

# Röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat

- ▶ A szerkezetmegoldás menete
- ▶ Lehetőségek és korlátok
- ▶ Alkalmazások

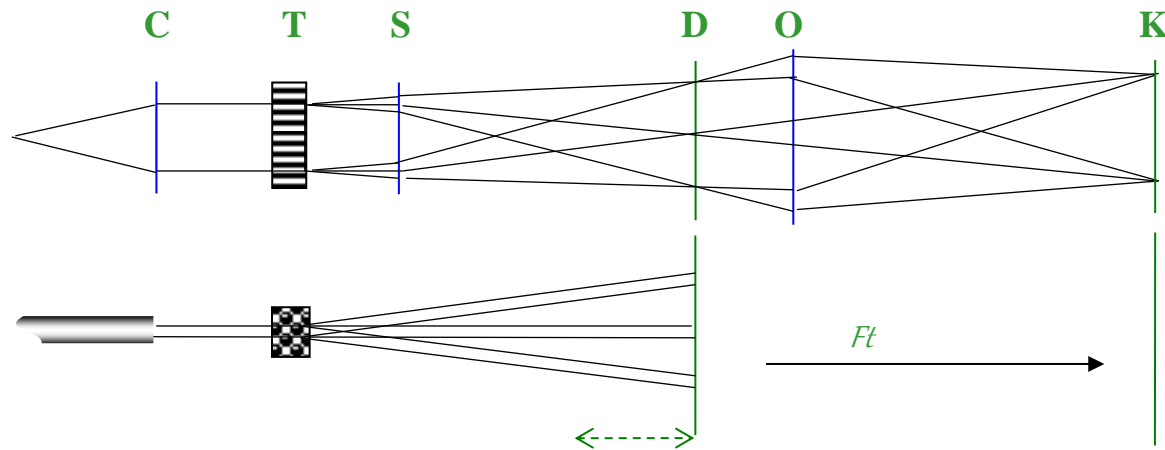
# A krisztallográfia alapjai

**Diffrakció:** a sugárzás rugalmas kölcsönhatása az anyaggal

**Röntgendiffrakció analógiája a mikroszkóppal:**

Részletes, nagyított kép alkotása a vizsgált tárgyról

De nem állíthatók elő megfelelő lencsék a szórt sugarak refókuszálására



**„Krisztallográfia”:**

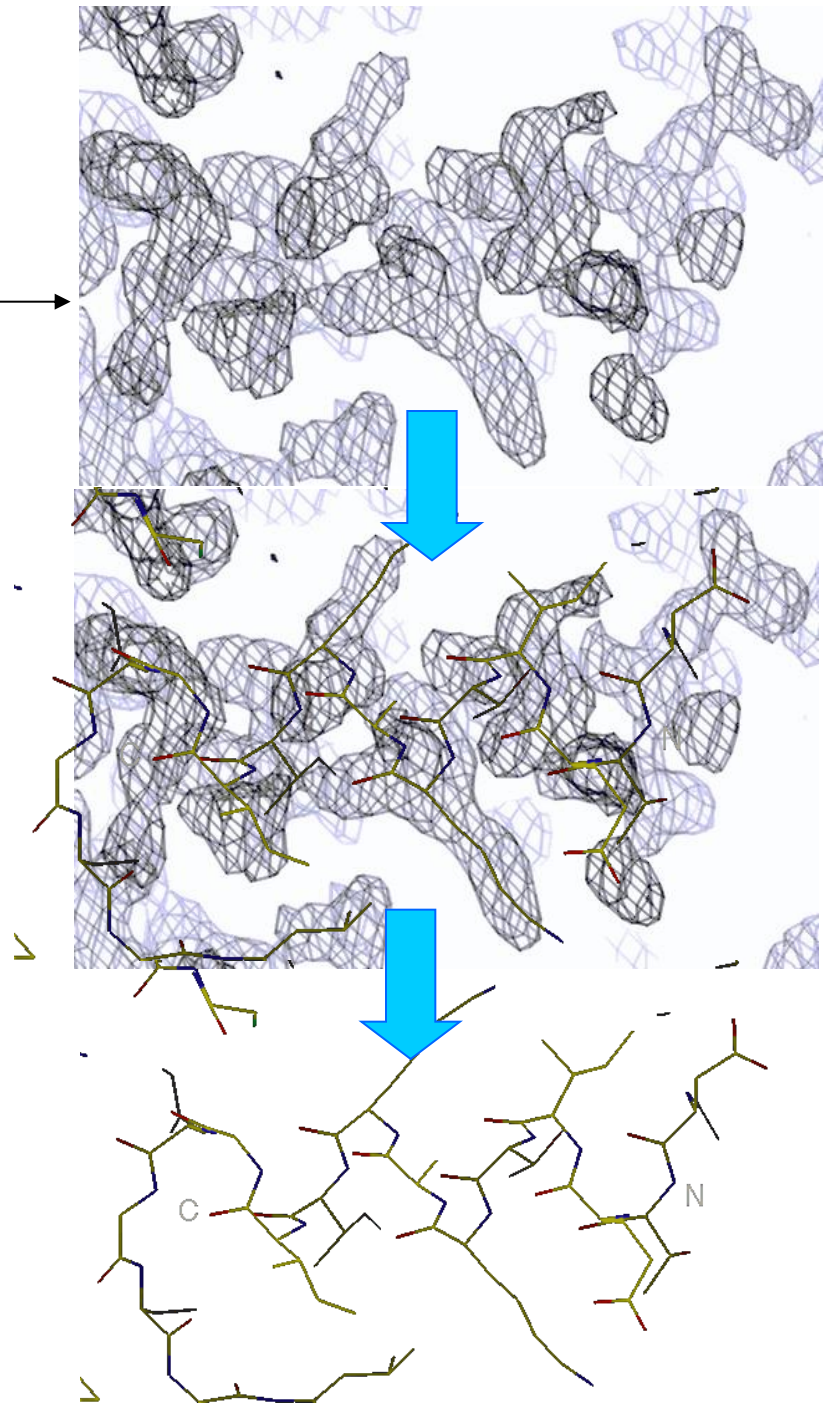
A sugárzás-anyag kölcsönhatás gyenge – kondenzált fázisú minta szükséges

Rendezett minta (egykristály): a szerkezetről 3 dimenziós információt kapunk, amiből sokatomos, bonyolult szerkezetek is meghatározhatók

# A kristallográfia alapjai

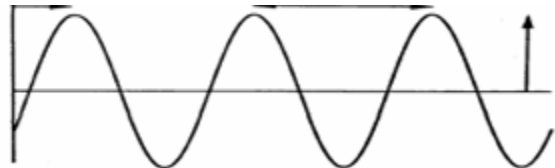
A röntgensugár a molekula elektronfelhőjével hat kölcsön, ezért a mérés kiértékelésekor **elektronsűrűségi térképet kapunk.**

Ezért modellépítési lépés is szükséges.



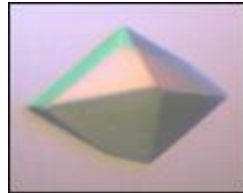
**Kristallográfiai fázisprobléma:** a diffrakciós képből a szórt sugarak fázisát nem kapjuk meg, csak az intenzitásukat, ezért nem számítható közvetlenül az elektronsűrűségi térkép.

fázis az origóhoz képest    hullámhossz    amplitudó

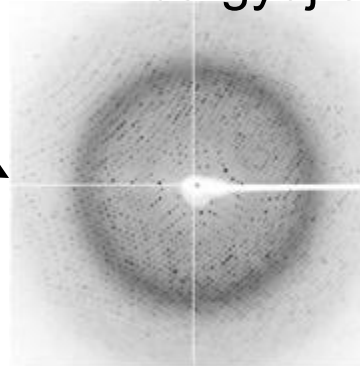


# Makromolekulás krisztallográfia lépései

Kristályosítás

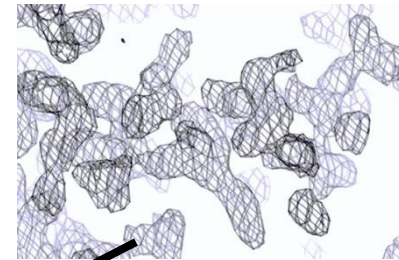


Adatgyűjtés



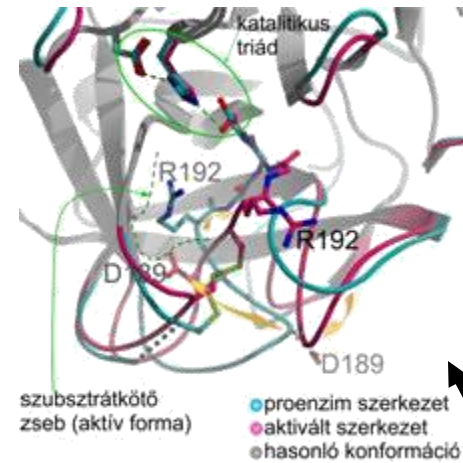
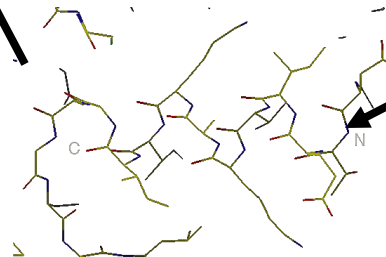
A fázisprobléma megoldása

Finomítás



Modellépítés

Validálás,  
interpretálás



# Alkalmazási lehetőségek és korlátok

Jellemző	Következmény	Előny/ hátrány az NMR-hez képest
Kristályok vizsgálhatók	Oligopeptidek hajlékonyak, nem kristályosíthatók	☹
	Hajlékony molekula esetén a kristálybeli konformáció félrevezető lehet	☹
A molekulaméretben nincs korlátozás	Közepes és nagy molekulák, komplexek (pl. vírusok, riboszóma) is vizsgálhatók	☺
Az elektronsűrűségi térkép a kristálybeli molekulákat tér- és időátlagban mutatja	A molekulamozgások dinamikájáról közvetett információt kapunk	☹
Általában a fehérjék konformációja jól meghatározott (globuláris fehérjék)	A kristálybeli konformáció fiziológiásan releváns; sok esetben pl. enzimreakció is vizsgálható	
Modellépítéskor egy hasonló szerkezet kiindulási modellként alkalmazható	Több hasonló szerkezet (pl. kismolekulás komplexek) esetén a szerkezetmegoldás gyors	☺

# A mért adatok információtartalma: felbontás

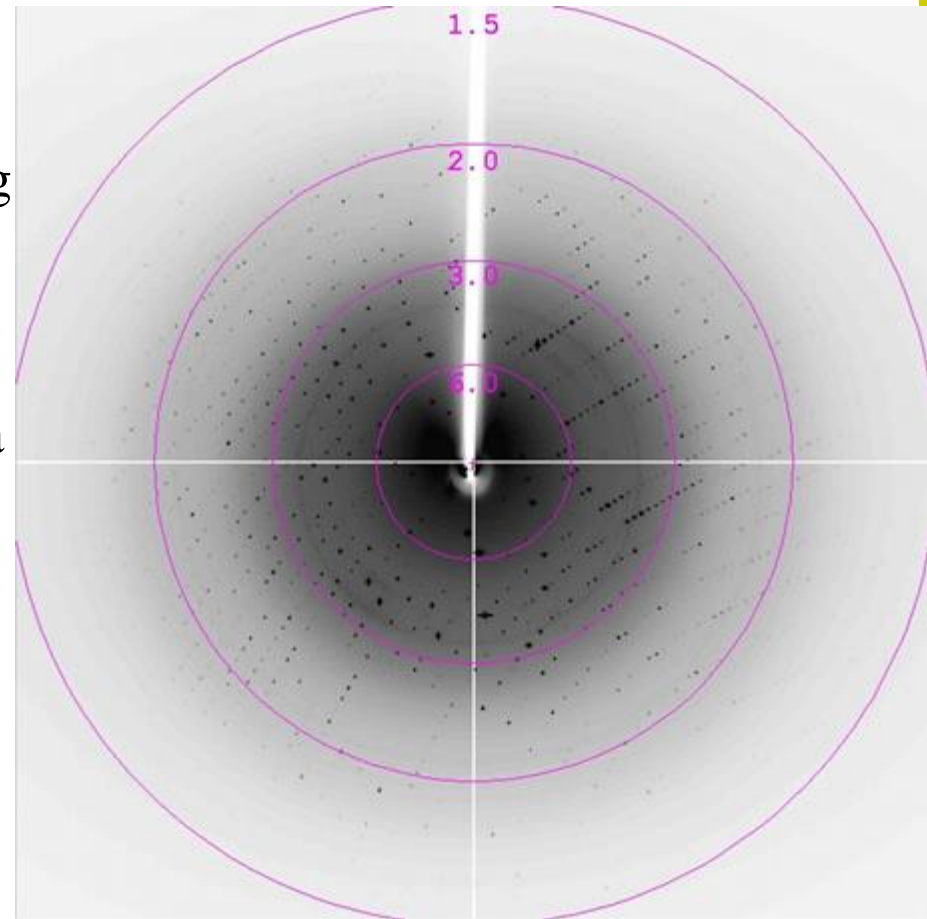
*Kismolekulák:* atomi felbontás (1-1,2Å).

*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.



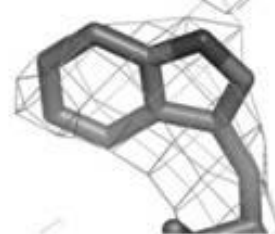
Felbontás:

1,2 Å

1,8 Å

2,8 Å

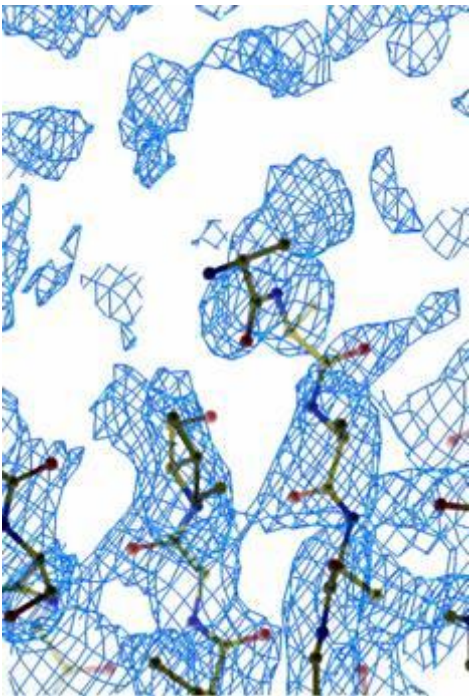
4,0 Å



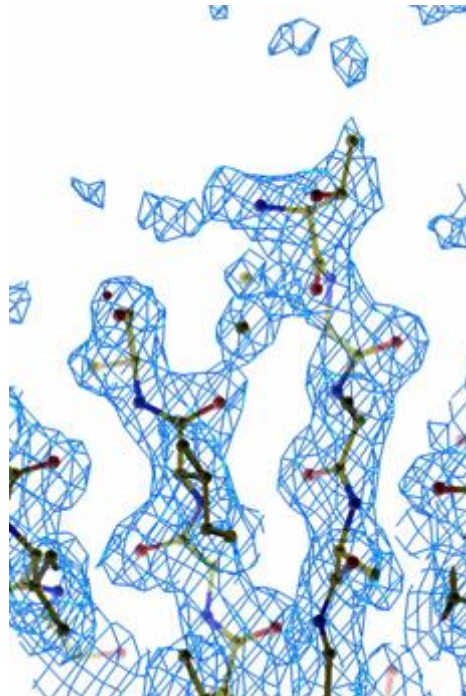
# Modellépítés - finomítás

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

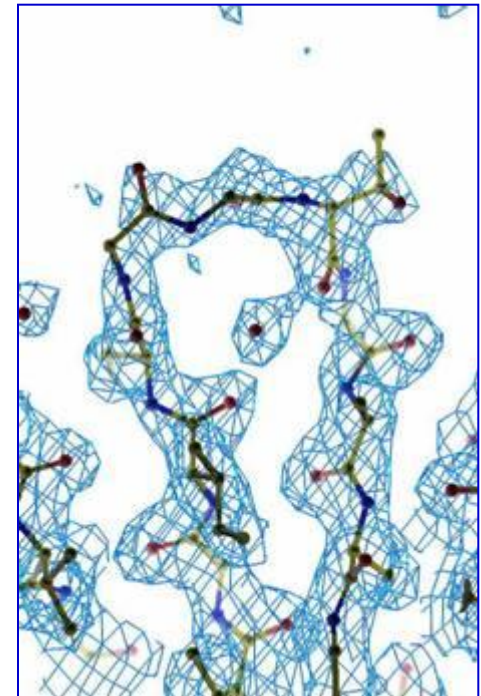
Finomítás 0. köre



6. köre



11. köre után:



# A fehérjeszerkezet érvényessége

Röntgendiffrakciós (és NMR) szerkezetvizsgálat esetén A mérésből nem közvetlenül kapjuk meg a szerkezetet: értelmezési lépés

- ▶ Illeszkedés a mért adatokhoz: kristallográfiai jósági tényezők (R faktor,  $R_{\text{free}}$ )
- ▶ Felbontás
- ▶ Mért adatok (reflexiók) és változók (atomonként 3 koordináta és általában egy atomi mozgástényező) számának aránya
- ▶ Atomi mozgástényezők:  
B $\geq$ 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 oldatbeli vizsgálatok eredményeivel?  
Kristályt vizsgálunk, nem oldatot - konformáció más lehet



# Oligopeptidok és fehérjék szerkezeti adatbázisokban

**CSD (www.ccdc.cam.ac.uk)**

Összes szerkezet: 462146

(~98% röntgendiffrakció)

Ebből peptid: 1107

aciklusos peptid: 728

pentapeptid, vagy nagyobb: 260

aciklusos pentapeptid, v. nagyobb: 139

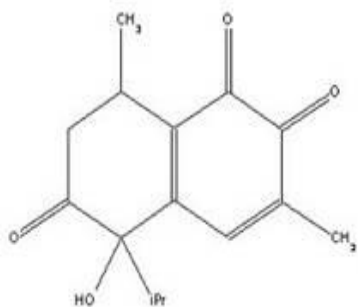
**PDB (www.pdb.org)**

Összes szerkezet: 64781

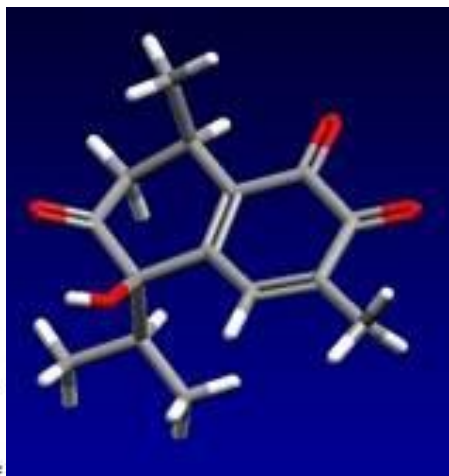
(~92% röntgendiffrakció)

Ebből fehérje vagy fehérje-fehérje

komplex: 59971



**1212121**  
E. Liaw, J.-B. Isset, U. Kolpak, K. Schenk, W. Jaihom, H. Chaitit,  
V. Chavasita, K. Hottelmann  
J. Nat. Prod., 65, 1332, 2002  
5-Hydroxy-5-isopropyl-3,8-dimethyl-7,8-dihydronaphthalene-1,2,6  
(SH)-trione  
Source: Heartwood of *Mansonia* 02021  
Melting Point 125-128 deg.C  
Colour: violet  
Extra Information: Plant used in Thai folk medicine as a cardiac  
stimulant, anxiolytic and antidepressant.  
C15 H18 O4  
SpaceGroup: P212121



**RCSB Protein Data Bank - Microsoft Internet Explorer**

Fájl Szerkesztés Nézet Kedvencek Eszközök Súgó

Vissza - - - Keresés - - - Kedvencek - - -

Cím <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

Adobe - Y! - Search Web - Mail - Shopping - My Yahoo!

**RCSB PDB**  
PROTEIN DATA BANK

An Information Portal to Biological Macromolecular Structures  
As of Tuesday Dec 12, 2006 there are 40628 Structures | PDB Statistics

Contact Us | Help | Print Page

PDB ID or keyword Author SEARCH Advanced Search

Home Search

Home  
Tutorial About This Site  
Getting Started  
Download Files  
Deposit and Validate  
Structural Genomics  
Dictionaries & File Formats  
Software Tools  
General Education  
BioSync  
General Information  
Acknowledgements  
Frequently Asked Questions  
Known Problems  
Report Bugs/Comments

**Welcome to the RCSB PDB**

The **RCSB** PDB provides a variety of tools and resources for studying the structures of biological macromolecules and their relationships to sequence, function, and disease.

The RCSB is a member of the **wwPDB** whose mission is to ensure that the PDB archive remains an international resource with uniform data.

This site offers tools for browsing, searching, and reporting that utilize the data resulting from ongoing efforts to create a more consistent and comprehensive archive.

Information about compatible browsers can be found [here](#).

A **narrated tutorial** illustrates how to search, navigate, browse, generate reports and visualize structures using this new site. [This requires the Macromedia Flash player download.]

Comments? [info@rcsb.org](mailto:info@rcsb.org)

**Molecule of the Month: Transposase**

In the 1940's, Barbara McClintock discovered that the genome is a dynamic, changing place. She was studying maize, and she found that the beautiful mosaic colors of the kernels did not follow

**NEWS**

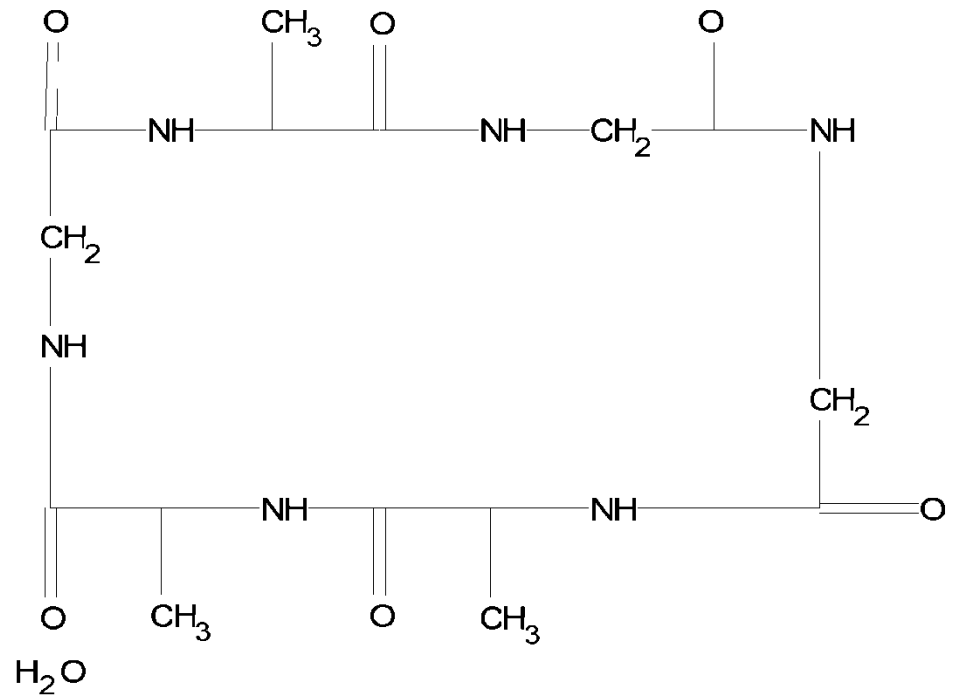
- Complete News
- Newsletter
- Discussion Forum

12-December-2006  
**RCSB PDB's 2006 Annual Report Now Available**

The RCSB Protein Data Bank's Annual Report is currently being distributed. Covering the period of July 1, 2005 - June 30, 2006, this report documents the recently released database and website.

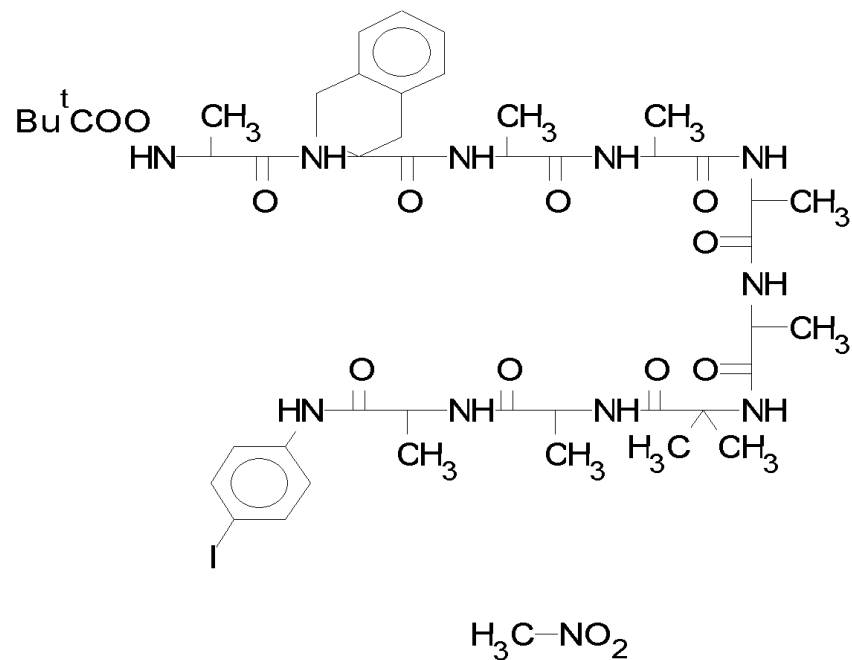
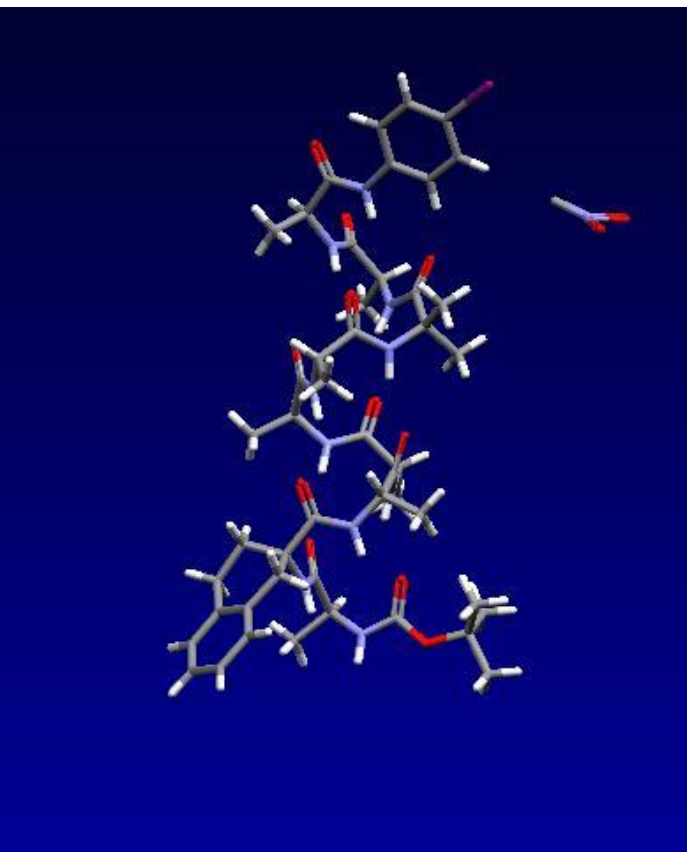
# Oligopeptidék

- Sok ciklikus peptid, vagy makrociklus



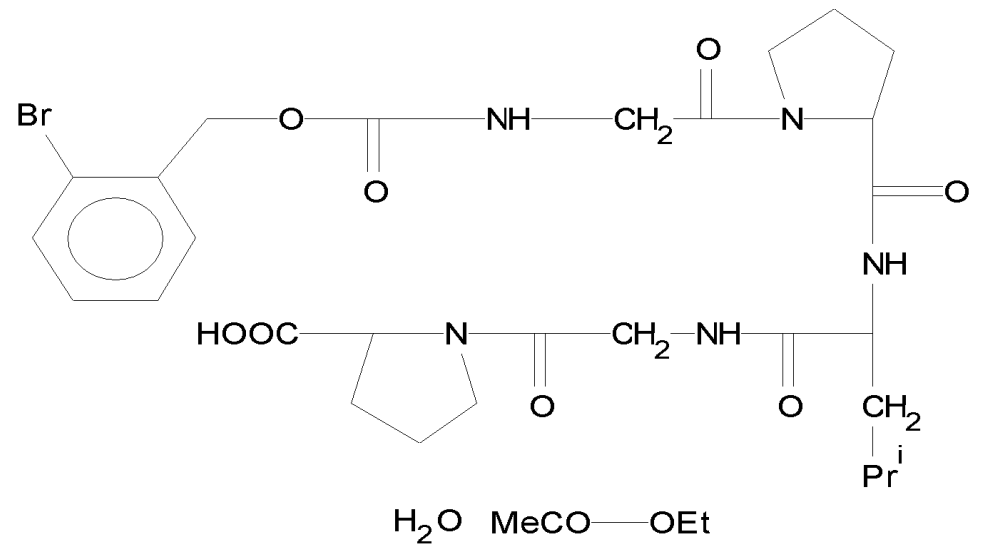
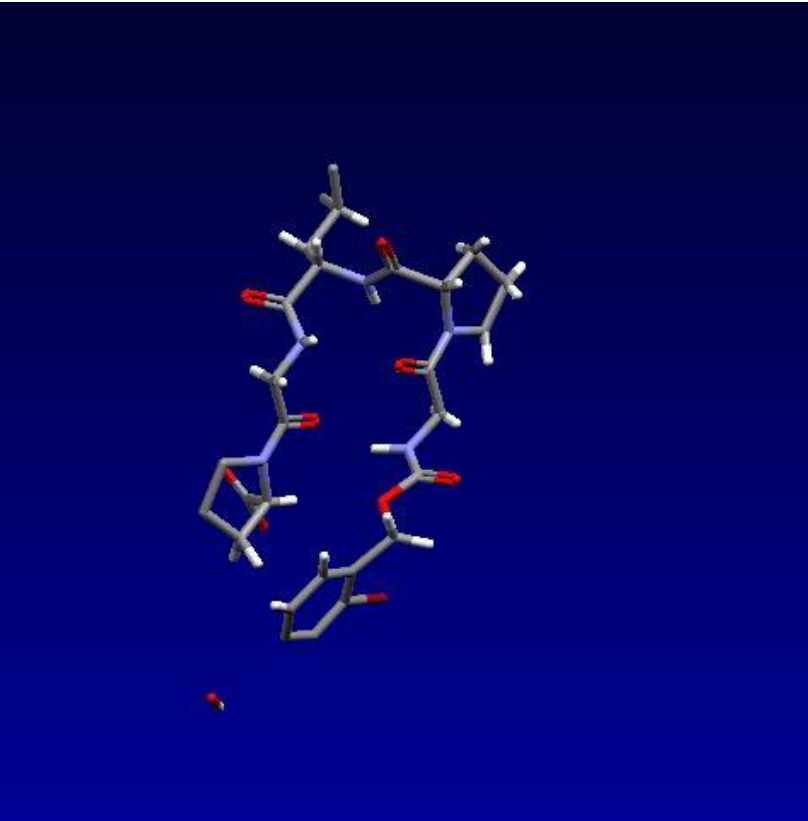
# Oligopeptidok

- ▶ Aciklusos peptidok között gyakori a helikális konformáció

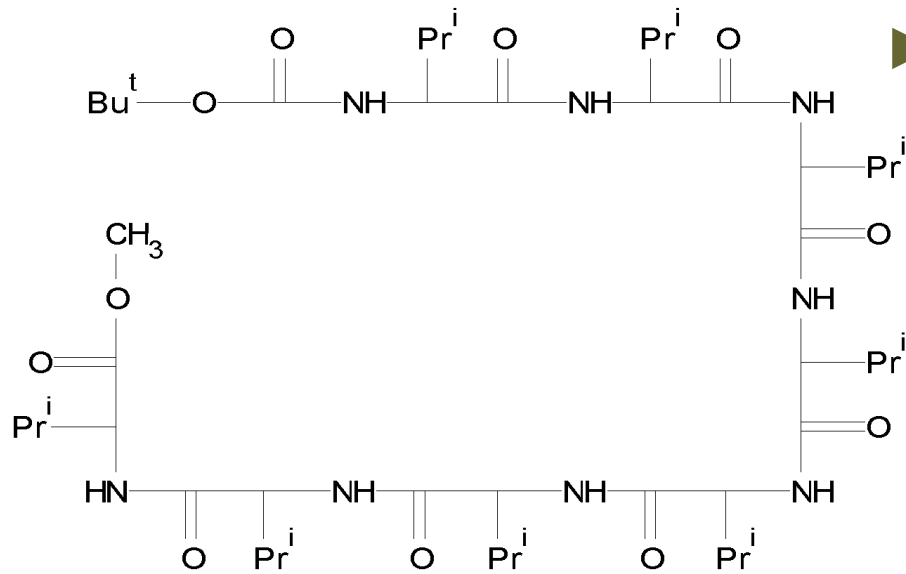


# Oligopeptidok

## ► Hajtókanyar



# Oligopeptidek



► Szokatlan konformációk. Pl. balmenetes antiparallel  $\beta$ -hélix

H<sub>2</sub>O



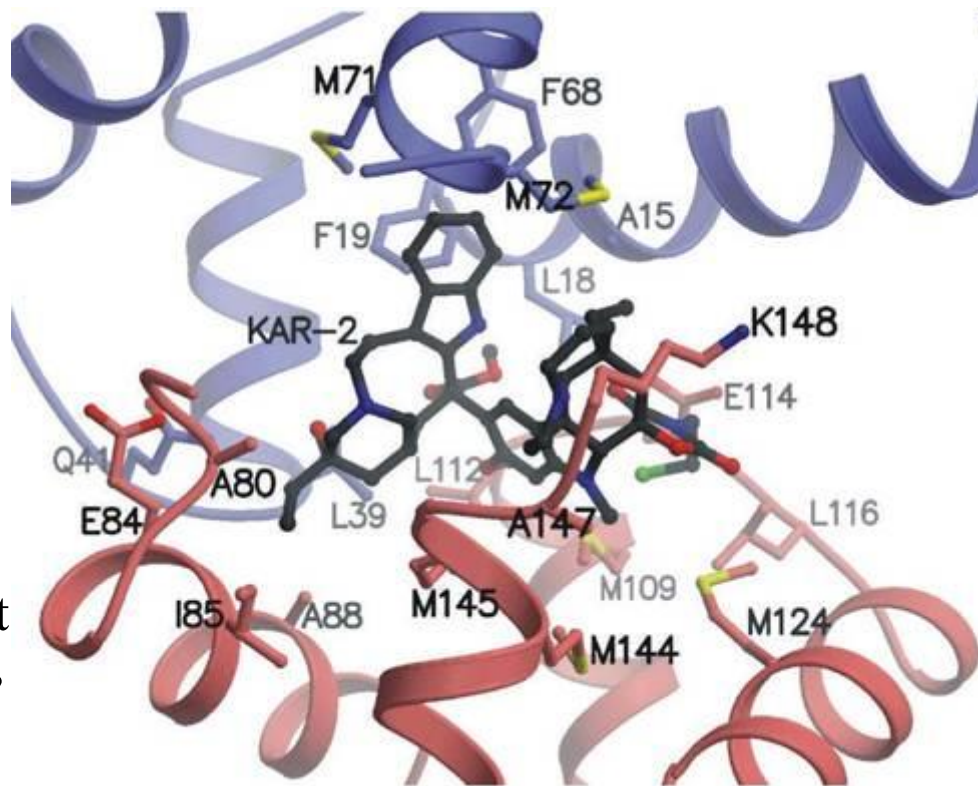
# A röntgendiffrakció alkalmazásai: makromolekulák

A kristálybeli konformáció általában azonos az oldatbelivel.

Kevésbé részletes kép a molekuláról, kismolekulás eredmények felhasználása.

Legtöbbször fehérjék, komplexeik és fehérje-nukleinsav komplexek vizsgálata (kristályosíthatóság)

- ▶ Natív szerkezet vizsgálata: szerkezet-funkció összefüggés, felgombolyodási családok
- ▶ Mutációk hatása: változások a működésben, fehérjetervezés
- ▶ Komplexek ligandumokkal: információk a mechanizmusról, specificitás; gyógyszertervezés
- ▶ Komplexek makromolekulák között: molekuláris felismerés, szabályozás
- ▶ Időfelbontásos krisztallográfia



# Szubatomi felbontású szerkezet

Még a kismolekulás kristályok esetén is ritka.

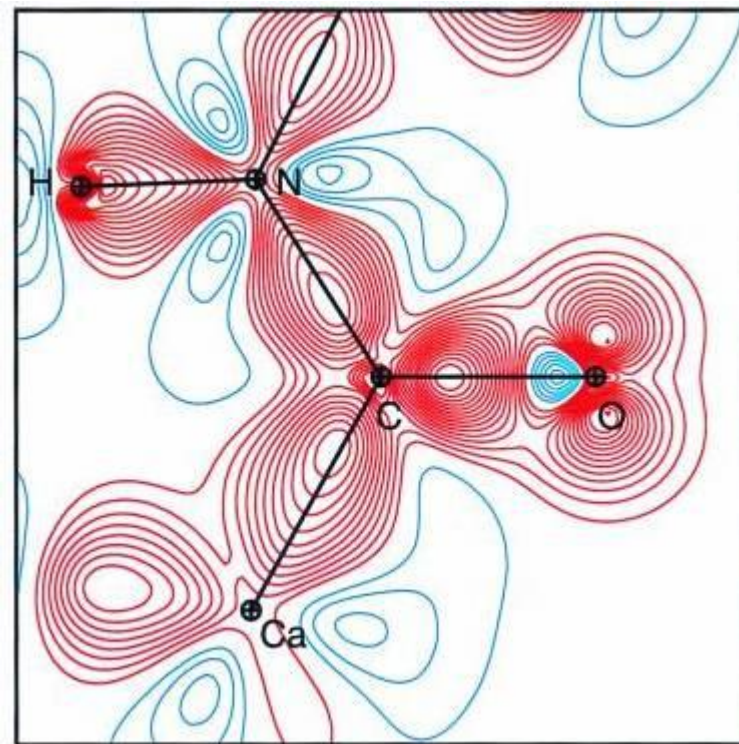
Ha a felbontás 0,5 Å körül van, a finomítás során a kötő elektronpárokat is figyelembe vevő modell.

Deformációs elektronsűrűségi térkép → delokalizáltak-e a  $\pi$ -elektronok,  
→ milyen a nem kötő elektronpárok iránya.

A molekula dipólusnyomatéka meghatározható, és következtethetünk a reakciókészségre is.

P1. Krambin (46 aminosavas fehérje,  
a kristály víztartalma kicsi, felbontás 0,54Å)

elektronsűrűségi térkép  
a peptidkötés síkjában:



Jelsch et al. PNAS 97, 3171 (2000)

# Atomi felbontású szerkezet

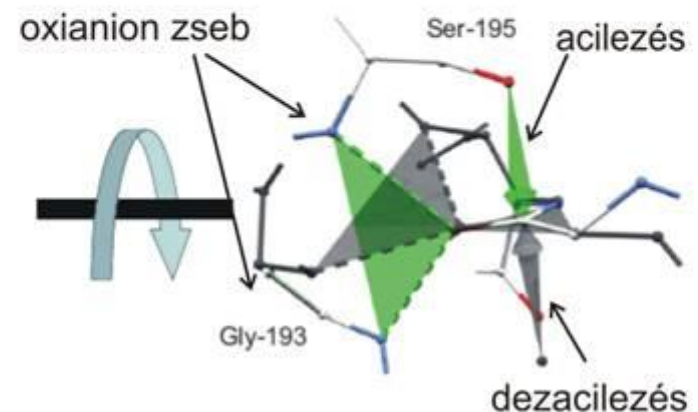
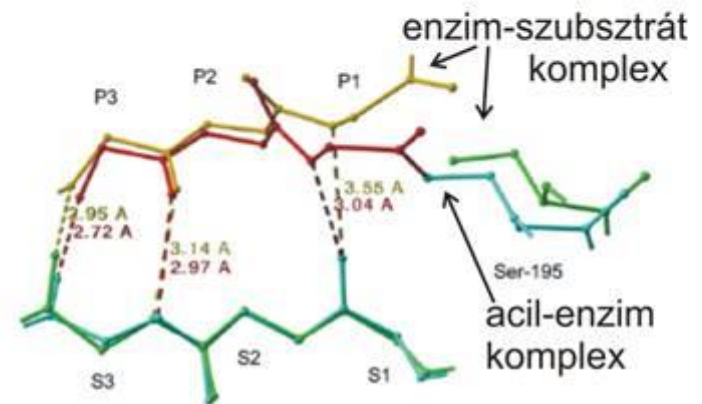
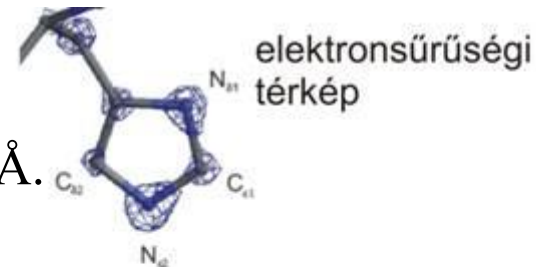
A felbontás 1-1,2Å. Távolságok hibája 0,02-0,06Å.

Vizsgálható a geometria torzulása, esetleg a csoportok protonáltsági foka is.

A vízmolekulák helyzete nagy biztonsággal meghatározható.

Pl. Enzim mechanizmus vizsgálata:  
Tripszin – peptid inhibitor szerkezetvizsgálata.  
Összehasonlítás az acil-enzim komplex szerkezetével.

A hasítandó kötés környezete, és a karbonil oxigént stabilizáló hidrogénkötések iránya a nukleofil támadás irányától függenek.





# Közepes felbontású szerkezet

A felbontás 1,8-2,7 Å. Átlagos koordináta hiba néhány tized Å.

A szerkezetmegoldáskor felhasználják az alkotó molekula geometriájára vonatkozó ismereteket (ideális kötésszögek, kötéshosszak, van der Waals sugár)

A makromolekula konformációja hordozza az információt.

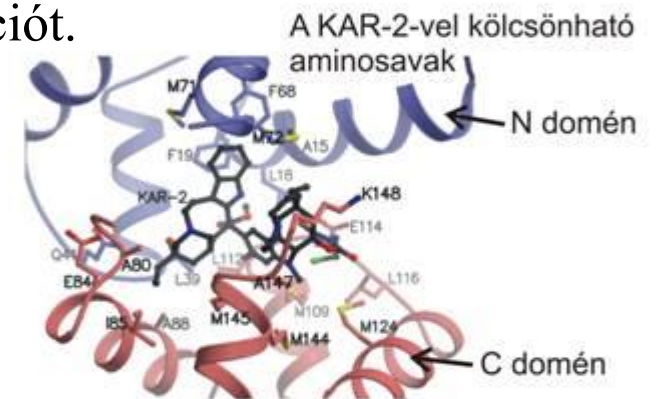
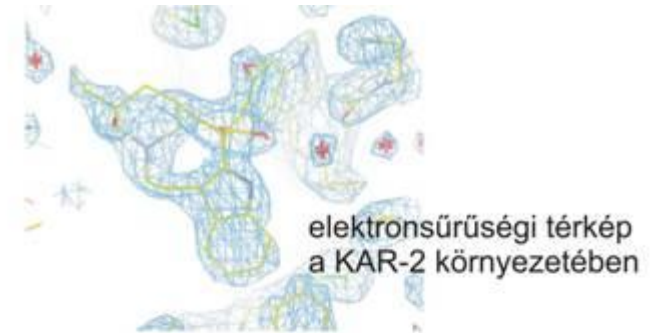
Vizsgálható: másodlagos kölcsönhatások mintázata, konformáció változások.

Vízmozgások és egyes ionok meghatározása bizonytalan lehet.

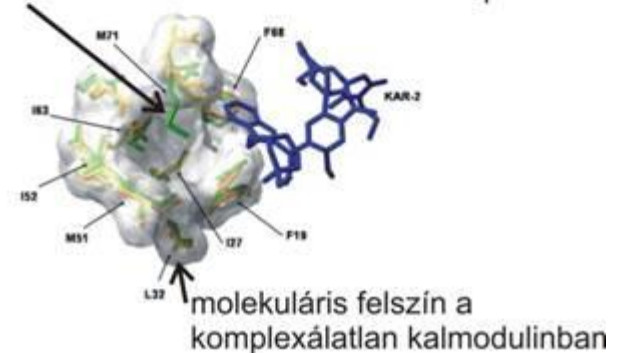
Pl. Kalmódulin-KAR-2 komplex szerkezete.

Szerkezeti jellemzők és funkció összefüggése: a KAR-2 bár kötődik, nem fejt ki antagonistista hatást, mint más kismolekulák.

Horvath et al. JBC. 280,8266 (2005)



A kalmódulin hidrofób zsebe zárt a komplexben



# Szerkezeti genomika

~20 konzorcium világszerte (sg.pdb.org)

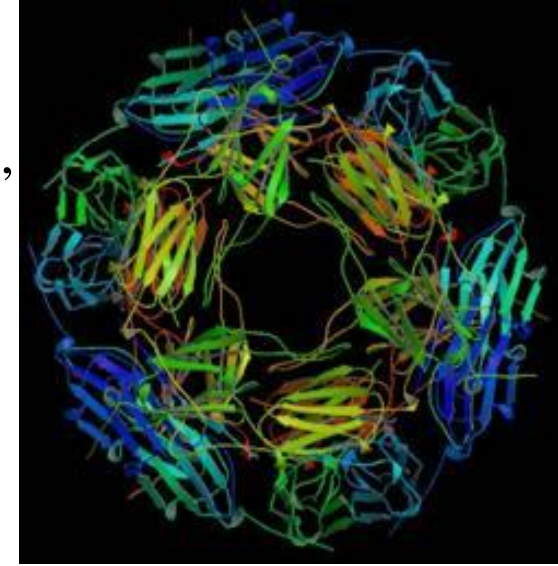
*Cél:* nagy áteresztőképességű szerkezet meghatározás (NMR és krisztallográfia)

*Hatékonyság:* Klónozástól a szerkezetmeghatározásig 4-18%,  
Célfehérje kiválasztásától 2-8%

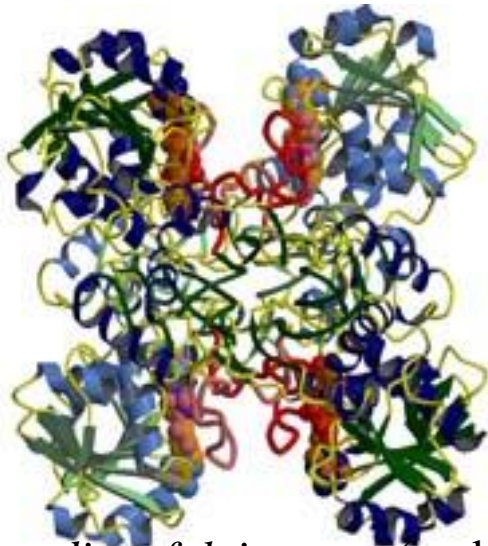
*Várt hatás:* evolúció és genetikai diverzitáskutatás,  
növénytermesztés, állattenyésztés, gyógyászat

Szerkezet-funkció összefüggések, szerkezet-alapú  
gyógyszertervezés, patogén és gazda fehérje  
összehasonlítás, szerkezet és funkció predikció

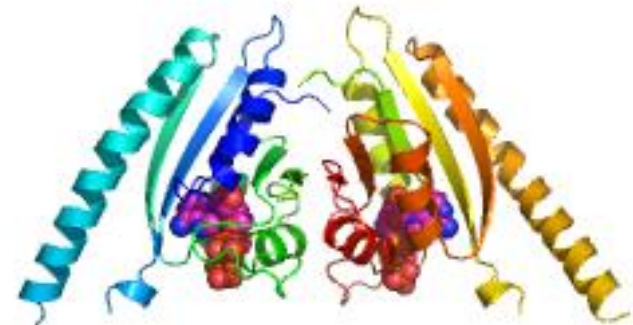
Technikai újítások (pl. fehérje termelés sejtmentes közegben)



Ismert funkció szekvencia alapján:  
Hősokk fehérje (*Methanococcus Jannaschii*), pdb:1shs



*Plasmodium falciparum* (malária)  
glicerinaldehyd-3-foszfát dehidrogenáz,  
gyógyszertervezés



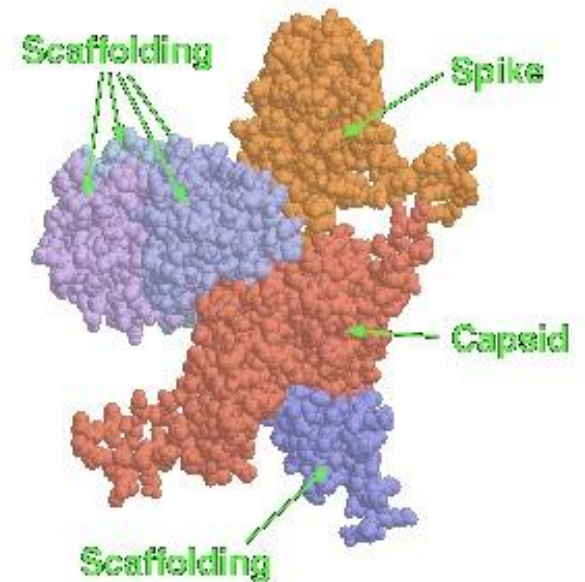
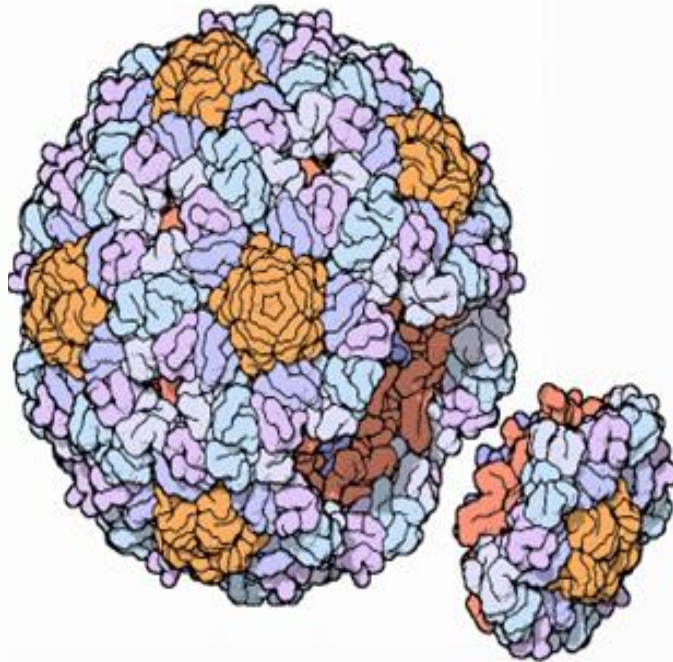
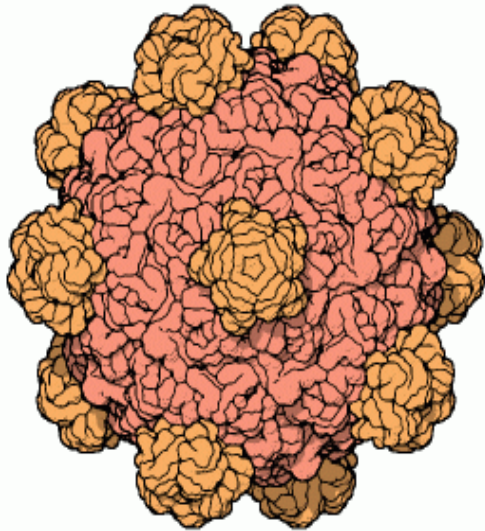
Funkció azonosítása a szerkezet alapján:  
ATP-kötő fehérje, pdb:1mjh

# Nagy méretű molekulakomplexek: vírusok

Bakteriofág  $\Phi$ X174: 7 fehérjelánc, 60 másolat: 590 000 nemhidrogén atom

A komplex nagy szimmetriája (nemkristallográfiai szimmetria) növeli a kristályosodási hajlamot, és felhasználják a szerkezetmegoldásban (fázisprobléma megoldása, modellépítés).

(pdb:1cd3, T.Dokland et al, J.Mol.Biol.288, 595,1999 )



# Kémiai Nobel-díj 2009.

„A riboszóma szerkezetének és funkciójának tanulmányozásáért”



**Venkatraman  
Ramakrishnan**

MRC Molekuláris  
Biológiai Laboratórium

Cambridge  
Egyesült Királyság



**Thomas A. Steitz**

Yale Egyetem,  
Howard Hughes  
Orvostudományi Intézet

New Haven  
USA



**Ada E. Yonath**

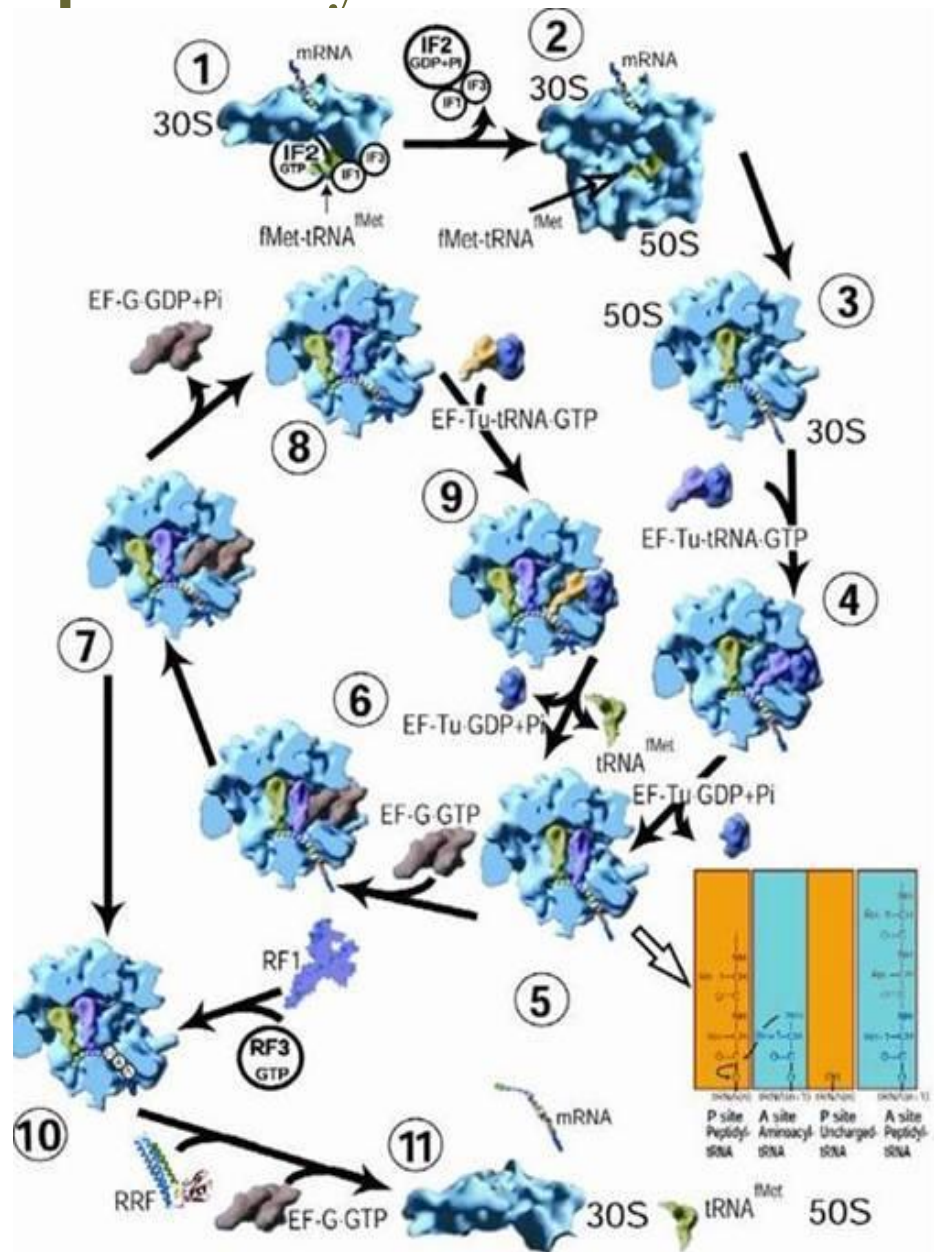
Weizmann  
Tudományos Intézet

Rehovot  
Israel

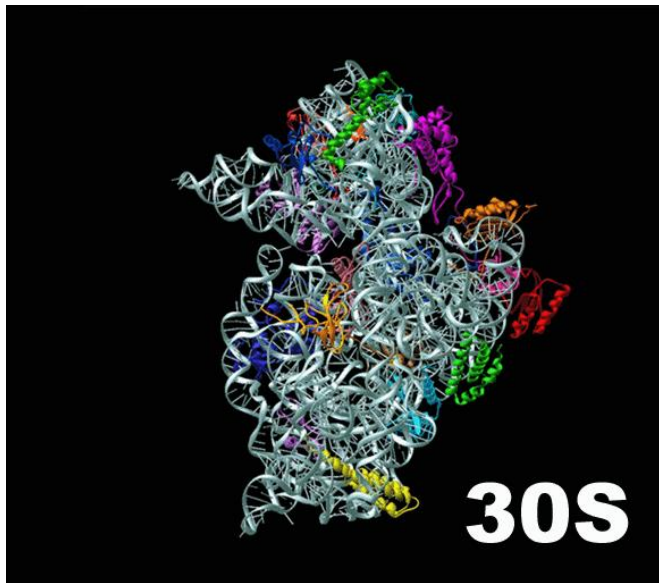
# Riboszóma: a sejt fehérjegyára

## Működése soklépcsős folyamat

1. 30S–kezdeti komplex,
2. 70S–kezdeti komplex,
3. 70S–kezdeti komplex metszete
4. dekódolás (EF-Tu /GTP)
5. A és P hely közt peptid kötés szintézis
6. EF-G /GTP kötése a pretranszlokációs komplexhez
7. EF-G/GTP a poszttranszlokációs komplexben
8. GTP hidrolízise (EF-G)
9. Dekódolás (mint 4.)
10. A ciklus befejezése(RF1 és RF3)
11. Kiindulási állapotba (RRF és EF-G/GTP)

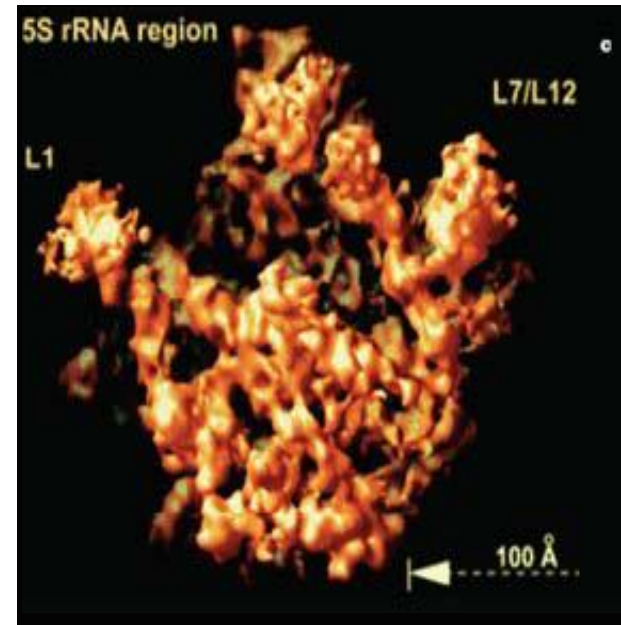


# Az atomi szintű szerkezetek jelentősége



~35000 atom  
20 fehérjelánc,  
1 RNS (~ 1600 nukleotid)

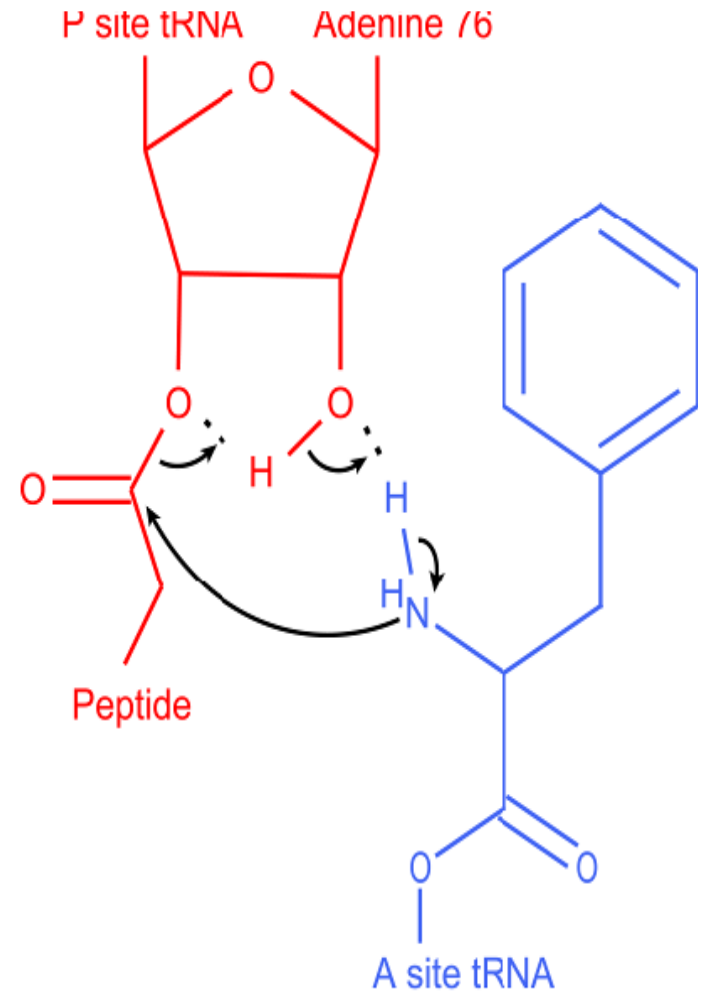
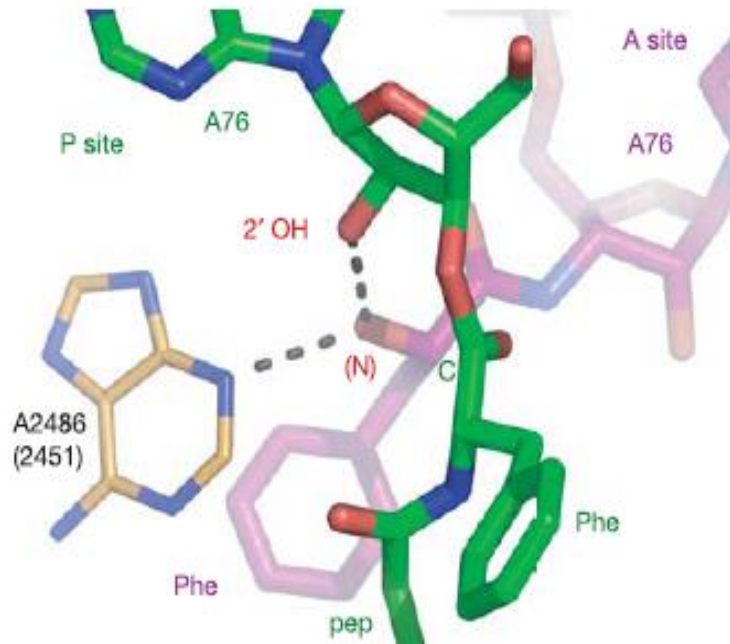
- ▶ Első kristályok ~1980 (Yonath)
- ▶ Alacsony felbontású szerkezetek 1985- (Steitz)
- ▶ Első nagy felbontású riboszóma alegység szerkezetek 2000 (Ramakrishnan, Steitz, Yonath)
- ▶ Azóta több, mint 120 szerkezet: 30S, 50S és a teljes 70S komplex.
- ▶ Komplexek: mRNS, tRNS, iniciátor faktorok, antibiotikumok...
- ▶ Gyakorlati jelentőség: antibiotikum rezisztencia megértése



~64000 atom  
33 fehérjelánc,  
2 RNS lánc (~2900 és 120 nukleotid)

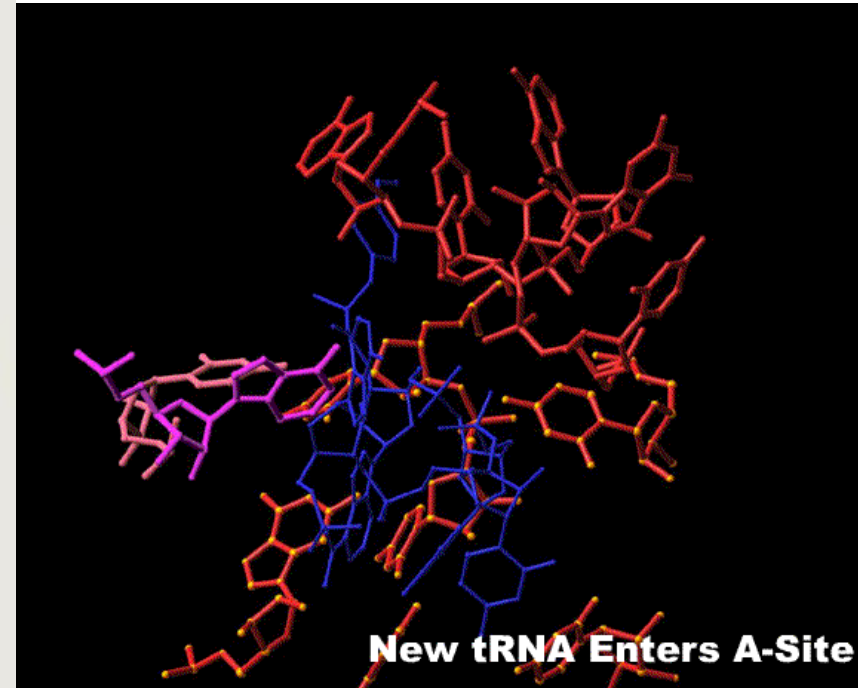
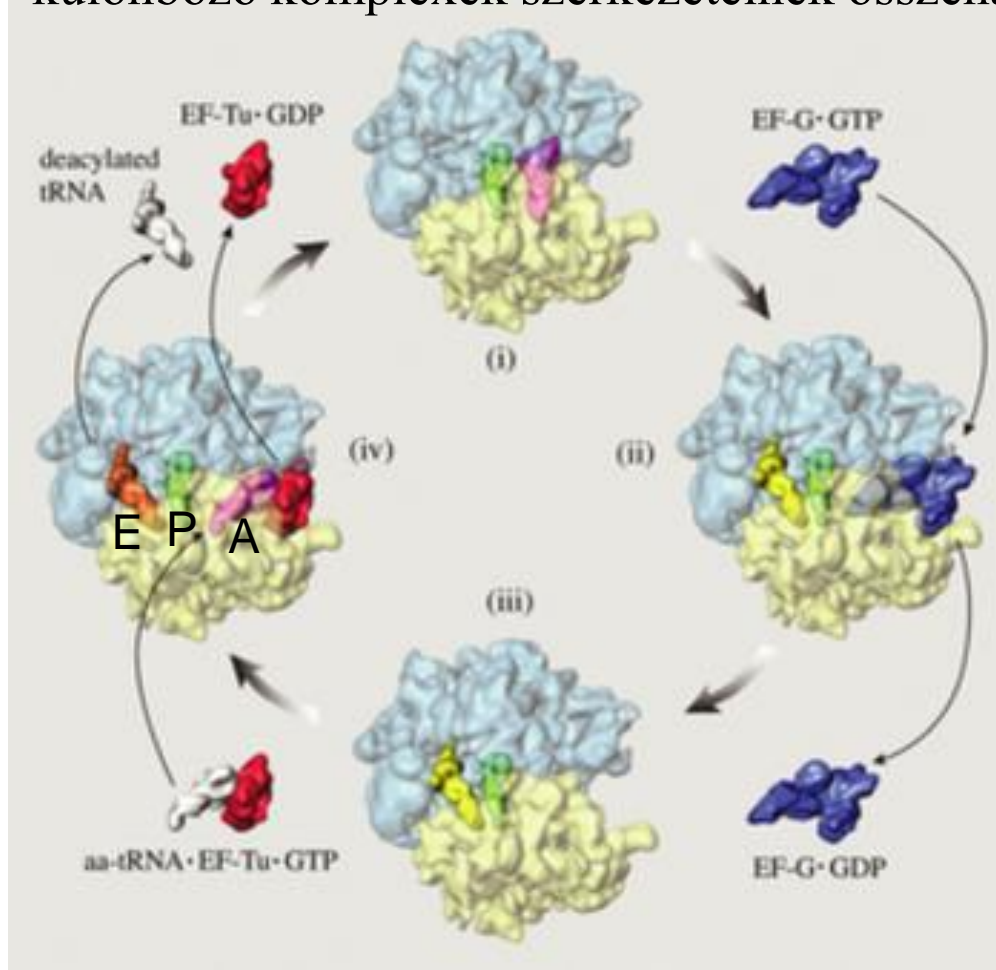
## A peptidkötés szintézise

- ▶ Helye: 50S alegység
- ▶ Katalizátor csoport: Adenin 2486



# A riboszóma működését kísérő mozgások

A tRNS elmozdulása az A-ról a P kötőhelyre:  
különböző komplexek szerkezeteinek összehasonlítása





# Membránfehérjék szerkezetvizsgálata

Nehézségek a fehérje előállításakor, tisztításakor, kristályosításakor: a transzmembrán régiók hidrofóbok, vízben nem stabil - detergensok használata

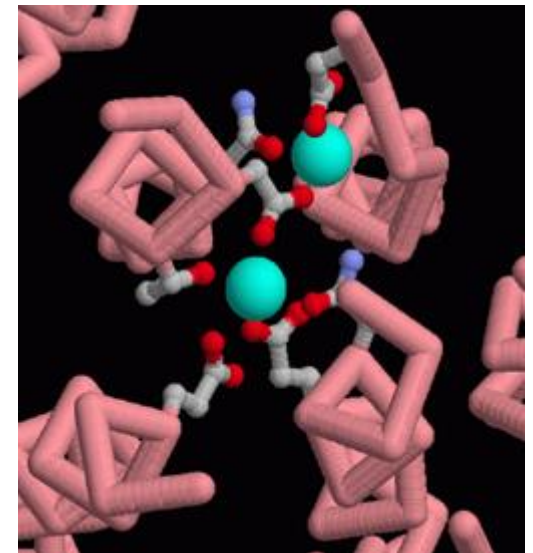
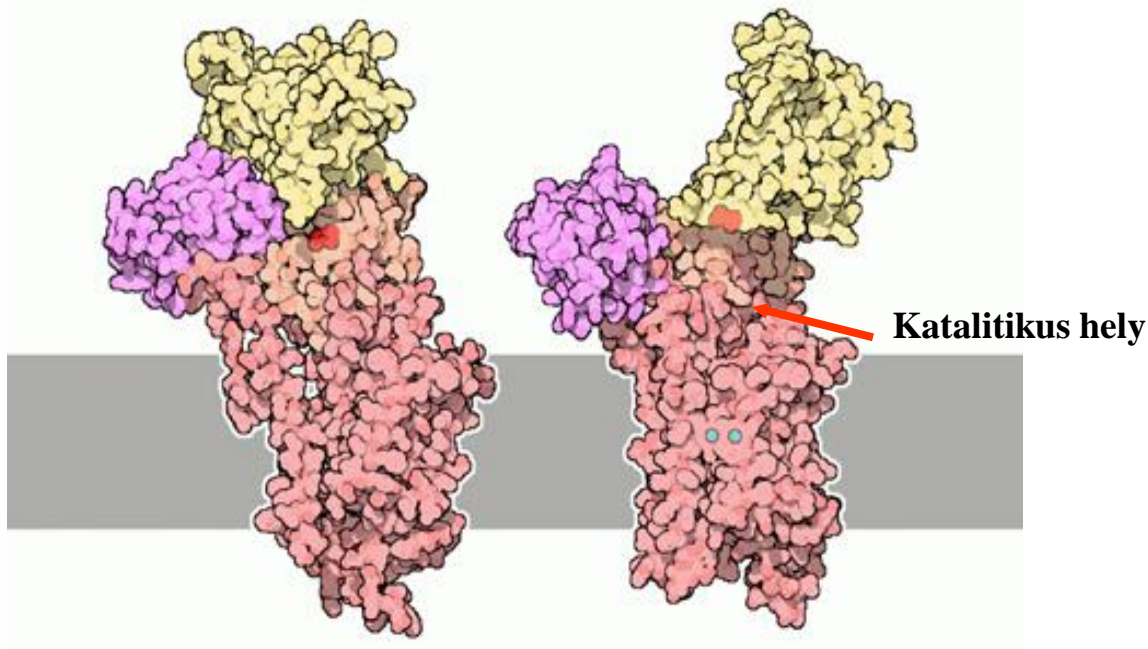
Kalcium pumpa szerkezetek (pdb:1iwo, 1eul) 4 lépéses ciklus

1: üres pumpa ( $H^+$  a transzfer helyen)

2: 2  $Ca^{2+}$  megkötése

3-4: ATP megkötése, hidrolízise közben a  $Ca^{2+}$  lefele távozik

(Toyoshima et al, Nature 418, 605 2002)





# Időfelbontásos felvételek kiértékelése

Időfelbontásos felvételek:

- ▶ elegendően lassú reakció
- ▶ az egész kristályban egyszerre indítható
- ▶ a közti termék elég nagy koncentrációban
- ▶ jó minőségű kristály

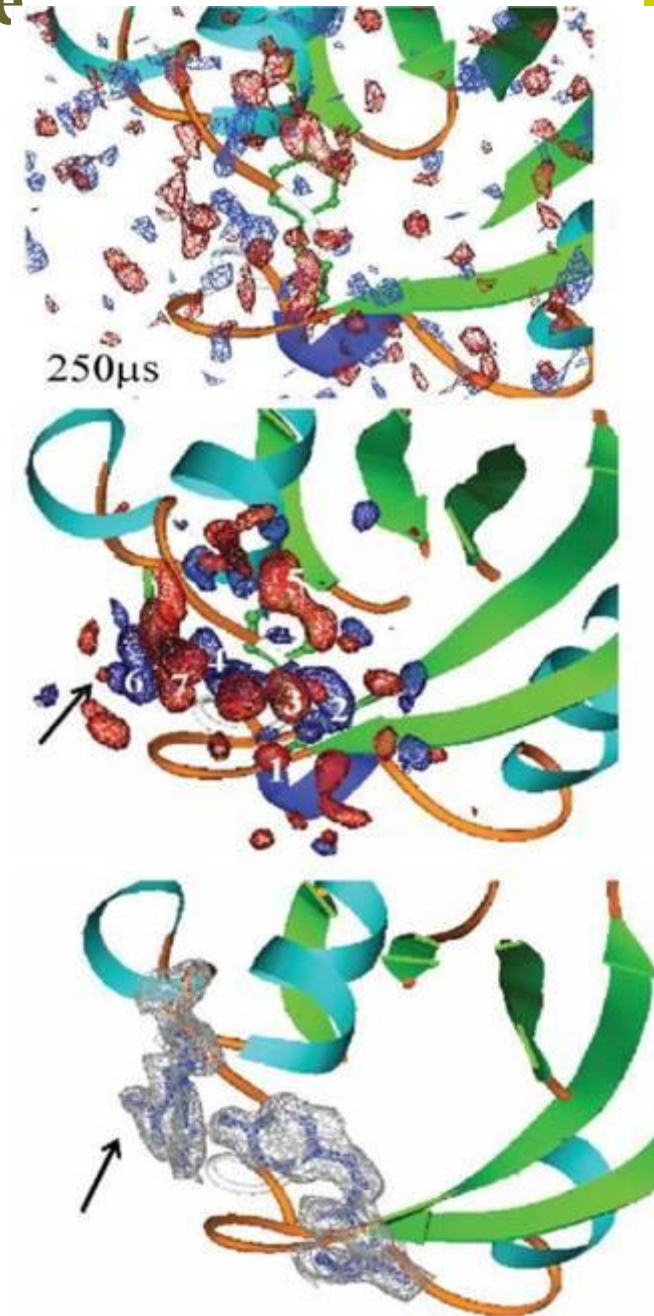
Fotoaktív sárga protein

(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



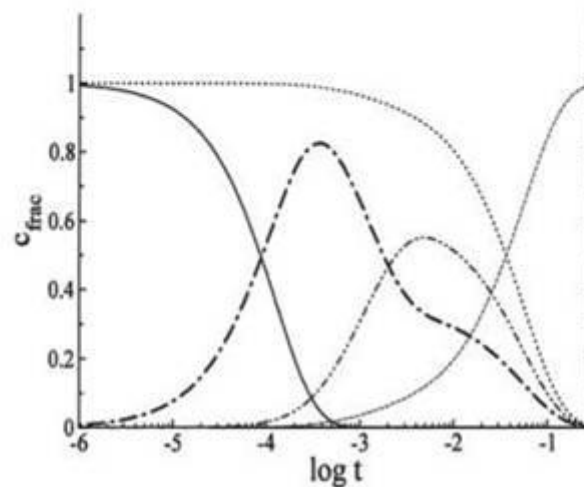
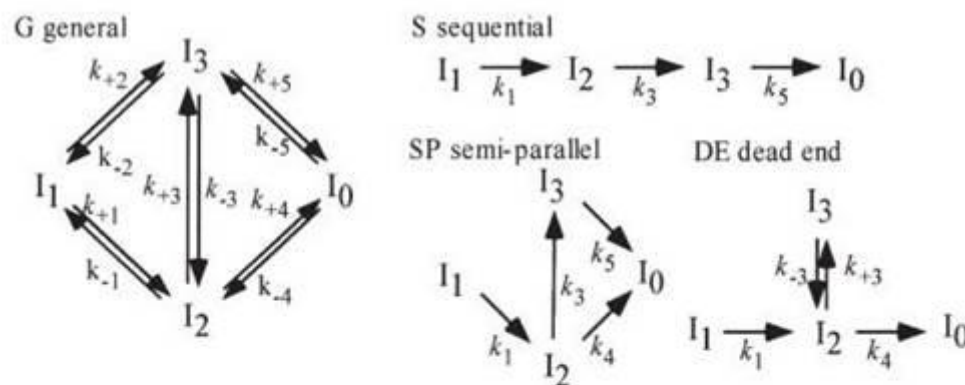
# Időfelbontásos felvételek kiértékelése

Laue felvételek – adatkészlet nem teljes

Differencia elektronsűrűségi térképek készítése a monokromatikus sugárzással készített ‘alapállapot’-hoz képest

Közi termékek azonosítása, átlagolás időben

Döntés különböző kinetikai modellek között

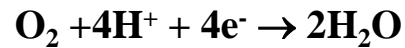
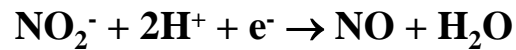


# Időfelbontásos kristallográfia

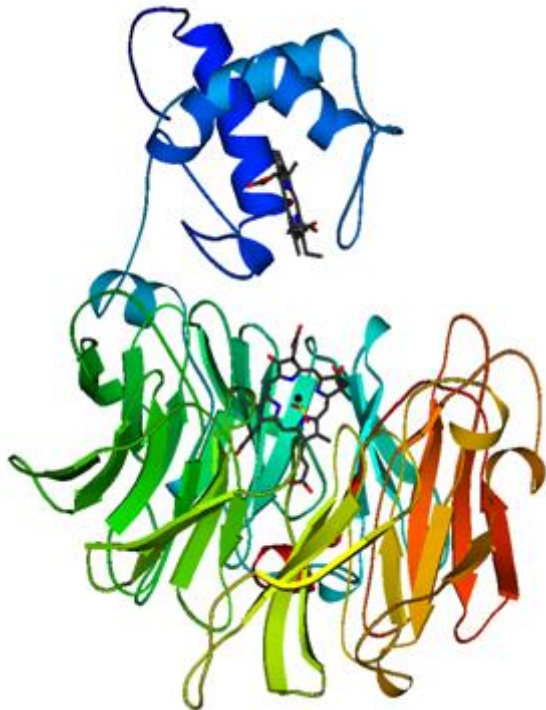
A reakció befagyasztása, adatgyűjtés monokromatikus sugárzással:

- ▶ lassú reakció
- ▶ a közti termék elég nagy koncentrációban

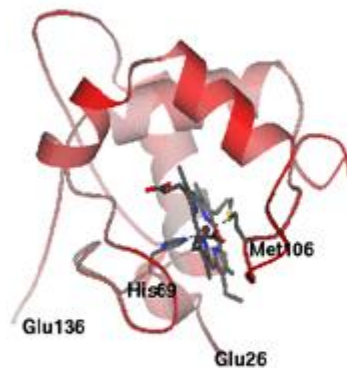
Citokróm cd1 nitrit reduktáz



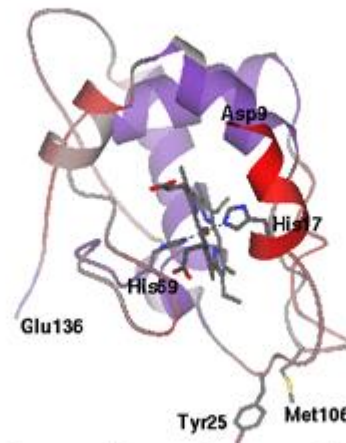
(J.Hajdu et al, Nat.Struct.Biol.7,1006,2000)



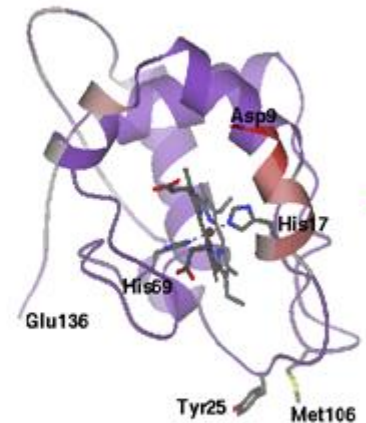
A citokróm cd1 nitrit reduktáz enzim c típusú doménjének szerkezetváltozásai



Redukált enzim



Intermediér szerkezet a nitrittel való visszaoxidáláskor



Oxidált enzim

# MASP-2 enzim autoaktivációja

Mannózkötő lektin-asszociált szerin-proteáz 2

Kimotripszin típusú szerin-proteáz

Az immunrendszer részét képező komplement kaskád indító lépésében vesz részt

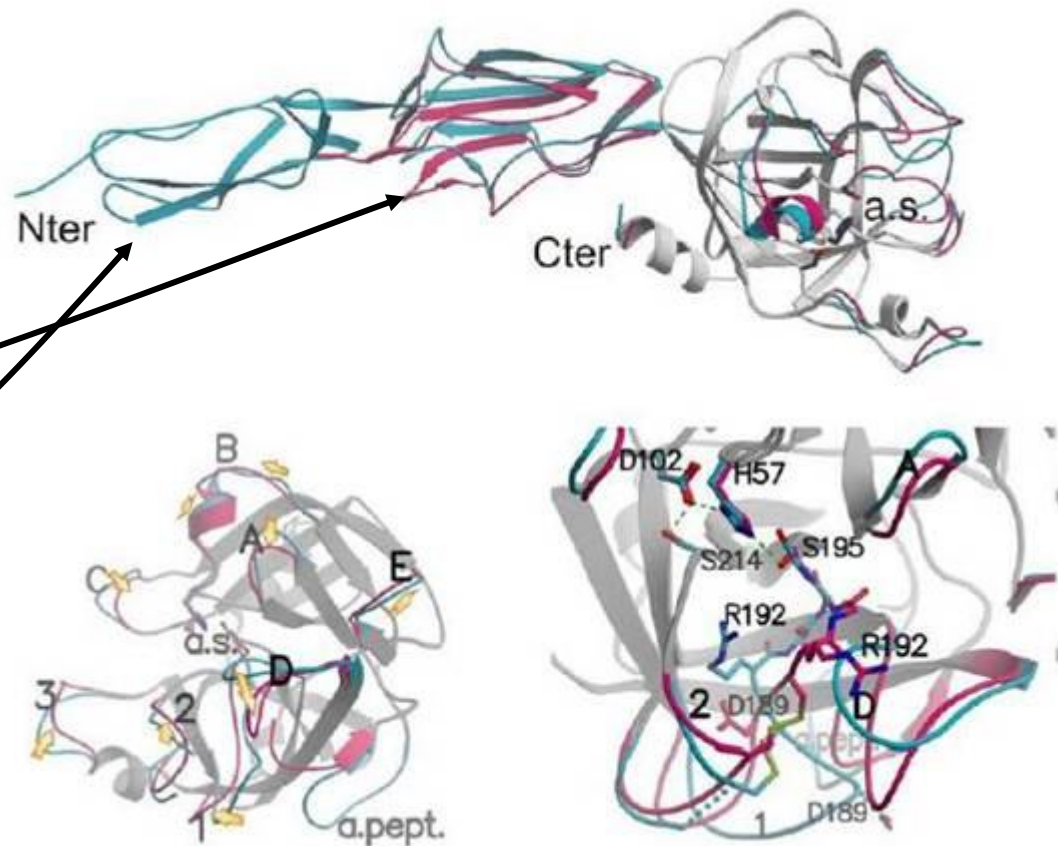
Autoaktiválódásra képes

Multidomén fehérje

Aktivált és  
Zimogén (inaktív)  
szerkezet:

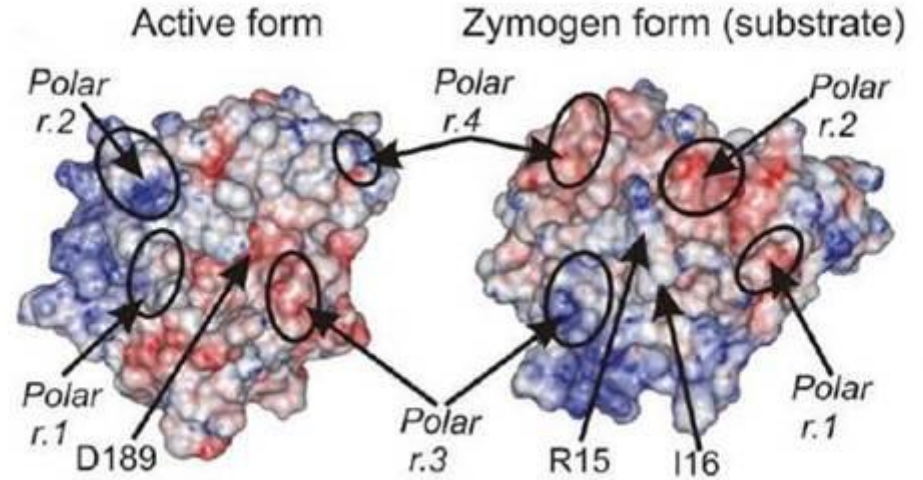
(Gál P. et al, JBC, 280, 33435,2005)

A család aktív szerkezeteiben az  
Asp194 kifordul, sóhidat létesít az  
új N-terminálissal, és így alakul ki  
az oxianion zseb.

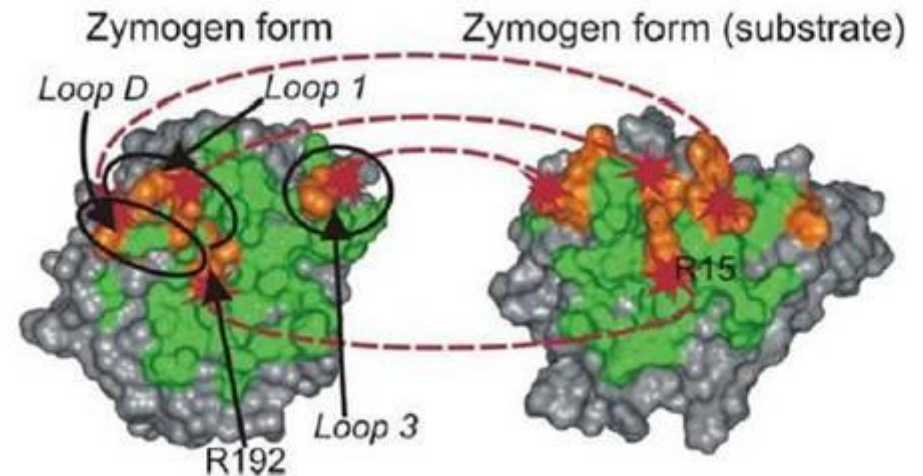


# MASP-2 enzim autoaktivációja

Az aktivált-zimogén enzim-szubsztrát komplex modellezése:  
a kötődés nem igényel nagy konformációváltozást



Zimogén-zimogén enzim-szubsztrát komplex:  
ekülöníthető egy régió, ami kedvezően kötődik, és egy, ami kedvezőtlen kölcsönhatásokat alakít ki ez indukálja az enzim konformációs átalakulását



# MASP-2 enzim autoaktivációja

A két lépés feltételezett mechanizmusa:

Mutációkkal igazoltuk az Arg192 szerepét.

A zimogén enzim aktív konformációjában egyelőre ismeretlen az Asp194 ionpárja.

