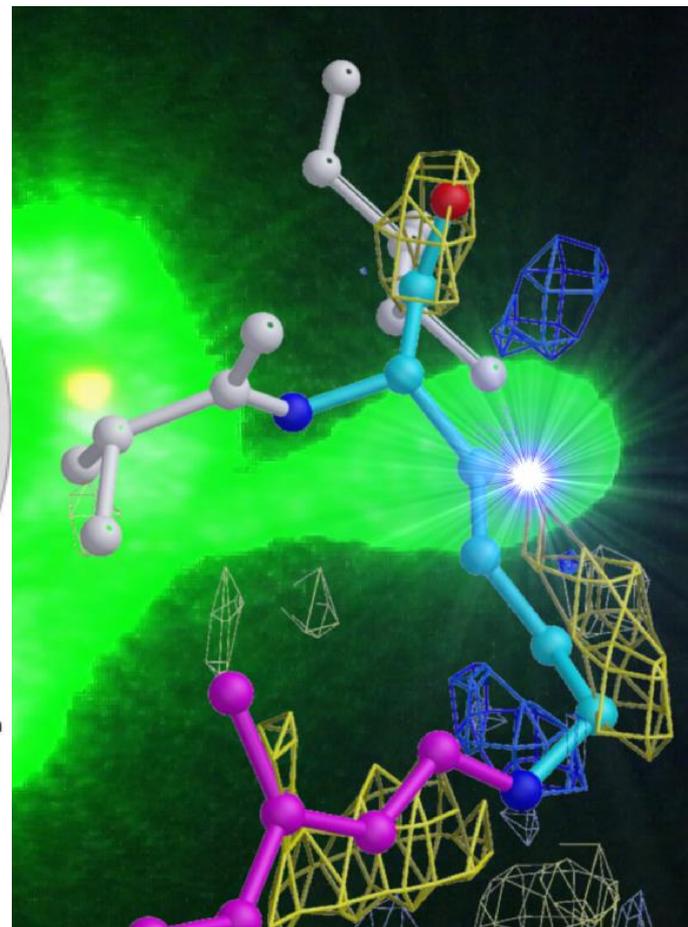
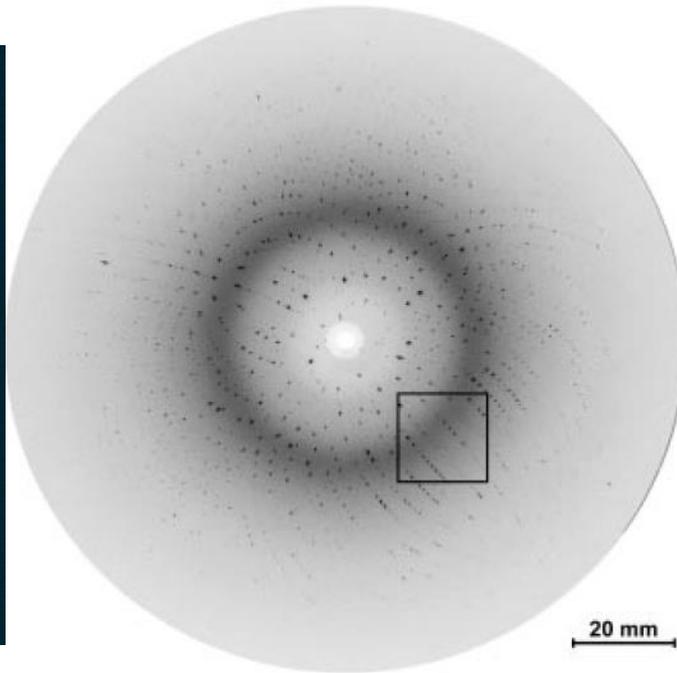
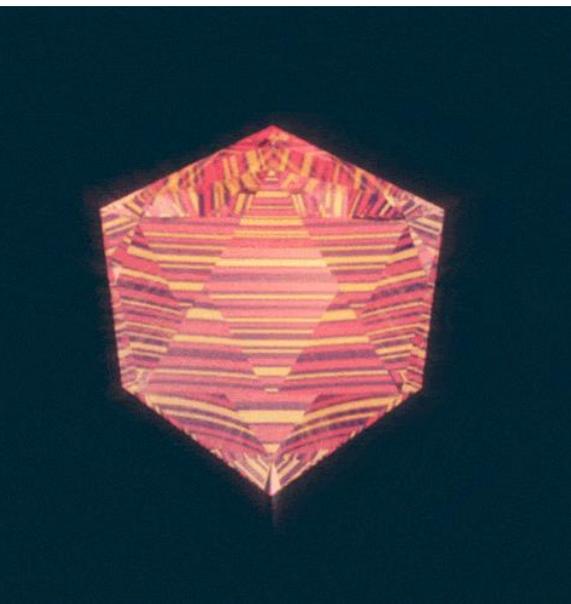
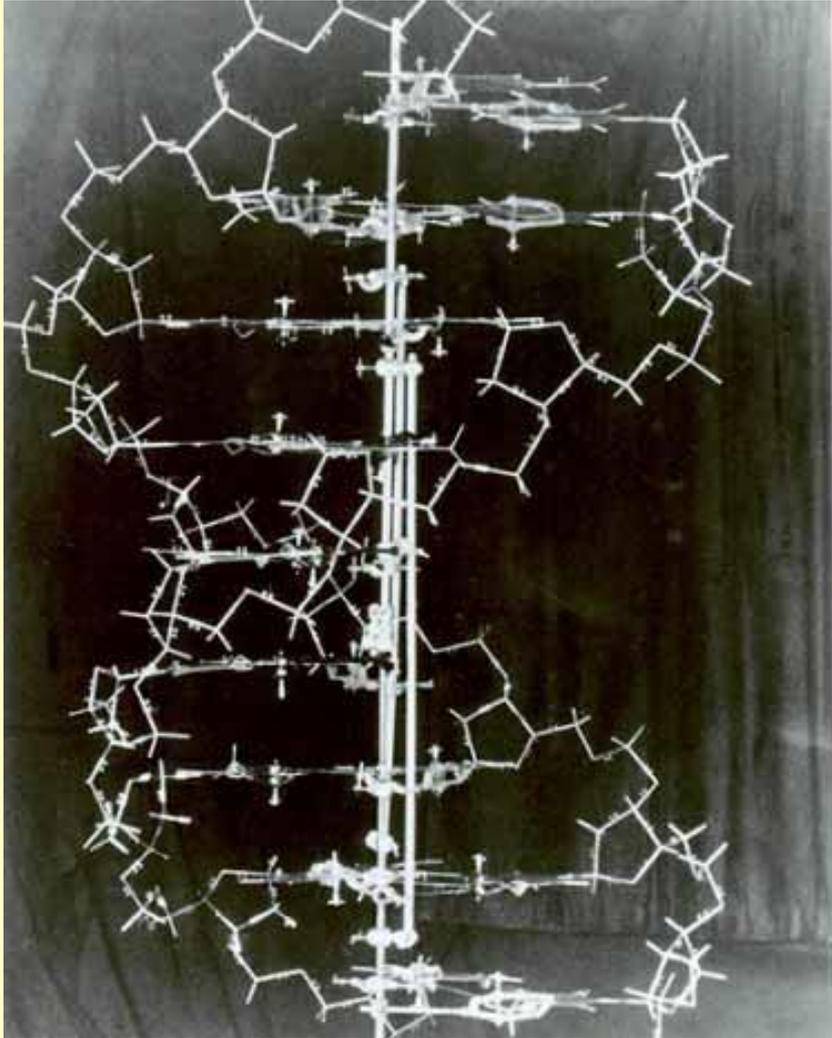


Рентгеноструктурный анализ



1953: Структура ДНК

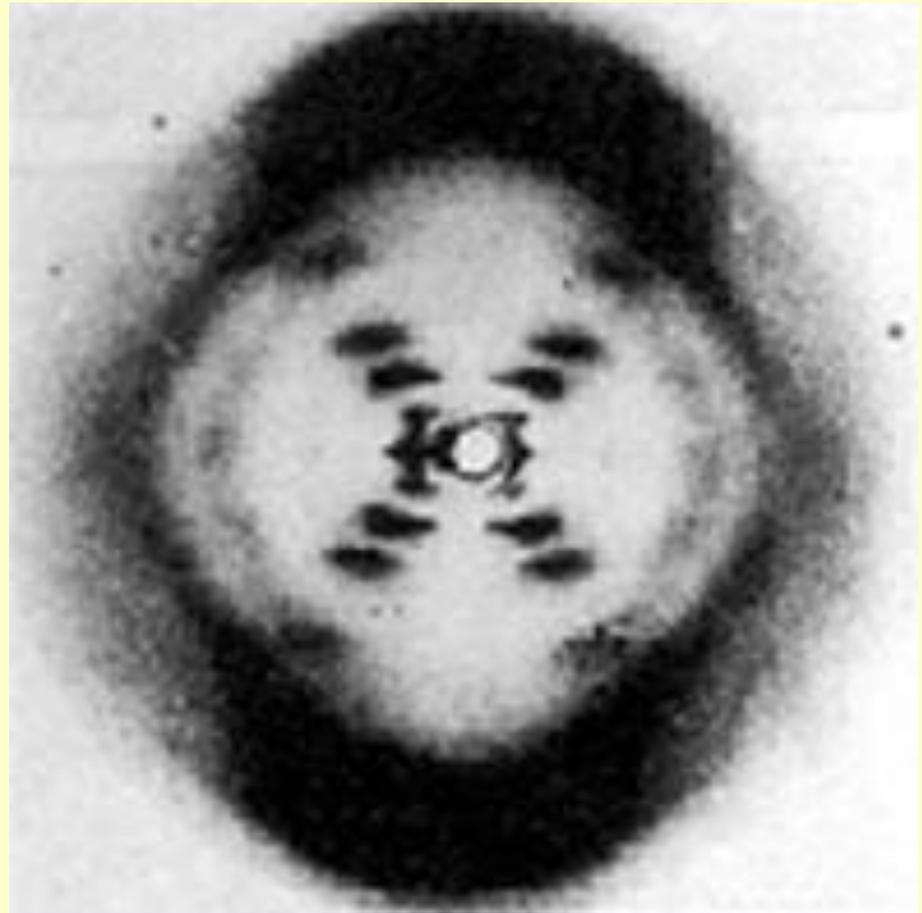
- Уотсон и Крик предложили модель двойной спирали



use only.

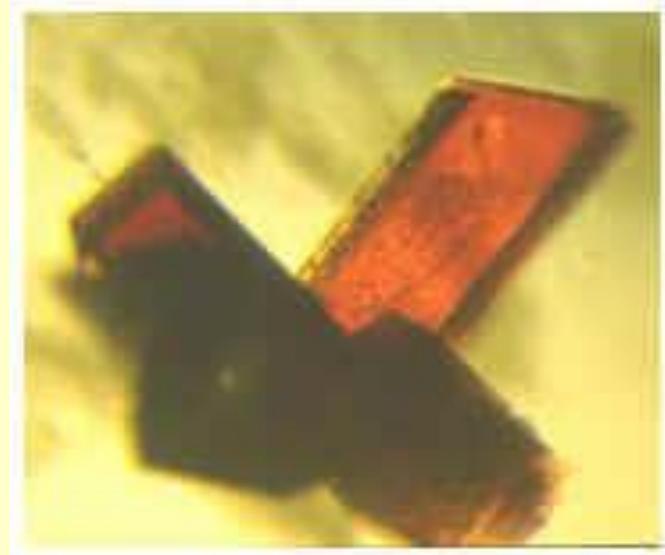
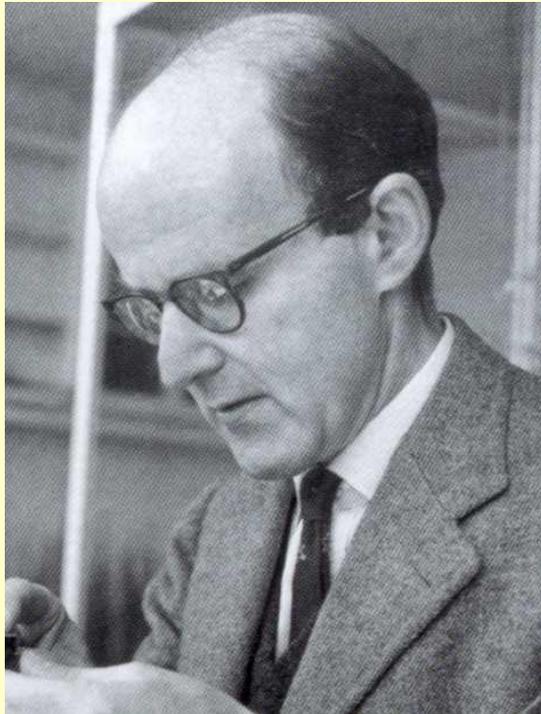
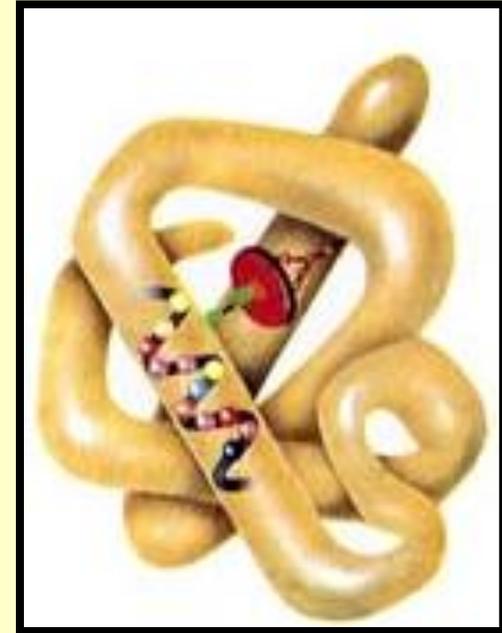


Кристаллы и дифракционная картина были получены Розалиндой Франклин

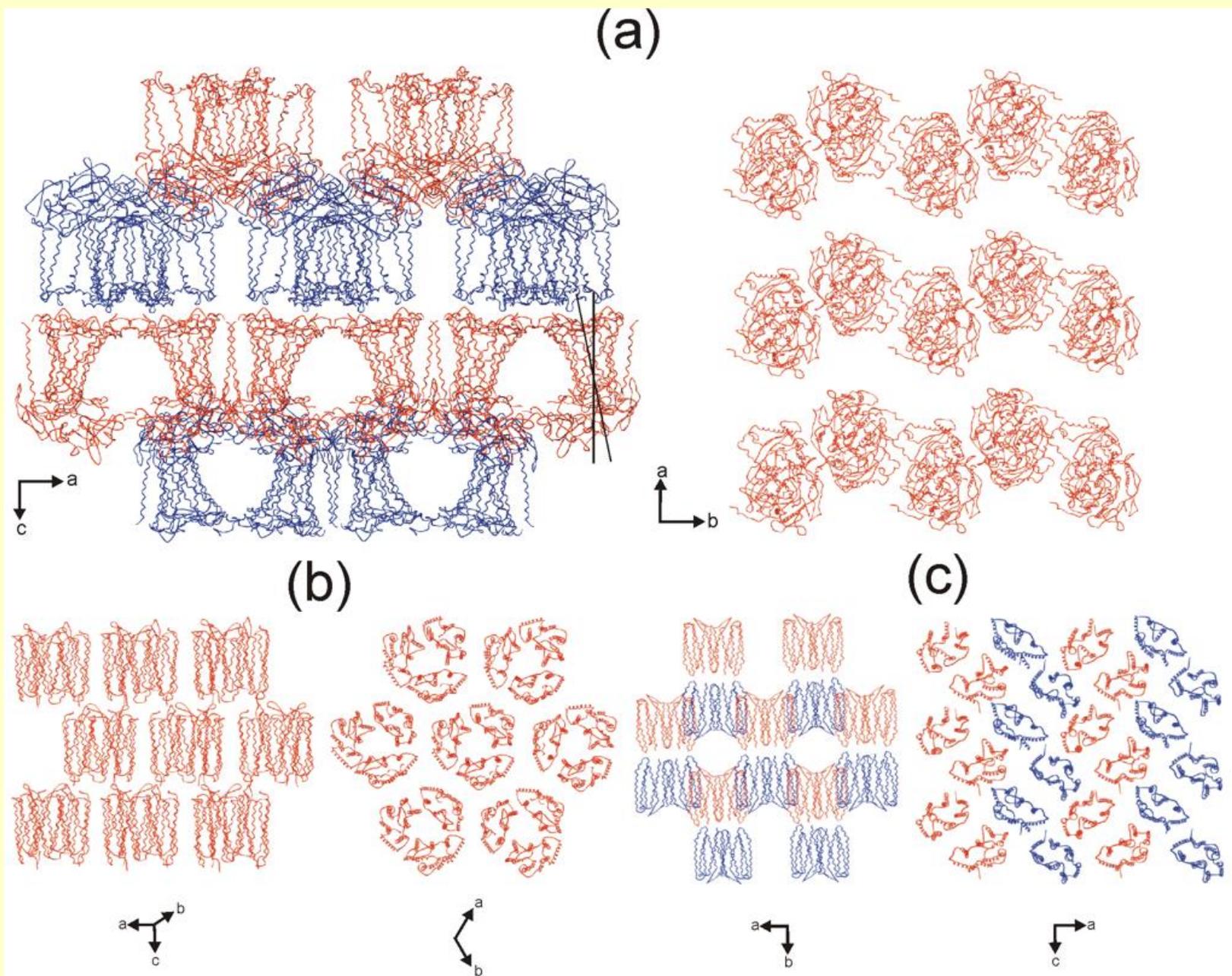


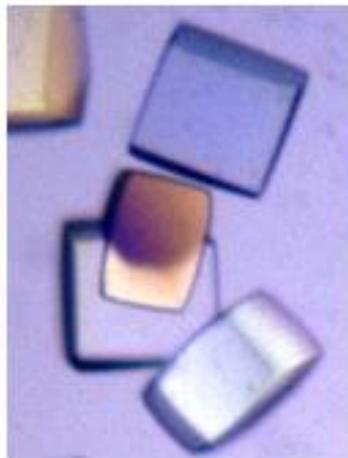
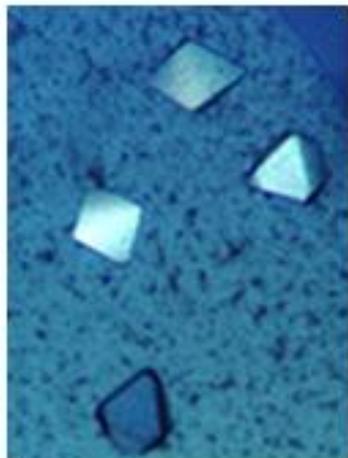
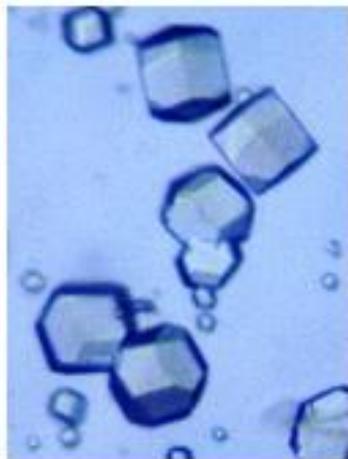
Первая структура белка

- Миоглобин.
 - Получена Максом Перуцем 1958.
 - Продемонстрировала преобладание альфа-спиральной упаковки (75%)
- 155 аминокислот, ~ 17 кДа.



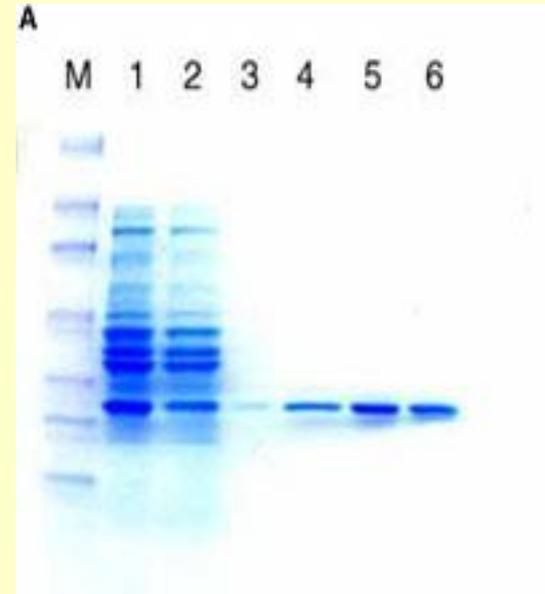
Упаковка белков в кристаллах обладает определенной симметрией





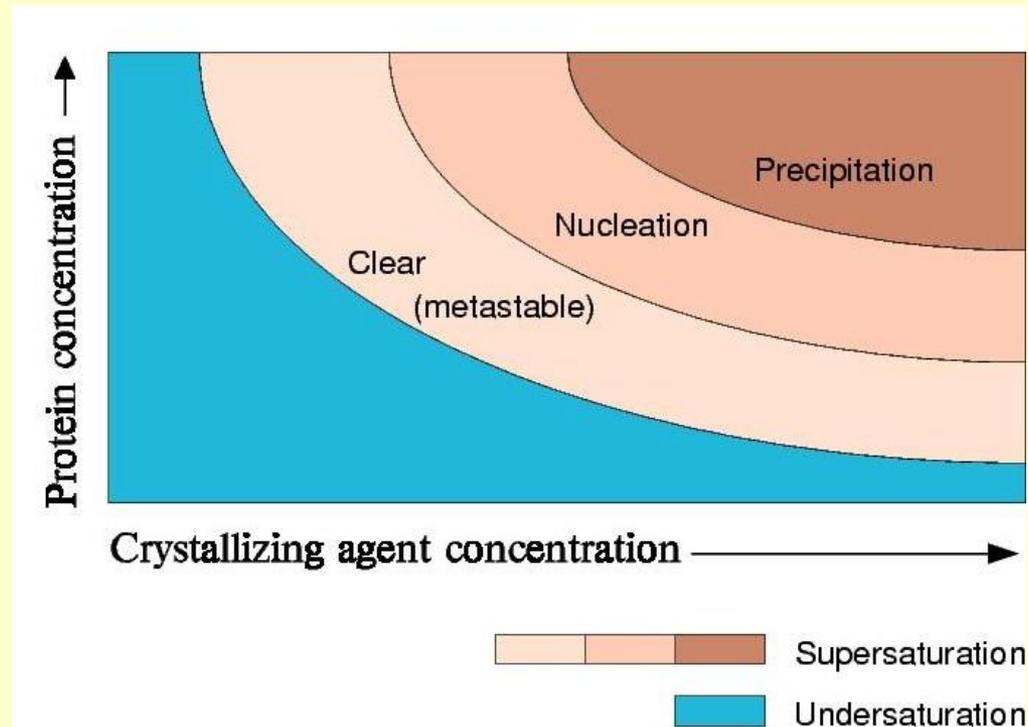
Требования к процедуре кристаллизации:

- Нужно около 10 мг очищенного белка.
 - Различные типы хроматографии.
- Раствор должен быть гомогенным.
 - Изоформы белка и микрогетерогенности резко ухудшают рост кристаллов
- Привести к концентрации около 20 mg/ml.
- Подходящие условия проведения эксперимента (контролируемая температура, отсутствие вибраций и т.д.).
 - Процесс роста кристалла может занять дни, недели и даже месяцы.



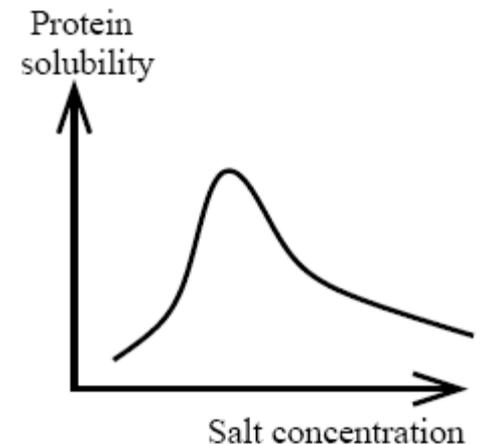
Основные концепции кристаллизации

- Изменение растворимости белка добавлением «преципитирующих (осаждающих) агентов»: солей, полиэтиленгликоли и т.п.
- Контролируемым образом привести раствор белка к перенасыщению:
 - Добавление преципитирующих агентов.
 - Высушивание капли раствора.
 - Обмен буферными реагентами (диализ).
- Ждать и регулярно контролировать ход процесса под микроскопом.



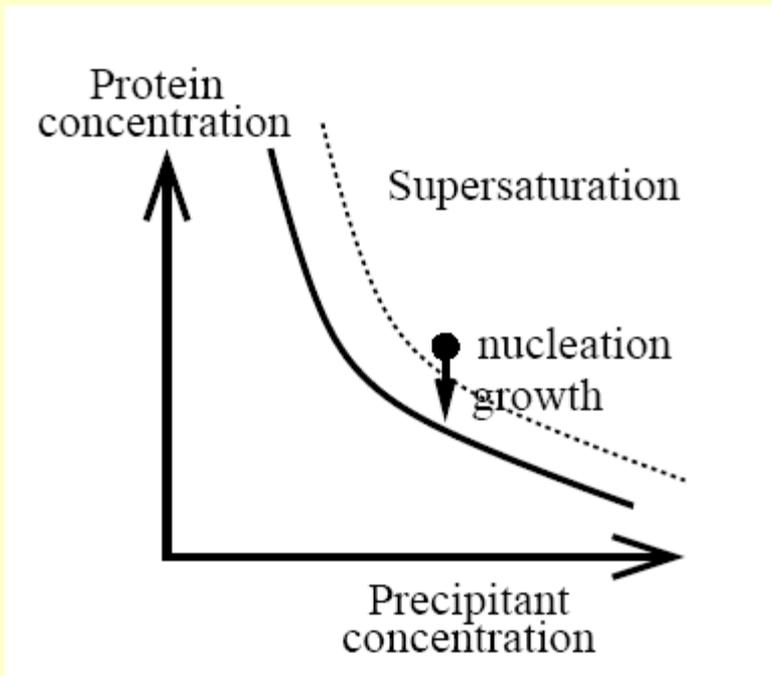
Факторы, влияющие на растворимость белка

- рН
 - Изменение рН влияет на зарядовое состояние аминокислотных остатков (напр. Asp, Glu, Lys, His, Arg), что приводит к изменению поверхностных зарядов и, как следствие, – к изменению взаимодействия макромолекулы с водным окружением
- Добавление солей схожим образом влияет на растворимость
- Полярные растворители
 - Например, полиэтиленгликоль (PEG) – связывает воду.
- Температура
 - изменение энтропийного фактора растворимости



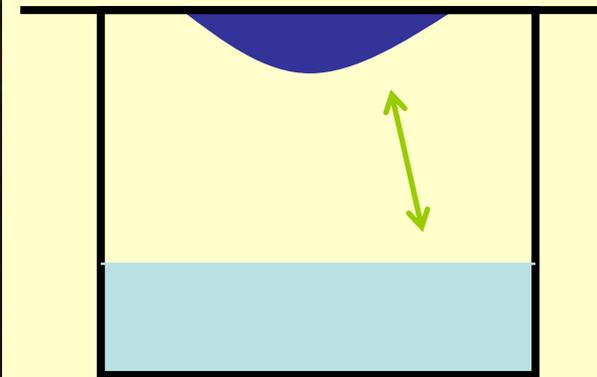
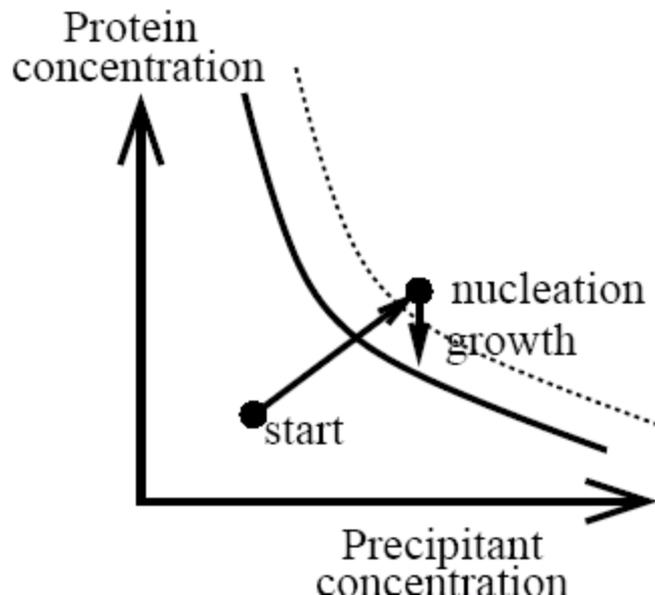
Серийные эксперименты

- Раствор белка смешивается с преципитирующим агентом
 - Прямое достижение перенасыщения
- Простой метод:
 - Легко масштабируется до уровня 100 нанолитров за счет использования автоматов



Диффузионные методы

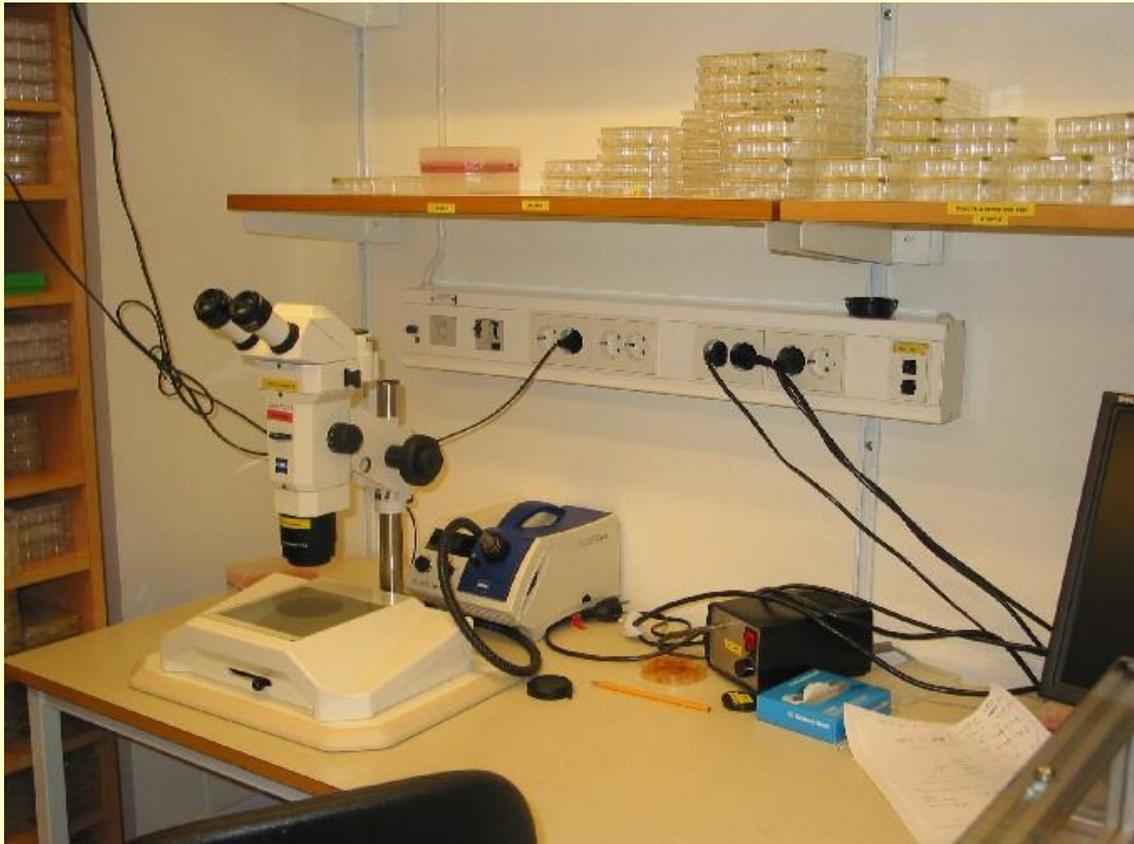
- Раствор белка (~5 μ l) помещается в виде капли над буферным раствором с высокой концентрацией преципитирующего агента
- Капля и буффер обмениваются агентом через диффузию в промежуточную среду (пар).
- Самый широко используемый метод



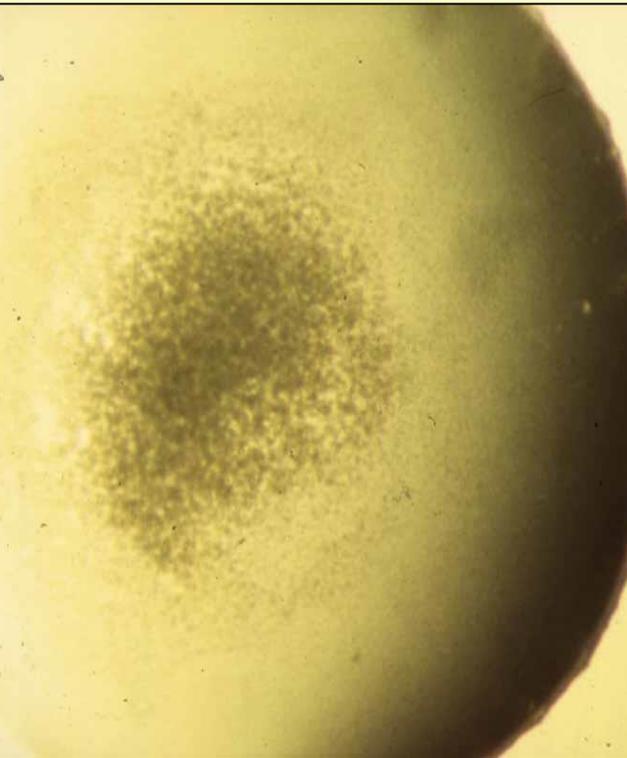
Precipitant solution

Температура:

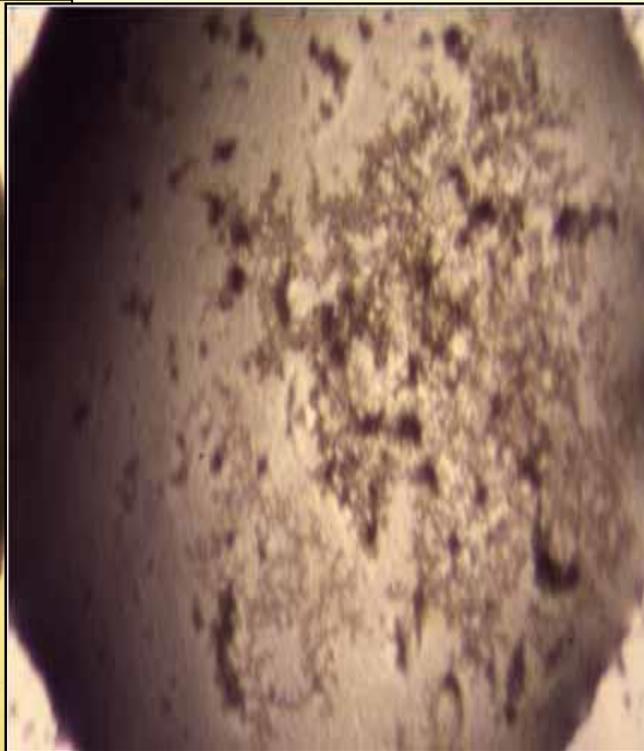
- Обычно эксперименты проводятся в лабораториях с контролируемой температурой.
- Как правило, температура варьируется от 20°C до 4°C .



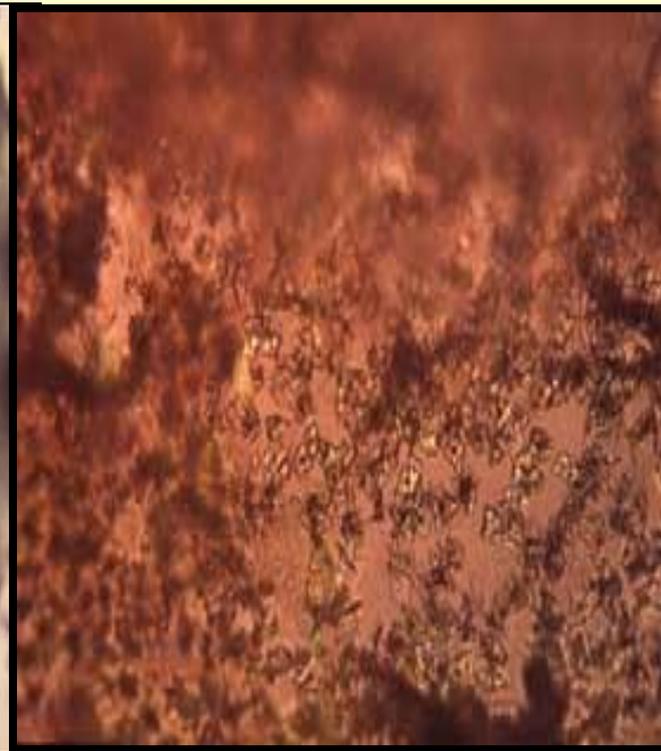
Типы осаднения



аморфное

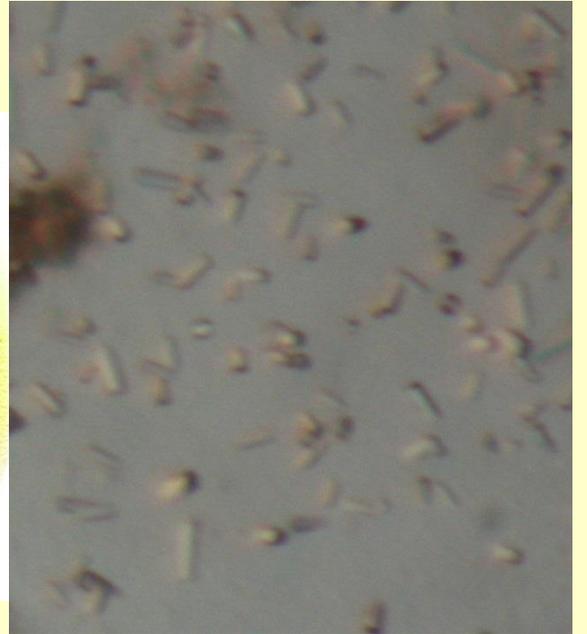
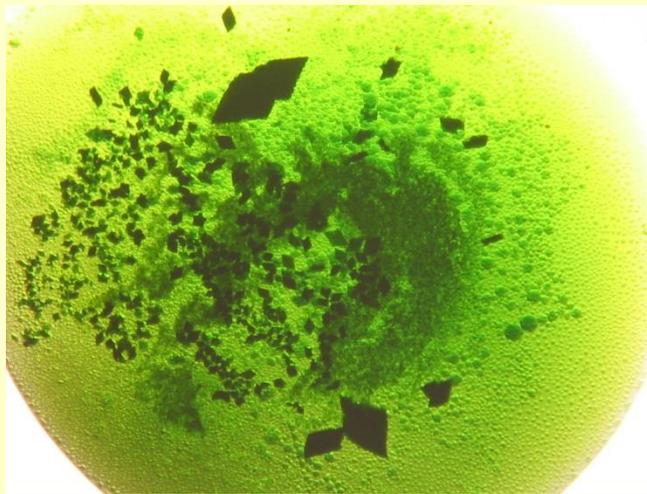
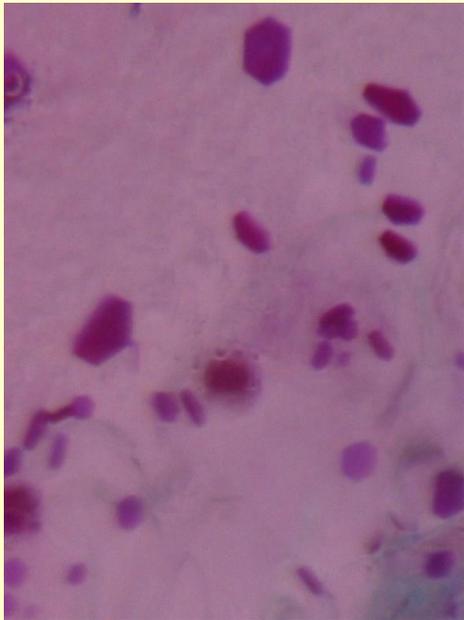
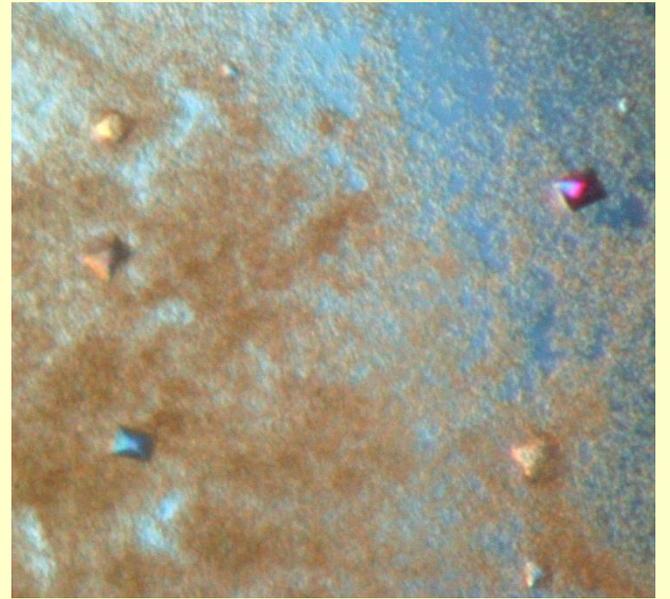
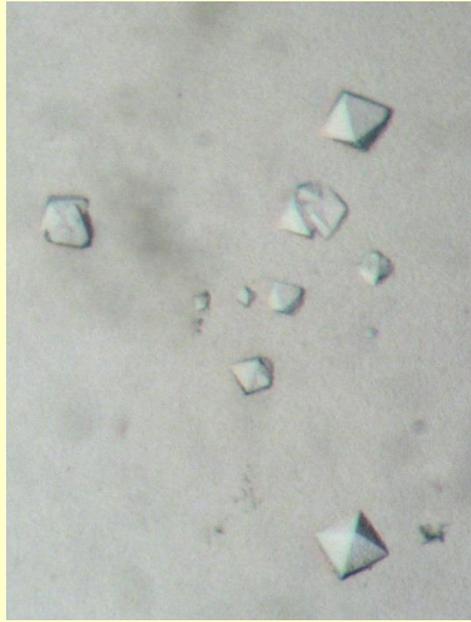


гетерогенное



микрористаллы

Опытный экспериментатор по внешнему виду осадка может определить, что следует изменить в условиях кристаллизации.

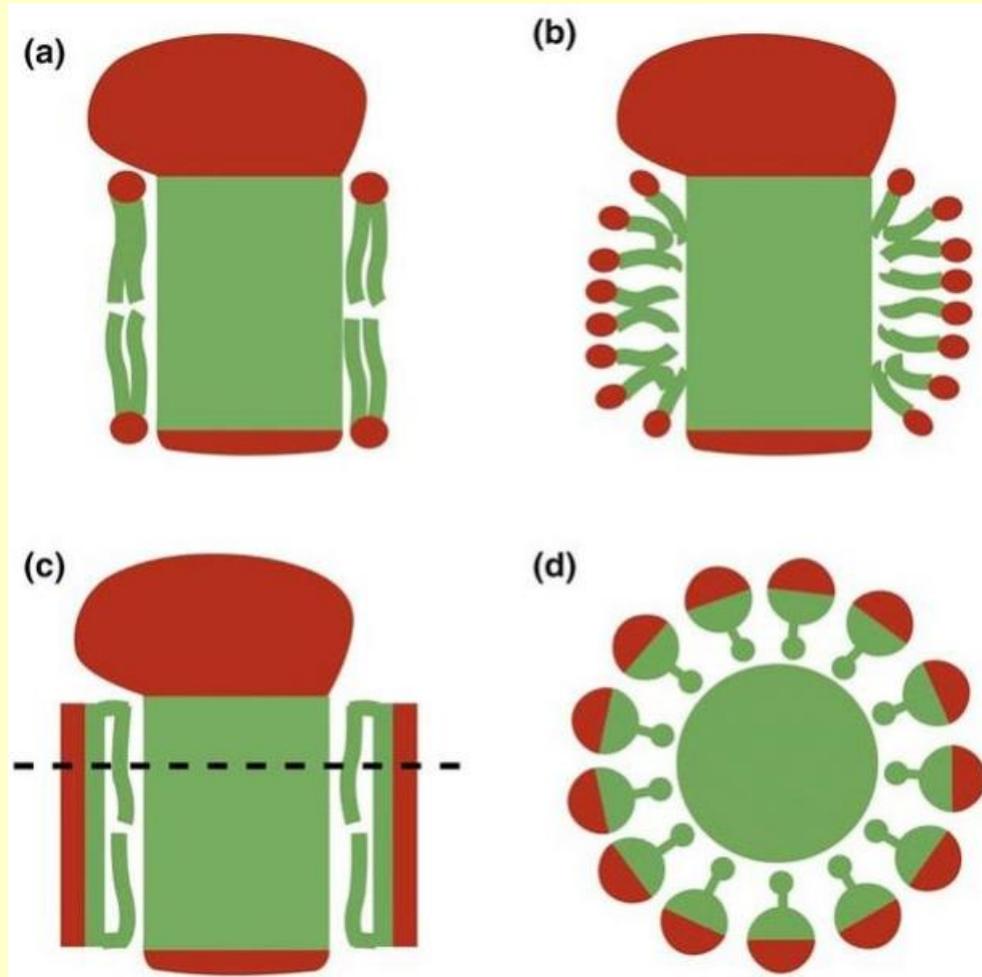


Роботы для кристаллизации

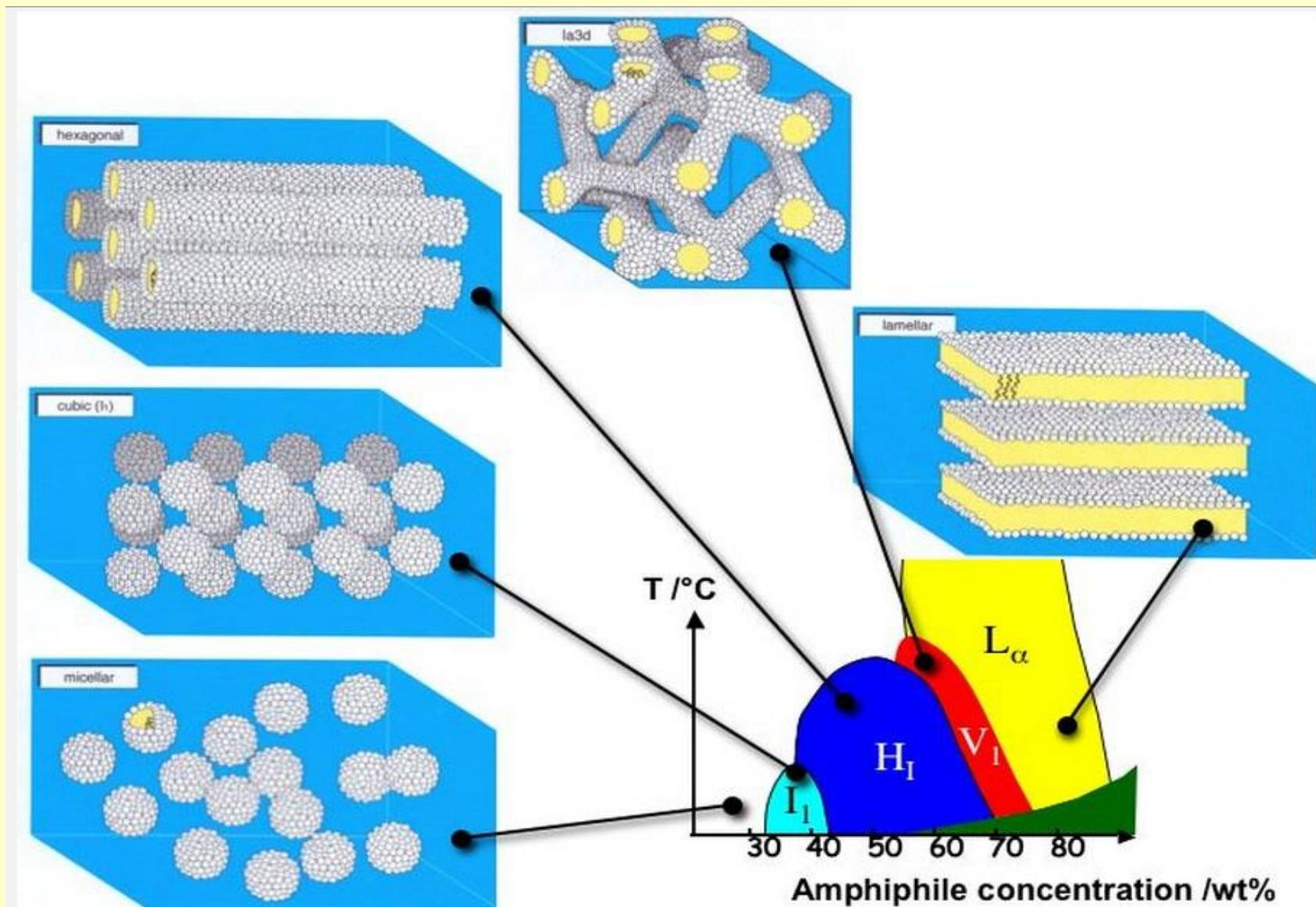
- Могут оперировать с каплями объемом 100 нанолитров.
 - Более точные, чем человек
 - Позволяют быстро сделать большее количество экспериментов по кристаллизации с тем же количеством белка



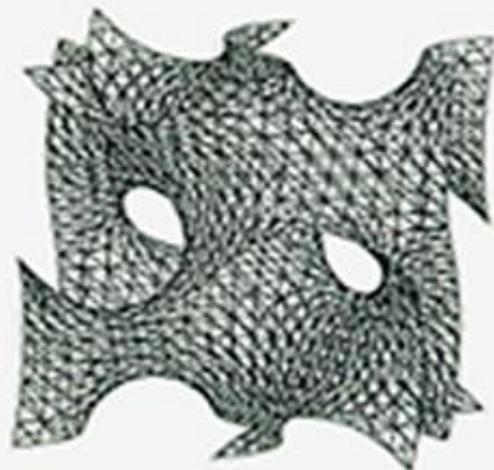
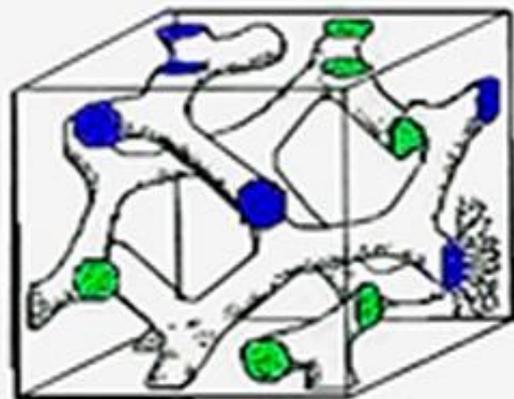
Кристаллизация мембранных белков: детергенты и LPD (липопептидные детергенты)



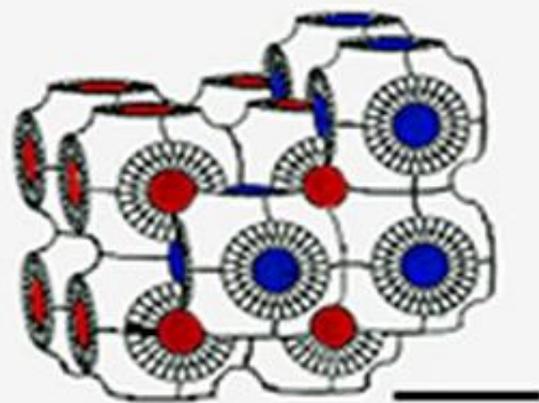
Кристаллизация мембранных белков при помощи липидных мезофаз



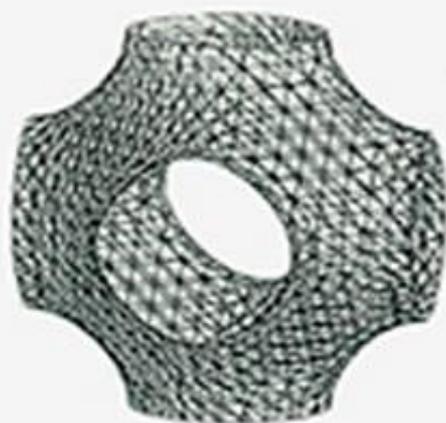
G (gyroid)
Ia3d
Q229



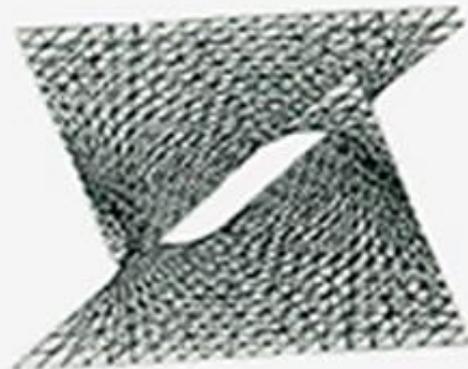
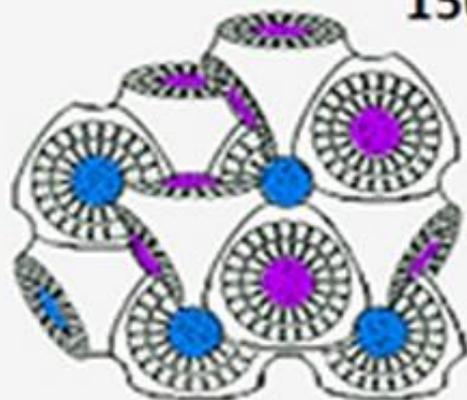
P (primitive)
Im3m
Q229



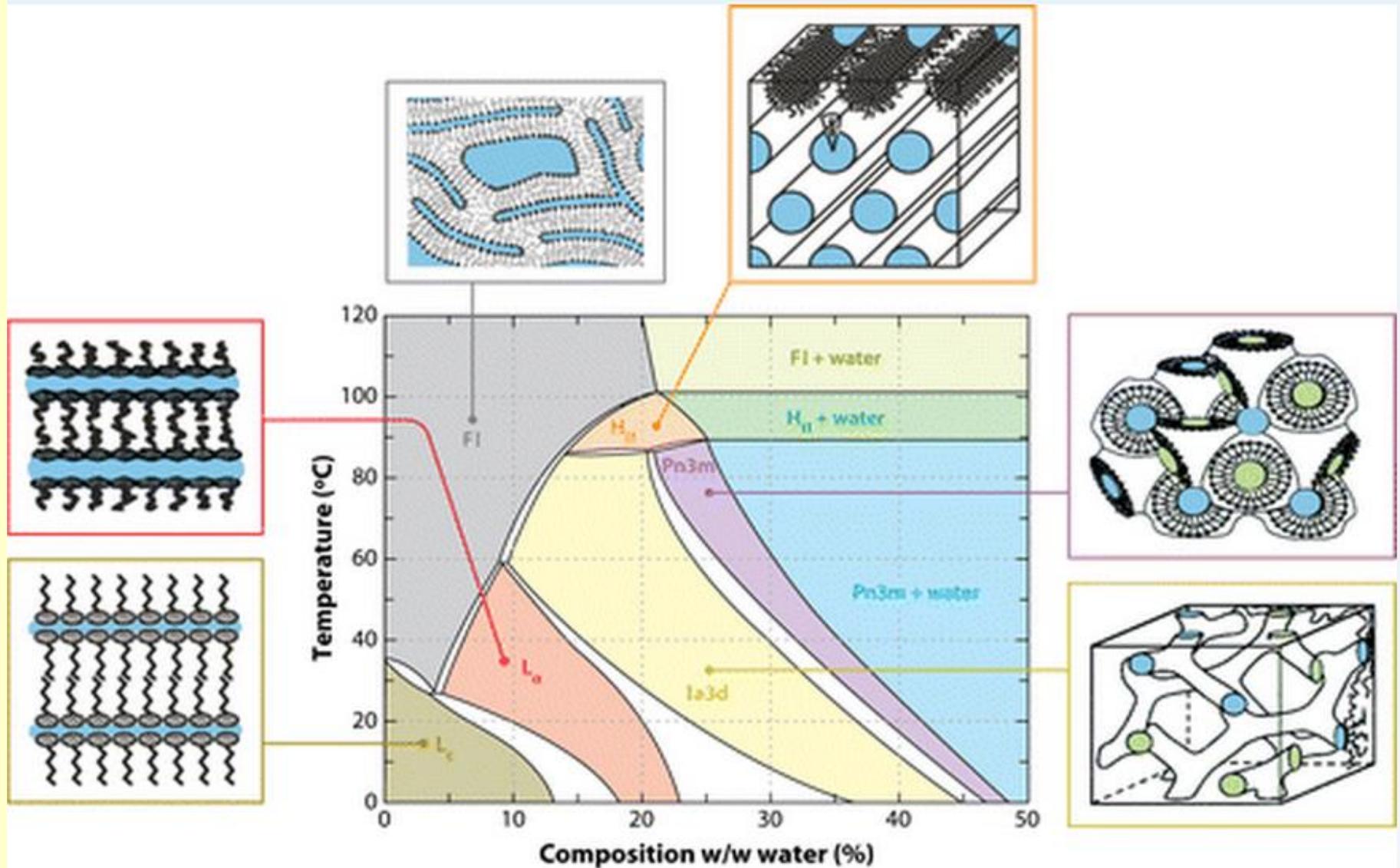
150 Å



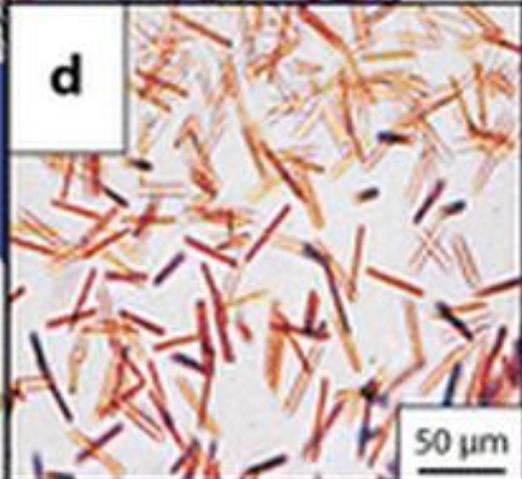
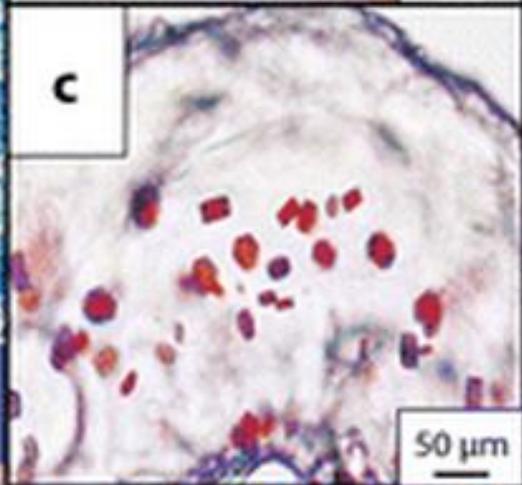
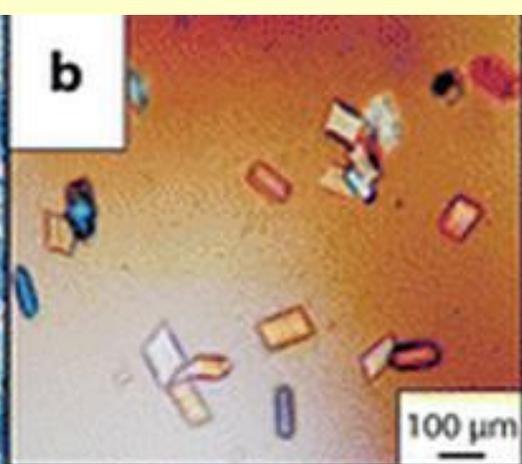
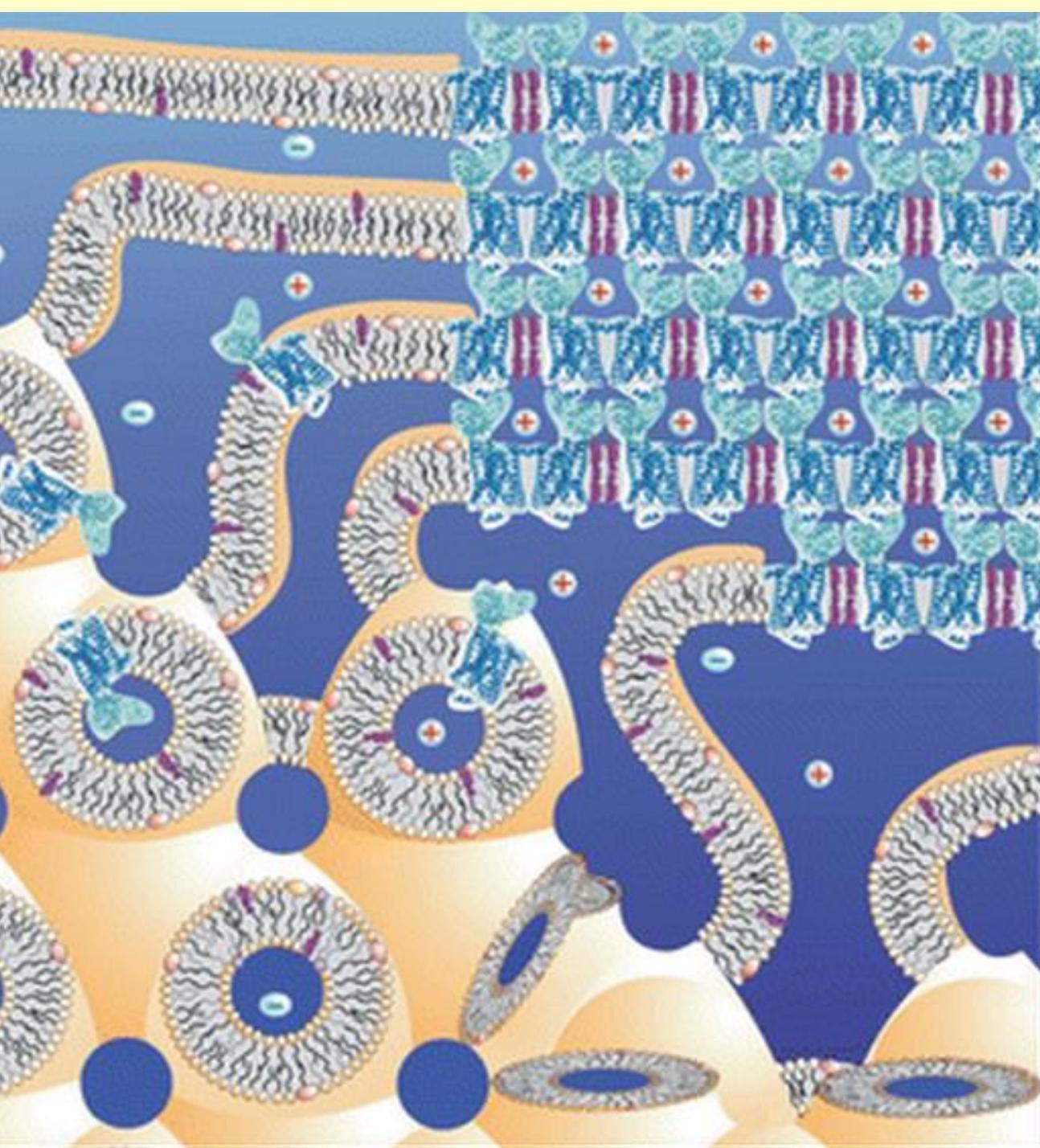
D (diamond)
Pn3m
Q224



Фазовая диаграмма моноолеина

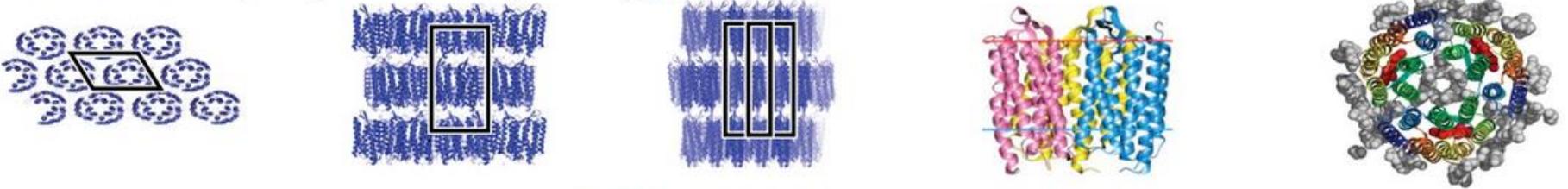




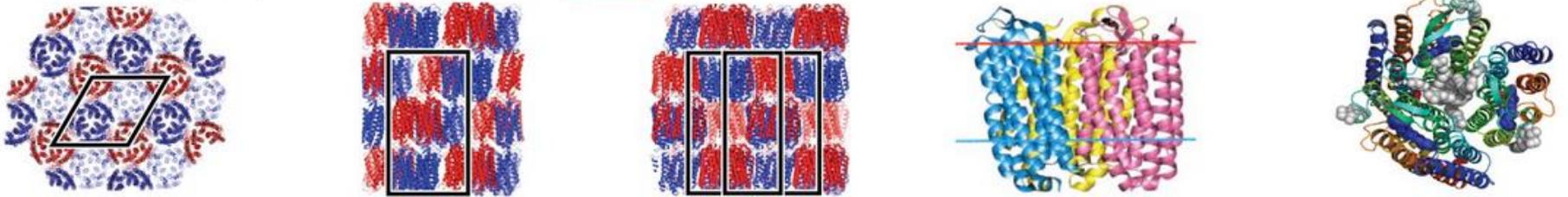




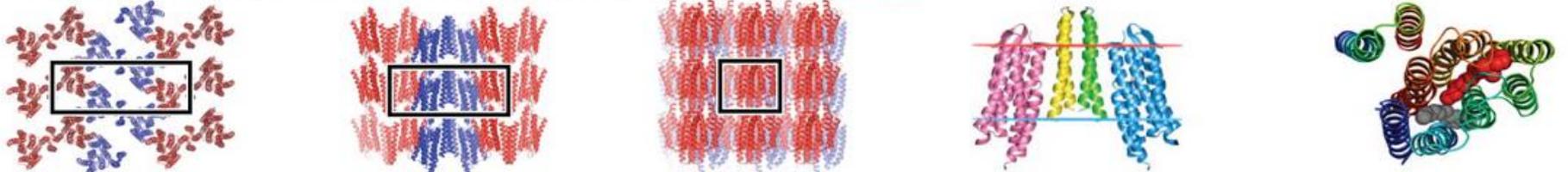
Bacteriorhodopsin (*H. salinarum*), 1.43 Å, [1MOK](#)



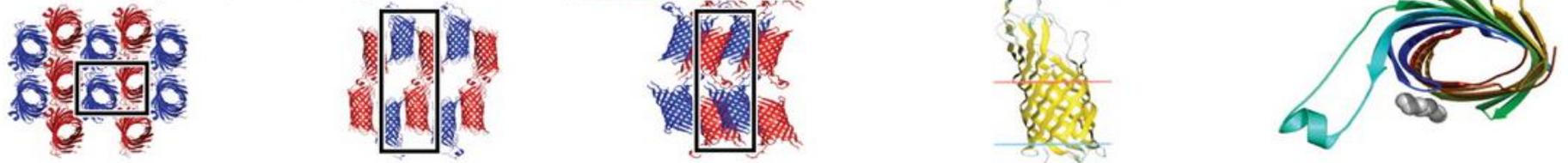
Halorhodopsin (*H. salinarum*), 1.70 Å, [2JAF](#)



Sensory rhodopsin II/transducer (*N. pharaonis*), 1.93 Å, [1H2S](#)

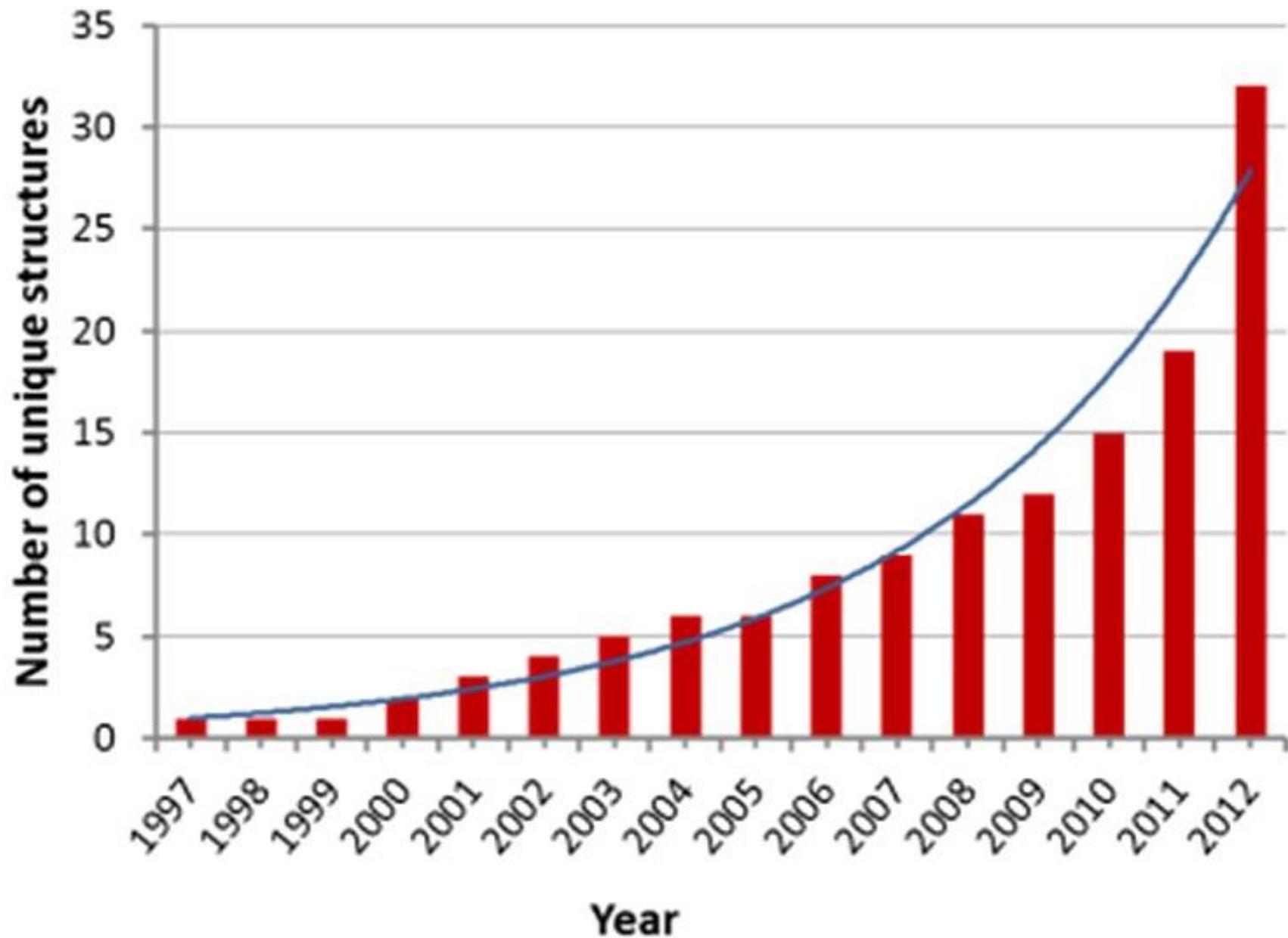


Adhesin OpcA (*N. meningitidis*), 1.95 Å, [2VDF](#)



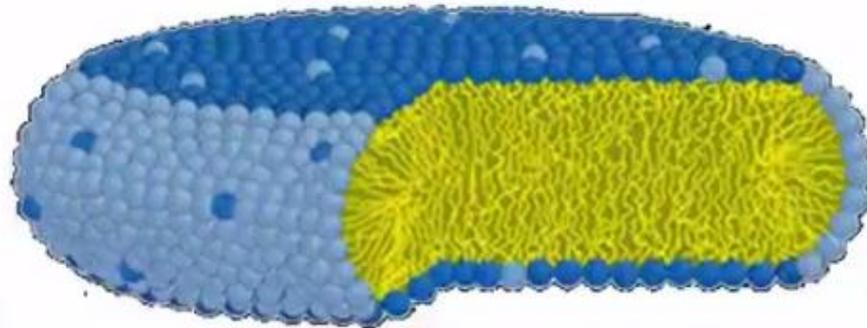
Total structures: **108**

Unique proteins: **32**



What Are Bicelles?

- Mixture of lipid and detergent that form disc-like structures



Faham *et al.* 2009.

Бицеллы

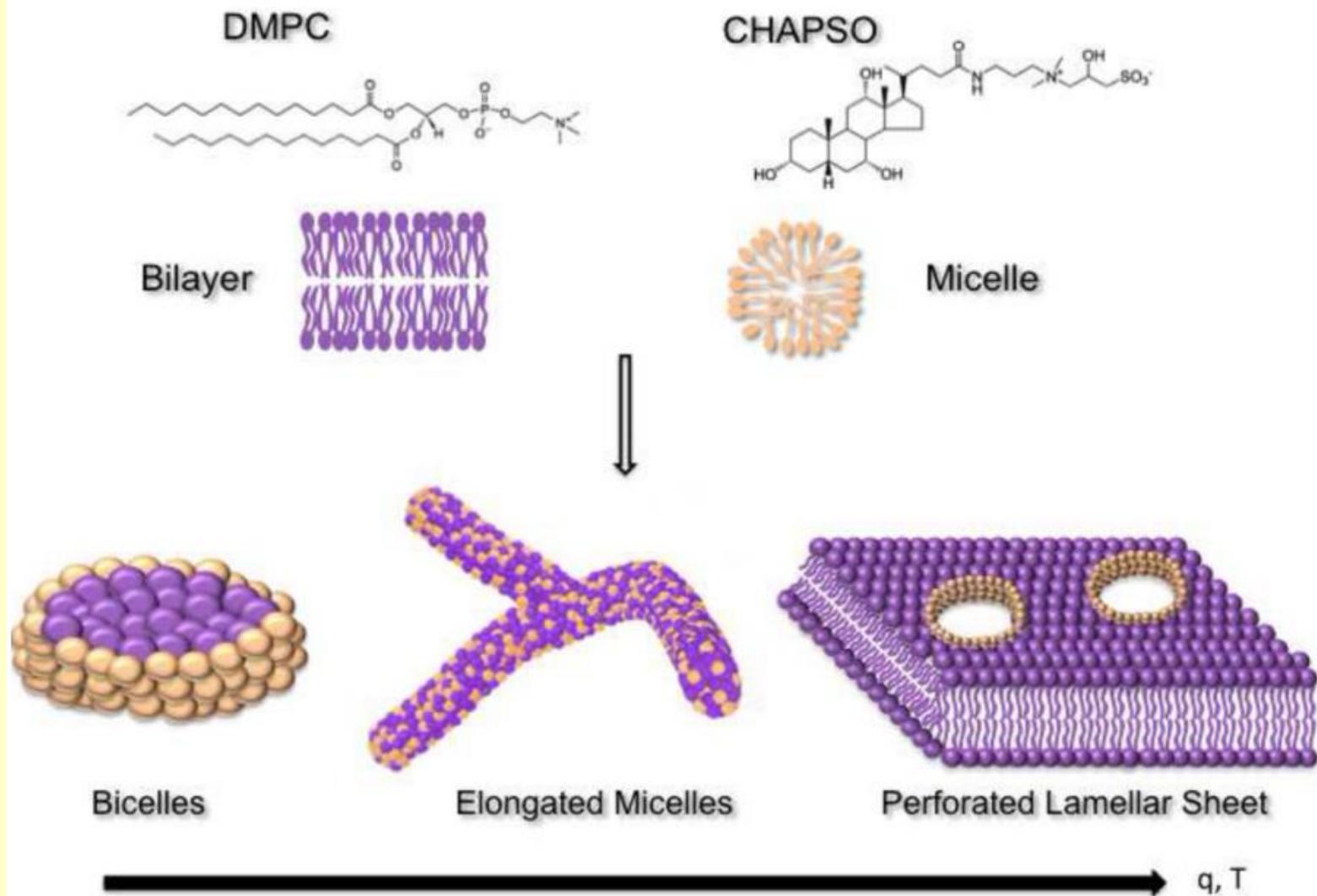
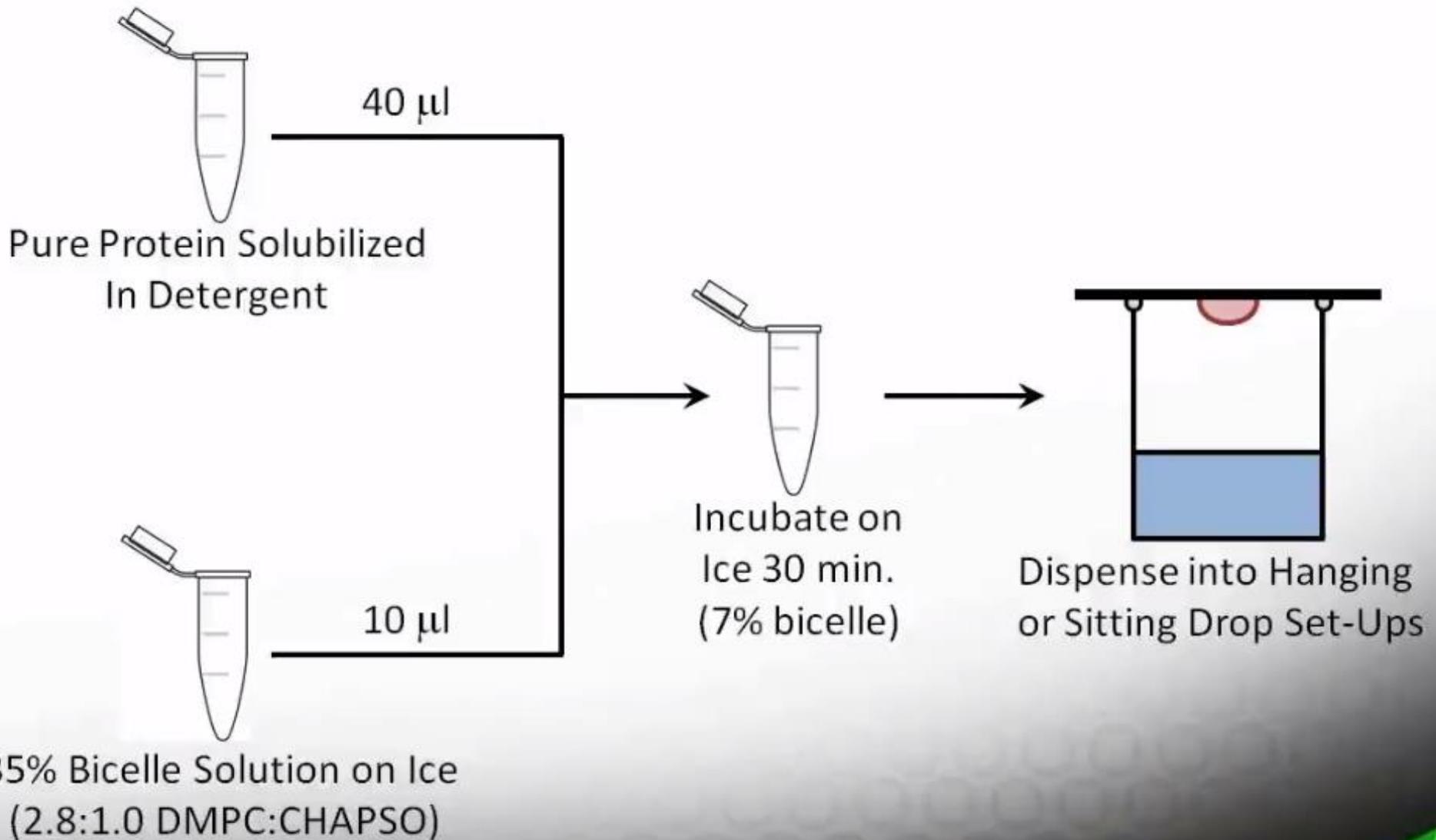


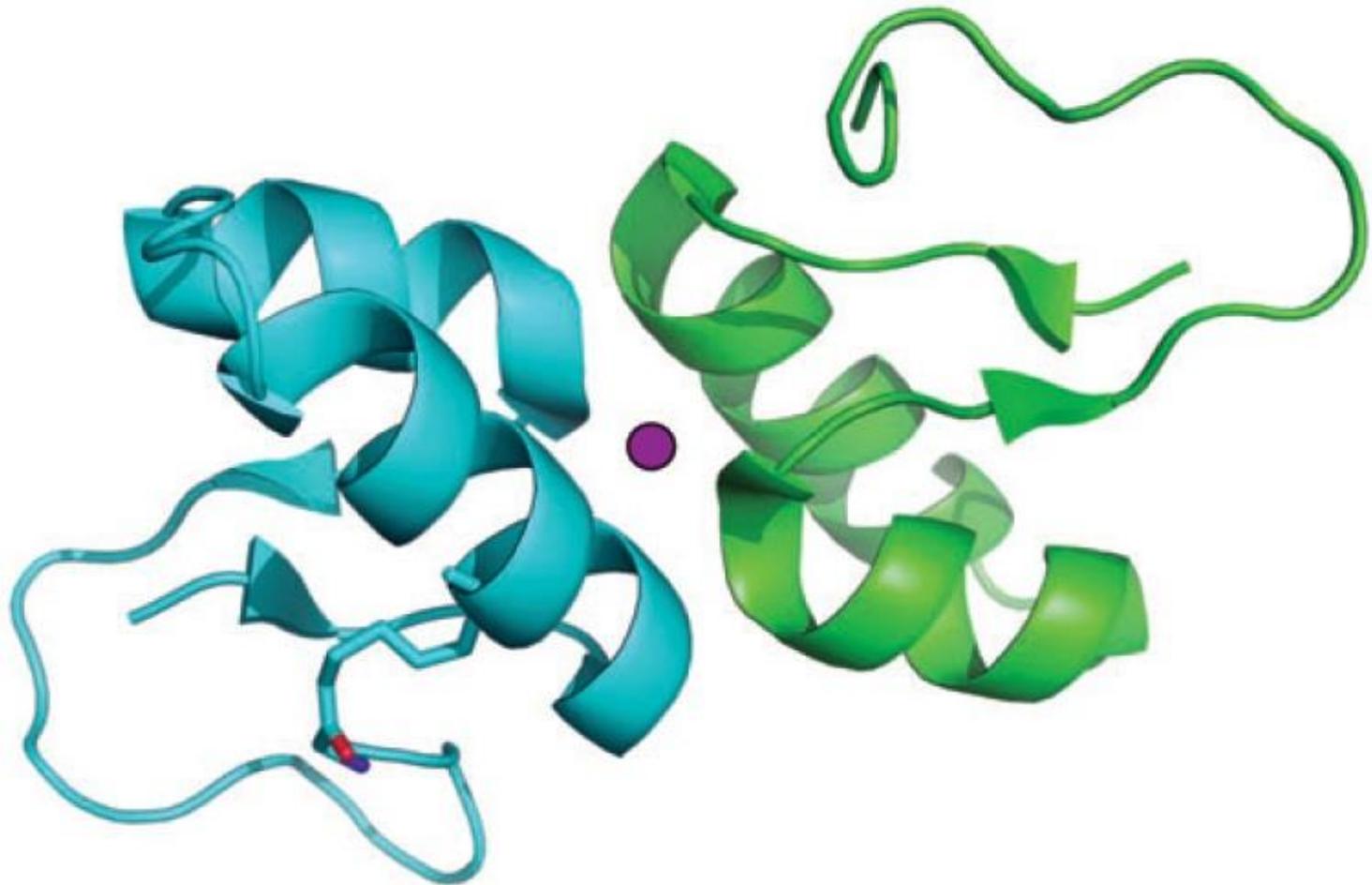
Figure 1. Phase behavior of bicellar mixtures

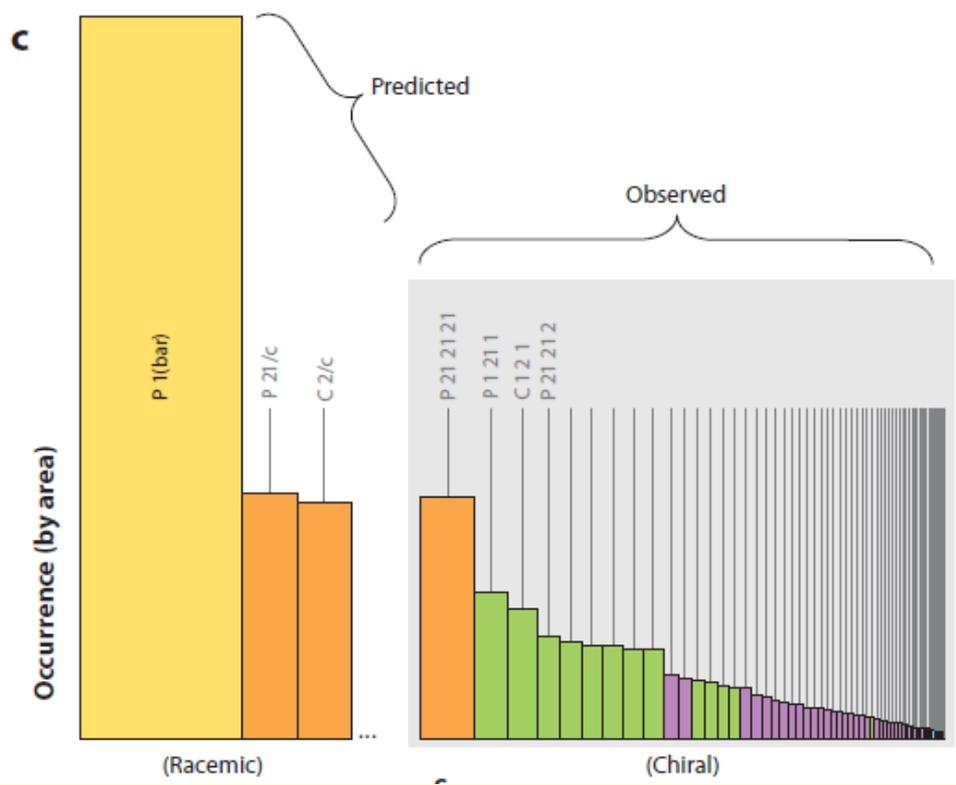
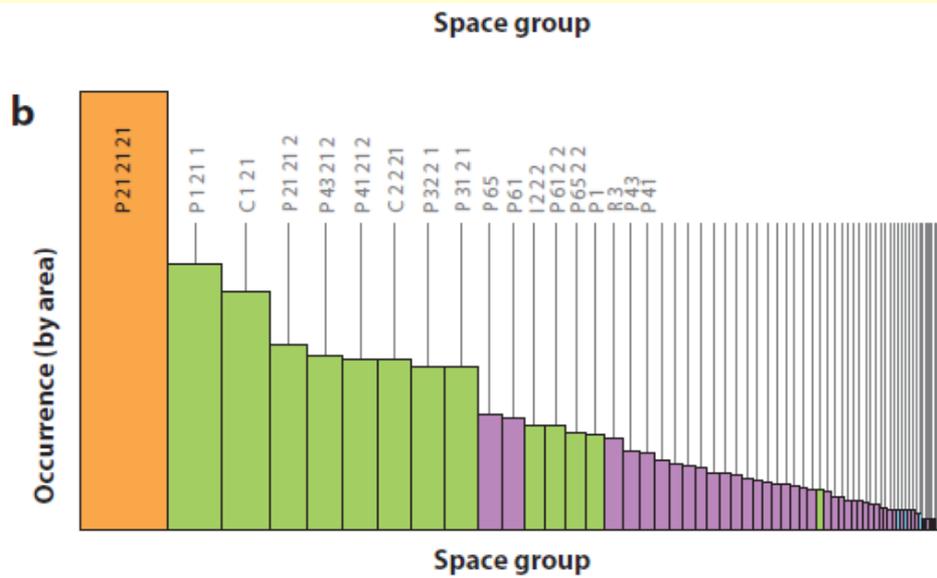
Bicelles are formed by mixing a phosphatidylcholine lipid such as DMPC with a detergent such as CHAPSO. The detergent shields the hydrophobic edges of the bilayer. With increasing temperatures and q , disc-shaped bicelles undergo phase transformation into worm-like cylindrical micelles and perforated lamellar sheet, which may also be beneficial for crystallization.

Применение бицелл

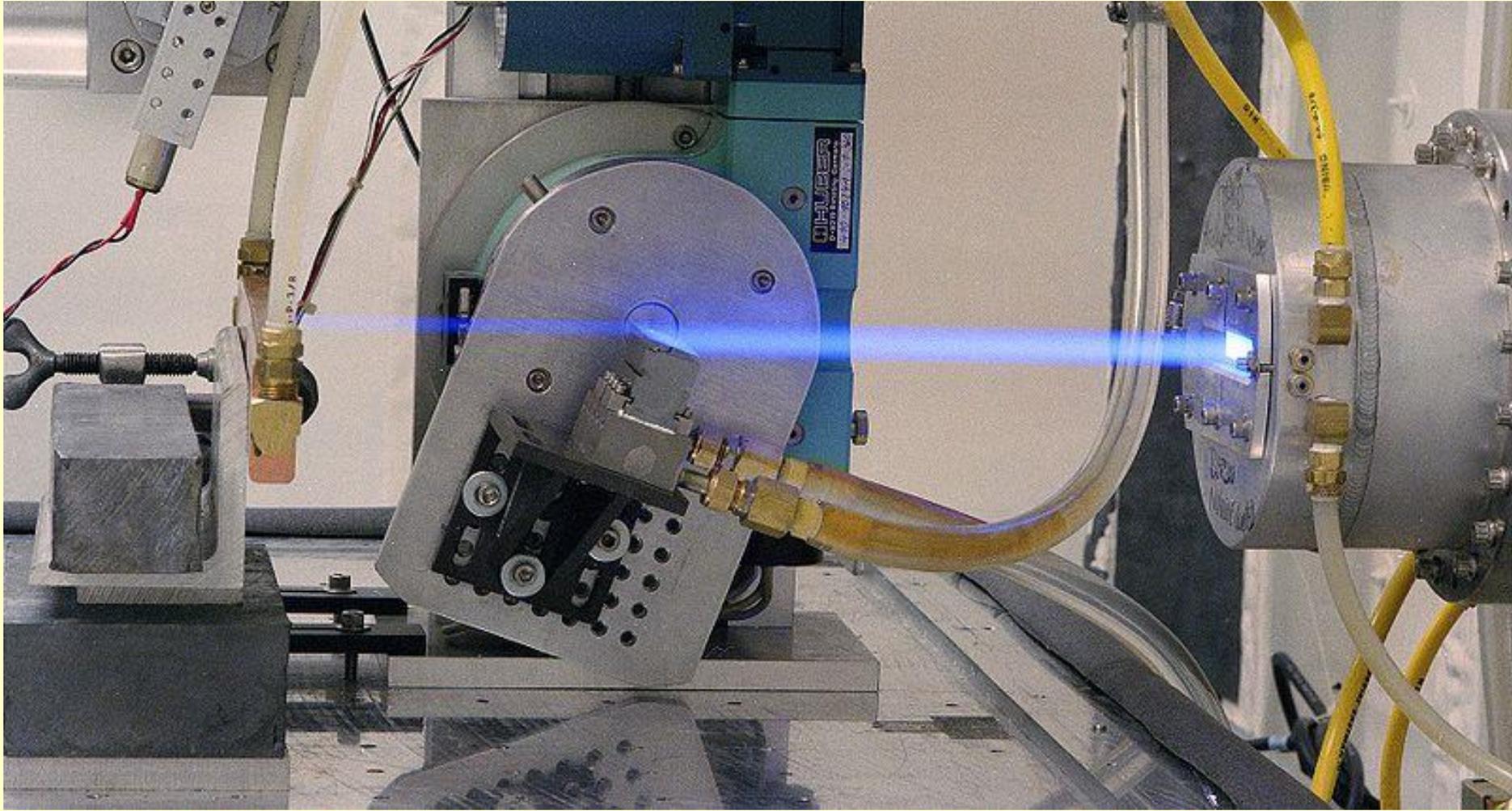


High-End: рацемическая кристаллография белков



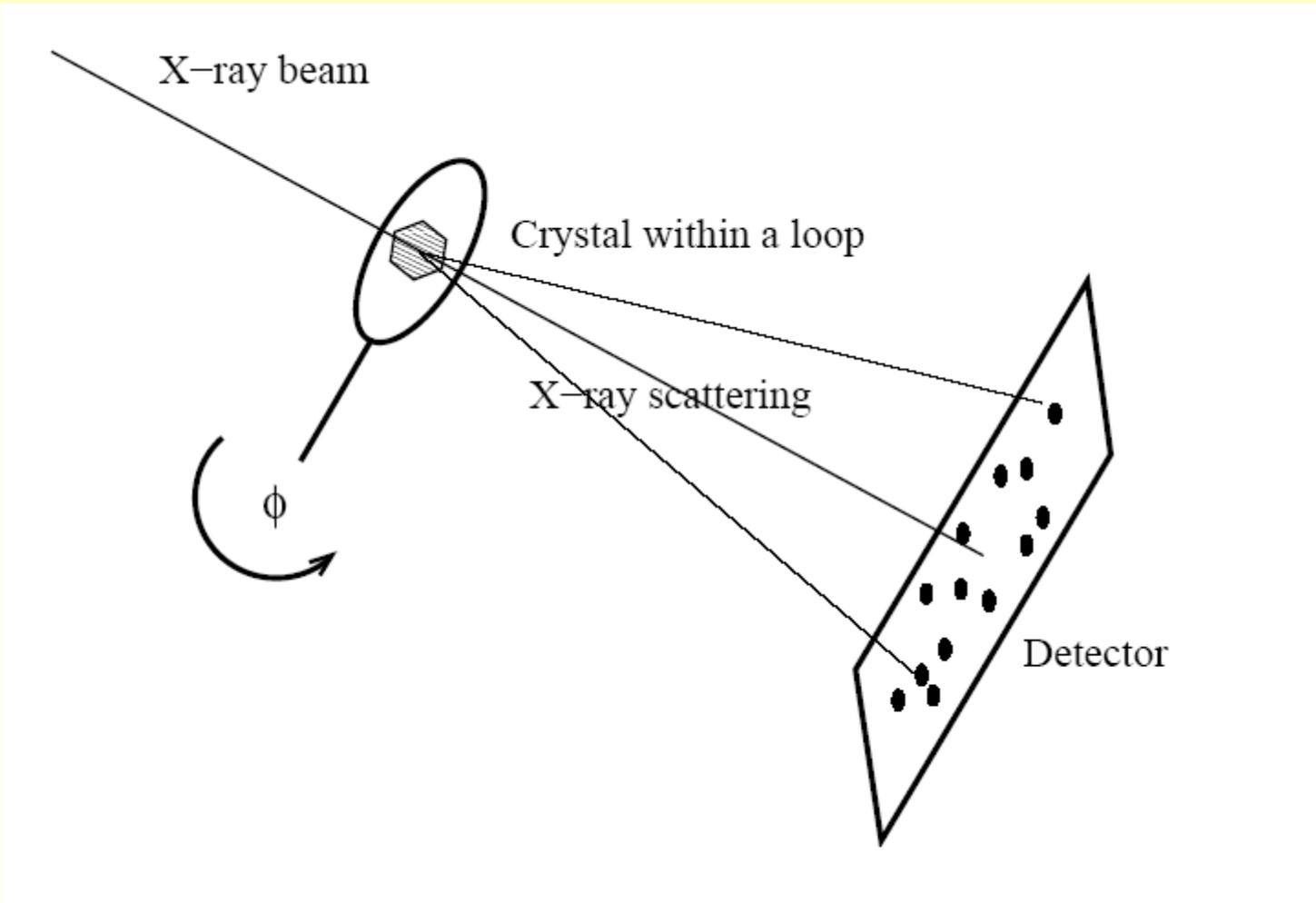






Сбор данных

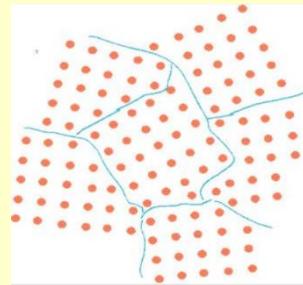
- Вращение кристалла для получения дифракции под разными углами падения излучения
- Как правило, получают около 100 дифракционных изображений



Охлаждение кристалла

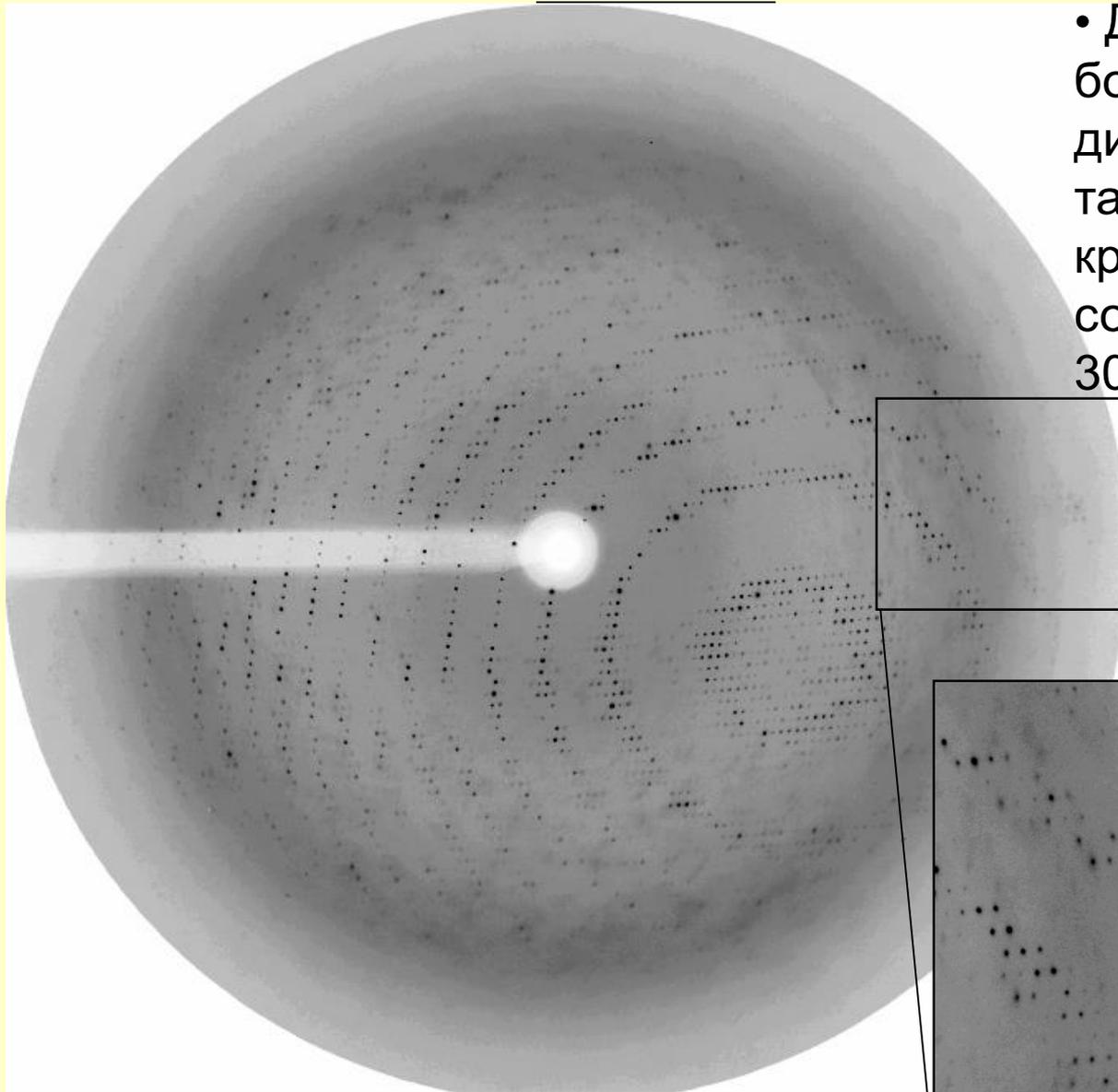
- Под действием интенсивного рентгеновского излучения происходит ионизация атомов и, как следствие, образование активных радикалов. Поэтому, при облучении кристалл разрушается
- Охлаждение увеличивает время жизни кристалла за счет уменьшения коэффициента диффузии радикалов, а также скоростей хим. реакций. Сейчас практически все данные получаются при охлаждении кристаллов до 100 К (при помощи ж.а.)

При быстрой заморозке кристалл может стать мозаичным – то есть разбиться на много нанокристаллов, немного по-разному ориентированных. Это приводит к резкому ухудшению дифракционной картины и, как следствие, – к уменьшению разрешения.

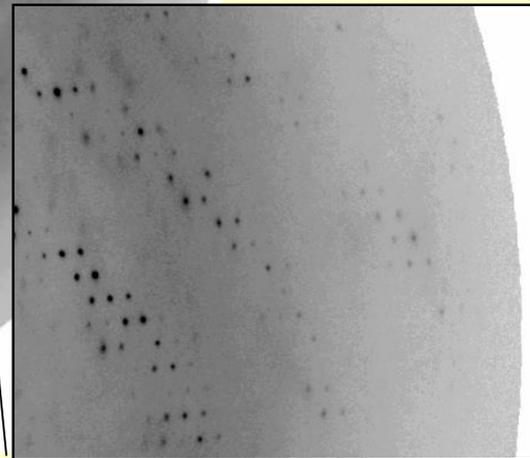


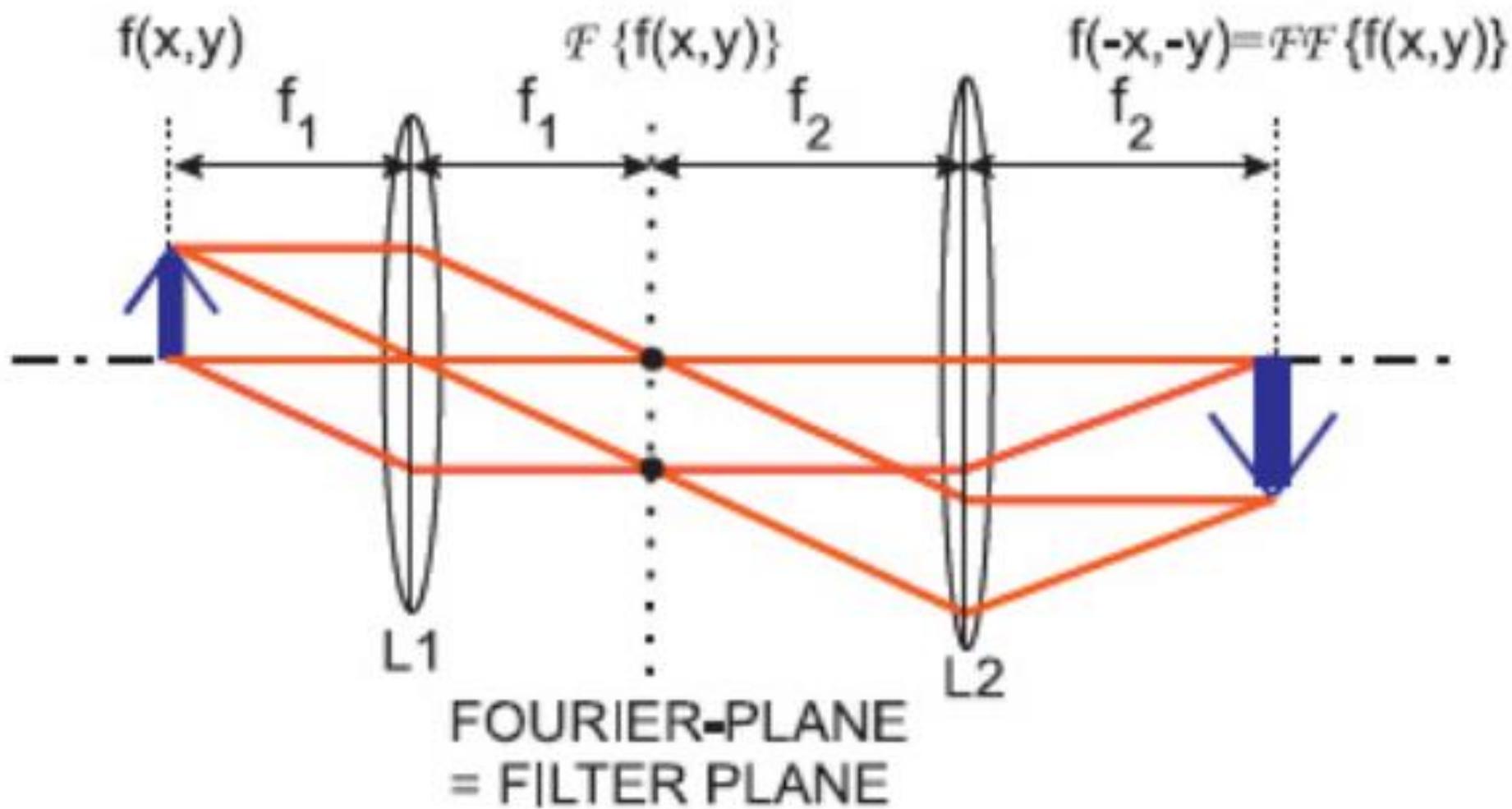
Поэтому, перед заморозкой добавляется криопротектор :
как правило, - глицерол или полиэтиленгликоль (400)

Картина дифракции от белкового кристалла



- Для дифракции характерно большое количество дифракционных максимумов, так как размер кристаллической ячейки составляет, как правило, от 30 до 300 Å.

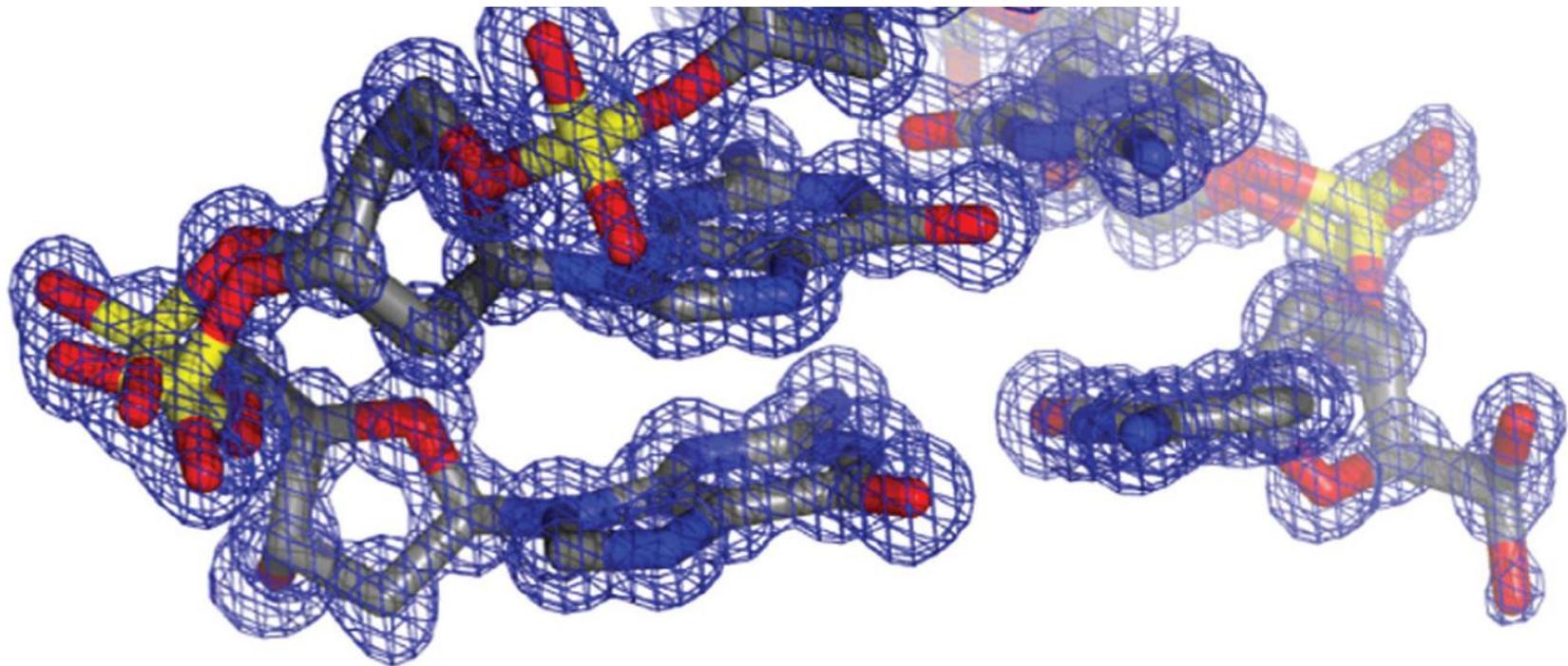


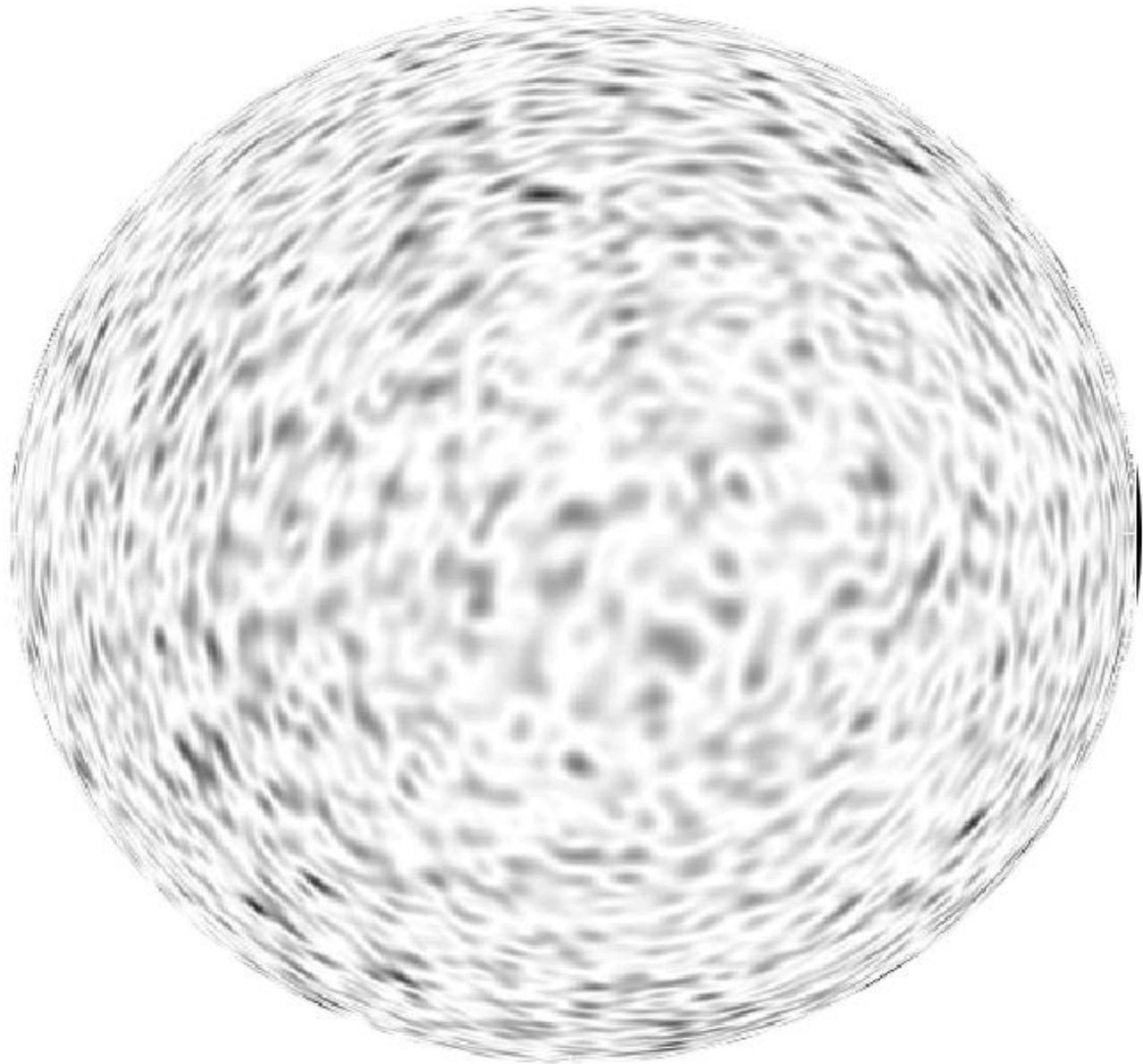


Разрешение структуры

- $>3.5 \text{ \AA}$: различима только вторичная структура белка (нуклеиновой кислоты) : альфа спирали, бета-листы (двойная спираль)
- $2-3 \text{ \AA}$ (среднее) – видно большинство отдельных атомов, молекулы растворителя (вода и ионы).
- Около 2 \AA – видны альтернативные конформации а.о. (сахарофосфатного остова)
- 1.6 \AA – можно различить «отверстие» в электронной плотности ароматических колец
- 1.1 \AA – видны атомы водородов (хотя рассеяние происходит только **на 1 электроне!**)

The crystal was maintained at 113 K during data collection. A total of 92 542, reflections were collected, indexed and reduced to 14 269 unique reflections to a maximum resolution of 0.92 Å with the program HKL 2000 (13). This DNA crystallizes in space group C2, with unit cell parameters of $a = 32.14 \text{ \AA}$, $b = 25.17 \text{ \AA}$, $c = 34.09 \text{ \AA}$, $\alpha = \gamma = 90^\circ$ and $\beta = 116.3^\circ$





Расчет электронной плотности в элементарной ячейке кристалла

- Амплитуда суммарного рассеяния от ячейки:

$$E(\mathbf{Q}) = \int \rho(\mathbf{r}) \cdot \exp(i \mathbf{r} \cdot \mathbf{Q}) d^3r$$

- Используя обратное Фурье-преобразование:

$$\rho(\mathbf{r}) = \int E(\mathbf{Q}) \cdot \exp(-i \mathbf{r} \cdot \mathbf{Q}) d^3\mathbf{Q}$$

- В действительности, берется конечная сумма по всем «рефлексам» (h,l,m) :

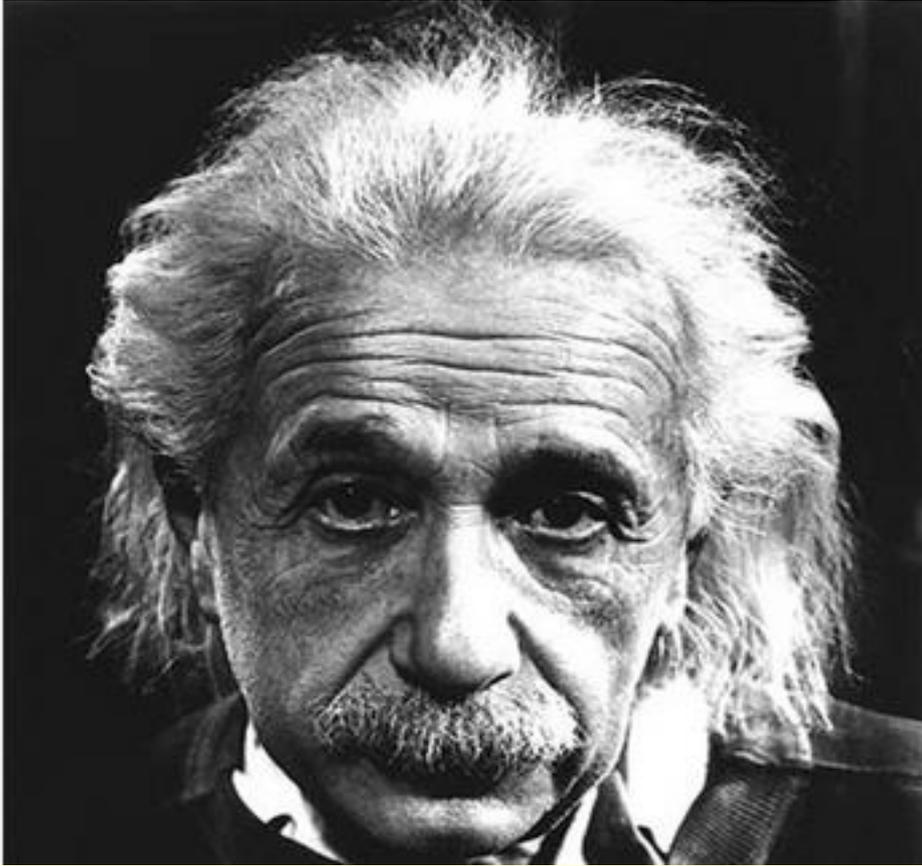
$$\begin{aligned} \rho(\mathbf{r}) &= \sum_{hlm} E(\mathbf{Q}_{hlm}) \cdot \exp(-i \mathbf{r} \cdot \mathbf{Q}_{hlm}) \\ &= \sum_{hlm} |E_{hlm}| \cdot \exp(-i \Phi_{hlm}) \cdot \exp(-i \mathbf{r} \cdot \mathbf{Q}_{hlm}) \end{aligned}$$

- В эксперименте измеряется интенсивность рассеянного излучения:

$$I_{hlm} \propto |E_{hlm}(\mathbf{Q}_{hlm})|^2$$

- Проблема отсутствия экспериментальной информации о фазе рассеянной рентгеновской волны называется

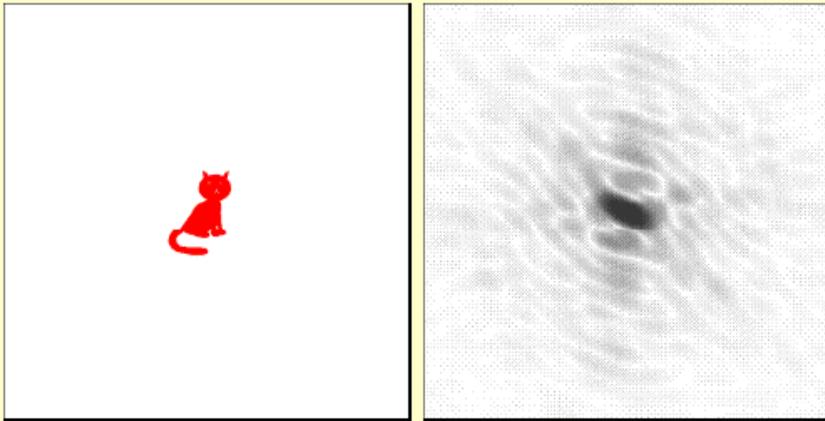
ФАЗОВОЙ ПРОБЛЕМОЙ



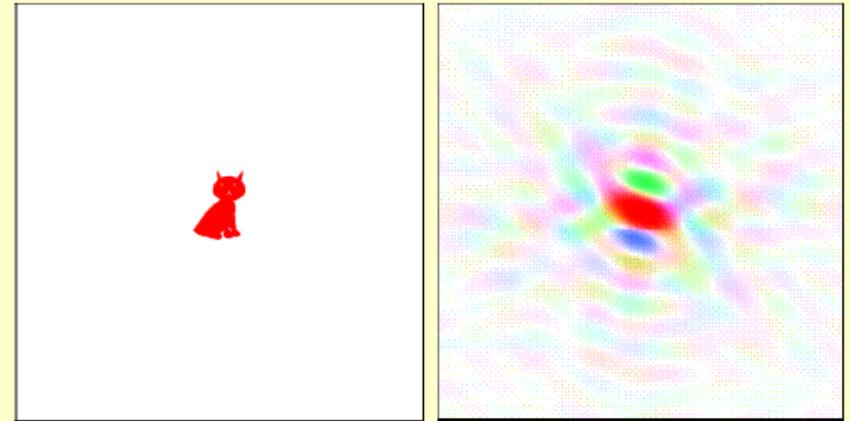


Методы решения фазовой проблемы

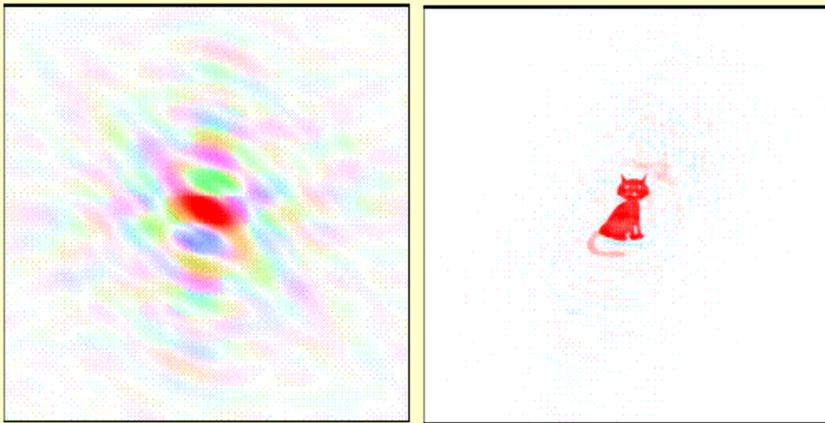
- 1) прямые методы:
- карты Паттерсона
- фазовые соотношения (пол.эл.плотн)
- 2) однократное и многократное изоморфное замещение
- 3) однократная и многократная аномальная дисперсия
- 4) молекулярное замещение



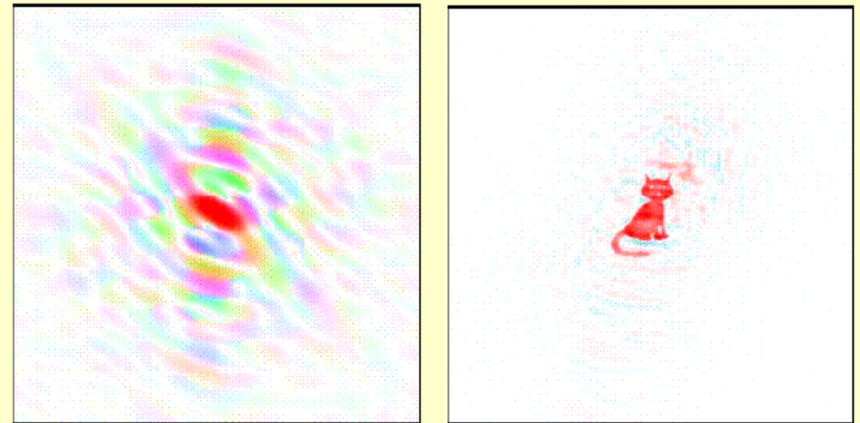
A cat with no phase information



A tailless cat with phases

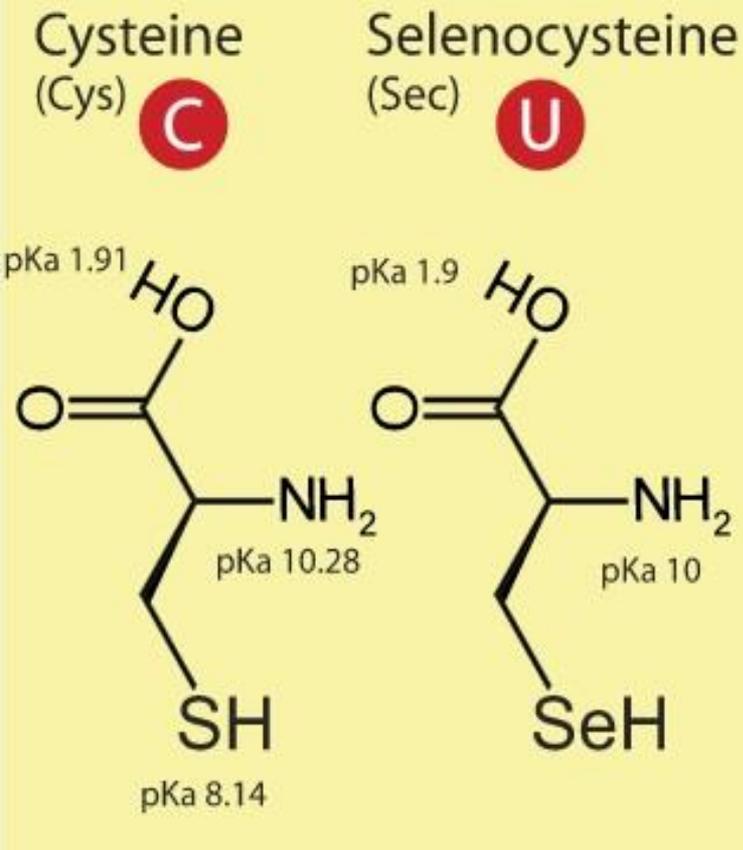


Use tailless phases as a guess for phases – tail weak. Works since good approximation.



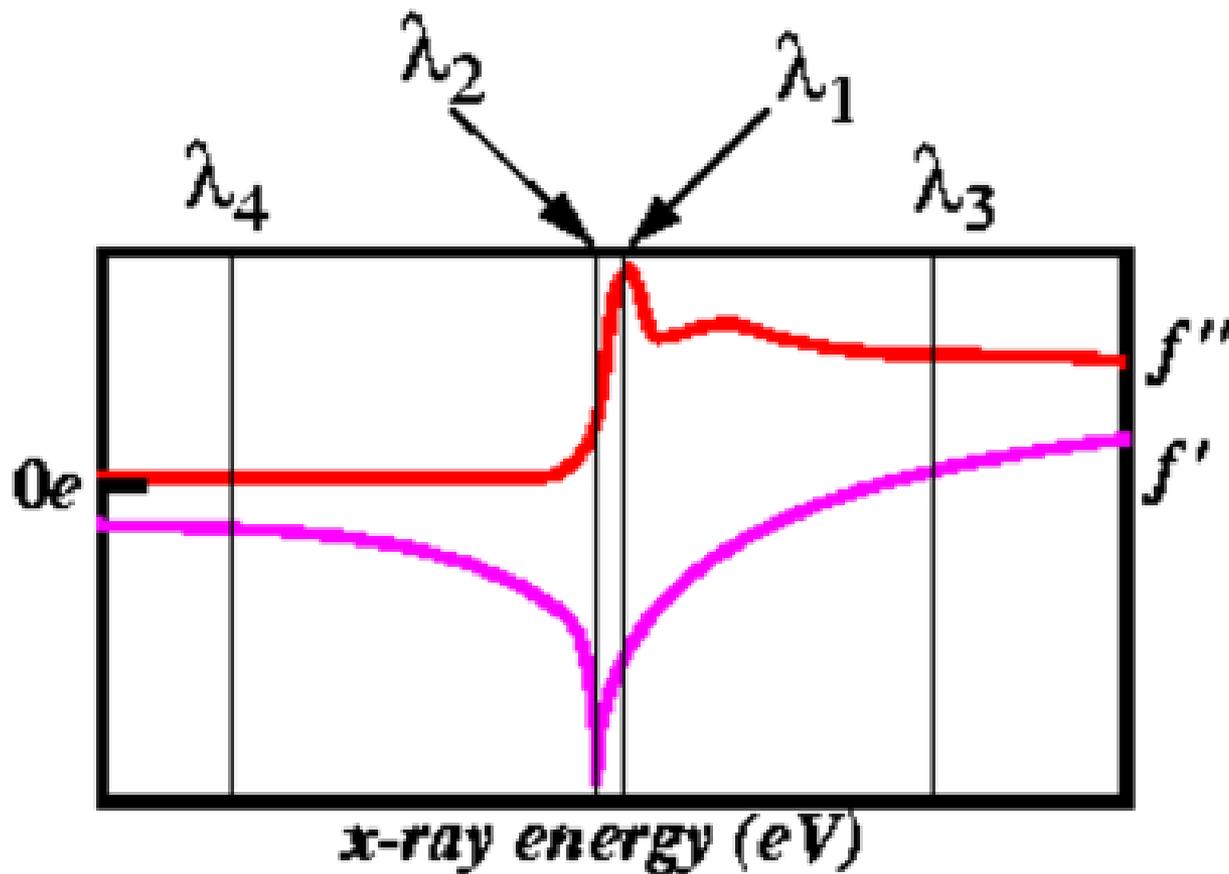
Combine twice the observed magnitude of the “cat” minus the tailless cat magnitude: $2F_o - F_c$ map.

Селеноцистеин и селенометионин



6	C Углерод s^2p^2 12.0107	7	N Азот s^2p^3 14.0067	8	O Кислород s^2p^4 15.9994	9	F Фтор s^2p^5 18.9984
14	Si Кремний s^2p^2 28.0855	15	P Фосфор s^2p^3 30.9737	16	S Сера s^2p^4 32.065	17	Cl Хлор s^2p^5 35.453
32	Ge Германий s^2p^2 72.63	33	As Мышьяк s^2p^3 74.9216	34	Se Селен s^2p^4 78.96	35	Br Бром s^2p^5 79.904

Факторы аномального рассеяния



$$f(\lambda) = {}^0f + f'(\lambda) + if''(\lambda)$$

Нарушение симметрии картины рассеяния из-за фазового сдвига при аномальном рассеянии

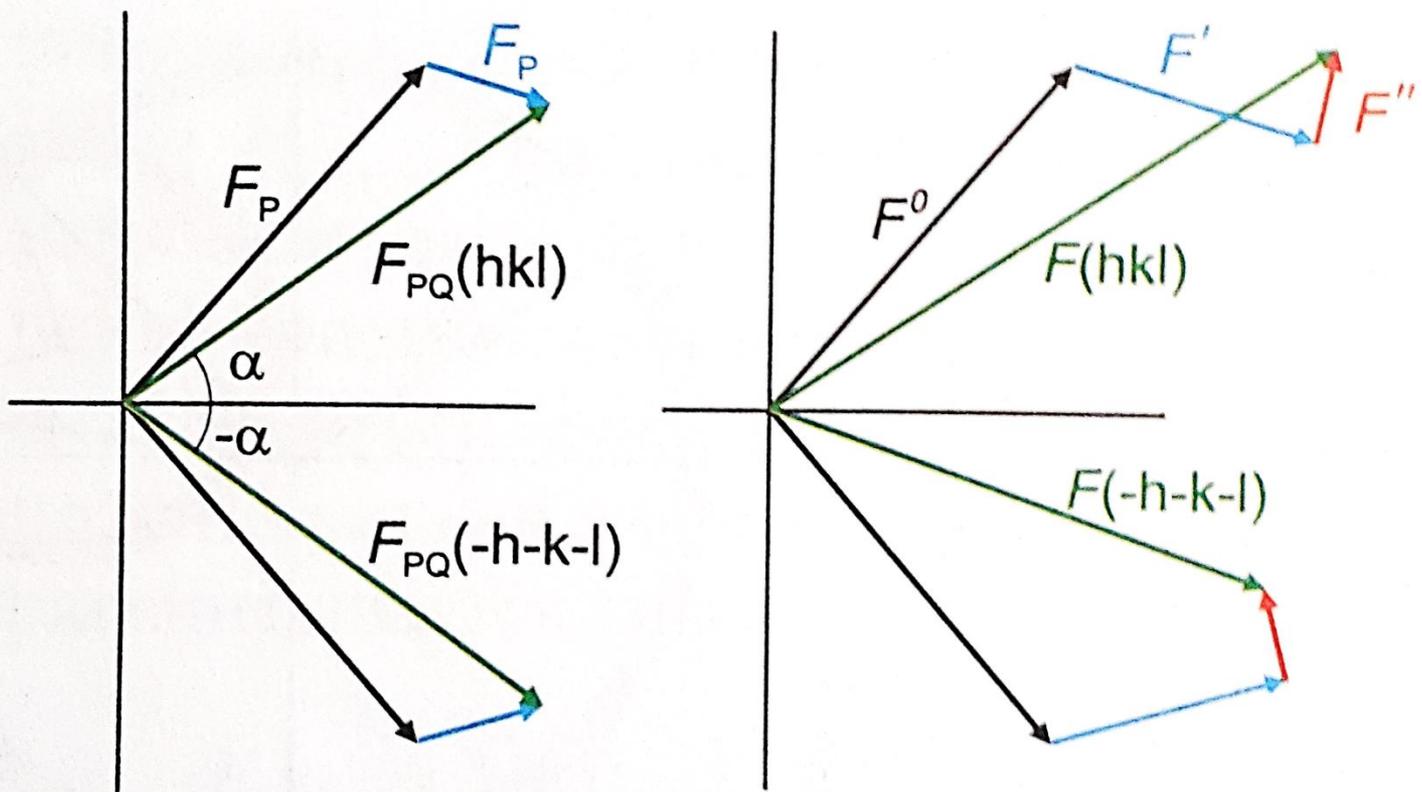
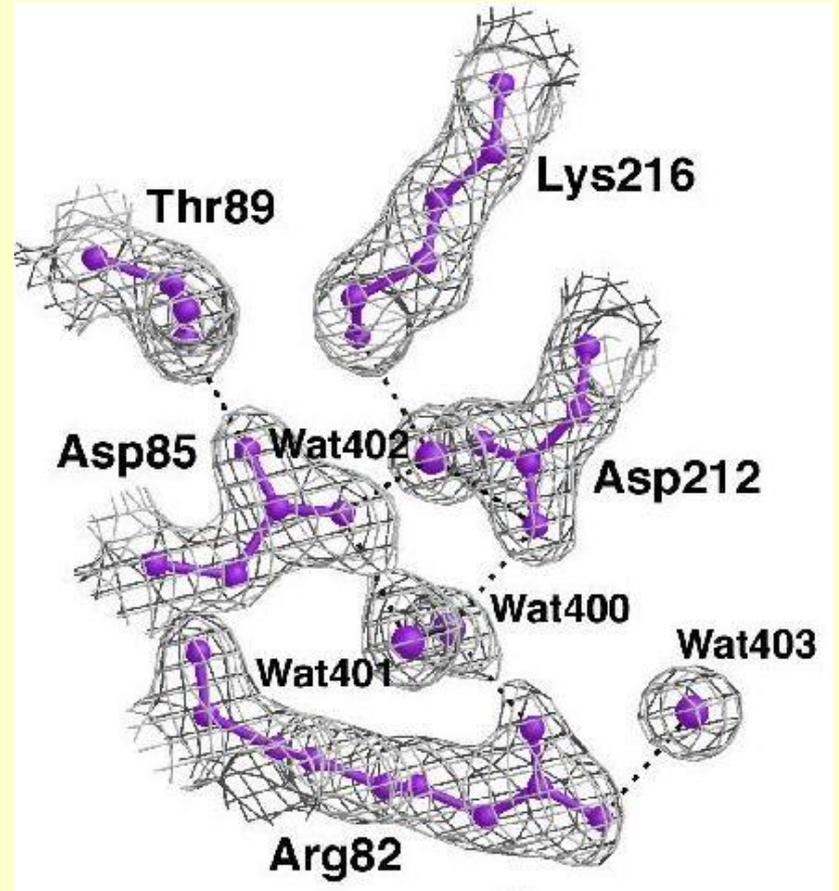
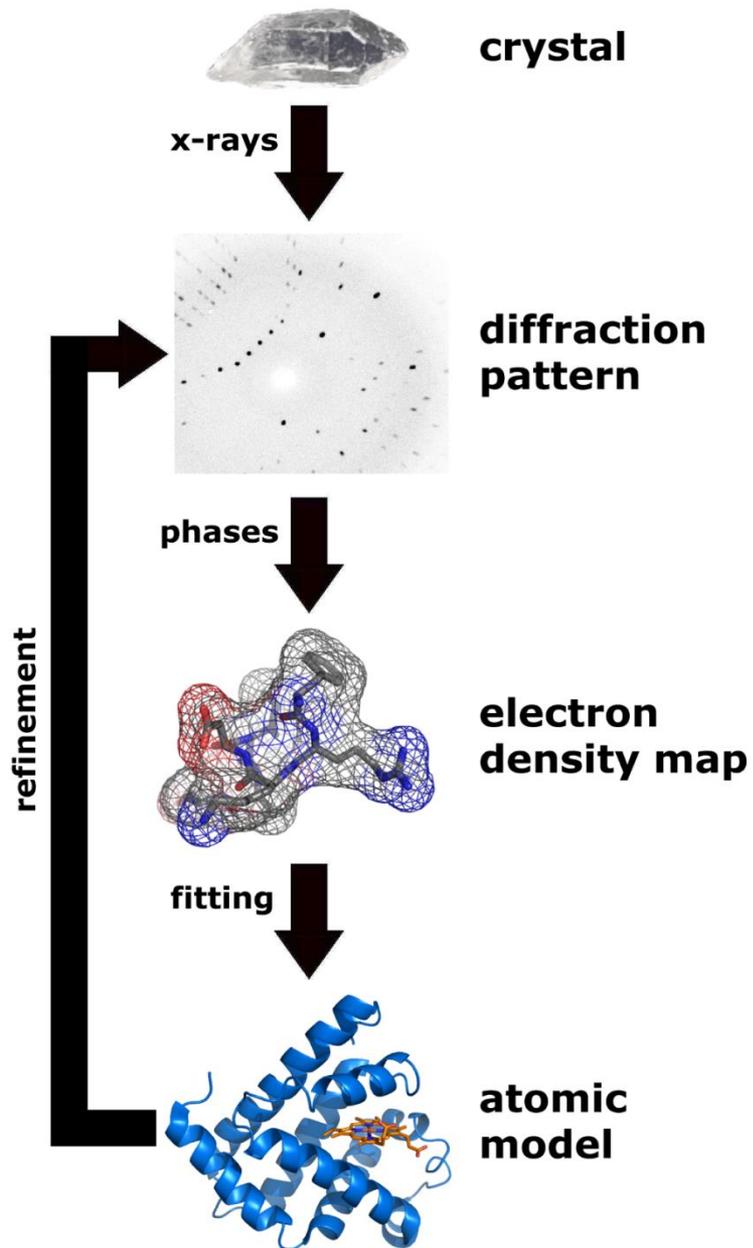


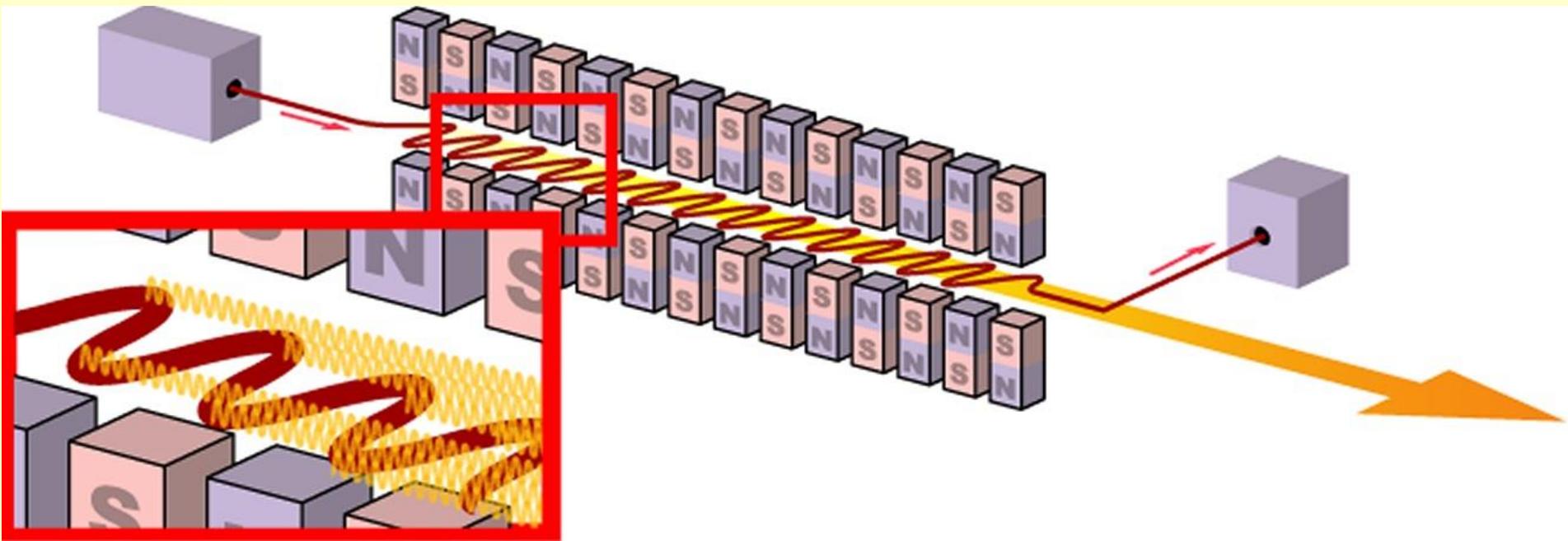
Рис. ЕЗ.21: а — закон Фриделя; б — влияние аномального рассеяния на $F(hkl)$ и $F(-h-k-l)$

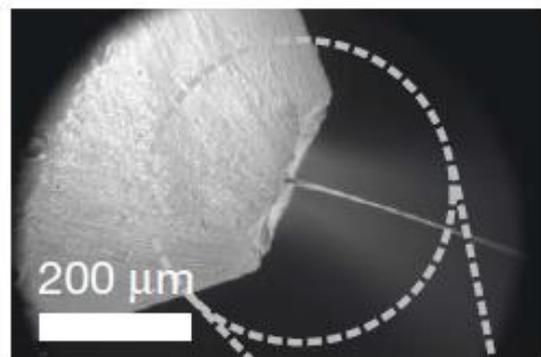


Femtosecond X-ray protein nanocrystallography

Henry N. Chapman^{1,2}, Petra Fromme³, Anton Barty¹, Thomas A. White¹, Richard A. Kirian⁴, Andrew Aquila¹, Mark S. Hunter³, Joachim Schulz¹, Daniel P. DePonte¹, Uwe Weierstall⁴, R. Bruce Doak⁴, Filipe R. N. C. Maia⁵, Andrew V. Martin¹, Ilme Schlichting^{6,7}, Lukas Lomb⁷, Nicola Coppola^{1†}, Robert L. Shoeman⁷, Sascha W. Epp^{6,8}, Robert Hartmann⁹, Daniel Rolles^{6,7}, Artem Rudenko^{6,8}, Lutz Foucar^{6,7}, Nils Kimmel¹⁰, Georg Weidenspointner^{11,10}, Peter Holl⁹, Mengning Liang¹, Miriam Barthelmess¹², Carl Caleman¹, Sébastien Boutet¹³, Michael J. Bogan¹⁴, Jacek Krzywinski¹³, Christoph Bostedt¹³, Saša Bajt¹², Lars Gumprecht¹, Benedikt Rudek^{6,8}, Benjamin Erk^{6,8}, Carlo Schmidt^{6,8}, André Hömke^{6,8}, Christian Reich⁹, Daniel Pietschner¹⁰, Lothar Strüder^{6,10}, Günter Hauser¹⁰, Hubert Gorke¹⁵, Joachim Ullrich^{6,8}, Sven Herrmann¹⁰, Gerhard Schaller¹⁰, Florian Schopper¹⁰, Heike Soltau⁹, Kai-Uwe Kühnel⁸, Marc Messerschmidt¹³, John D. Bozek¹³, Stefan P. Hau-Riege¹⁶, Matthias Frank¹⁶, Christina Y. Hampton¹⁴, Raymond G. Sierra¹⁴, Dmitri Starodub¹⁴, Garth J. Williams¹³, Janos Hajdu⁵, Nicusor Timneanu⁵, M. Marvin Seibert^{5†}, Jakob Andreasson⁵, Andrea Rocker⁵, Olof Jönsson⁵, Martin Svenda⁵, Stephan Stern¹, Karol Nass², Robert Andritschke¹⁰, Claus-Dieter Schröter⁸, Faton Krasniqi^{6,7}, Mario Bott⁷, Kevin E. Schmidt⁴, Xiaoyu Wang⁴, Ingo Grotjohann³, James M. Holton¹⁷, Thomas R. M. Barends⁷, Richard Neutze¹⁸, Stefano Marchesini¹⁷, Raimund Fromme³, Sebastian Schorb¹⁹, Daniela Rupp¹⁹, Marcus Adolph¹⁹, Tais Gorkhover¹⁹, Inger Andersson²⁰, Helmut Hirsemann¹², Guillaume Potdevin¹², Heinz Graafsma¹², Björn Nilsson¹² & John C. H. Spence⁴

XFEL



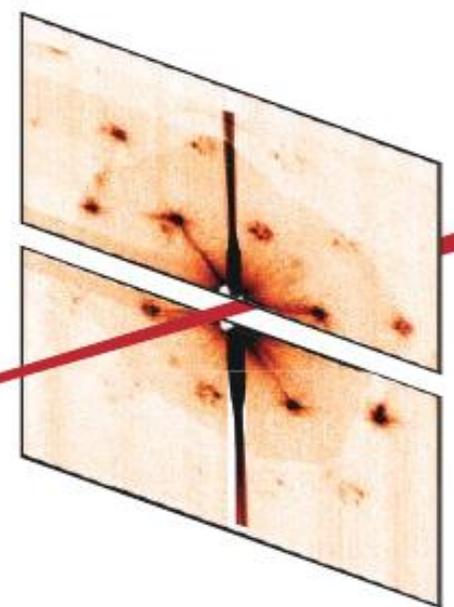
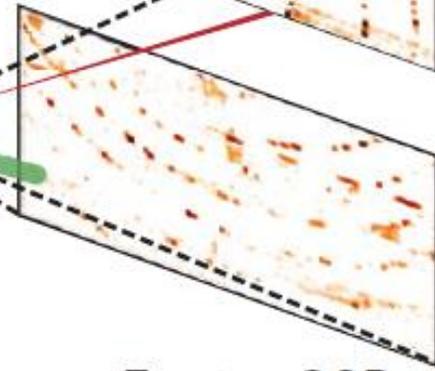
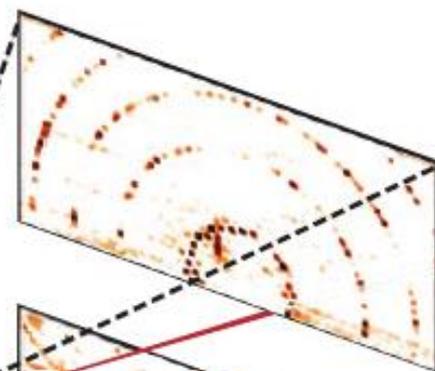


LCLS X-ray pulses

A red line representing the path of LCLS X-ray pulses, entering from the bottom left and passing through the interaction point.

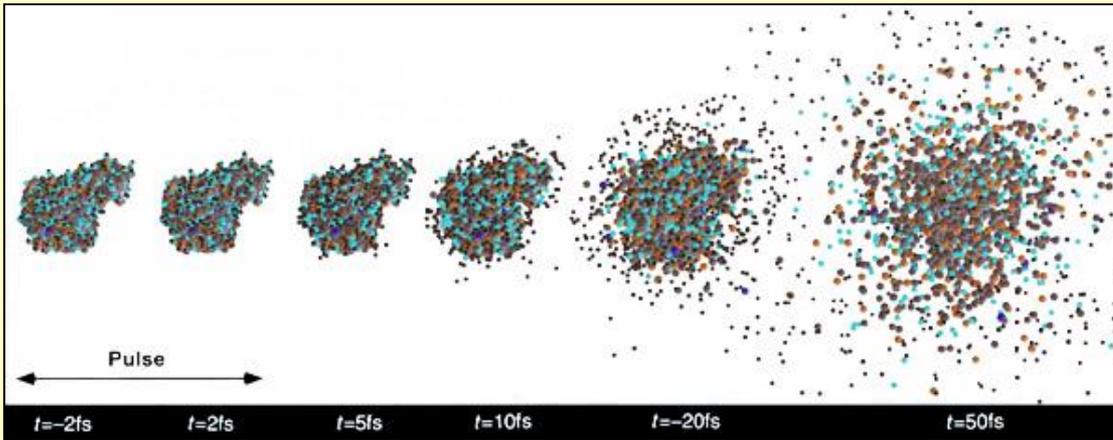
Interaction point

An upward-pointing black arrow indicating the location where the liquid jet and X-ray pulses meet.



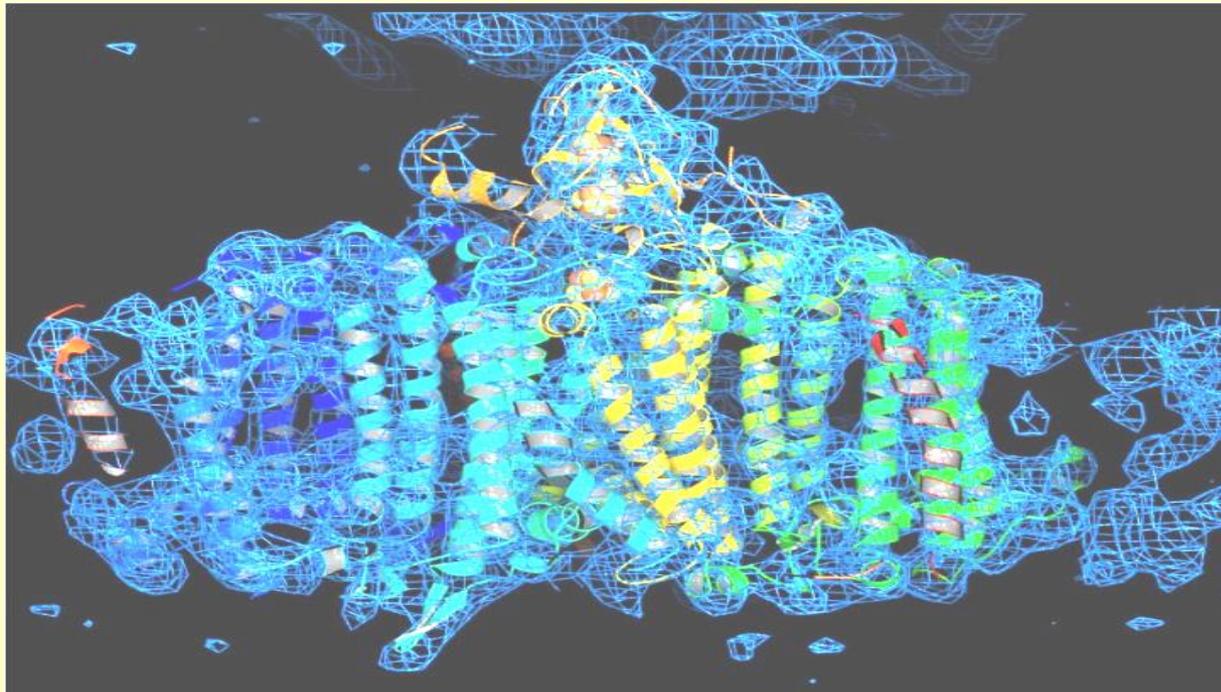
Rear pnCCD ($z = 564 \text{ mm}$)

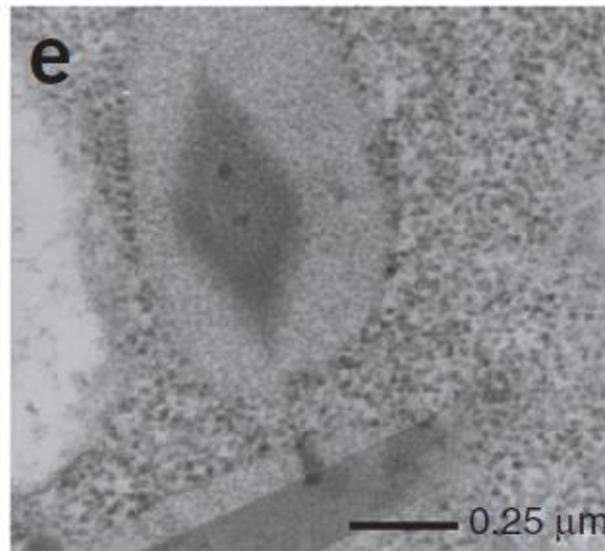
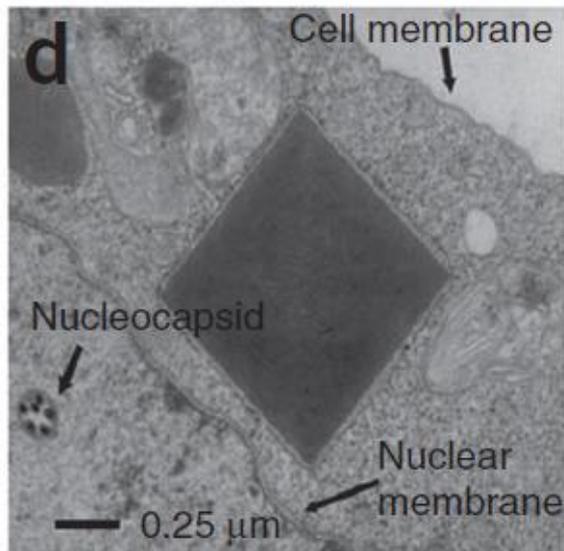
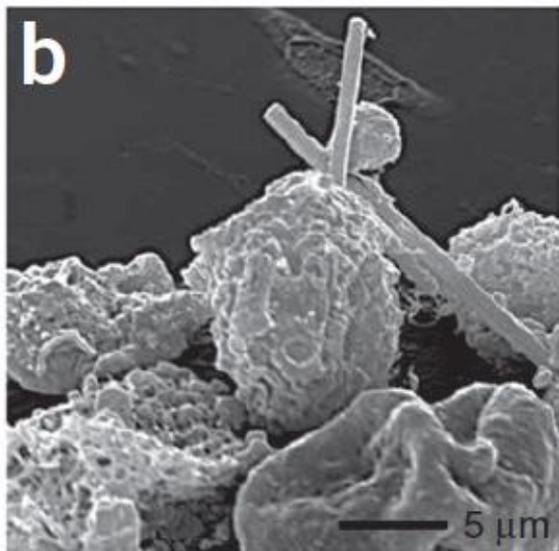
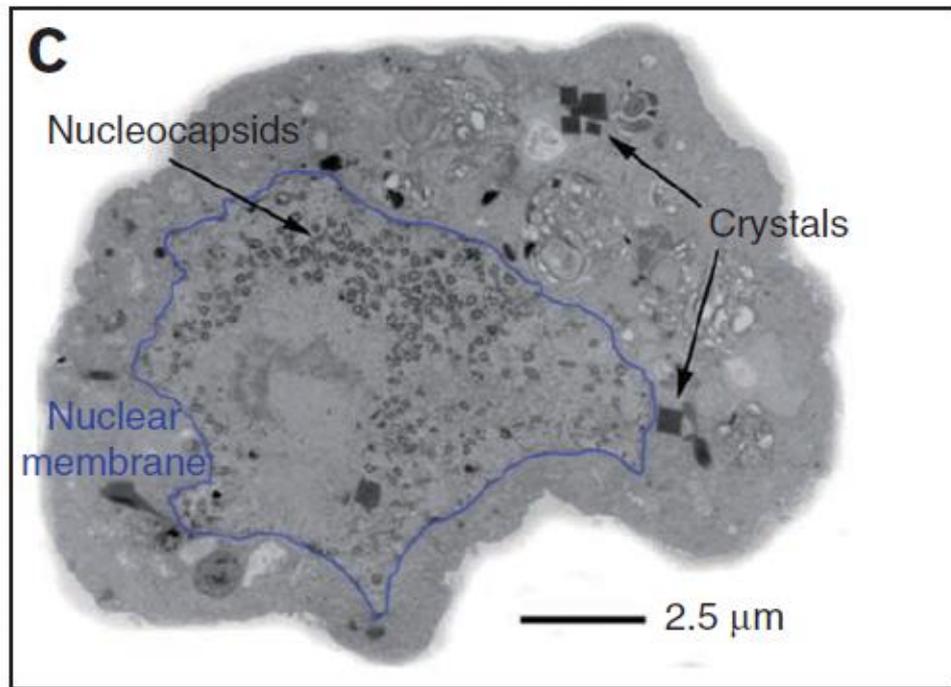
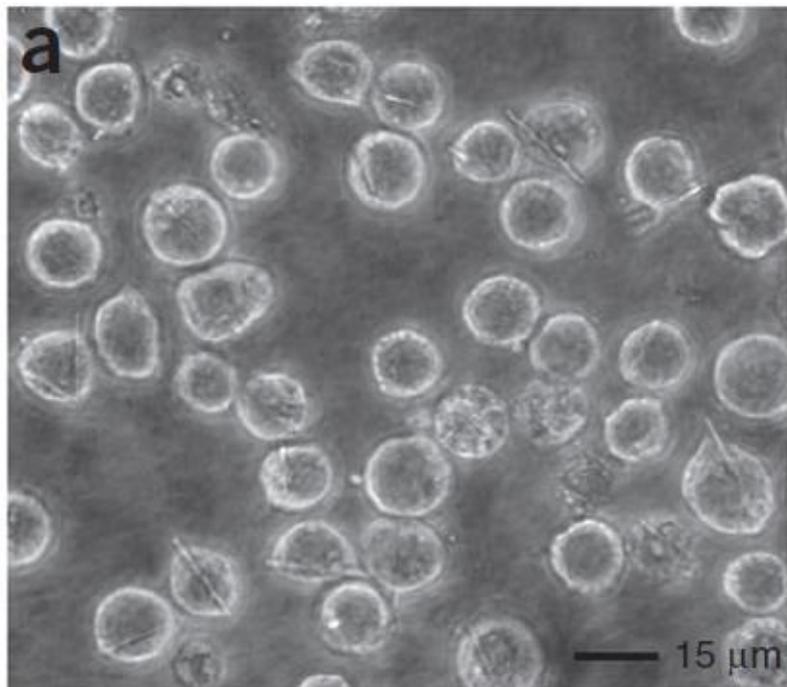
XFEL – первые структуры



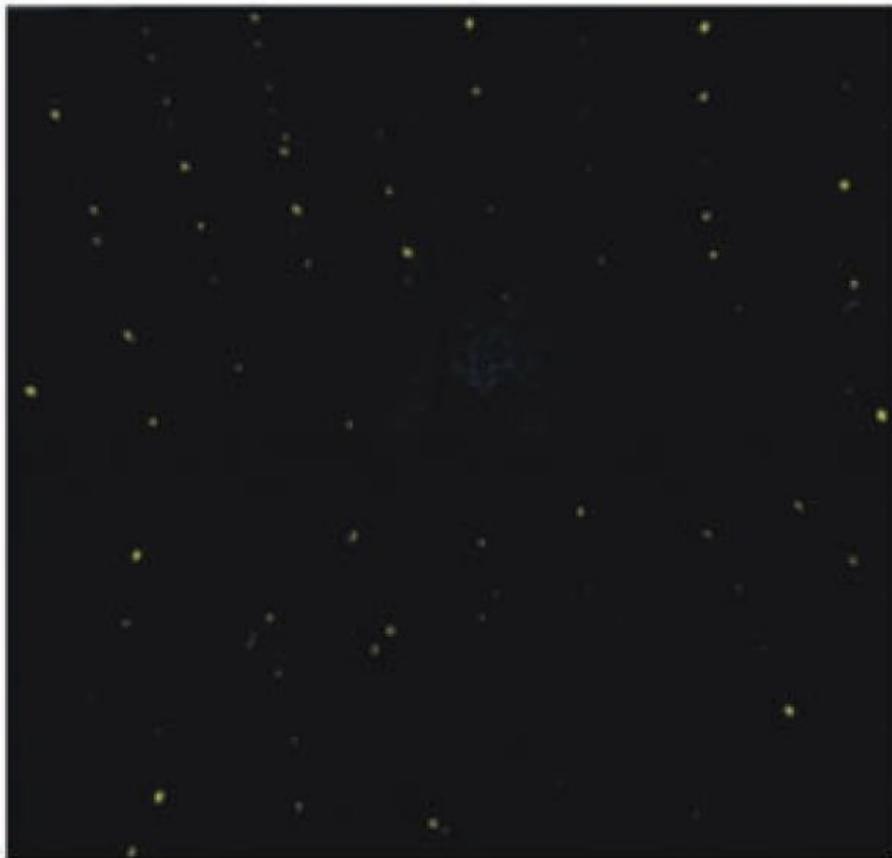
Chapman et al., Nature 470, 73-77, 2011

Siebert et al., Nature 470, 78-81, 2011

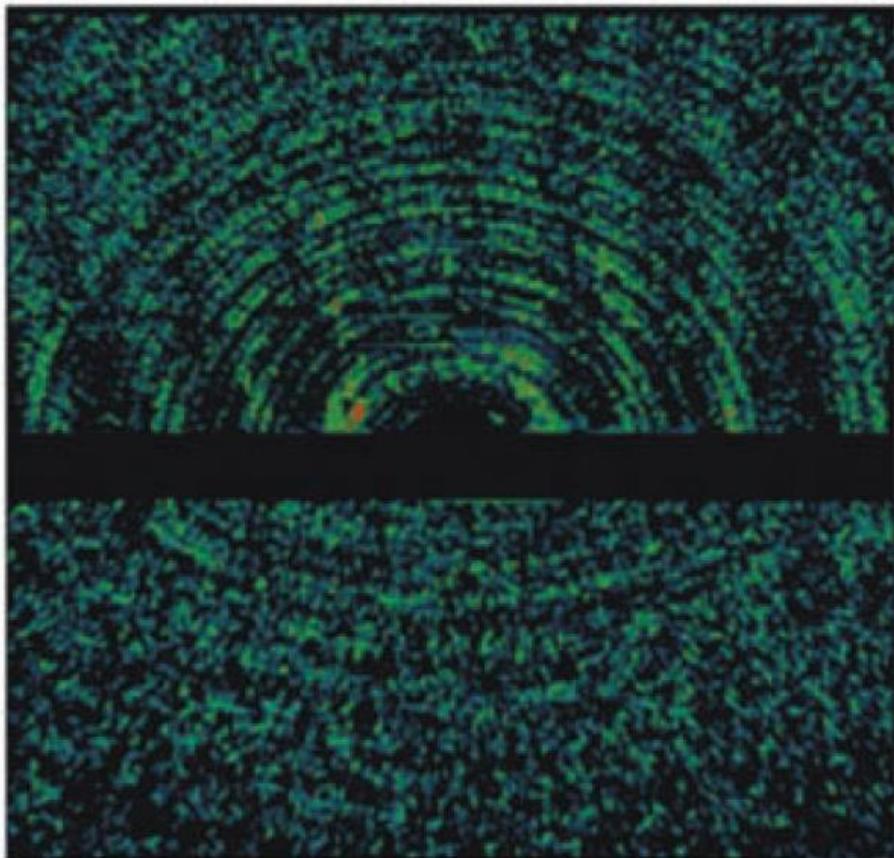




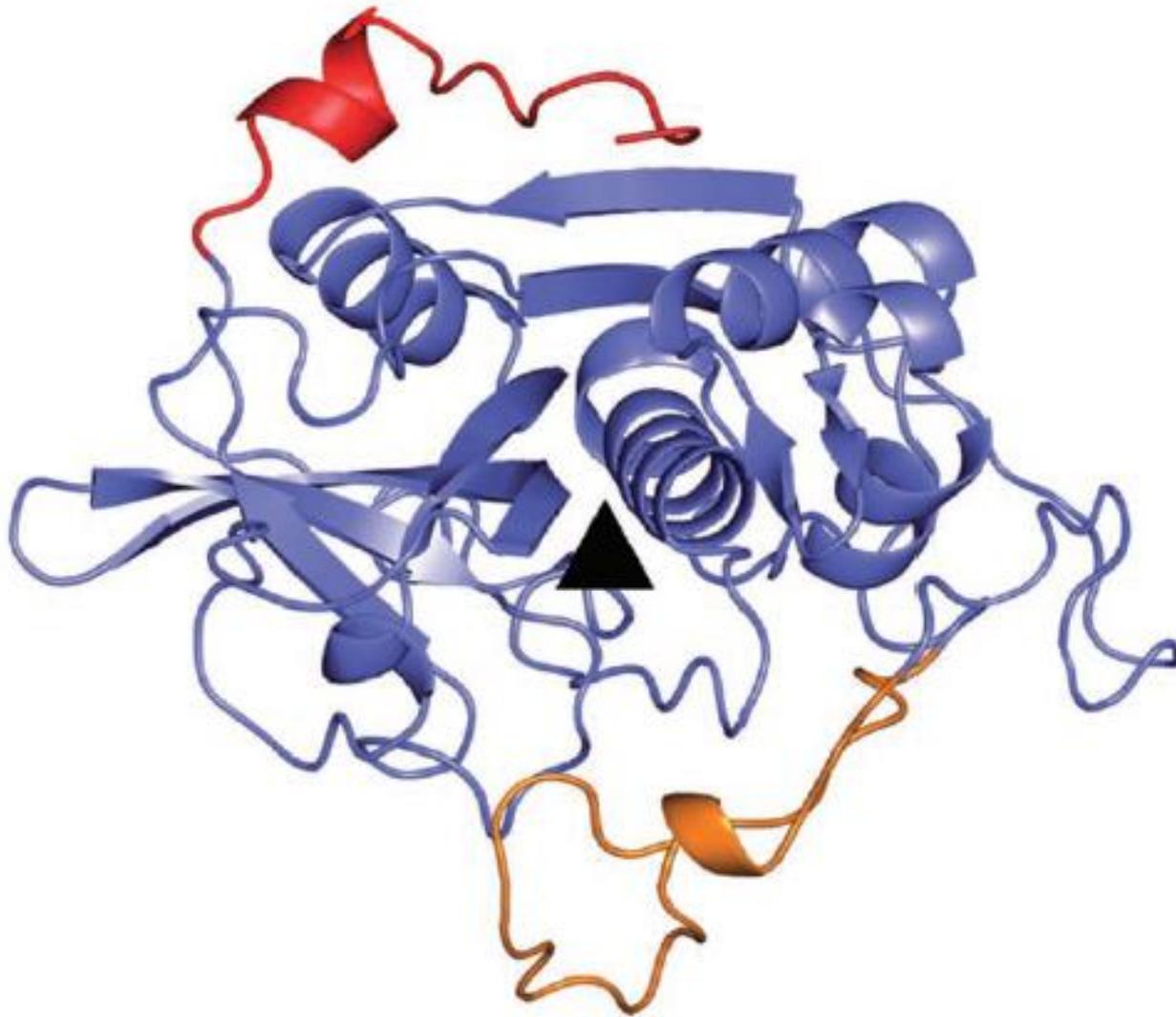
a



b



In vivo protein crystallization opens new routes in structural biology



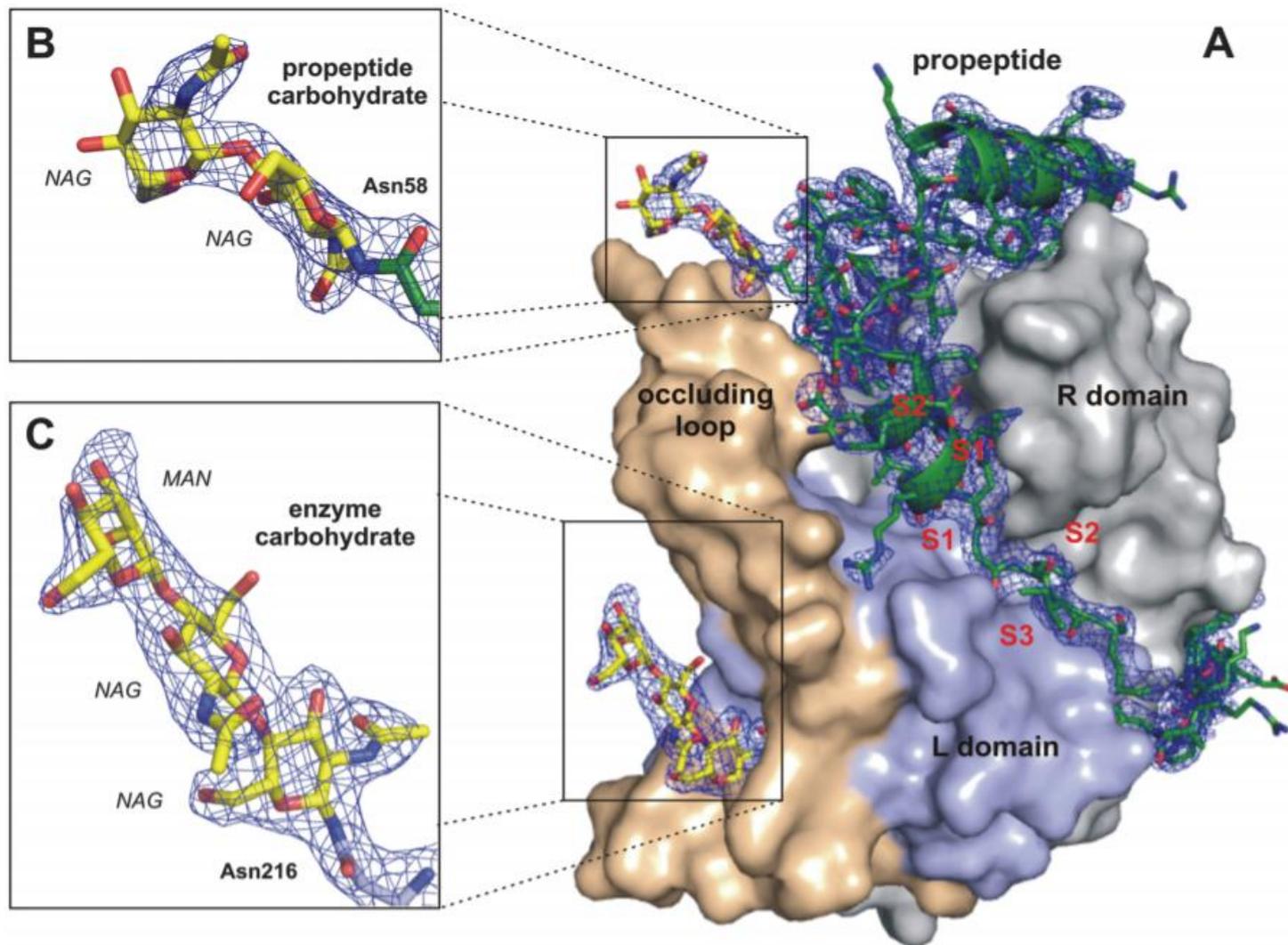


Fig. 2. Quality of the calculated electron density. **(A)** Surface representation of the TbCatB-propeptide complex solved by molecular replacement using the mature TbCatB structure (11) as a search model. The solution revealed additional electron density ($2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, 1σ , blue) of the propeptide (green) that is bound to the V-shaped substrate-binding cleft and of two carbohydrate structures (yellow) N-linked to the propeptide **(B)** and to the mature enzyme **(C)**. The propeptide, as well as both carbohydrates, are well-defined within the electron density map (blue), which confirms that the phases are not biased by the search model. Color codes correspond to Fig. 1C.

DOI:
10.1126/science
.1229663

Lipidic cubic phase injector facilitates membrane protein serial femtosecond crystallography

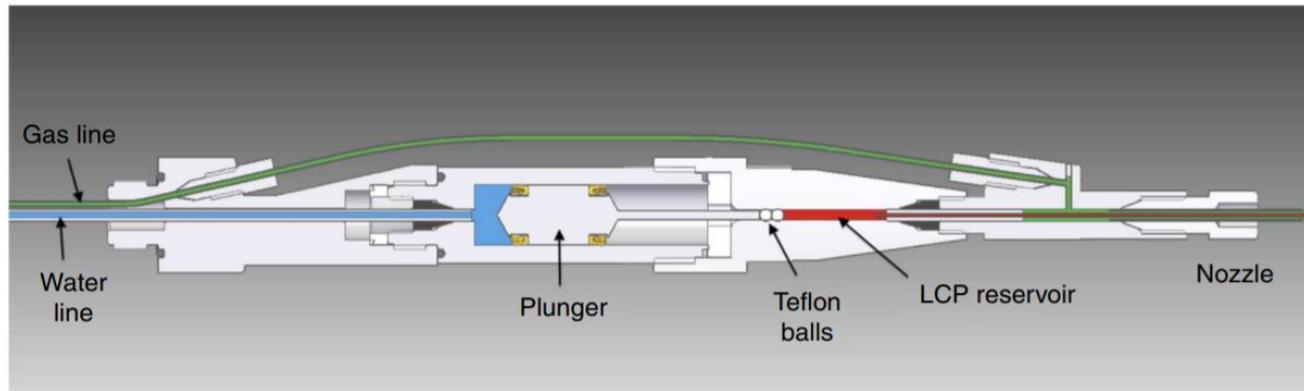
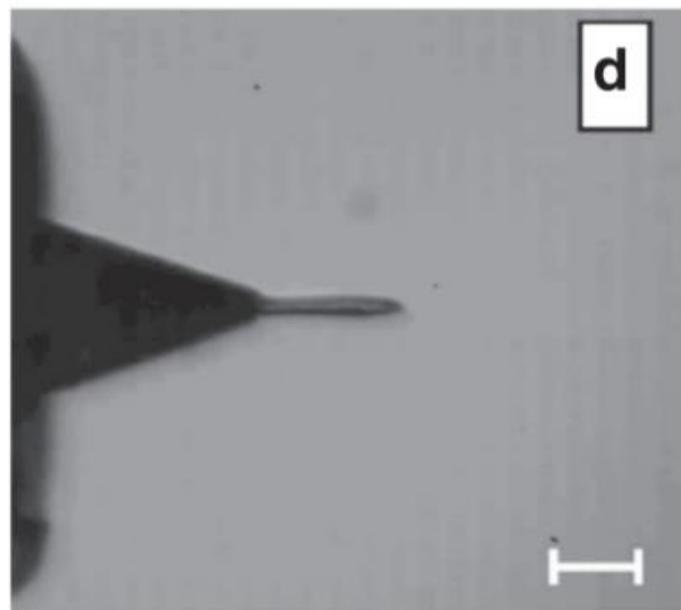
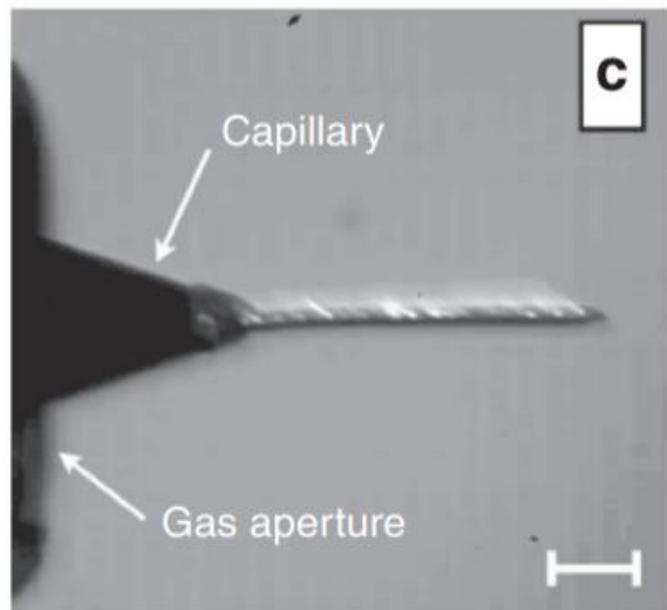
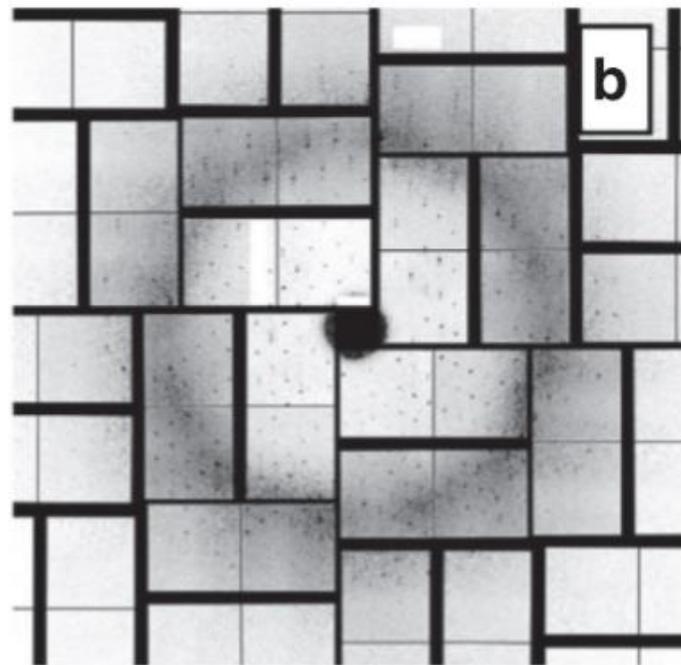
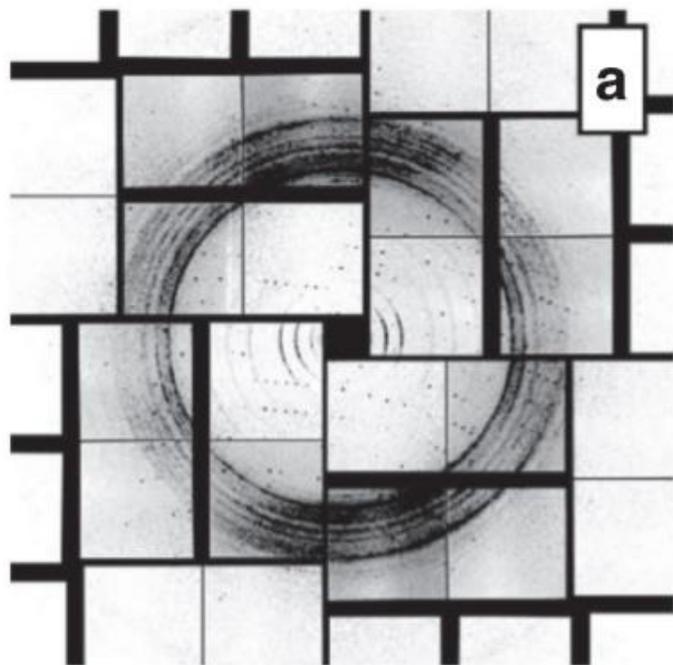
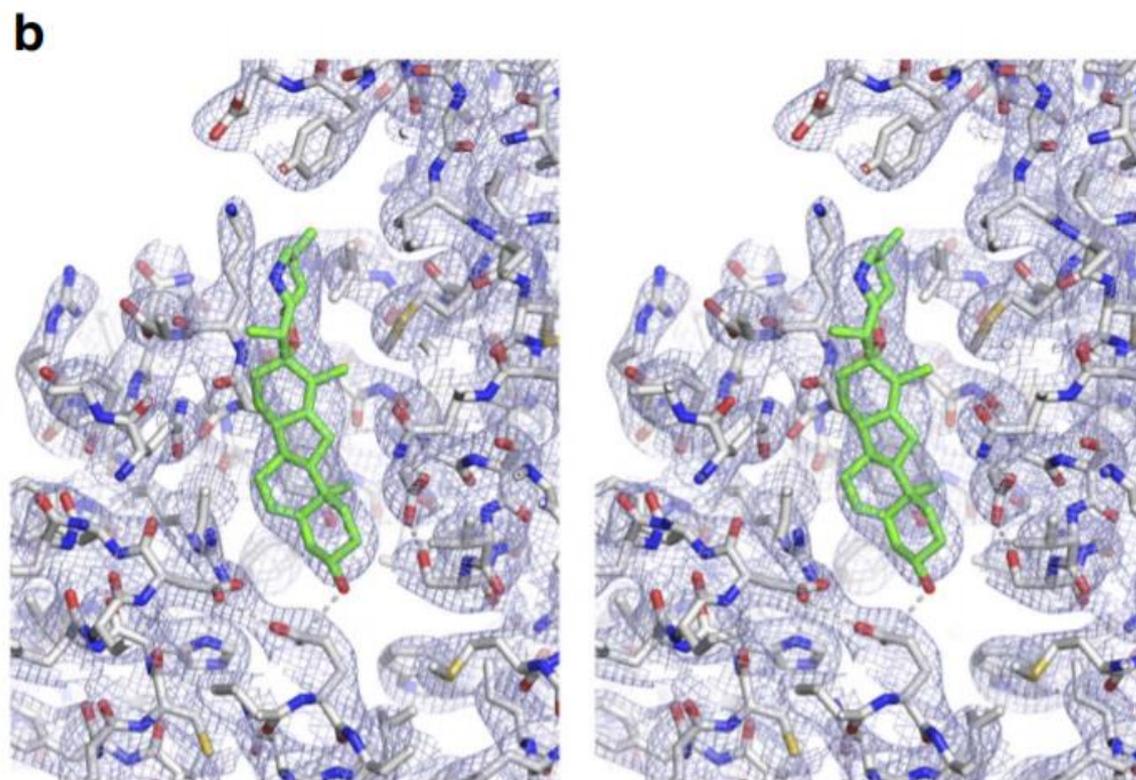
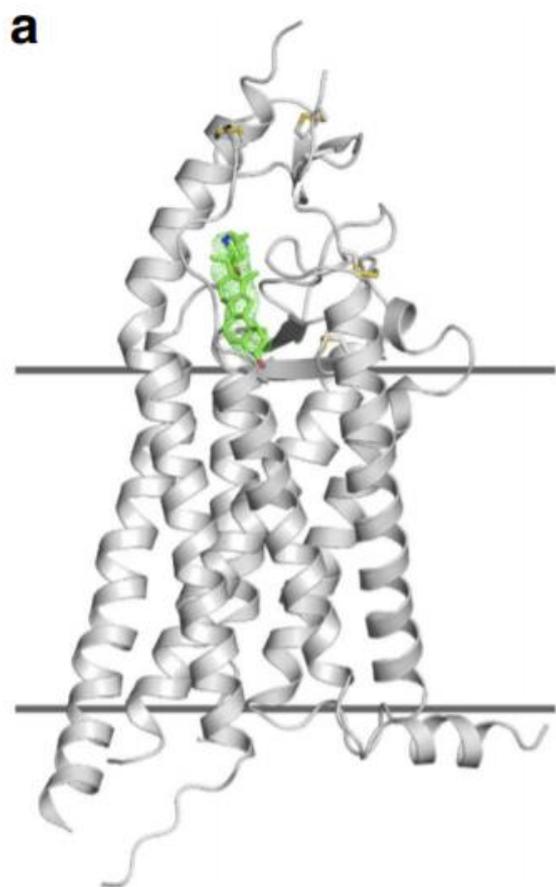


Figure 1 | Middle section through the LCP injector. In operation, the device is attached via the leftmost threaded fitting to a nozzle rod (not shown) for insertion into the experimental chamber. Water (blue) and gas (green) lines are routed through the nozzle rod from the left. LCP (red) is extruded from the nozzle on the right. Water, at a pressure of up to 300 psi, drives the hydraulic plunger, which amplifies the pressure 34 times to drive LCP through a capillary with an inner diameter of 10–50 μm . Two spherical Teflon beads are used to provide a tight seal against a pressure of up to 10,000 psi. The co-flowing gas is necessary for reliable extrusion and to maintain co-axial flow.





ПЭТ

