje komplexek



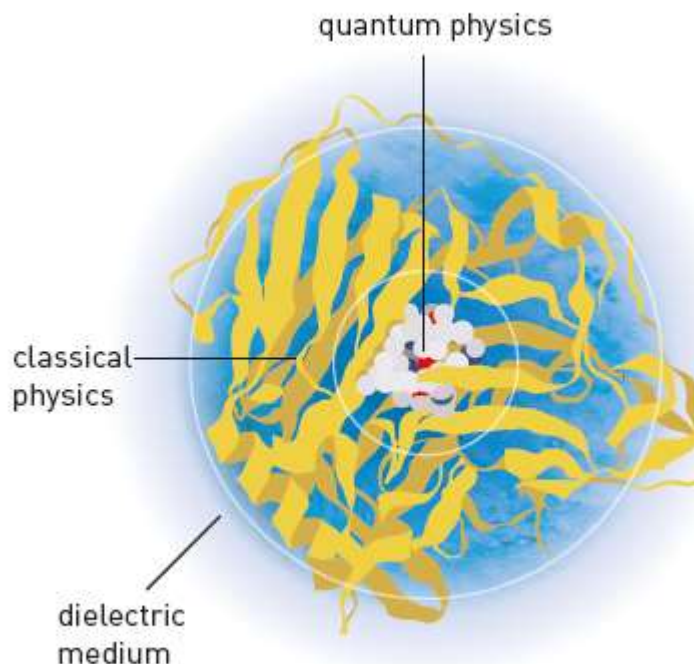
Pl. Riboszóma:

A tRNS elmozdulása az A-ról a P kötéshelyre - (különböző (stabil) komplexek összehasonlítása)

Térszerkezetek szerepe a fehérjeműködés feltárásában

Térszerkezetek felhasználása molekulamodellezés kiindulópontjaként

„The Nobel Prize in Chemistry 2013 was awarded jointly to Martin Karplus, Michael Levitt and Arieh Warshel "for the development of multiscale models for complex chemical systems.”

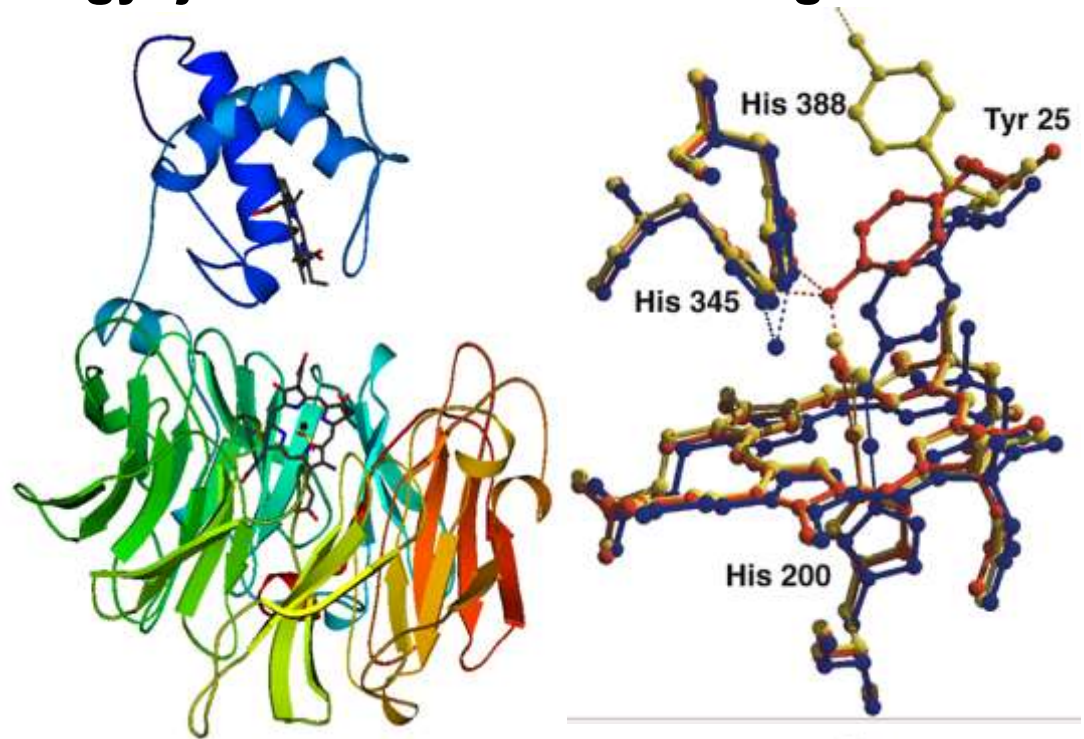
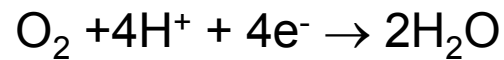
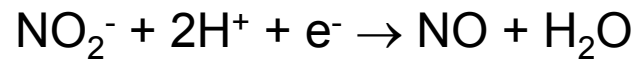


Időfelbontásos krisztallográfia 1.

A reakció befagyasztása, adatgyűjtés monokromatikus sugárzással:

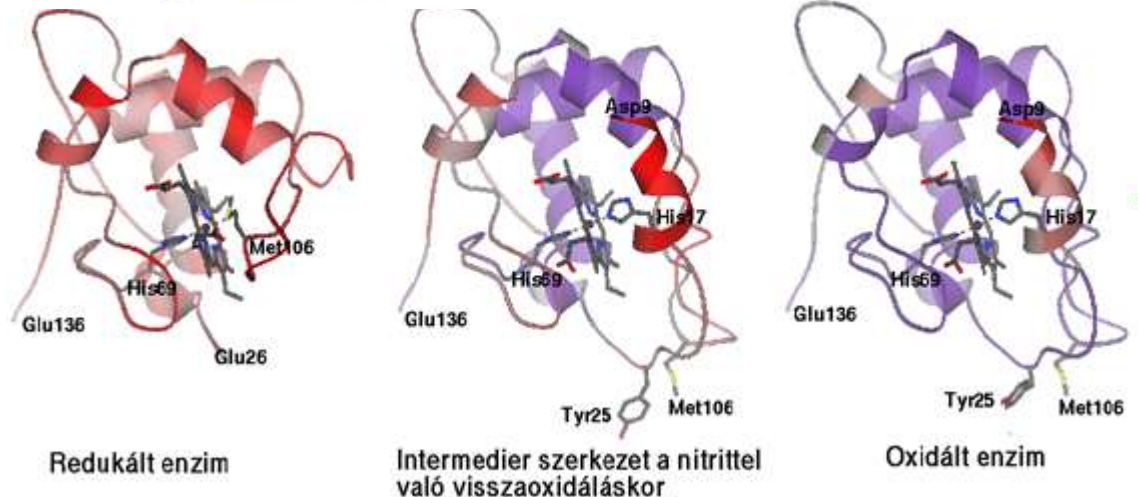
- ▶ lassú reakció
- ▶ a közti termék elég nagy

Citokróm cd1 nitrit reduktáz



J.Hajdu et al, Nat.Struct.Biol.7,1006,2000

Williams et al. Nature 389,406,1997



Időfelbontásos krisztallográfia 2. – időfelbontásos felvételek

Feltétele:

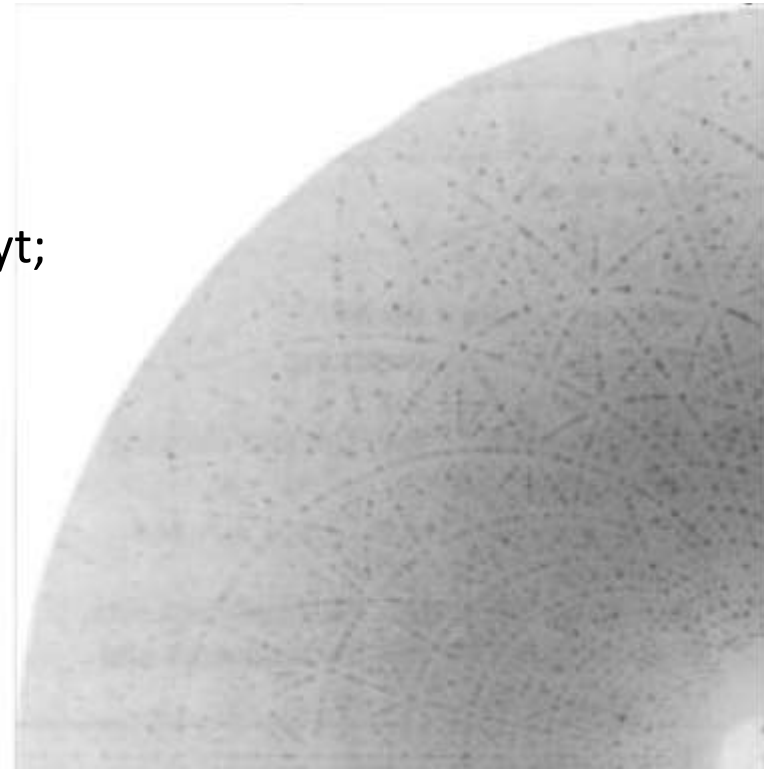
- ▶ elegendően lassú reakció
- ▶ az egész kristályban egyszerre indítható (pl. fotoreakció)
- ▶ a közti termék elég nagy koncentrációban
- ▶ jó minőségű kristály (M.Schmidt et al, Methods Mol. Biol.,305,115,2005)

Időfelbontás ~ 100 ps – 5 ns

Mérés szinkrotron sugárforrásnál:

- a mérés a röntgen impulzusokhoz hangolható
- fehér röntgensugárzás: nem kell forgatni a kristályt;
pillanatfelvételek

Polikromatikus
röntgensugárzással:
Laue felvételek



Időfelbontásos felvételek kiértékelése

Laue felvételek – adatkészlet nem teljes

Differencia elektronsűrűségi térképek készítése a monokromatikus sugárzással készített 'kiindulási állapothoz képest

Közti termékek azonosítása, átlagolás időben

Döntés különböző kinetikai modellek között

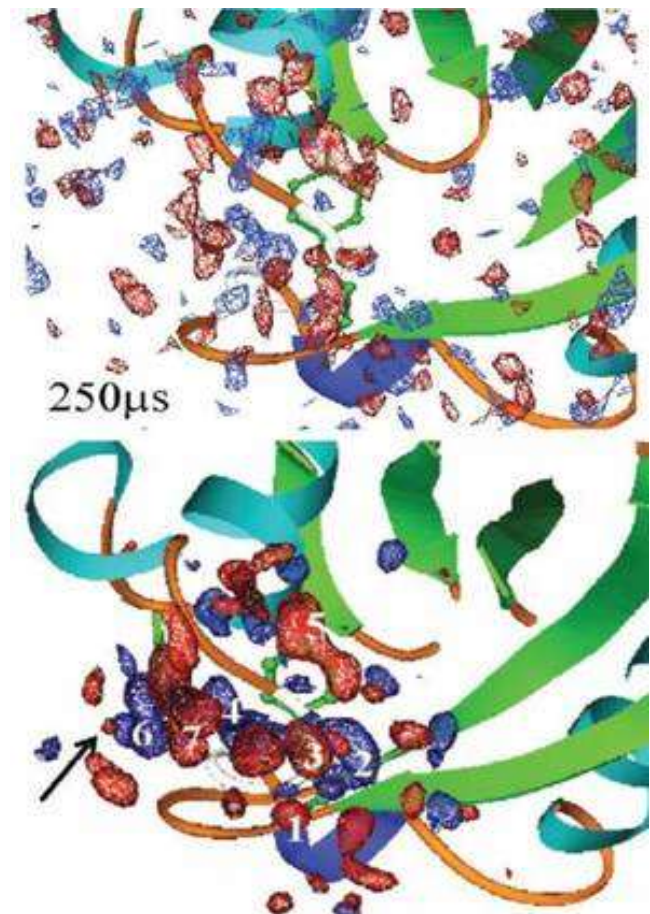
Fotoaktív sárga protein

(M.Schmidt et al, Methods Mol. Biol., 305, 115 2005)

1. Kék fény hatására para-kumarinsav transz→cisz
2. Sötét szakasz: a fehérje relaxálódása (szub ps-ms)

A fotociklus jellemzése 100ps-1s

- ábra - differencia elektronsűrűségi térkép zaj simítás előtt
- időfüggetlen differencia elektronsűrűségi térkép
 - a közti termék modellezett elektronsűrűségi térképe



Időfelbontásos felvételek kiértékelése

Közi termékek azonosítása, átlagolás időben
Döntés különböző kinetikai modellek között

Jung et al Nat. Chem. 5:212 2013

