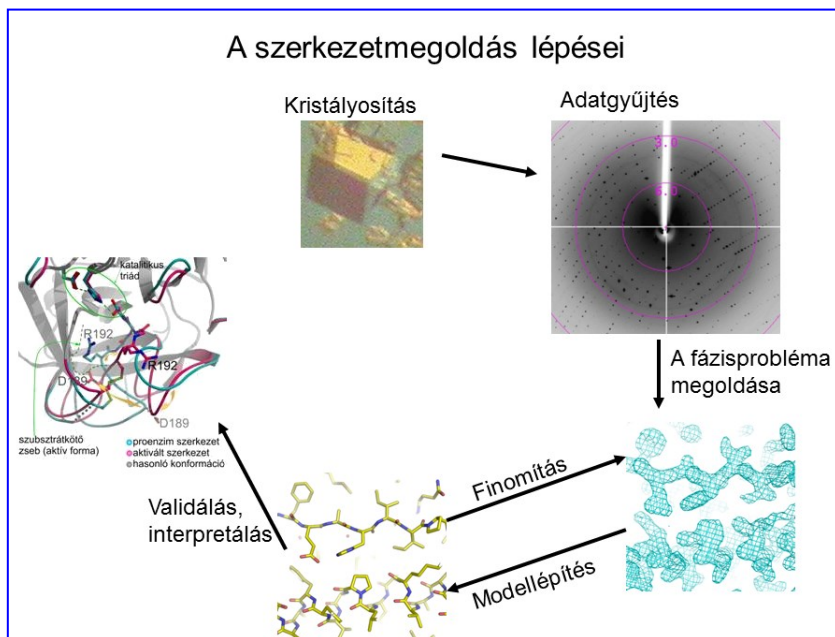


Fehérjekristallográfia

A gyakorlat célja:

1. Bemutató: fehérjekristályok előállítása, a kristályosítási kísérletek értékelése
2. Bemutató: röntgendiffrakciós mérés
3. Fehérjeszerkezet megoldás – modellépítés és finomítás példafeladatok
4. Szerkezetvalidálás



A felhasznált programok ingyenesen letölthetők:

Honlapjaik (letöltés, dokumentáció ...):

CCP4 www.ccp4.ac.uk

Phenix <https://www.phenix-online.org/>

Coot (tartalmazza a Phenix és CCP4 programcsomag is)

Magyar nyelvű röntgendiffrakciós jegyzet:

http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011_0025_vegy_1/adatok.html

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

Lizozim szerkezetmegoldáshoz letölthető példafájlok és rövid magyarázatok:

<http://harmatv.web.elte.hu/Rontgendiffrakcio-jegyzet/Peldafajlok-szerkezetmegoldas/>

Eszközök*:

Kristályosítás:	TTP Labtech Mosquito LCP
Kristálynövekedés monitorozása:	Formulatrix RockImager 2
Diffraktométer:	Rigaku CrystaLAB Synergy-R

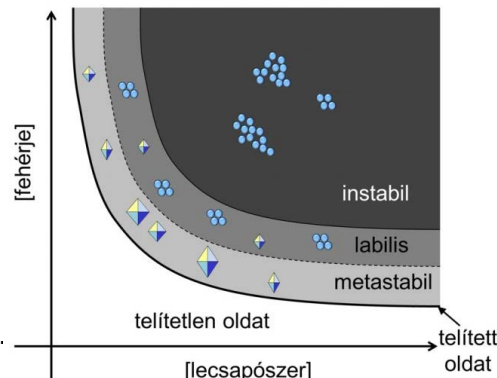
* A műszerfejlesztés az Európai Unió és Magyarország Kormánya támogatásával valósult meg, az Európai Regionális Fejlesztési Alap hozzájárulásával VEKOP-2.3.2-16-2017-00014 és VEKOP-2.3.3-15-2017-00018 pályázatok keretében.

1. Kristályosítás

A kristályosítás első lépése a kristályosítási körülmények előszűrése (sok, nagyon különböző kristályosítási körülmény tesztelése), célja:

- A fehérje kristályosítási fázisdiagramjának feltérképezése (szisztematikus kísérletek pl. PACT screen, PEG-ION screen; Stura footprint screen)
- Az elképzelhető összes körülményből egyetlen mintavétel (ritka mátrix screen, pl. JCSG+ screen, Structure screen 1-2, Proplex screen)

Feladat: előzetes szűrés kísérleteinek kiértékelése



1A) Adatok

- fehérjeoldat összetétele:
- kísérleti körülmények (ld. függelék):
- kristályosító cseppek összetétele:
- hőmérséklet:
- dátum, kristályosítás: monitorozás:

1B) Jelölje meg a kristályosító tálca sematikus rajzán, hogy melyik cseppben mi történt:

0:- csapadék:1(por) 2(granuláris) 3(amorf) 4(mikrokristályos) :fázisszeparáció:5 kristály:6(mikro) 7(tű) 8(lap) 9(3D)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
B	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
C	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
D	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
E	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
F	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
G	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
H	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

1C) A függelék alapján:

Hány körülményben volt kristályképződés?

Hányféle kristály morfológiát láthatunk?

Azokra az oldatokra, amikben kristályok képződtek, mi jellemző:

Nagy ionkoncentrációjú sók típusa („kisózás”)

pH tartomány

Nemionos lecsapószer típusa, + kis koncentrációjú sók („besózás”):

pH tartomány

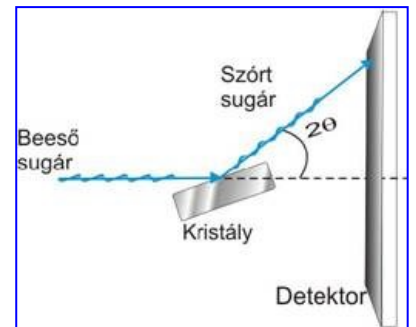
Optimalizáláshoz kiválasztott körülmények:

.....
.....
.....

2) Adatgyűjtés (röntgendiffrakciós mérés)

A röntgendiffrakciós mérés célja az összes reflexió megmérése a lehető legkisebb expozíciós idővel (dózis), emellett a redundancia növelése.

$$2d \sin\theta = n\lambda$$



2A) Adatok:

Mérési hőmérséklet:

A fehérjekristály típusa: mérete

2B) A tesztmérés alapján

Várható felbontás: Kristályminőségi problémák?

Elemi cella paraméterek és kristályrendszer:

2C) A mérési stratégia és mérési idő hogyan változik, ha

változtatjuk a kristályrendszert:

változtatjuk a várható felbontást:

Az elindított mérés paramétereit:

Runs/frames (különböző elforgatási tartományok/diffrakciós képek száma):

Teljes mérési idő: Beállítások:

3) Modellépítés

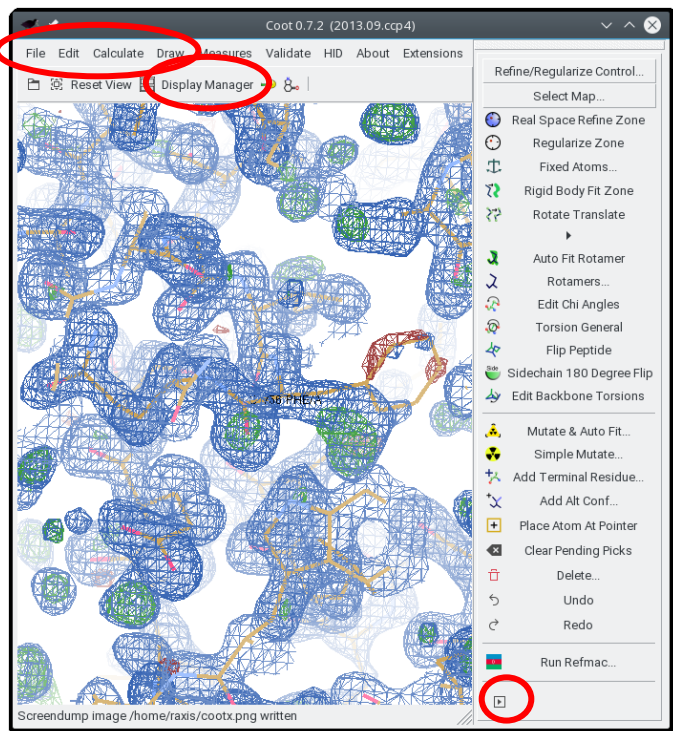
Indítsuk el a **Coot** programot!

- A szerkezet beolvasása : **File > Open Coordinates**
- A térképszámoláshoz szükséges fázisok és amplitúdók **File > Auto Open MTZ**

Beállítások:

- **Display Manager** (középső egérgomb görgetése - melyik térkép kontúrszintjét állítja)
- **Draw > Cell and Symmetry** (A *Master Switch Yes*-re, -> *Apply* és *OK*). kristályban szomszédos molekulák megjelenítése
- **Draw > Go to Atom** A kis ablakban tudunk lépegetni a szekvencia szerint.

Az ablak jobb oldalán levő eszköztár alján kattintsunk a nyílra: jelenítsük meg a gombok szöveges feliratait:



A megjelenített térképek:

- kék háló $2F_o - F_c$ típusú differencia térkép, pozitív, ahol van atom a szerkezetben. Javasolt elektronsűrűségi szint 1-1,5 σ (egérgöggővel állítható)
- piros (negatív, ahonnan el kell törölnünk atomokat) és zöld (pozitív, ahova be kell raknunk atomokat) háló: $F_o - F_c$ típusú térkép. Javasolt elektronsűrűségi szint 3-3,5 σ (egérgöggővel állítható).

Irányítás:

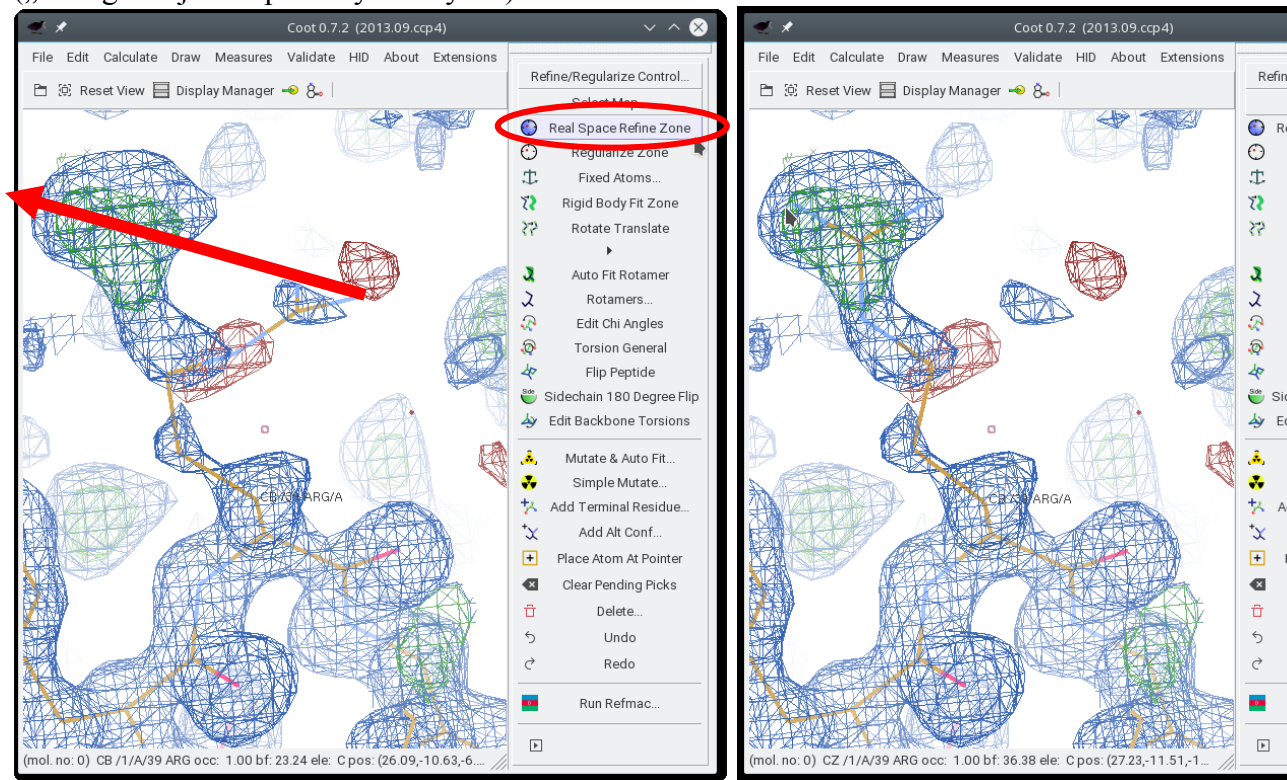
- BAL EGÉRGOMB: forgatás, atomok kiválasztása (*atomra* kell klikkelni)
- KÖZÉPSŐ EGÉRGOMB: centrálás másik atomra; görgetés: megjelenített elektronsűrűségi szint
- JOBB EGÉRGOMB: zoom

Általános tanácsok:

- Sose hagyjunk műveletet befejezetlenül (**Accept** vagy **Cancel**)
- Időnként mentjük el a szerkezetet (**File > Save coordinates**)

A szerkezet javítása a jobb oldali parancsok segítségével történik

- Hiányos oldallánc kiegészítése (ha van elektronsűrűsége): **Mutate and Auto Fit** (az aminosav kiválasztása egy atomjára klikkeléssel, majd az aminosavnév kiválasztása a listáról)
- Ha a térképen nem látható egy atomcsoport, töröljük el (**Delete ...**)
- **Rotamers**, vagy **Auto Fit Rotamer** Oldallánc konformációjának megváltoztatása
- **Flip peptide és Sidechain 180 degree fit**: főlánc; Asn, Gln, His átfordítása; a H-kötések alapján!!
- **Real Space Refine Zone** Egy vagy több aminosav illesztése az elektronsűrűségi térképhez: A fehérrel jelölt illesztett szerkezetrészletet bal egérgombbal megfoghatjuk, és elhúzzhatjuk („rácigálhatjuk” a piros nyíl irányába).



Illesztés előtt...

és után.

- **Láncszakadás kijavítása:**
 - Add **Terminal Residue** (melyik aminosav előtt vagy után akarunk egy másikat beépíteni)
 - az új beépített aminosavat (alanint) helyezük el a térképnek megfelelően: több kör **Real Space Refine Zone**, különböző méretű zónákkal (az új aminosav + előtte- és utánalevők)
 - (- további aminosavak beépítése **Add Terminal Residue** és **Real Space Refine Zone**)
 - oldalláncok generálása **Mutate and Auto Fit** majd **Real Space Refine Zone**

3A) Feladat: építsünk be egy-egy fehérjeszakaszt különböző felbontású térképekbe

A modellépítés menete: a szekvencia mentén lépegetve vizsgáljuk meg minden aminosavat, hogy jól illeszkedik-e a térképbe; és ha kell, javítsuk!

Fájlok:

Felbontás:.....

Átépitett fehérjeszakasz:

Hogyan befolyásolja a térkép minőségét a felbontás:

Keressen olyan aminosavat, aminek nem látszik az oldallánca a térképen!

Tipikusan milyen típusú aminosavak ezek?

Mi az oka annak, hogy nem látszanak?

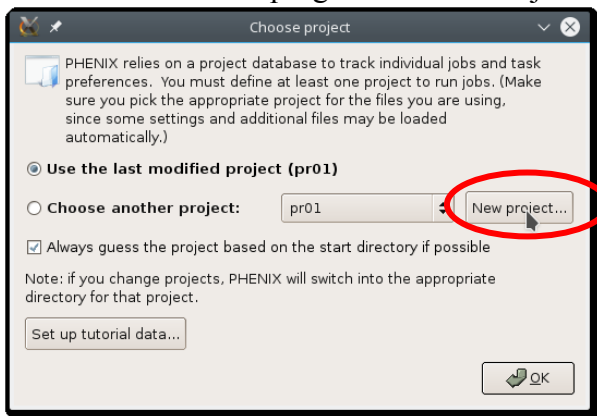
Volt-e olyan aminosav, aminek nem volt egyértelmű a konformációja?

Vizsgáljon meg néhány Asn, Gln vagy His oldalláncot a hidrogénkötések szempontjából!

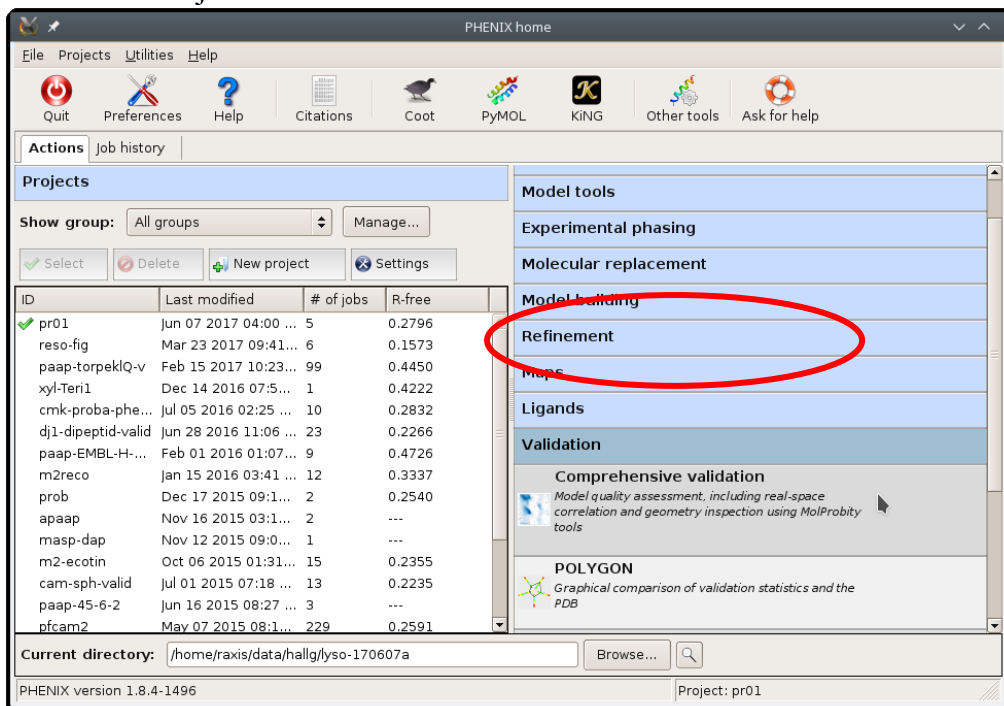
.....

4. Szerkezetfinomítás, szerkezetvalidálás

Indítsuk el a **Phenix** programot. Definiáljunk egy új projektet, a munkakönyvtárunkat megadva.



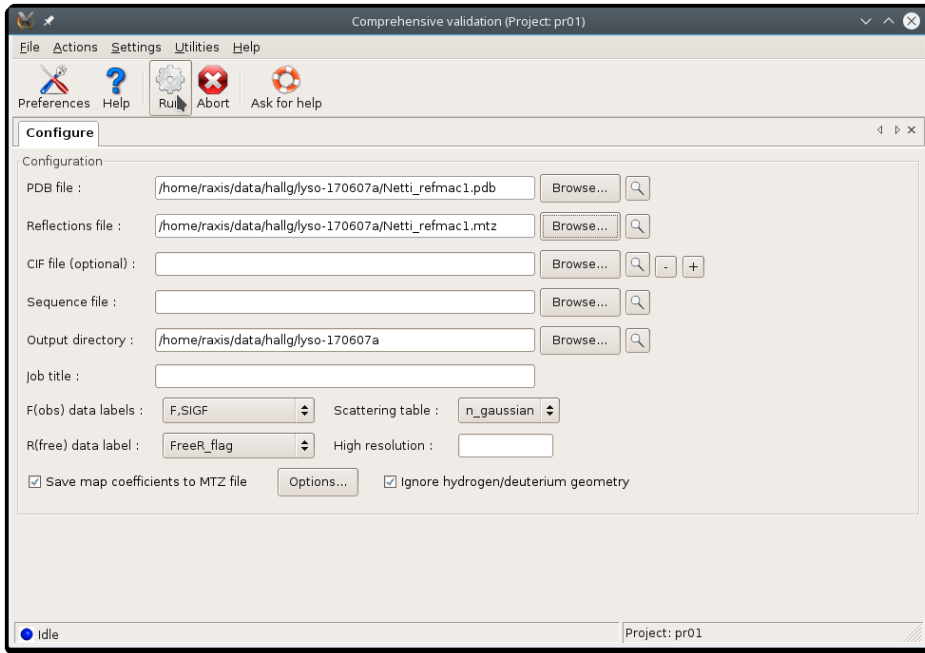
Minden Phenix-ben futtatott program egy sorszámozott alkönyvtárat nyit a munkakönyvtárunkban. Válasszuk ki a jobb oldali menüből: **Refinement**.



4A) Configure fül:

Adjuk meg a modellépítéskor elmentett pdb fájlt (koordináták) és a kiindulási mtz fájlt (mért amplitúdók):

Configure > Input files Add file



Különböző finomítási stratégiák próbálhatók ki, amelyek a szerkezetet leíró paraméterek számában különböznek

-hogyan írjuk le a szerkezeten belüli mozgékonyt/rendezetlenséget: *B-faktorok; TLS paraméterek*

-ha nem atomi a felbontásunk, a molekulageometriai kényszerfeltételekre van szükség a molekulageometria megtartásához (kötéshosszak, kötésszögek, királis és síkalkatú csoportok)

A finomítás során a mért és a modelltől számolt amplitúdók eltérését (pl. $\sum_{\text{reflexiók}} (F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}})^2$) és a geometriának az ideális geometriától való eltérését (pl. $\sum_{\text{kötések}} (d_{\text{aktuális}} - d_{\text{ideális}})^2$) különbözőképpen súlyozva minimalizáljuk.

4A) Refinement settings fülben állítsuk be:

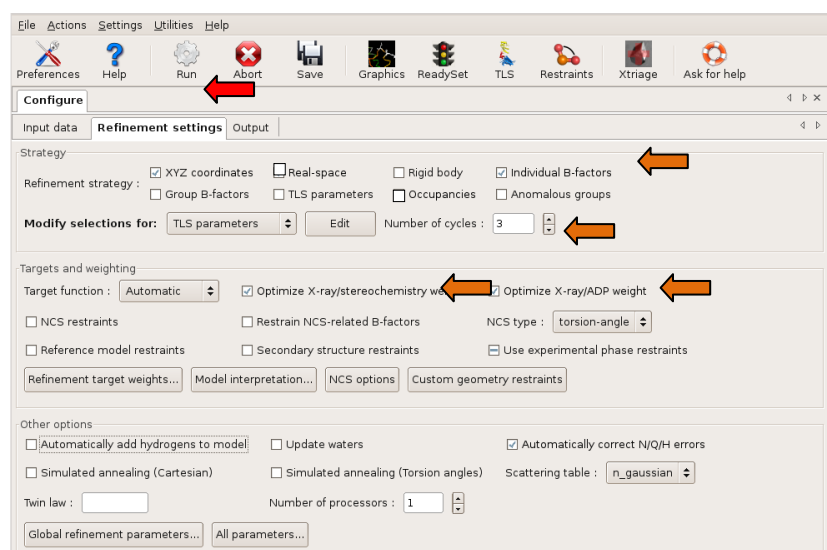
XYZ coordinates (3 paraméter/atom)

Individual B-factors (1 paraméter/atom)

Refinement cycles: 2

Optimize

RUN: indítsuk el a finomítást



A finomítás után automatikusan megtörténik a **validálás** is.

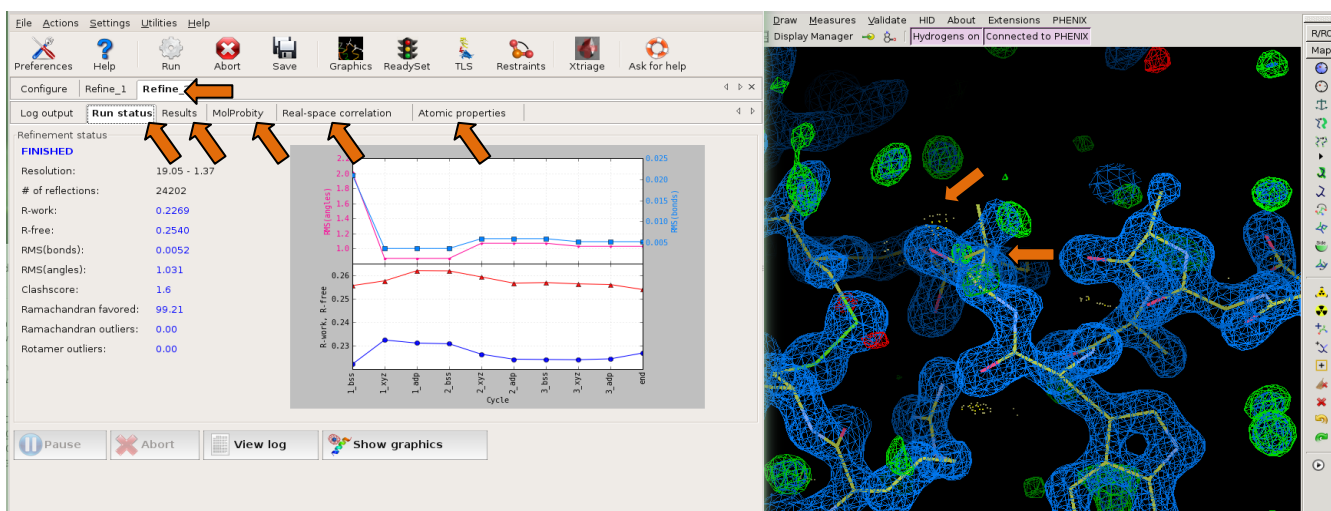
- **Run status; Results** fül: illeszkedés a mért adatokhoz: R-faktor

R-faktor:

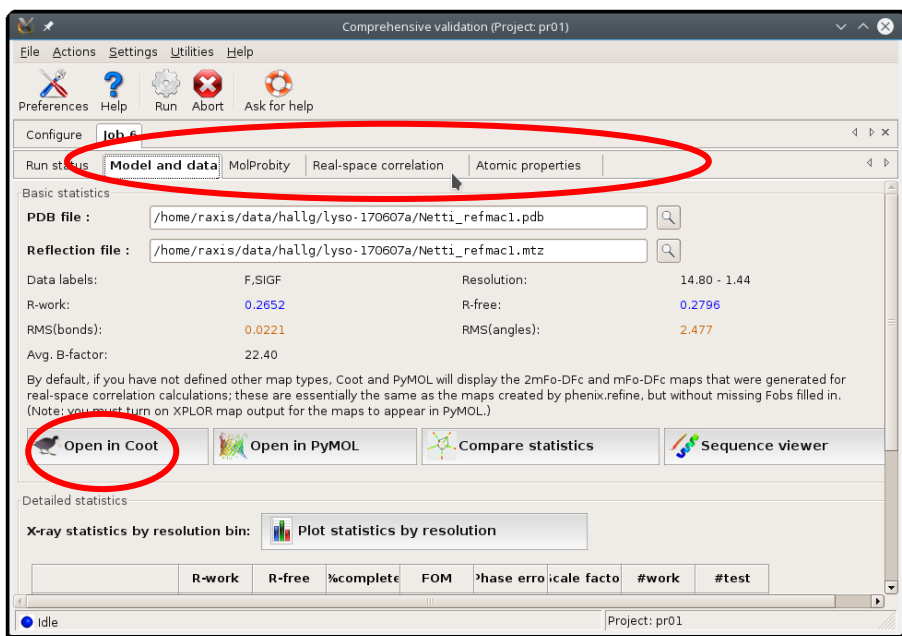
Makromolekuláknál túlllesztés veszélye miatt szabad R-faktor is

$$R = \frac{\sum_{\text{reflexiók}} |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}|}{\sum_{\text{reflexiók}} F_{\text{obs}}}$$

- **Modell-geometria (Molprobity)** az ideális geometriától jelentősen eltérő kötэшosszak, kötэшzögek, planáris és királis csoportok konfigurációja, torziósszögek (Ramachandran térkép és oldalláncok)
- Kedvezőtlen **másodlagos kölcsönhatások** (clash) – szintén a **Molprobity** fűlnél található.
- A kiugróan **nagy B-faktorú** aminosavak felsorolása az **Atomic properties** fűlnél található.
- A **Model and data** fűlnél indítsuk el a coot programot (Open in Coot) – itt a modell problémás régiói jól láthatóan meg lesznek jelölve a Coot-ban. A validálás táblázataiban a felsorolt problémás aminosavakra kattintva a Coot automatikusan ezekre ráközelít.



(Megjegyzés: a validálás külön is lefutatható, és szerveren is elérhető: Molprobity.)



- Nagyon jó áttekintő grafikon található a **Real-space correlation** fül alatt (**Multi-criterion plot**): elektronsűrűség korreláció; B-faktorok; főlánc (Ramachandran térkép) vagy oldallánc konformáció, kedvezőtlen térbeli közelség.



A validálás eredményei alapján a szerkezetben melyik régiókat kell még javítanunk?
 Vizsgáljuk meg a rossz geometriával rendelkező részeket a szerkezetben: lehetne-e másképpen a térképhez illeszteni a modellnek ezeket a részeit, úgy, hogy a geometriai torzulást kiküszöböljük?
 Vannak-e olyan részek, ahol nagyon kis elektronsűrűség, vagy 'szakadozott', zajos? – Arról, hogy az ilyen helyeken talált elektronsűrűség zaj-e úgy győződhetünk meg, hogy a szerkezetből eltöröljük ezeket az atomcsoportokat, majd egy finomítási ciklus után megvizsgáljuk, hogy újra megjelennek-e az elektronsűrűségi térképen.

4B) Validálás eredményei

Hogyan változott az R és R_{free} a finomítás során? előtte:utána:.....

A szerkezetben melyik régiókat kell még javítanunk?

.....

Vizsgálja meg a rossz geometriával rendelkező részeket a szerkezetben: lehetne-e másképpen a térképhez illeszteni a modellnek ezeket a részeit, úgy, hogy a geometriai torzulást kiküszöböljük?