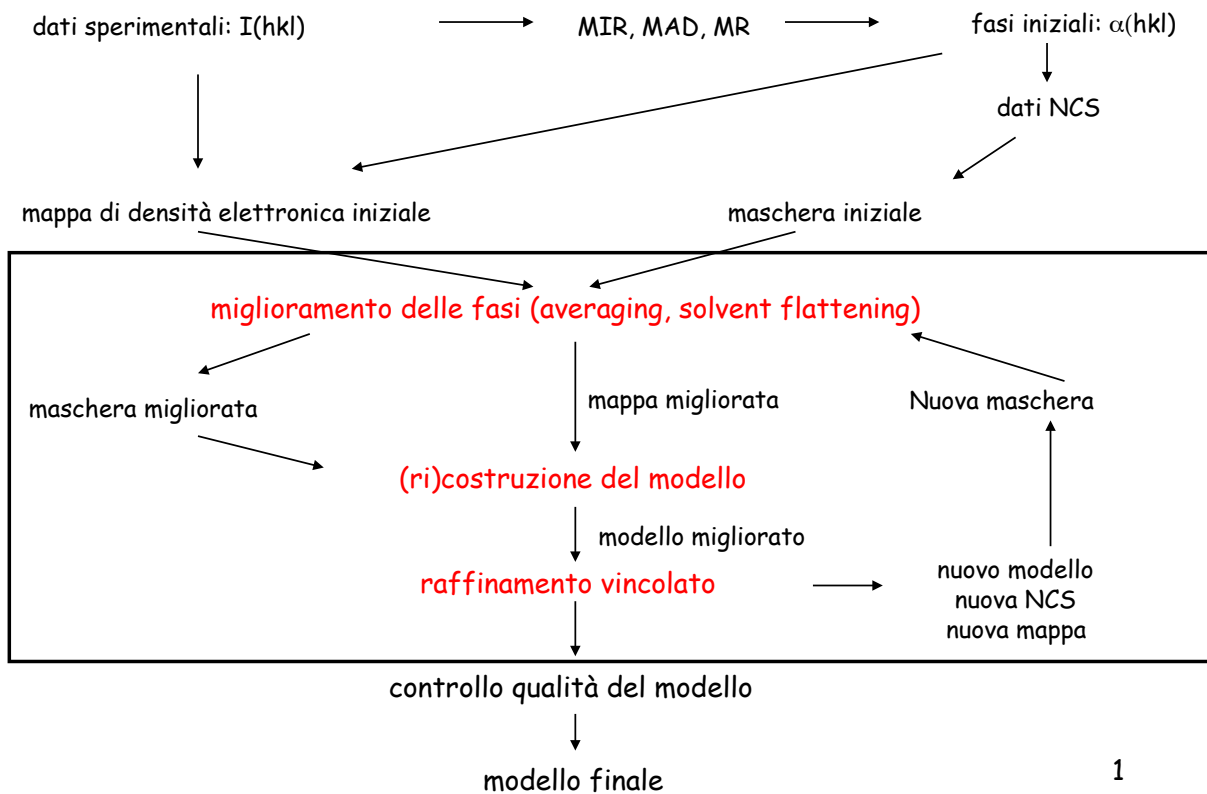


## Raffinamento delle fasi e del modello atomico



## Density Modification

interpretazione di  $\rho(x,y,z)$

Problema: densità elettronica di qualità insufficiente

- ambiguità nel tracciare la catena aminoacidica
- discontinuità nella mappa di densità elettronica



Errori nel modello non facilmente rimovibili nel successivo raffinamento cristallografico

- Solvent flattening
- Non Crystallographic Symmetry Averaging

## Solvent flattening

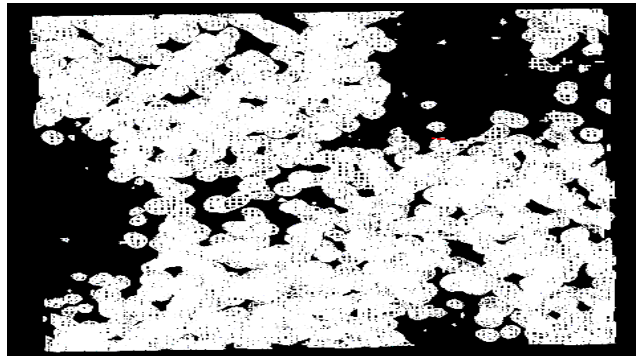
Assunzioni:

zona proteica = alta densità elettronica (localizzabile)

zona solvente = bassa densità elettronica

si costruisce una **maschera** attorno alla zona proteica

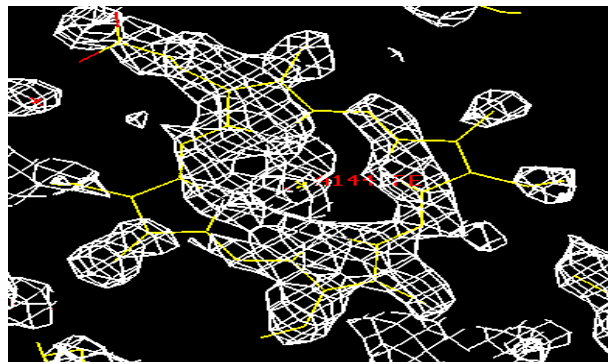
- si pone  $\rho(x,y,z) = \text{costante}$  (piccola) all'esterno della maschera
- calcolo nuove fasi
- calcolo nuova densità elettronica



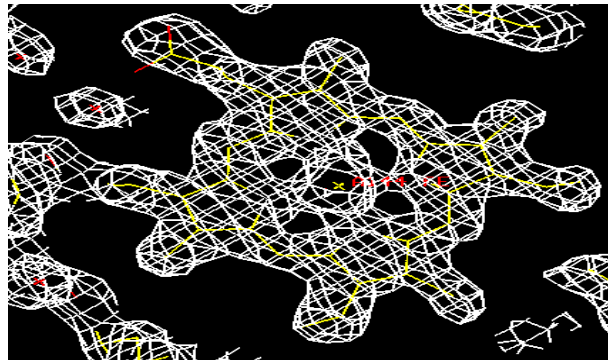
3

## Solvent flattening

prima  
solvent  
flattening



dopo  
solvent  
flattening



4

## Non Crystallographic Symmetry (NCS) Averaging

Prerequisiti:

- 2 o più molecole proteiche nell'u.a.
- operatori di NCS noti

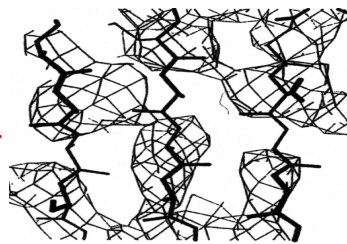
Assunzione:

$\rho(x,y,z)$  di molecole legate da NCS è identica

- maschera attorno alla  $\rho(x,y,z)$  di una molecola
- applicazione degli 'n' operatori NCS
- media delle 'n'  $\rho(x,y,z)$  e calcolo nuove fasi
- Segnale/Rumore aumenta di  $n^{1/2}$
- calcolo nuova densità elettronica



prima NCS av.



dopo NCS av.

5

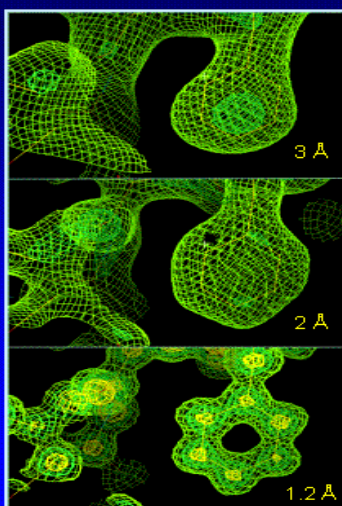
## Risoluzione sperimentale

$$\rho(\vec{x}) = \frac{1}{V} \sum_{\vec{h} \in \{\min\}}^{\{\max\}} F(\vec{h}) \exp[-2\pi i(\vec{h}\vec{x})]$$

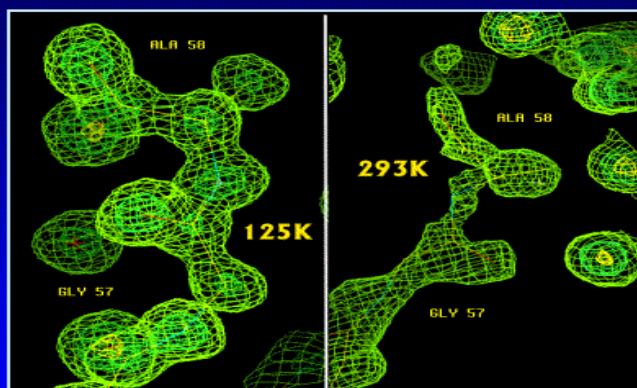
Advanced Methods in Modern Biomolecular Crystallography



Importance of resolution



Reduced disorder at low temperature



Dramatic improvements in the overall structure are likely to result from better definition of disordered regions regardless of resolution

6

## Raffinamento e validazione

- costruzione modello atomico nella densità elettronica
- raffinamento cristallografico  
(verifica accordo fra modello e dati sperimentali)
- validazione del modello
- sottomissione del modello al PDB

Problema:

basso rapporto osservazioni/parametri: parametri per ciascun atomo =  $(x_j, y_j, z_j, B_j)$ ;  
 $B_j \propto \langle u_j^2 \rangle$

(Per esempio: parametri = (12000 atomi  $\times$  4 parametri = 48000)

osservazioni =  $\sum_{hkl}$  (osservazioni a 2.1 Å = 138000  $\rightarrow$  o/p=2.9)



ambiguità nell'interpretazione della densità elettronica

Soluzione:

- aumentare il numero delle osservazioni: alta risoluzione dei dati ( $< 1.5$  Å)
- **utilizzare informazioni aggiuntive**: stereochimica strutturale nota (geometrical restraints)

7

## Stereochimica

Per ogni amminoacido (circa 8 atomi) occorre determinare come minimo **6 parametri**:

- gli angoli  $\phi, \psi$
- 2 angoli per definire la posizione della catena laterale:  $\chi_1, \chi_2$
- due B factor: uno per la catena principale e l'altro per la catena laterale

Dunque, riprendendo l'esempio di prima  $12000/8 \times 4 = 6000$  parametri

osservazioni = 138000  $\rightarrow$  o/p=23

Conclusione: grazie ai vincoli stereochimici abbiamo circa 20 osservazioni sperimentali per ogni parametro

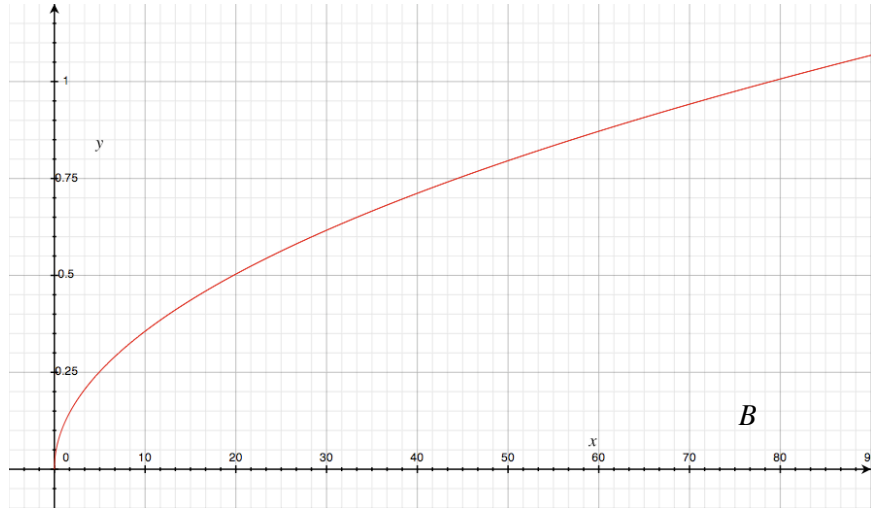
8

## B factor

$$B = 8\pi^2 \langle u^2 \rangle$$

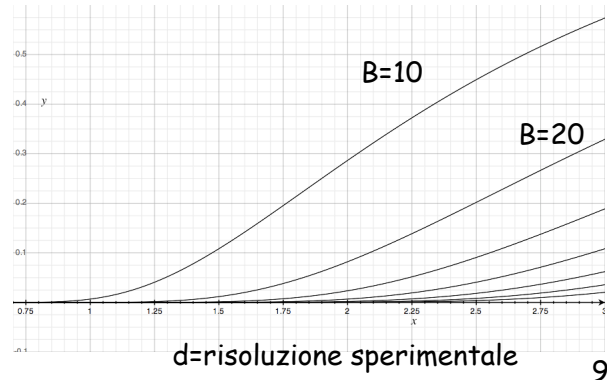
$$\sqrt{\langle u^2 \rangle}$$

Incertezza sulle coordinate



Scattering power:  $\exp\left[-\frac{B}{2d^2}\right]$

Lo scattering ad alta risoluzione è dominato da atomi con B piccolo!



## Costruzione del modello atomico

- catena principale (scheletro  $C\alpha$ )
- catene laterali
- molecole solvente

## Raffinamento strutturale vincolato

processo iterativo di correzione del modello volto a minimizzare *una funzione di energia generalizzata*:  $C = R + k'U$

$$R = \frac{\sum_{\mathbf{h}} \left| |F_{\text{obs}}(\mathbf{h})| - k |F_{\text{cal}}(\mathbf{h})| \right|}{\sum_{\mathbf{h}} |F_{\text{obs}}(\mathbf{h})|}$$

← accordo con i dati sperimentali

accordo con i parametri stereochimici

$$U = \sum_j B_j (b_j^{\text{obs}} - b_j^{\text{cal}})^2 + \sum_j T_j (\tau_j^{\text{obs}} - \tau_j^{\text{cal}})^2 + \sum_j \Phi_j (q + \cos(n\phi_j - \delta)) + \sum_{i,j} (A_{i,j} r_{i,j}^{-12} - B_{i,j} r_{i,j}^{-6})$$

lunghezza legami

angoli di legame

angoli di torsione

Van der Waals

## Validazione modello

Esame del modello finale raffinato:

- accordo fra modello e dati sperimentali (R-factor)

$$R = \frac{\sum_{\mathbf{h}} \left| |F_{\text{obs}}(\mathbf{h})| - k |F_{\text{cal}}(\mathbf{h})| \right|}{\sum_{\mathbf{h}} |F_{\text{obs}}(\mathbf{h})|}$$

- Free R-factor (per evitare l'overfitting dei dati)

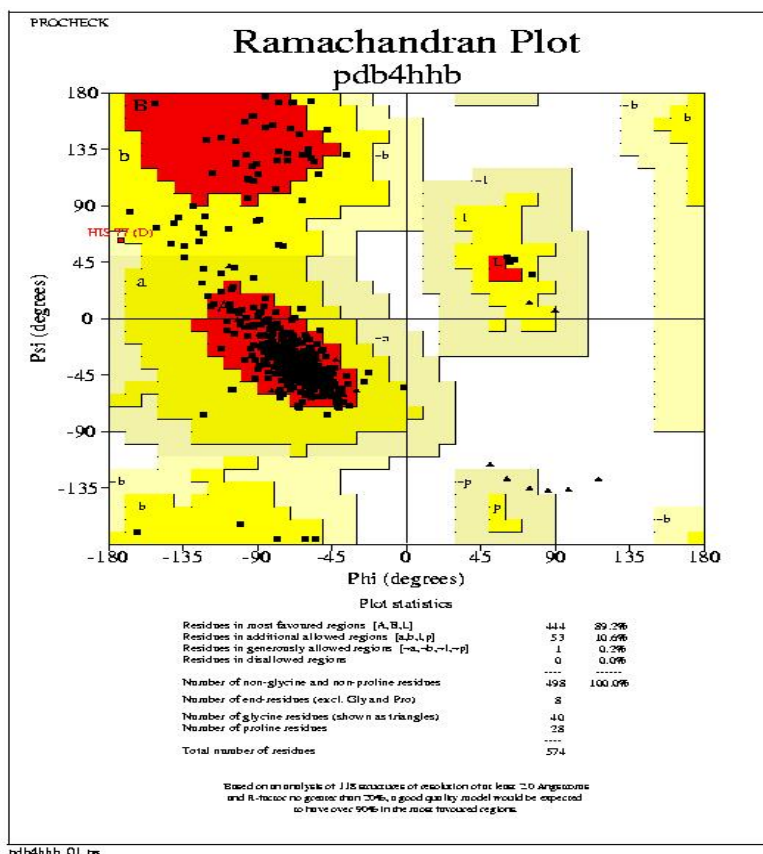
- stereochimica delle strutture macromolecolari

- contatti/interazioni fra residui vicini spazialmente

—————> PDB

CRYST1	39.550	74.570	66.560	90.00	99.94	90.00	P 1	21	1	4
ATOM	1	CB	SER	1	30.854	-6.329	36.118	1.00	41.46	6
ATOM	2	OG	SER	1	31.600	-7.531	36.190	1.00	44.54	8
ATOM	3	C	SER	1	30.991	-3.833	36.183	1.00	40.24	6
ATOM	4	O	SER	1	30.868	-2.883	36.961	1.00	40.08	8
ATOM	5	N	SER	1	31.848	-5.217	38.114	1.00	39.55	7
ATOM	6	CA	SER	1	31.668	-5.130	36.630	1.00	40.83	6
ATOM	7	N	THR	2	30.605	-3.796	34.906	1.00	39.92	7
ATOM	8	CA	THR	2	29.920	-2.658	34.286	1.00	38.97	6
ATOM	9	CB	THR	2	30.734	-2.067	33.086	1.00	39.67	6
ATOM	10	OG1	THR	2	31.045	-3.101	32.139	1.00	38.83	8
ATOM	11	CG2	THR	2	32.020	-1.403	33.566	1.00	38.83	6
ATOM	12	C	THR	2	28.542	-3.116	33.777	1.00	38.40	6
ATOM	13	O	THR	2	27.815	-2.341	33.141	1.00	38.79	8
.										
.										
ATOM	2166	HOH	WAT	401	20.048	3.400	49.038	1.00	31.45	8
ATOM	2167	HOH	WAT	402	-9.403	0.553	32.633	1.00	44.09	8
ATOM	2168	HOH	WAT	403	3.928	-6.370	32.724	1.00	21.48	8
END										

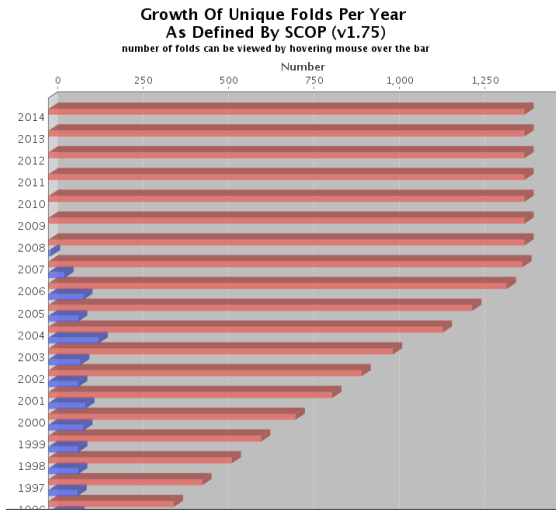
11



12

3 metodi principali:

- X-ray crystallography (~ 88.6%)
- (NMR) (~ 10.4%)
- Electron microscopy (0.8%)



1400 different folds

