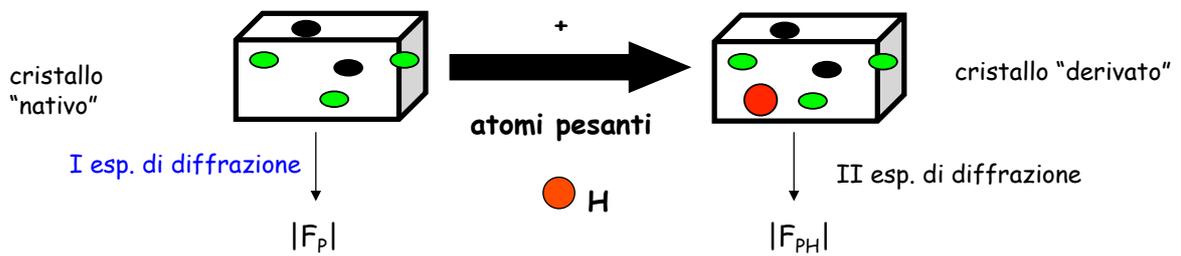


Ottenere delle fasi mediante atomi pesanti: M.I.R.  
(Multiple Isomorphous Replacement)

$$F(h,k,l) = \int_{cell} \rho(x,y,z) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)] dV = \sum_{j=1}^{N_{atomi}} f_j \exp[-2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)]$$

Fattore di scattering  
atomico (atomo)

Proprietà  
strutturale  
(posizione)



$$F_{PH} = F_P + F_H$$

1

$$\forall (h,k,l) \equiv \mathbf{h} \quad F_{PH}(\mathbf{h}) = F_P(\mathbf{h}) + F_H(\mathbf{h})$$



Se troviamo la posizione degli atomi pesanti nella cella elementare abbiamo:

$|F_H|$ ,  $\alpha_H$  (calcolati dalla posizione dell'atomo pesante)

$|F_P|$ ,  $|F_{PH}|$  misurati con 2 esperimenti di diffrazione ( $I \propto |F|^2$ )

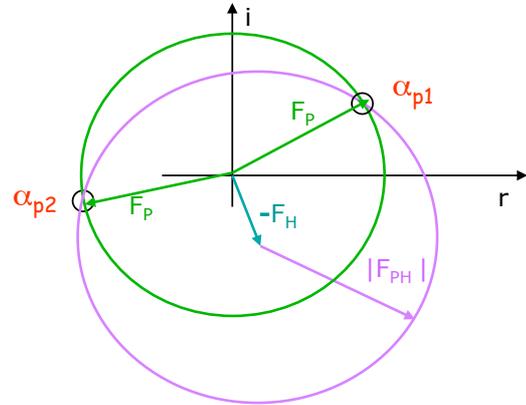
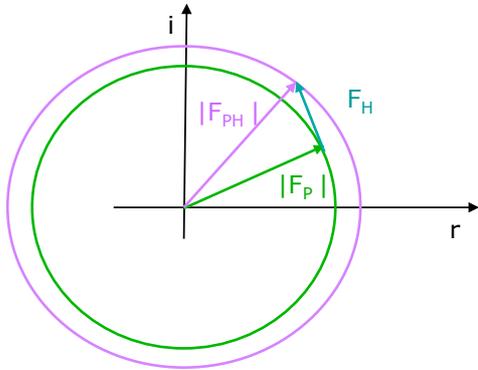
2

$$\forall (h,k,l) \equiv \mathbf{h}$$

Consideriamo il cerchio di raggio  $|F_{PH}|$  centrato in  $-F_H$  le 2 intersezioni con il cerchio di raggio  $|F_P|$ , danno 2 valori di fase possibile:  $\alpha_{p1}$  e  $\alpha_{p2}$

conosciamo solamente i moduli  $|F_P|$ ,  $|F_{PH}|$   
li rappresentiamo come cerchi nel piano complesso

$$F_P = -F_H + F_{PH}$$



2 soluzioni per la fase di  $F_P$ : ambiguità di fase per ogni fattore di struttura  $F_P(\mathbf{h})$

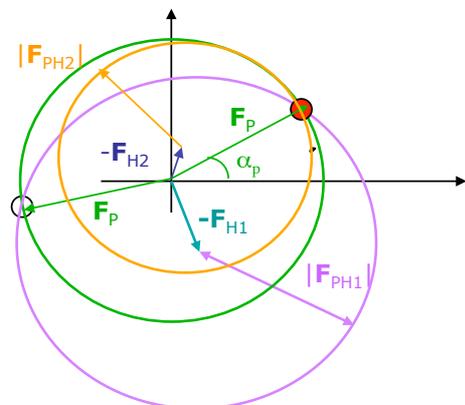
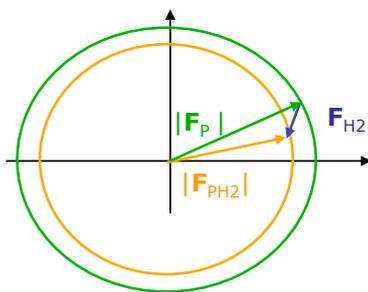
3

### Soluzione dell'ambiguità di fase

Esperimento con un altro atomo pesante  $|F_{PH2}|$ :

$$F_P = -F_{H1} + F_{PH1}$$

$$F_P = -F_{H2} + F_{PH2}$$



### Multiple Isomorphous Replacement (MIR)

con 3 esperimenti di diffrazione (1 nativo, 2 atomi pesanti) si ricavano le fasi  $\alpha_p$

4

## Rappresentazione algebrica

$$F_{PH} = F_P + F_H \longrightarrow |F_{PH}|e^{i\alpha_{PH}} = |F_P|e^{i\alpha_P} + |F_H|e^{i\alpha_H}$$

$$|F_{PH}|^2 = (F_P + F_H)(F_P + F_H)^* = |F_P|^2 + |F_H|^2 + |F_P||F_H|(e^{i(\alpha_P - \alpha_H)} + e^{-i(\alpha_P - \alpha_H)})$$

$$\cos(\alpha_P - \alpha_H) = \frac{|F_{PH}|^2 - |F_P|^2 - |F_H|^2}{2|F_P||F_H|} = A_H$$

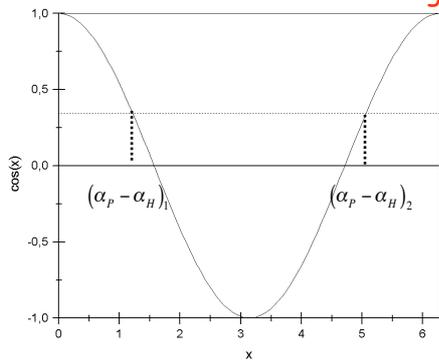
noto dalle pos.  
degli atomi pesanti

Ambiguità di fase

Soluzione dell'ambiguità di fase: 2 eq. in 2 inc.

$$\cos(\alpha_P - \alpha_{H1}) = A_{H1}$$

$$\cos(\alpha_P - \alpha_{H2}) = A_{H2}$$



5

Come trovare  $\alpha_H \Leftrightarrow$  posizione degli atomi pesanti ?

$$F_H(h,k,l) = \int_{cell} \rho_H(x,y,z) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)] dV = \sum_{j=1}^{N \text{ atomi pesanti}} f_{Hj} \exp[-2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)]$$

posizione degli atomi pesanti

$$\mathbf{x}_H \Leftrightarrow F_H = |F_H|e^{i\alpha_H}$$

fattore di struttura

differenze isomorfe

$$\Delta|F|_{iso} \equiv |F_{PH}| - |F_P| \propto |F_H|$$

da dimostrare

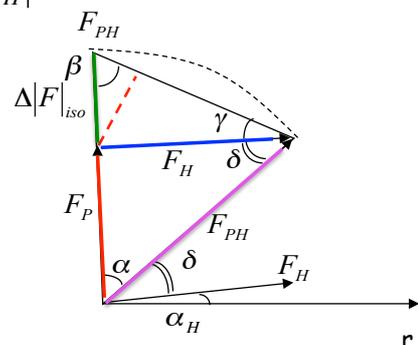
$$\Delta|F|_{iso} \sin \beta = |F_H| \sin \gamma = \dots \quad \Delta|F|_{iso} = |F_H| \frac{\sin \gamma}{\sin \beta}$$

$$\alpha = \alpha_P - \alpha_{PH}$$

$$\delta = \alpha_{PH} - \alpha_H$$

triangolo isoscele:  $\gamma$  e  $\beta$  in funzione di  $\alpha$  e  $\delta$

$$\begin{cases} 2\beta + \alpha = \pi \\ \gamma + \delta = \beta \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} \beta = \frac{\pi - \alpha}{2} \\ \gamma = \beta - \delta \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} \beta = \frac{\pi - \alpha}{2} \\ \gamma = \frac{\pi - \alpha}{2} - \delta \end{cases}$$



6

$$\Delta|F|_{iso} = |F_H| \frac{\sin \gamma}{\sin \beta}$$

$$\begin{cases} \gamma = \frac{\pi - \alpha}{2} - \delta \\ \beta = \frac{\pi - \alpha}{2} \end{cases}$$

$$\Delta|F|_{iso} = |F_H| \frac{\sin\left(\frac{\pi}{2} - \frac{\alpha}{2} - \delta\right)}{\sin\left(\frac{\pi}{2} - \frac{\alpha}{2}\right)} = |F_H| \frac{\cos\left(\frac{\alpha}{2} + \delta\right)}{\cos\left(\frac{\alpha}{2}\right)} = |F_H| \left( \cos \delta - \tan\left(\frac{\alpha}{2}\right) \sin \delta \right)$$

$$\begin{cases} \alpha = \alpha_P - \alpha_{PH} \\ \delta = \alpha_{PH} - \alpha_H \end{cases} \quad \cos\left(\frac{\alpha}{2} + \delta\right) = \cos \frac{\alpha}{2} \cos \delta - \sin \frac{\alpha}{2} \sin \delta$$

$$\Delta|F|_{iso} = |F_H| \left[ \cos(\alpha_{PH} - \alpha_H) - \tan\left(\frac{1}{2}(\alpha_P - \alpha_{PH})\right) \sin(\alpha_{PH} - \alpha_H) \right]$$

7

$$\Delta|F|_{iso} = |F_H| \left[ \cos(\alpha_{PH} - \alpha_H) - \tan\left(\frac{1}{2}(\alpha_P - \alpha_{PH})\right) \sin(\alpha_{PH} - \alpha_H) \right]$$

Il modulo del fattore di struttura dell'atomo pesante e' piccolo rispetto a quello della proteina  
 $\Leftrightarrow$  la perturbazione indotta nel cristallo dall'atomo pesante e' piccola rispetto al contributo complessivo della proteina

$$\begin{aligned} &\downarrow \alpha_P \approx \alpha_{PH} \\ &\approx 0 \end{aligned}$$

$$|F_{PH}| - |F_P| = \Delta|F|_{iso} \approx |F_H| \cos(\alpha_{PH} - \alpha_H)$$

$$(\Delta|F|_{iso})^2 \approx |F_H|^2 \cos^2(\alpha_{PH} - \alpha_H) = \frac{1}{2}|F_H|^2 + \frac{1}{2}|F_H|^2 \cos 2(\alpha_{PH} - \alpha_H)$$

$$\cos 2\alpha = \cos^2 \alpha - \sin^2 \alpha = 2 \cos^2 \alpha - 1 \Rightarrow \cos^2 \alpha = \frac{1 + \cos 2\alpha}{2}$$

"RUMORE"  
 $\alpha_{PH}, \alpha_H$  indipendenti!

$$(\Delta|F|_{iso})^2 \approx \frac{1}{2}|F_H|^2 + \text{rumore}$$

8

fun. di Patterson delle diff. isomorfe = fun. di Patterson dei soli atomi pesanti!  
 ⇒ posizioni degli atomi pesanti

$$P(u,v,w) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l=-\infty}^{+\infty} |F(h,k,l)|^2 \exp(-2\pi i(hu + kv + lw)) =$$

$$\frac{1}{V} \sum_{h,k,l=0}^{+\infty} |F(h,k,l)|^2 \exp(-2\pi i(hu + kv + lw)) + \frac{1}{V} \sum_{h,k,l=-\infty}^0 |F(h,k,l)|^2 \exp(-2\pi i(hu + kv + lw)) =$$

$$= \frac{1}{V} \sum_{h,k,l=0}^{+\infty} (|F(h,k,l)|^2 \exp(-2\pi i(hu + kv + lw)) + |F(-h,-k,-l)|^2 \exp(2\pi i(hu + kv + lw))) =$$

$$\rho(\mathbf{x}) = \rho(\mathbf{x})^* \Rightarrow F(\mathbf{h}) = F^*(-\mathbf{h}) \Rightarrow |F(\mathbf{h})| = |F(-\mathbf{h})|$$

La funzione di Patterson è centrosimmetrica

$$= \frac{1}{V} \sum_{h,k,l=0}^{+\infty} |F(h,k,l)|^2 2 \cos(2\pi(hu + kv + lw)) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l=-\infty}^{+\infty} |F(h,k,l)|^2 \cos(2\pi(hu + kv + lw))$$

$$P^{iso}(\mathbf{u}) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} (\Delta |F_{\mathbf{h}}|_{iso})^2 \cos(2\pi \mathbf{h} \cdot \mathbf{u}) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} (|F_{PH}| - |F_P|)^2 \cos(2\pi \mathbf{h} \cdot \mathbf{u}) \approx$$

$$\approx \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} \frac{1}{2} |F_H|^2 \cos(2\pi \mathbf{h} \cdot \mathbf{u}) + rumore \approx \frac{1}{2} P^H(\mathbf{u})$$

9

La mappa di Patterson è **centrosimmetrica** (invariante per inversione rispetto all'origine): 2 set di posizioni di atomi pesanti ottenute per inversione rispetto all'origine



... 2 set di fasi ...



... che producono 2 mappe di densità elettronica **enantiomorfe**



controllo della **chiralità** della mappa e degli degli amminoacidi inseriti nella mappa e degli elementi di struttura secondaria per risolvere l'ambiguità di fase

## Riassunto MIR:

3 esp. di diffrazione:  $|F_P|, |F_{PH1}|, |F_{PH2}|$

Patterson delle diff. isomorfe: 
$$\begin{cases} \Delta|F|_{iso1} \equiv |F_{PH1}| - |F_P| \Rightarrow \{\mathbf{x}_{H1}^i\}_{i=1}^n \\ \Delta|F|_{iso2} \equiv |F_{PH2}| - |F_P| \Rightarrow \{\mathbf{x}_{H2}^i\}_{i=1}^m \end{cases}$$

posizione degli atomi pesanti

$\alpha_{H1}, \alpha_{H2}$

$$\cos(\alpha_P - \alpha_{H1,2}) = \frac{|F_{PH1,2}|^2 - |F_P|^2 - |F_{H1,2}|^2}{2|F_P||F_{H1,2}|}$$

fasi degli atomi pesanti

fasi:  $\alpha_P$