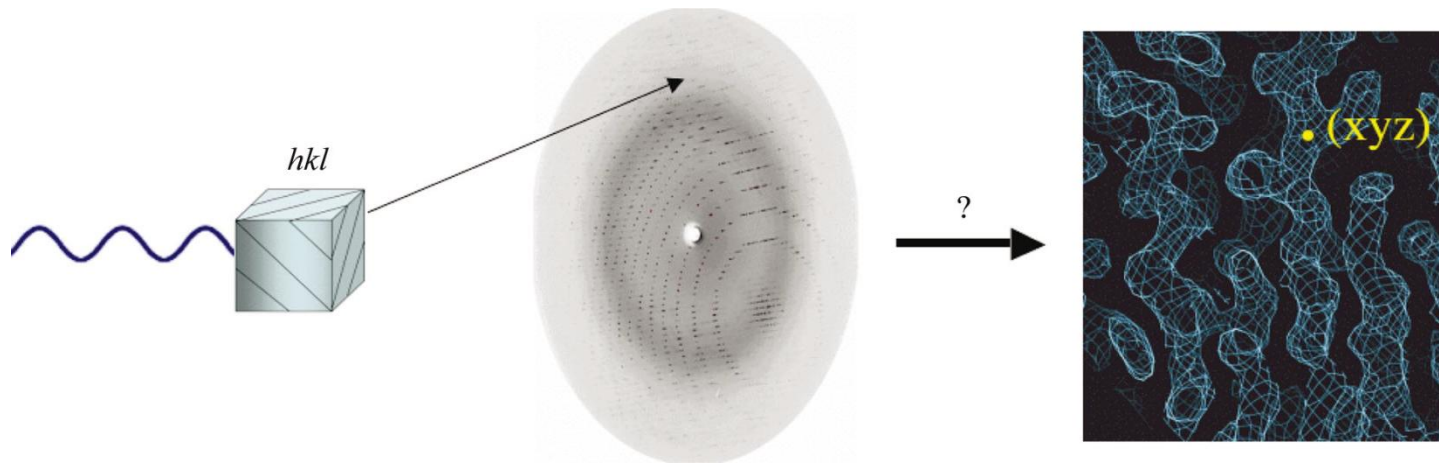


Το πρόβλημα φάσης
και
οι δυνατές
προσεγγίσεις.

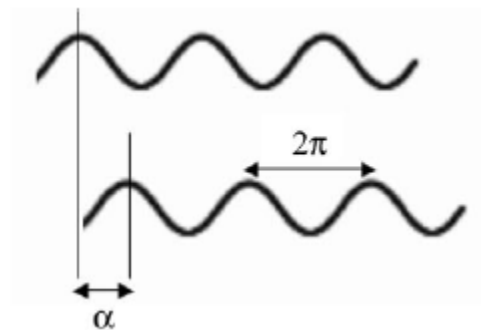


Το πείραμα Περίθλασης

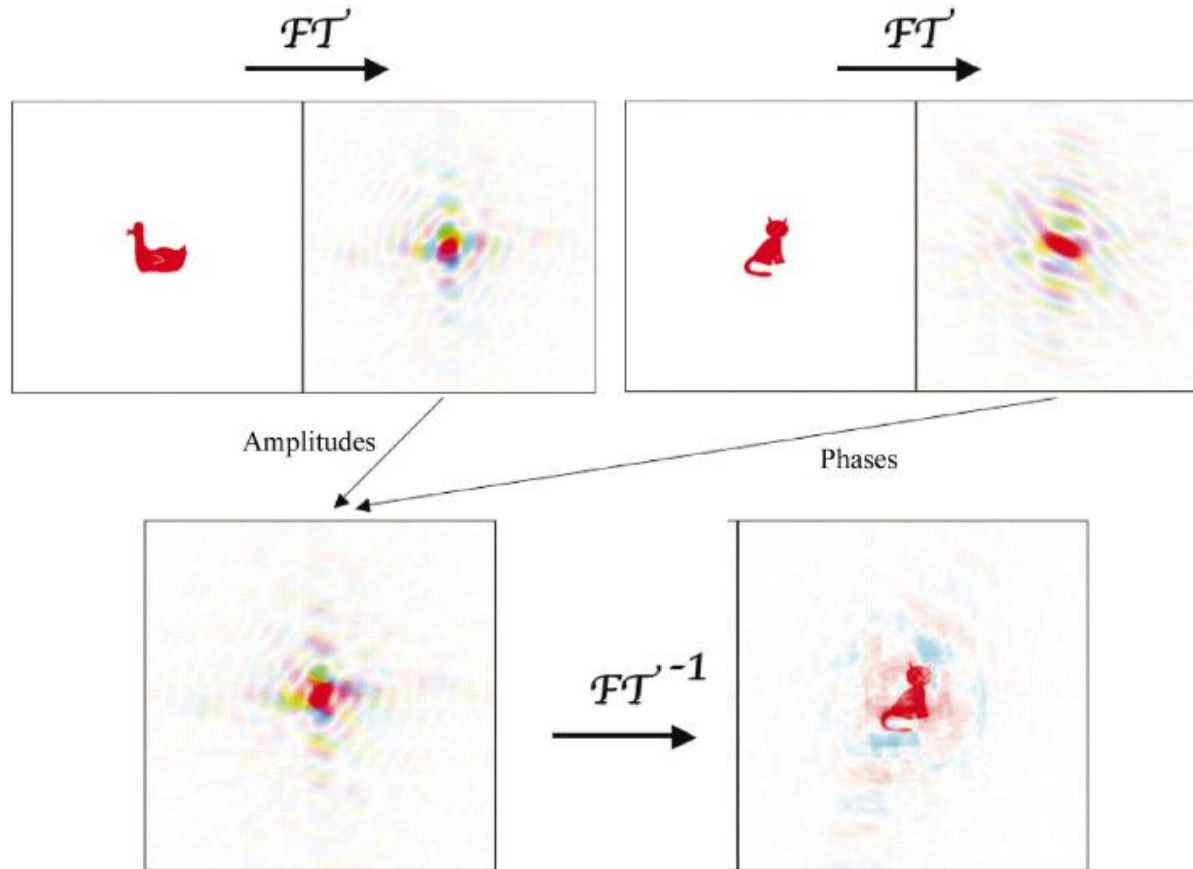


$$\rho(xyz) = 1/V \sum |F_{hkl}| \exp(i\alpha_{hkl}) \exp(-2\pi ihx + ky + lz),$$

where V is the volume of the unit cell and α_{hkl} is the phase associated with the structure-factor amplitude $|F_{hkl}|$. We can measure the amplitudes, but the phases are lost in the experiment. This is the phase problem.

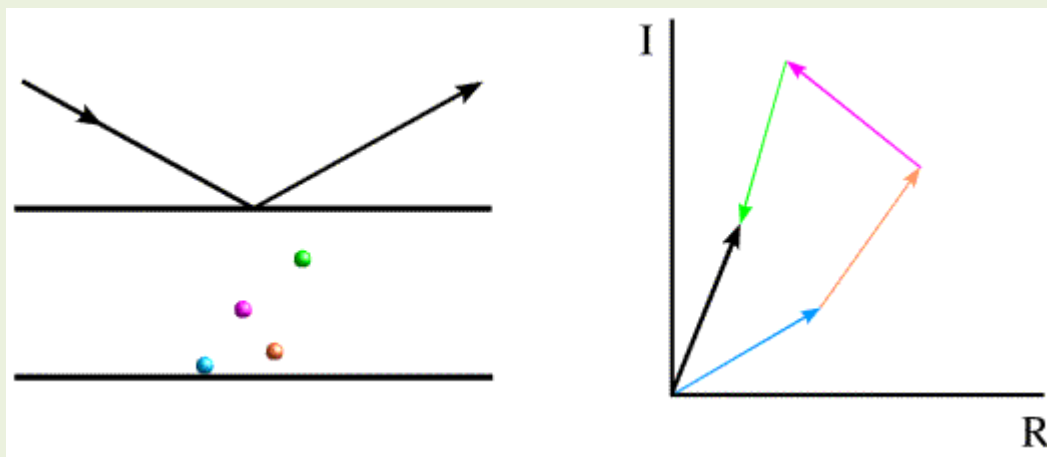


The importance of phases



The importance of phases in carrying information. Top, the diffraction pattern, or Fourier transform (FT), of a duck and of a cat. Bottom left, a diffraction pattern derived by combining the amplitudes from the duck diffraction pattern with the phases from the cat diffraction pattern. Bottom right, the image that would give rise to this hybrid diffraction pattern. In the diffraction pattern, different colours show different phases and the brightness of the colour indicates the amplitude. Reproduced courtesy of Kevin Cowtan.

Όταν ακτίνες X περιθλώνται από κρύσταλλο δημιουργούν κηλίδες πάνω στον ανιχνευτή. Κάθε κηλίδα αντιστοιχεί σε ένα σημείο στο αντίστροφο πλέγμα και αναπαριστά ένα κύμα με πλάτος και σχετική φάση.



Η φάση και το πλάτος των σκεδαζόμενων ακτινών δημιουργείται από τα μεμονωμένα σκεδαζόμενα κύματα.

Η σχετική φάση εξαρτάται από την απόσταση των ατόμων μεταξύ των planes. Οι συνεισφορές των ατόμων στη σκέδαση αναπαριστώνται ως διανύσματα. Το συνολικό σκεδαζόμενο κύμα αναπαριστάται από το μαύρο διάνυσμα που είναι η συνισταμένη όλων των διανυσμάτων.

Το διάνυσμα που αναπαριστά τη συνολική σκέδαση ενός ορισμένου set Bragg planes αποτελεί τον παράγοντα δομής F (διάνυσμα ή μιγαδικός).

Οι παράγοντες δομής για τα διάφορα σημεία στο αντίστροφο πλέγμα αντιστοιχούν σε έναν μετασχηματισμό Fourier της κατανομής της ηλεκτρονιακής πυκνότητας μέσα στη μοναδιαία κυψελίδα του κρυστάλλου.

Μετασχηματισμός Fourier: αυστηρώς ορισμένη μαθηματική διεργασία που αποσυνθέτει μια συνάρτηση σε άθροισμα άπειρων ημιτονοειδών και συνημιτονοειδών συναρτήσεων.

➔ μια νέα συνάρτηση που περιγράφει κατά πόσο συμμετέχει κάθε στοιχειώδες ημίτονο στον σχηματισμό της αρχικής συνάρτησης.

Εφαρμόζοντας αντίστροφο μετασχηματισμό Fourier στους παράγοντες δομής επιστρέφουμε στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα.


Πληροφορίες από διάγραμμα περίθλασης

- Θέσεις ανακλάσεων

Κάθε κηλίδα πάνω στον ανιχνευτή προσδιορίζεται από h, k, l

- Αποστάσεις των σημείων  μέγεθος και συμμετρία της μοναδιαίας κυψελίδας

- Εντάσεις ανακλάσεων

 ηλεκτρονική πυκνότητα $\rho(x,y,z)$

Για τον προσδιορισμό της ηλεκτρονιικής πυκνότητας:

- Πλάτος σκεδαζόμενης ακτινοβολίας
- Φάση της ακτινοβολίας

★ Η ακτινοβολία είναι κύμα και ως κύμα μπορεί να μελετηθεί με τριγωνομετρικές συναρτήσεις. Η **φάση** είναι βασικό μέγεθος των τριγωνομετρικών συναρτήσεων. Εξαρτάται από τη θέση και το χρόνο.

Το μέγεθος που διαταράσσεται παίρνει μια μέγιστη και μια ελάχιστη τιμή.

$$| \text{μέγιστη} | = | \text{ελάχιστη} |$$

Αυτή η απόλυτη τιμή είναι το **πλάτος** του κύματος.

Το πλάτος της έντασης $I(hkl)$ της ακτινοβολίας που σκεδάζεται από ένα άτομο εξαρτάται από:

- τον αριθμό e^- του ατόμου
- την κατανομή τους

Υποθέτοντας ότι ο κρύσταλλος αποτελείται από N διακριτά άτομα ανά κυψελίδα που βρίσκονται στις θέσεις x_j, y_j, z_j της κυψελίδας, το κύμα $F(hkl)$ που περιθλάται από τα επίπεδα hkl δίνεται από τη σχέση:

$$F_{hkl} = \sum_{i=1}^n f^i \cdot e^{2\pi i(hx_i + ky_i + lz_i)}$$

Ο παράγοντας δομής μιας ανάκλασης $F(hkl)$ είναι μια άθροιση όλων των ατόμων της μοναδιαίας κυψελίδας του κρυστάλλου που εξαρτάται από τον **ατομικό παράγοντα σκέδασης** κάθε ατόμου f^i και τη **θέση του ατόμου**.

$$F_{hkl} = \sum_{i=1}^n f^i \cdot e^{2\pi i(hx_i + ky_i + lz_i)}$$

two terms

Electronic property of atom

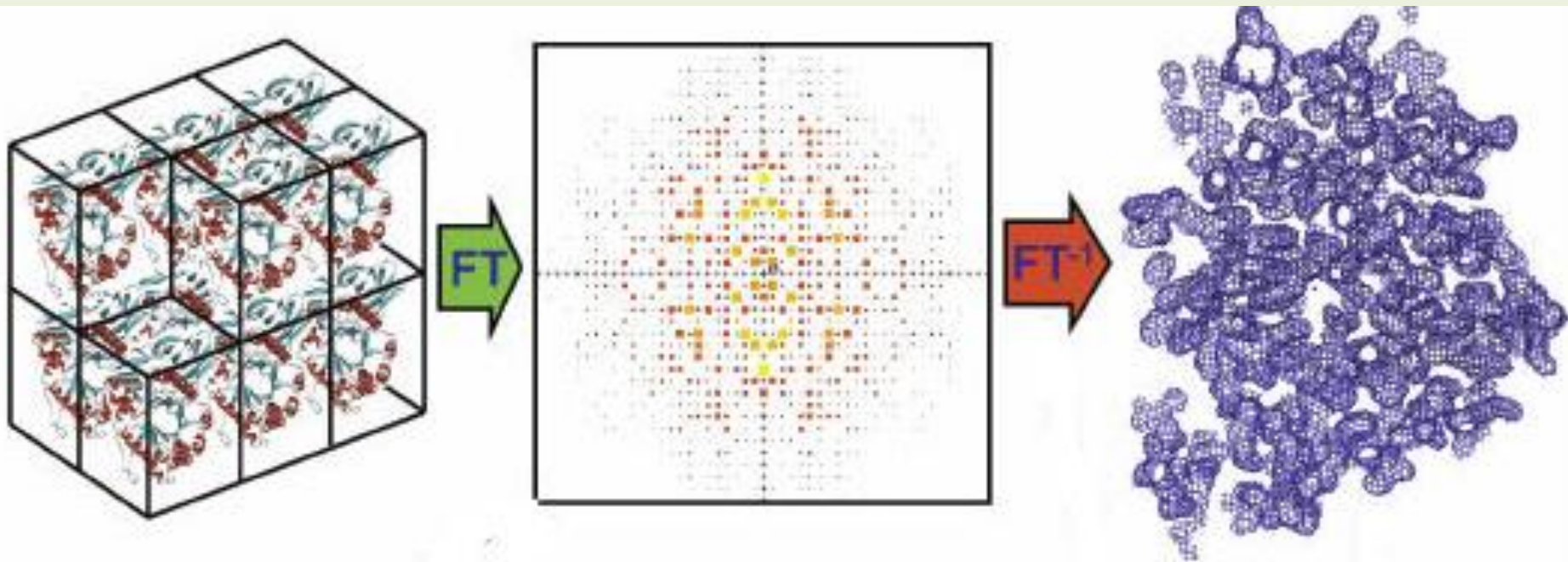
Structural property (position)

Η ηλεκτρονική πυκνότητα $\rho(x,y,z)$ σαν τρισδιάστατη περιοδική συνάρτηση μπορεί να αναπαρασταθεί από μια τρισδιάστατη σειρά Fourier.

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F(hkl) e^{-2\pi(hx+ky+lz)}$$

Πρόβλημα Φάσης

Τα πλάτη των ανακλάσεων $|F(hkl)|$ μπορούν να μετρηθούν πειραματικά. Δεν έχει βρεθεί ακόμη τρόπος για την πειραματική μέτρηση των φάσεων $\alpha(hkl)$ των ανακλάσεων.



Το μετρήσιμο στοιχείο από το μετασχηματισμό Fourier του κρυστάλλου είναι το πλάτος του παράγοντα δομής F που είναι ανάλογο της τετραγωνικής ρίζας της έντασης I . Οι φάσεις που λείπουν θα πρέπει να προσεγγιστούν από συμπληρωματικά πειράματα.

$$I \sim F^2$$

$$F^2 = |F|^2$$

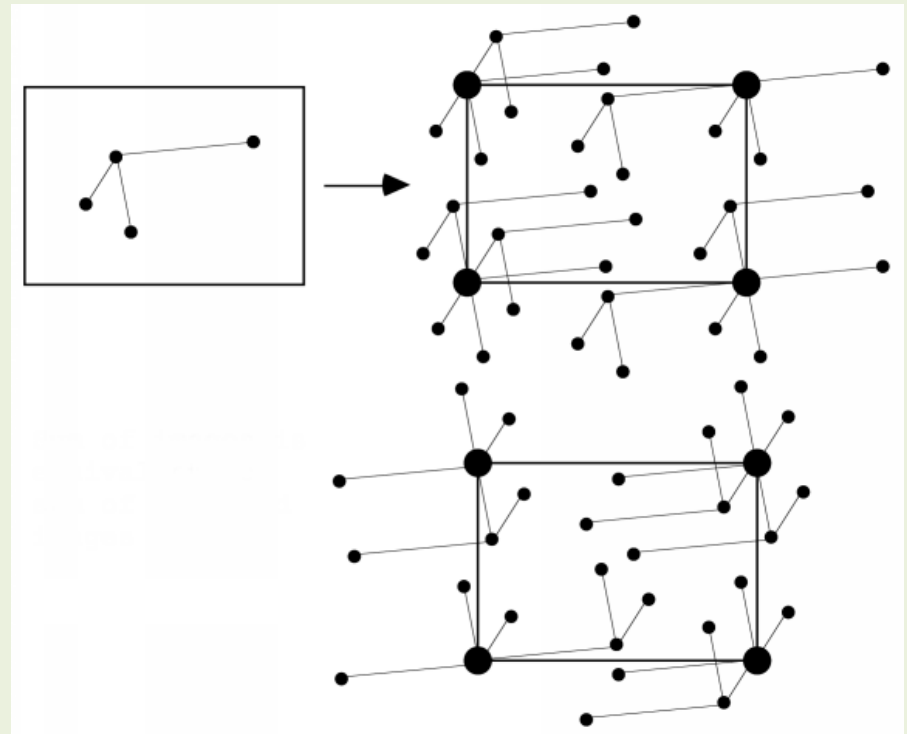
Συνάρτηση Patterson

Τι θα μπορούσαμε να πάρουμε εάν εφαρμόζαμε έναν μετασχηματισμό Fourier των εντάσεων (πλάτη στο τετράγωνο) που θα απαιτούσε μόνο τα μετρήσιμα δεδομένα??

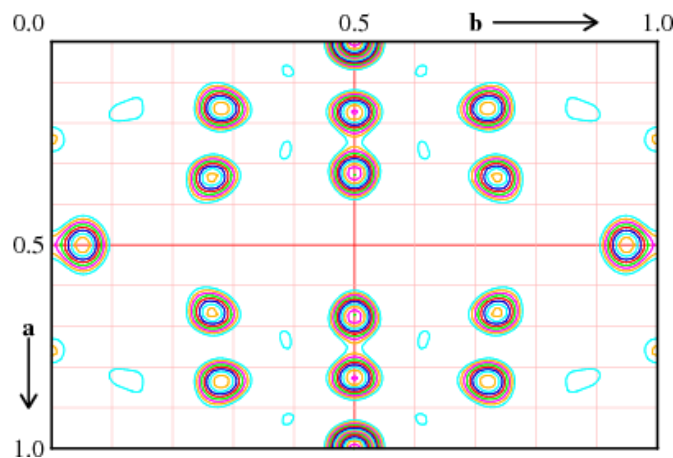
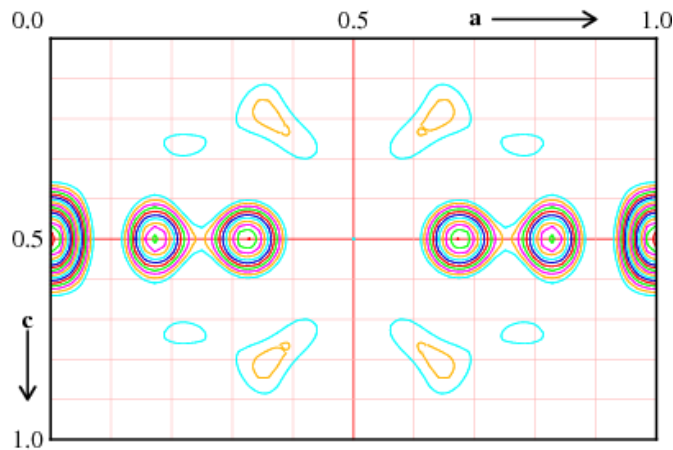
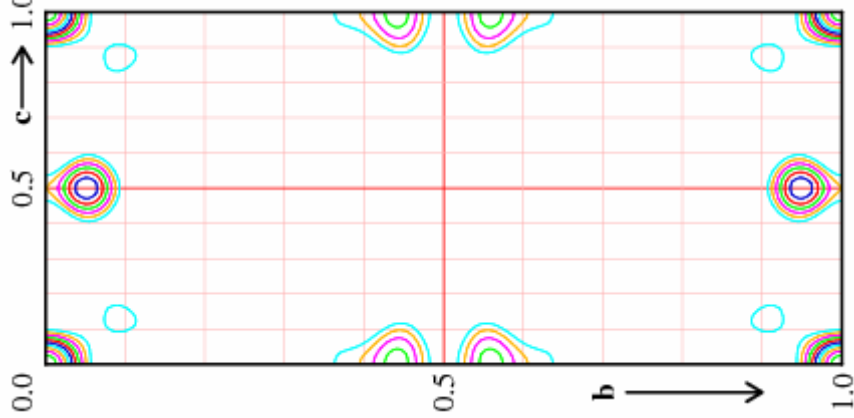
$$P(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F(h, k, l)^2 \sigma_{\text{υν}}\{2\pi(hx + ky + lz)\}$$

Σε κάθε κορυφή αντιστοιχεί 1 ζεύγος ατόμων.

Για σχετικά μικρούς αριθμούς ατόμων, είναι δυνατό να αποκρυπτογραφηθούν οι πραγματικές θέσεις των ατόμων που θα μπορούσαν να δημιουργούν τις κορυφές που παρατηρούνται.



Χάρτες Patterson



A Patterson map of N points will have $N(N-1)$ peaks, excluding the central peak and any overlap.

The peaks in the Patterson function are the interatomic distance vectors weighted by the product of the number of electrons in the atoms concerned.

Because for each vector between atoms i and j there is an oppositely oriented vector of the same length (between atoms j and i), the Patterson function always has [centrosymmetry](#).

Μοριακή αντικατάσταση

Προϋπόθεση: ύπαρξη μοντέλου πρωτεϊνικής δομής με σημαντικό βαθμό ομοιότητας στο επίπεδο της αμινοξικής αλληλουχίας.

- τοποθέτηση του μοντέλου σε σωστό προσανατολισμό και σωστή θέση στην άγνωστη μοναδιαία κυψελίδα.
 - προσανατολισμός: πρέπει να οριστούν 3 γωνίες περιστροφής
 - τοποθέτηση: πρέπει να οριστούν 3 παράμετροι μετατόπισης

Εάν υπάρχει ένα μόριο μέσα στην ασύμμετρη μονάδα του κρυστάλλου τότε η μοριακή αντικατάσταση είναι ένα πρόβλημα 6 διαστάσεων.

- συνάρτηση περιστροφής
- 3D translation function

Μοριακή αντικατάσταση

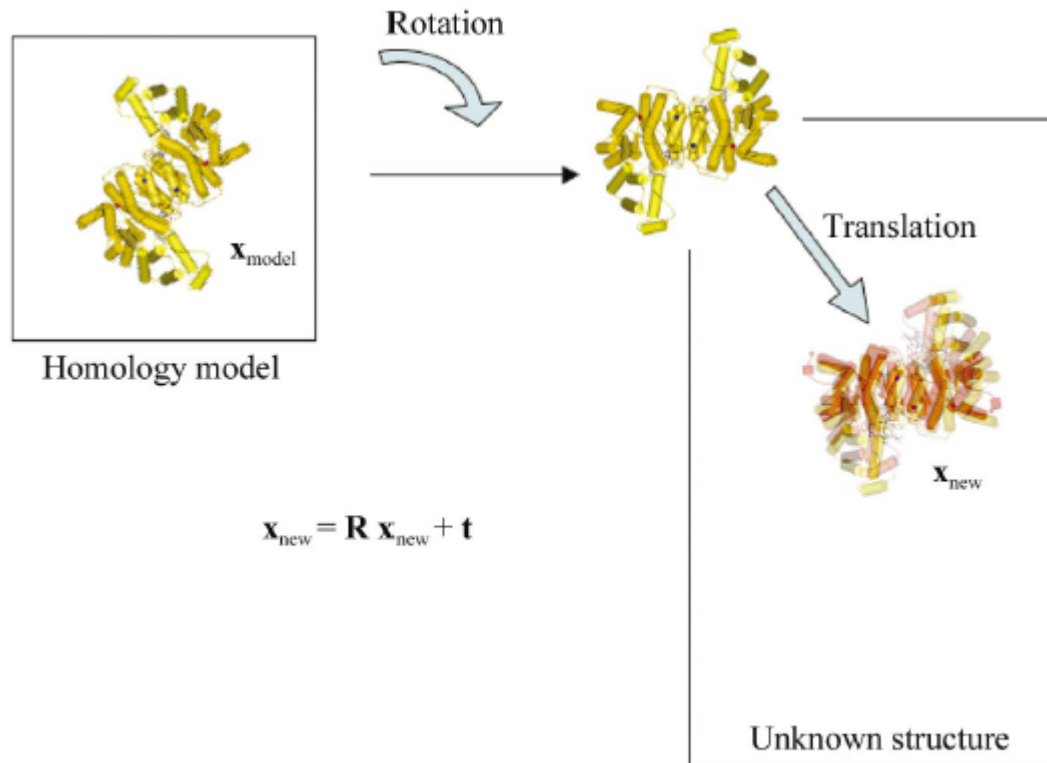


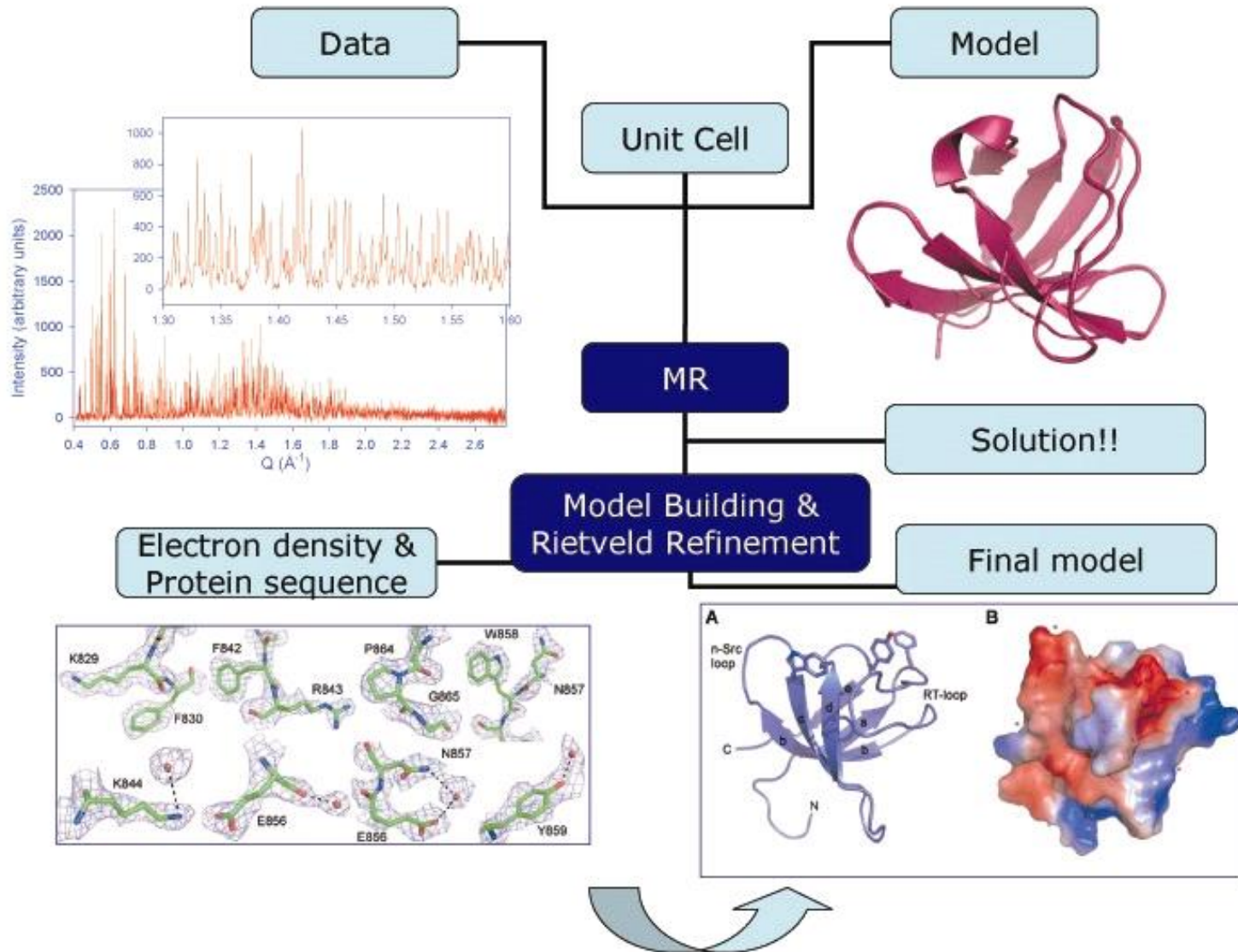
Figure 4
The process of molecular replacement.

Second SH3 domain of Ponsin: SH3.2

After purification the SH3.2 domain spontaneously formed a microcrystalline material suitable only for powder diffraction measurements

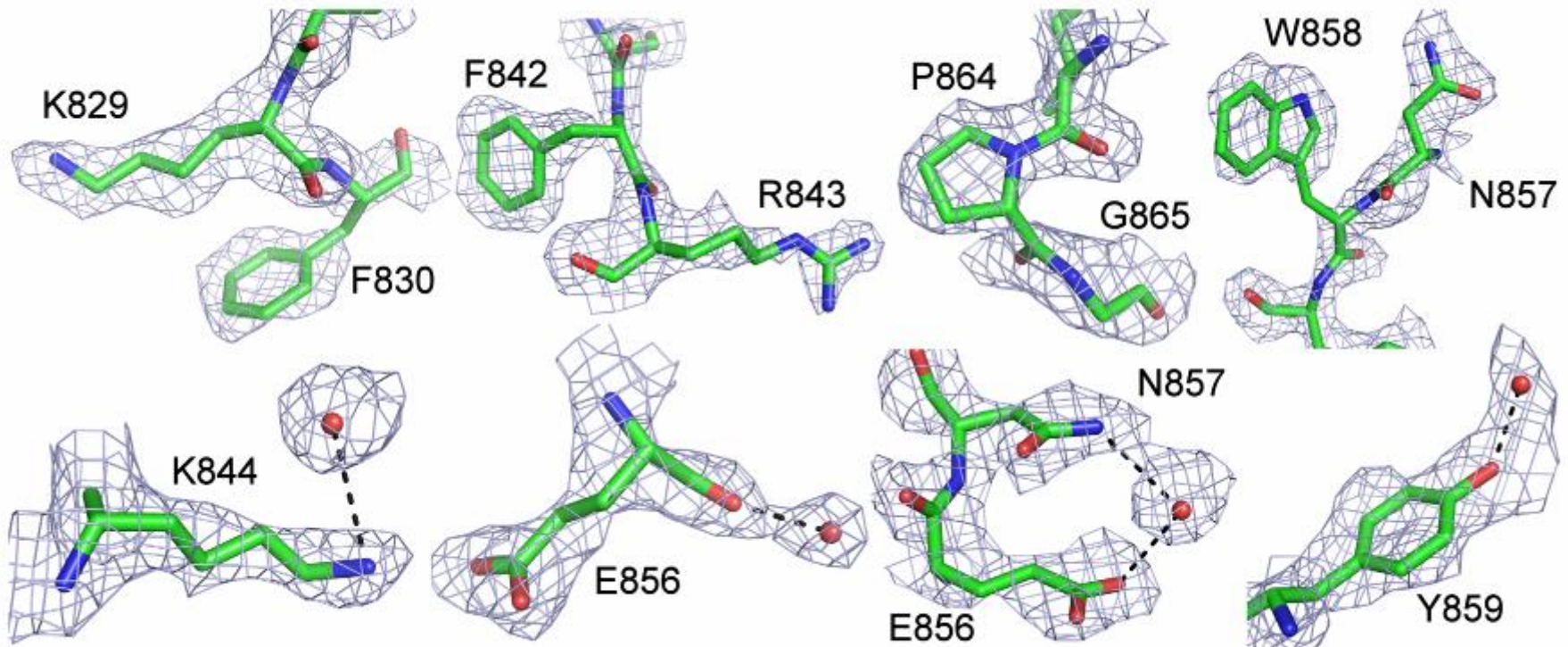


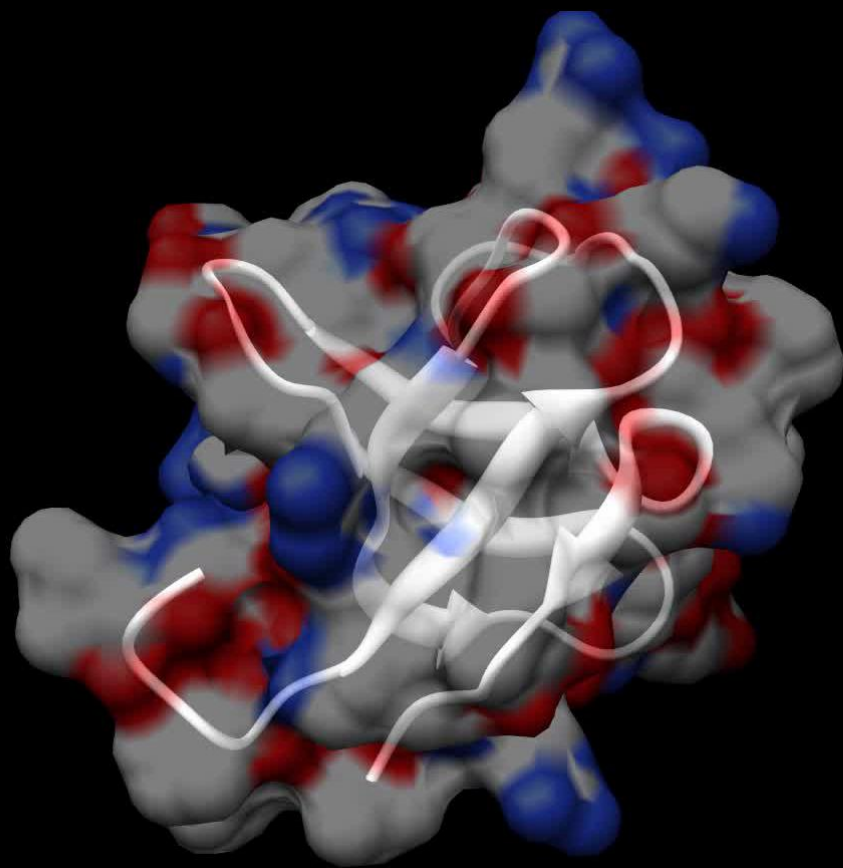
Στρατηγική



Selected regions of the final refined structural model in stick representation and the corresponding total omit map contoured at 1σ .

544 protein atoms and 36 water molecules were identified in total OMIT and difference electron density maps.






Direct Methods

Υπόθεση: ο κρύσταλλος αποτελείται από άτομα παρόμοιου σχήματος που όλα έχουν θετική ηλεκτρονιακή πυκνότητα.

➤ υπάρχει **στατιστική συσχέτιση μεταξύ ομάδων παραγόντων δομής** και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να συμπεράνουμε πιθανές τιμές για τις φάσεις.

- Λύση μικρών μοριακών δομών  *μεγάλη ειδικότητα*
- στατιστικές σχέσεις εξασθενούν όσο αυξάνεται ο αριθμός των ατόμων
- περιορίζονται σε δομές που έχουν το πολύ μερικές εκατοντάδες άτομα στη μοναδιαία κυψελίδα.

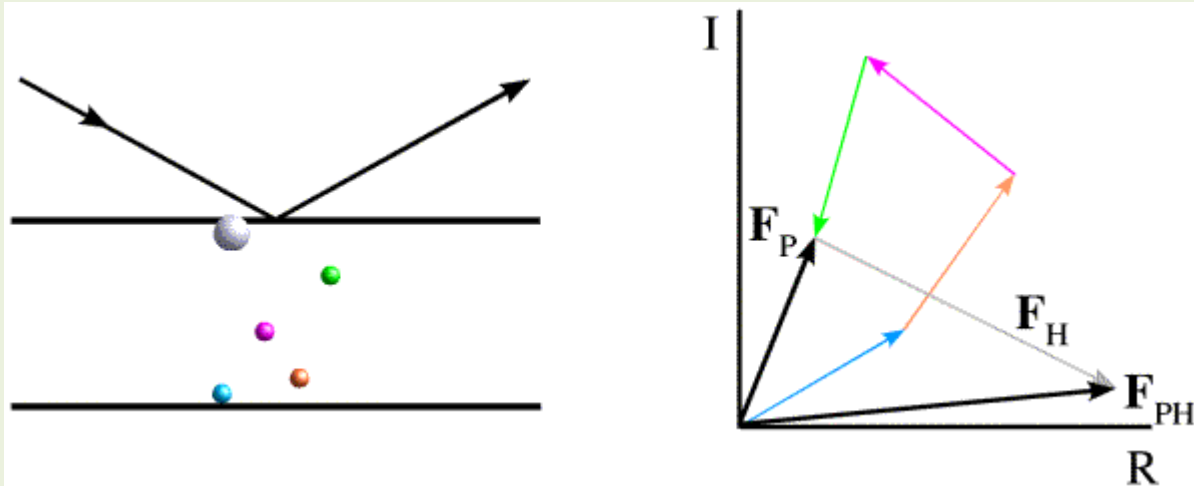
Αν και δεν εφαρμόζονται στη μεγάλη πλειοψηφία των πρωτεϊνικών κρυσταλλικών δομών είναι χρήσιμες στο πλαίσιο πειραματικών μεθόδων για λύση του προβλήματος φάσης

- ισόμορφη αντικατάσταση
- ανώμαλη σκέδαση


Ισόμορφη αντικατάσταση

Επιφέρουμε μια αλλαγή στον κρύσταλλο που διαταράσσει του παράγοντες δομής με την προσθήκη **βαρέων ατόμων**.

Η εισαγωγή ενός βαρέως ατόμου αλλάζει την ένταση της σκέδασης σημαντικά καθώς τα βαρέα άτομα συνεισφέρουν δυσανάλογα στη συνολική σκέδαση.



Διαφορετικά άτομα συνεισφέρουν στην ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας ανάλογα με το τετράγωνο του αριθμού e^- που περιέχουν. Οι συνεισφορές των ελαφρύτερων ατόμων τείνουν να ακυρωθούν γιατί σκεδάζονται με διαφορετικές γωνίες φάσης. Όλα τα e^- στα βαρέα άτομα θα σκεδάζονται κυρίως σε φάση.

native crystal
derivative crystal  Δεδομένα περίθλασης

Οι διαφορές στις σκεδαζόμενες εντάσεις θα αντανakλούν σε μεγάλο βαθμό τη συνεισφορά στη σκέδαση των βαρέων ατόμων.

Αυτές οι διαφορές χρησιμοποιούνται για την κατασκευή ενός χάρτη Patterson ή αξιολογούνται με direct methods.

Γνωρίζοντας σε ποιες θέσεις του κρυστάλλου εντοπίζονται βαριά άτομα, υπολογίζεται η συνεισφορά τους στους παράγοντες δομής.

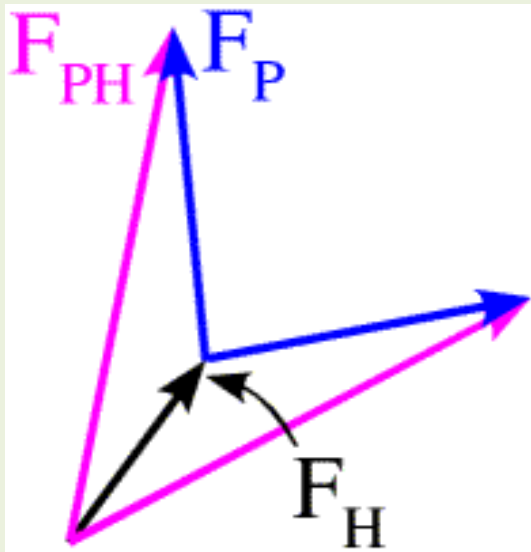
Υπόθεση: η σκέδαση από τα άτομα της πρωτεΐνης δεν αλλάζει λόγω της προσθήκης βαρέων ατόμων.

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

F_{PH} : παράγοντας δομής του derivative κρυστάλλου

F_P : παράγοντας δομής της πρωτεΐνης

F_H : παράγοντας δομής βαρέως ατόμου



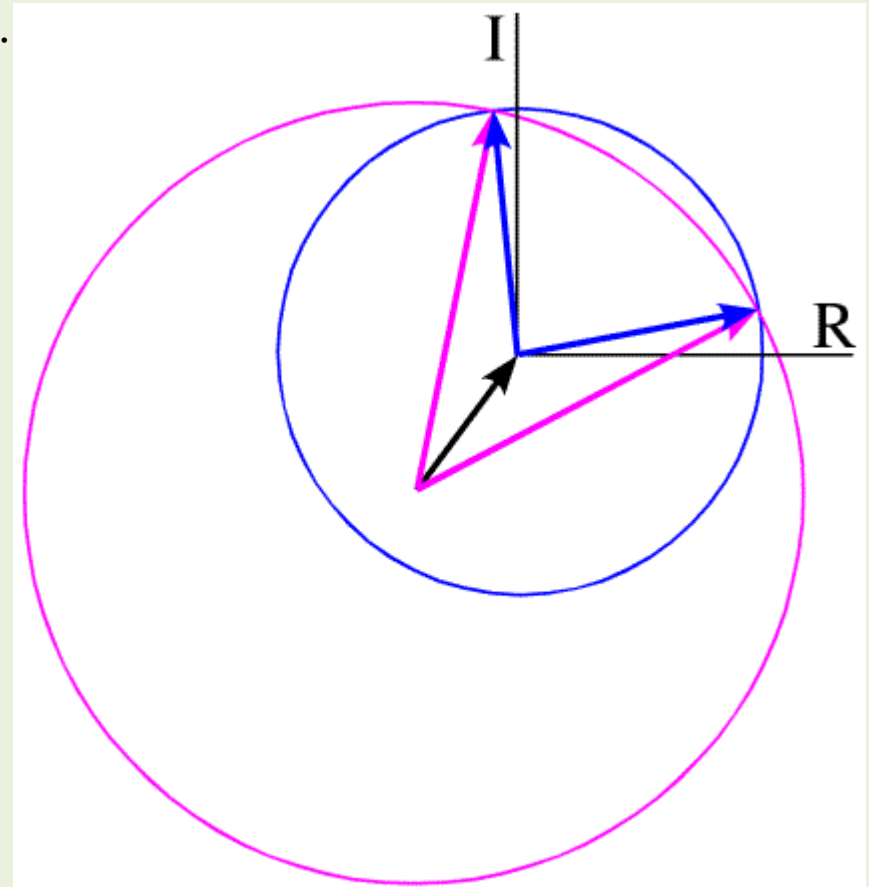
➔ Η ισότητα ορίζει τρίγωνο όπου είναι γνωστά το μήκος και ο προσανατολισμός της μιας πλευράς (F_H) και τα μήκη των 2 άλλων πλευρών.

Υπάρχουν 2 τρόποι να κατασκευάσουμε ένα τέτοιο τρίγωνο και επομένως 2 πιθανές φάσεις για το F_P .

Κύκλος με ακτίνα $|F_P|$ και κέντρο την αρχή του διανύσματος. Δείχνει όλα τα διανύσματα που θα μπορούσαν να σχεδιαστούν με όλες τις πιθανές γωνίες φάσης για το F_P .

Κύκλος με ακτίνα $|F_{PH}|$ και κέντρο την αρχή του διανύσματος F_H . Όλα τα σημεία στον ροζ κύκλο είναι πιθανές τιμές (μέγεθος και φάση) για το F_P που ικανοποιούν την ισότητα

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

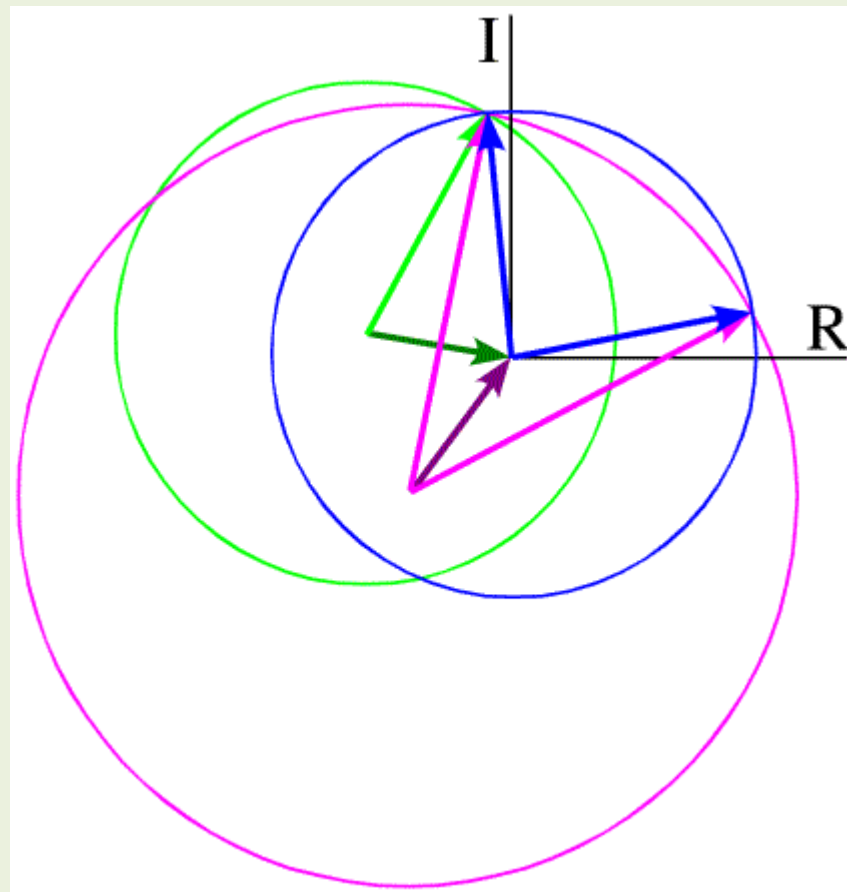


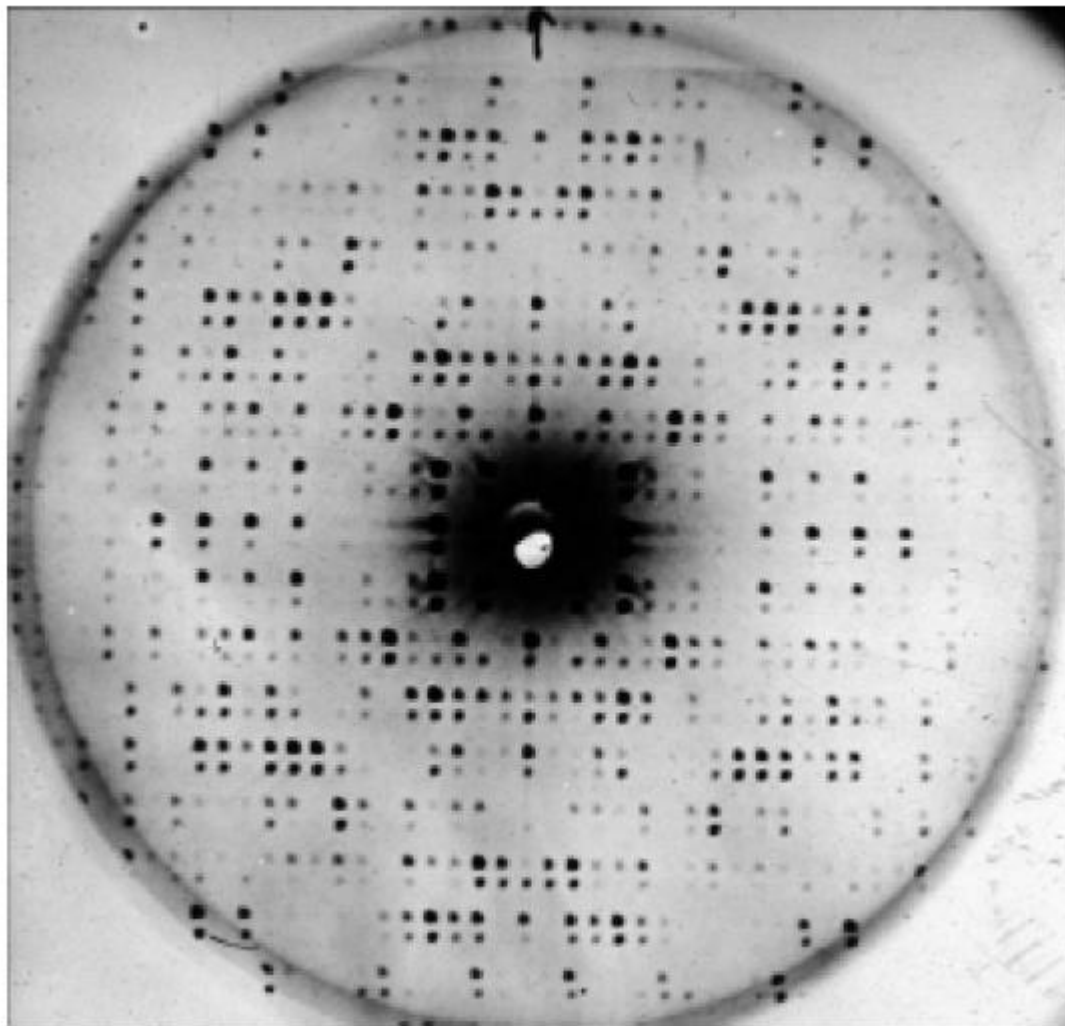
Η **ασάφεια της διπλής φάσης** μπορεί να ξεπεραστεί ετοιμάζοντας έναν 2^ο derivative crystal με βαρέα άτομα που δένουν σε άλλες θέσεις.

Πράσινος κύκλος: πληροφορία από τον 2^ο derivative crystal: 1 φάση συμφωνεί με τις παρατηρήσεις.

Λιγότερο ασαφής
φάση-πολλαπλοί
παράγωγοι κρύσταλλοι

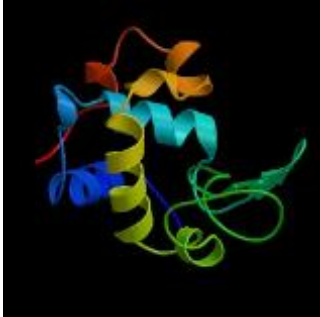
➔ multiple isomorphous
replacement

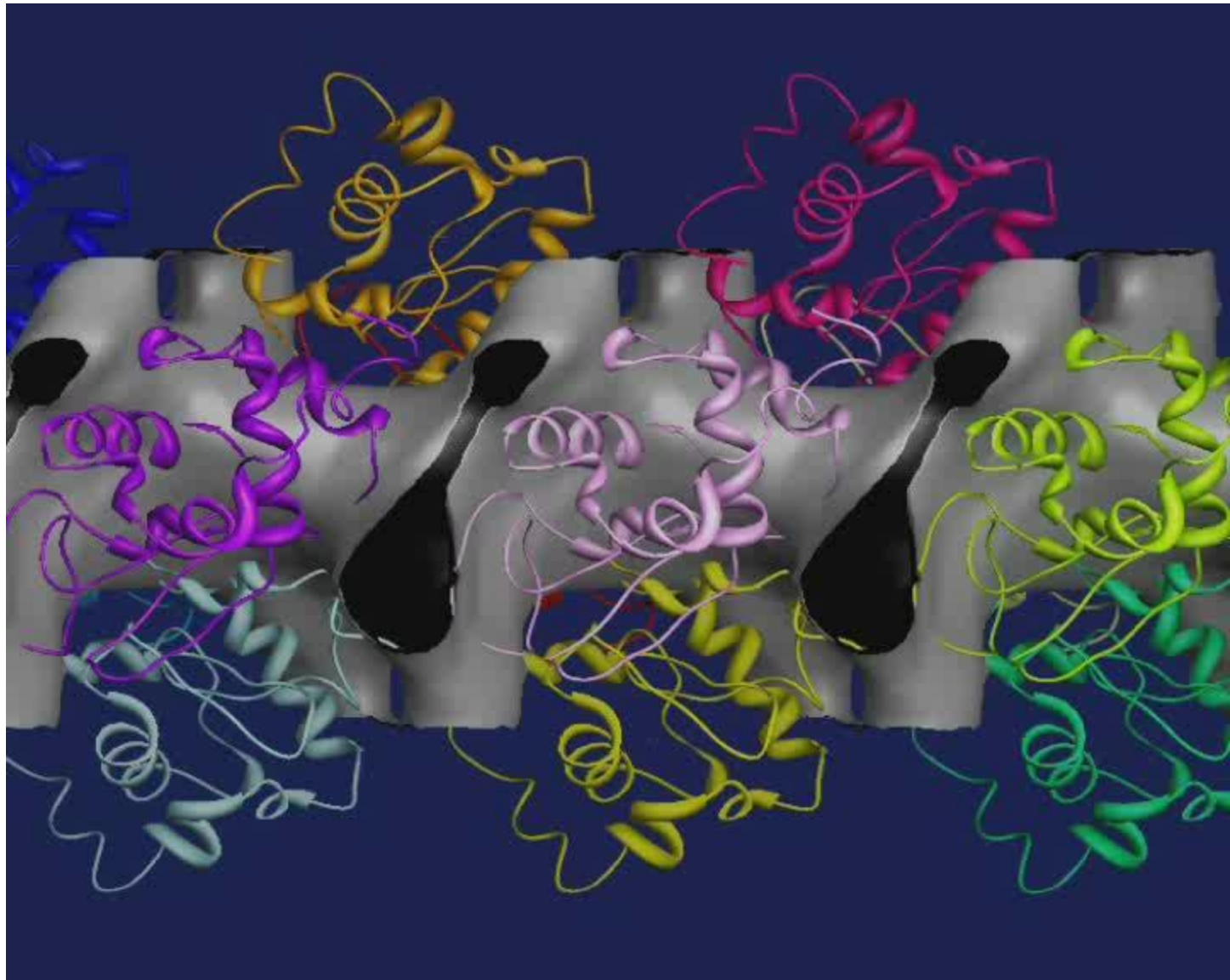




Two protein diffraction patterns superimposed and shifted vertically relative to one another. One is from the native bovine β -lactoglobulin, one from a crystal soaked in a mercury salt solution. Note the intensity changes for certain reflections and the identical unit cells suggesting isomorphism. (Photo courtesy of Dr Lindsay Sawyer).

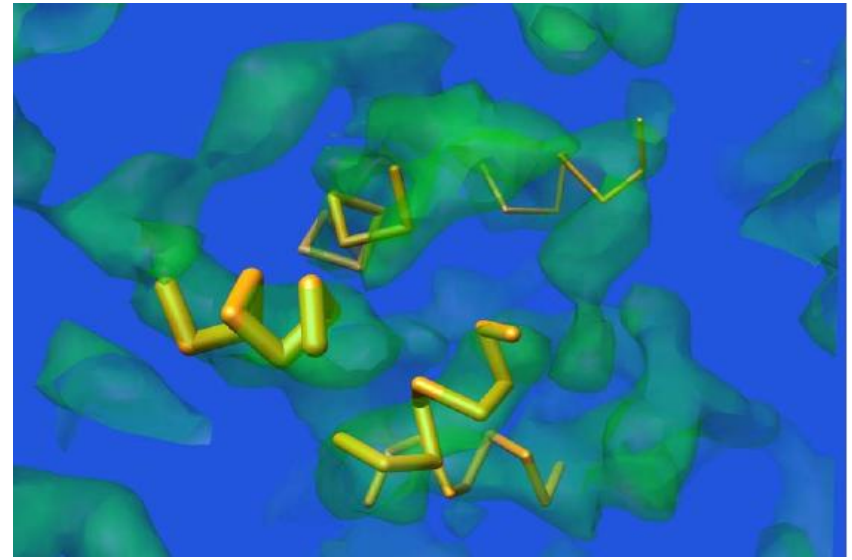
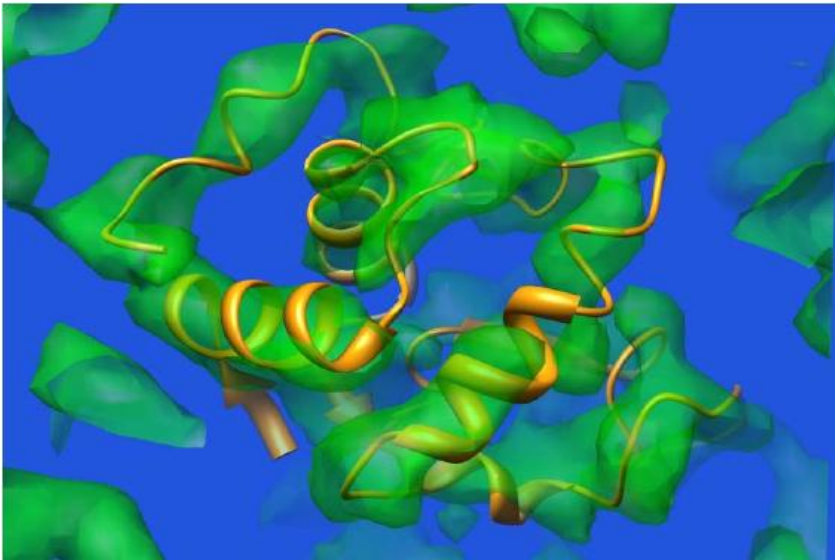
Test system

protein	Hen egg-white Lysozyme (HEWL) 
Molecular weight	14.4 kDa
Unit-cell (Å)	a=b=79.2 c=38.0
Space-group	P4₃2₁2
Heavy atoms	Gd (Z=64) Ho (Z= 67)



Low resolution phasing in Gd and Ho derivatives of lysozyme

METHOD: Multiple Isomorphous Replacement (MIR)

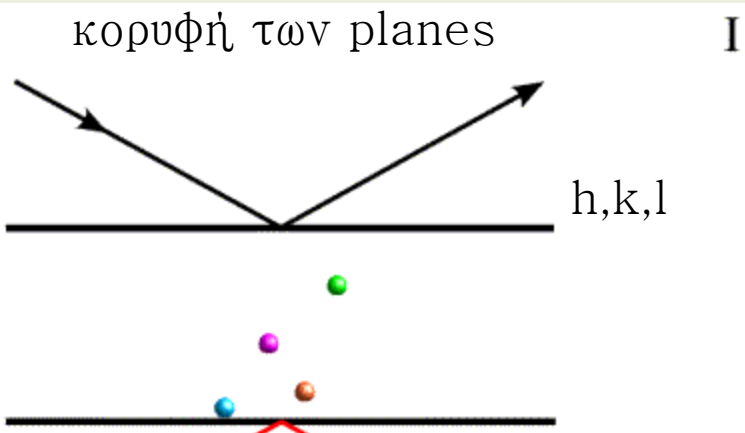


Ανώμαλη σκέδαση

Τα περισσότερα e^- στα άτομα που αποτελούν έναν κρύσταλλο θα αλληλεπιδράσουν πανομοιότυπα με τις ακτίνες X. ➡

Ζεύγη κηλίδων περίθλασης υπακούν στο νόμο του Friedel

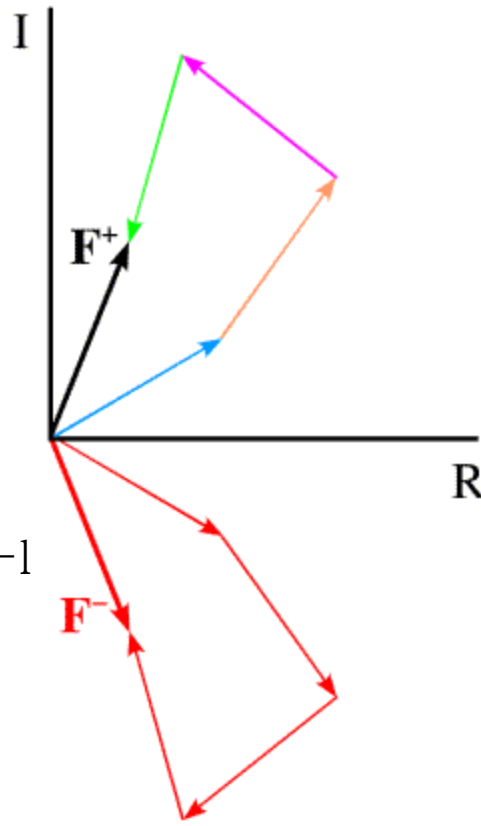
Περίθλαση από την κορυφή των planes



h, k, l

$-h, -k, -l$

Περίθλαση από το κάτω μέρος των ίδιων planes



Τα άτομα συνεισφέρουν στο πρότυπο περίθλασης με φάσεις που καθορίζονται από τις σχετικές τους αποστάσεις (έγχρωμα βέλη)

Έτσι, αντικατοπτρίζονται κατά μήκος του οριζόντιου άξονα.

Πλειοψηφία των e^-
του κρυστάλλου

Ηλεκτρομαγνητικό κύμα: το ηλεκτρικό πεδίο επάγει την ταλάντωση των e^- . Όσο η συχνότητα ταλάντωσης είναι πολύ διαφορετική από την φυσική συχνότητα ταλάντωσης, τα e^- θα ταλαντώνονται με την ίδια φάση.

Inner cell e^-

Όταν η συχνότητα είναι παρόμοια με τη φυσική συχνότητα ταλάντωσης, τότε υπάρχει μια μικρή μετατόπιση τόσο στο πλάτος όσο και στη φάση της επαγόμενης ταλάντωσης.

$$F = (f + f') + f''$$

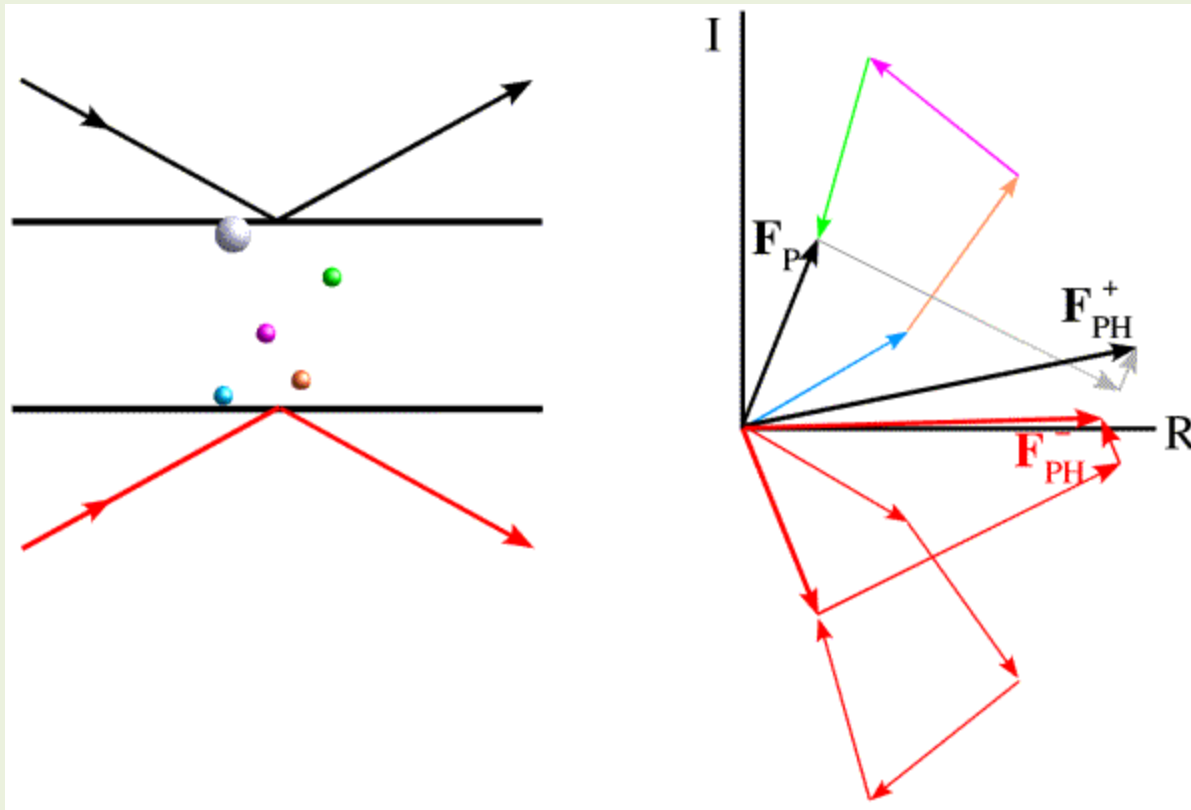
Η μετατόπιση στο πλάτος και στη φάση λέγεται ανώμαλη σκέδαση.

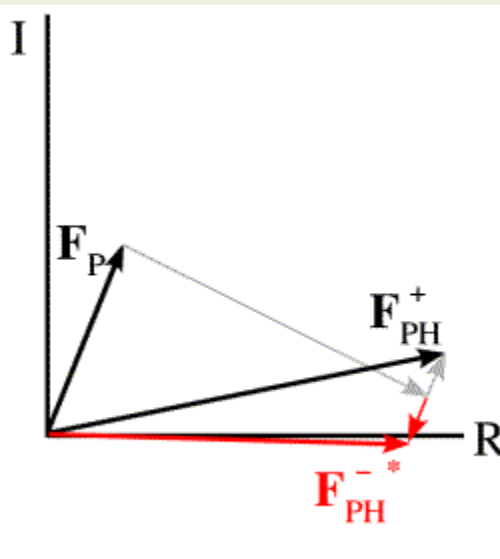
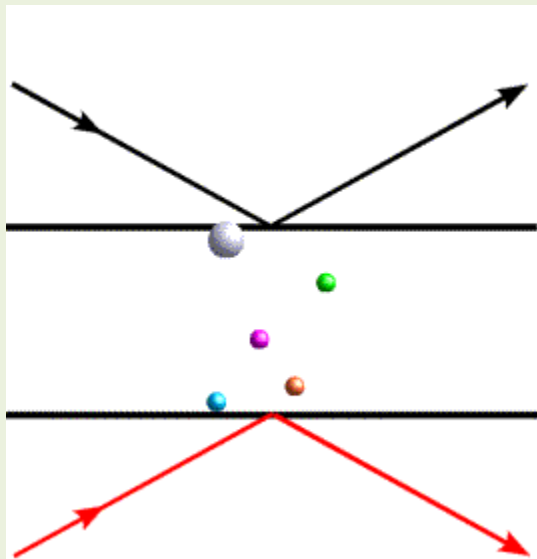
Η μετατόπιση φάσης στην ανώμαλη σκέδαση οδηγεί στην κατάργηση του νόμου του Friedel.

προσθήκη βαρέως ατόμου με δυνατότητα ανώμαλης σκέδασης

- η μετατόπιση φάσης αναπαριστάται με ένα διάνυσμα σε 90° από τη φυσική σκέδαση του βαρέως ατόμου. Αυτό το διάνυσμα είναι κάθετο στη συνεισφορά της ανώμαλης σκέδασης ανεξάρτητα με ποιο ζεύγος Friedel κοιτάμε.

➔ Κατάργηση συμμετρίας





Το αποτέλεσμα της ανώμαλης σκέδασης είναι να κάνει τα πλάτη του ζεύγους Friedel διαφορετικά.

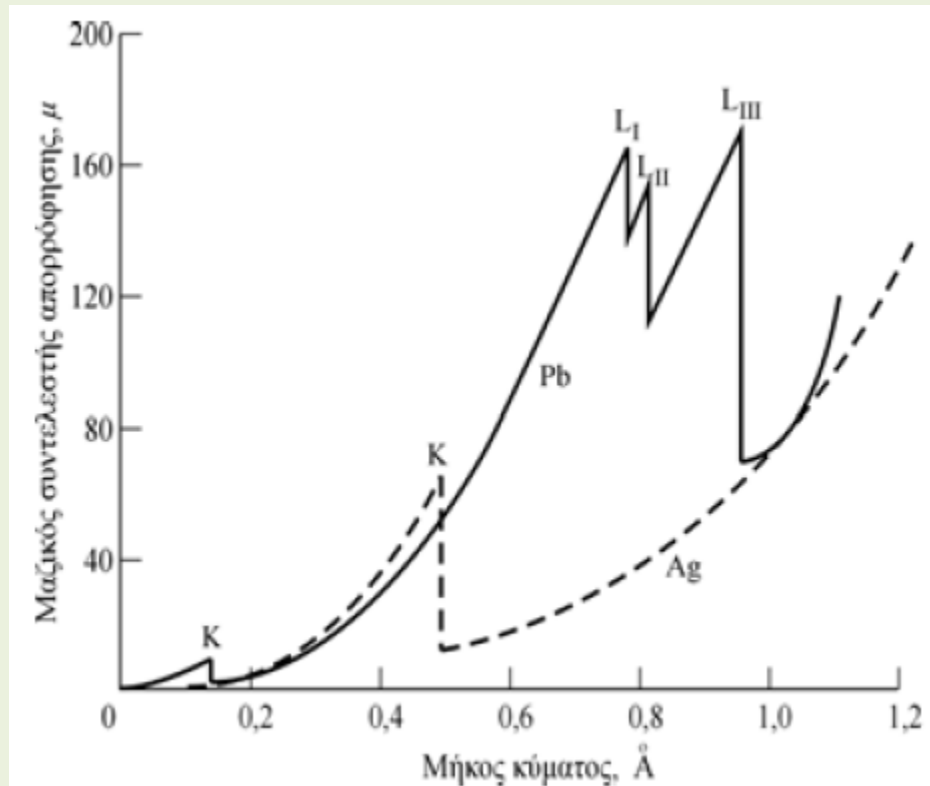
MAD, multiple wavelength anomalous dispersion

Συλλέγοντας δεδομένα σε διάφορα μήκη κύματος κοντά στο όριο απορρόφησης ενός στοιχείου στον κρύσταλλο, μπορούμε να πάρουμε πληροφορία φάσης ανάλογη της MIR.

Εφαρμογή: εισαγωγή σεληνομεθειονίνης στη θέση της μεθειονίνης.

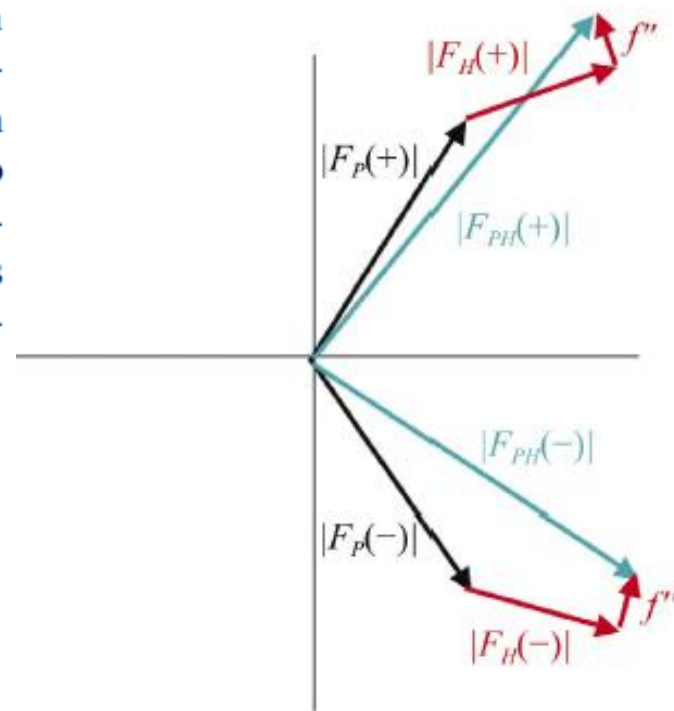
Τα άτομα Se που αντικαθιστούν τα άτομα S δίνουν ισχυρό ανώμαλο σήμα σε μήκη κύματος που επιτυγχάνονται με πηγές ακτινών X synchrotron.

Για τον εντοπισμό των βαρέων ατόμων συλλέγουμε δεδομένα γύρω από τις κορυφές απορρόφησης.



4.1. Anomalous scattering

The atomic scattering factor has three components: a normal scattering term that is dependent on the Bragg angle and two terms that are not dependent on scattering angle, but on wavelength. These latter two terms represent the anomalous scattering that occurs at the absorption edge when the X-ray photon energy is sufficient to promote an electron from an inner shell. The dispersive term reduces the normal scattering factor, whereas the absorption term is 90° advanced in phase. This leads to a breakdown in Friedel's law, giving rise to anomalous differences that can be used to locate the anomalous scatterers. Fig. 17 shows the variation in anomalous scattering at the K edge of selenium and Fig. 18 the breakdown of Friedel's law.



Breakdown of Friedel's law when an anomalous scatterer is present.
 $f(\theta, \lambda) = f_0(\theta) + f'(\lambda) + if''(\lambda)$. $F_{hkl} \neq F_{\bar{h}\bar{k}\bar{l}}$. $\Delta F^\pm = |F_{PH}(+)| - |F_{PH}(-)|$ is the Bijvoet difference.

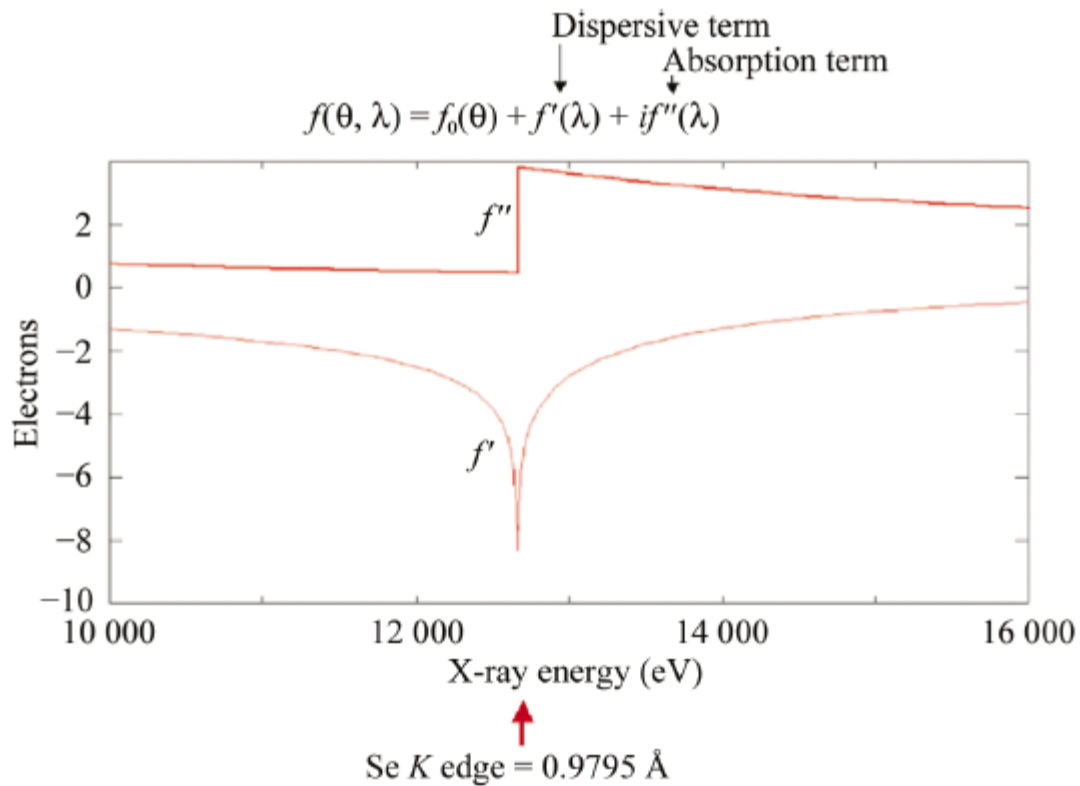


Figure 17
 Variation in anomalous scattering at the *K* edge of selenium.

Τεχνικές βελτίωσης φάσης

Density modification

➤ solvent flattening

Εάν ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας τροποποιηθεί ώστε η περιοχή του διαλύτη να ισοπεδωθεί, οι αντίστοιχες φάσεις θα είναι πιο ακριβείς. Παρατηρούμε τις συνδέσεις μεταξύ των μη διατεταγμένων μορίων του διαλύτη με τα διατεταγμένα μόρια της πρωτεΐνης.

➤ averaging

Όταν η ίδια πρωτεΐνη εμφανίζεται σε διαφορετικές θέσεις σε έναν χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας, η πυκνότητα θα ποικίλει σε κάθε αντίγραφο πρωτεΐνης. Με τον μέσο όρο της ηλεκτρονιακής πυκνότητας ακυρώνουμε κάποια τυχαία λάθη κι έτσι αυξάνεται η ακρίβεια των αντίστοιχων φάσεων.

➤ automated fitting and refinement

Εάν η ηλεκτρονιακή πυκνότητα μπορεί να μεταφραστεί με ένα ατομικό μοντέλο, η κατανομή της πυκνότητας θα είναι πιο κοντά στην πραγματικότητα και οι αντίστοιχες φάσεις θα είναι πιο ακριβείς. Το χτίσιμο του μοντέλου σε χάρτη πυκνότητας ακολουθείται από βελτίωση ώστε να συμφωνεί με τα δεδομένα περίθλασης. Οι βελτιωμένες φάσεις χρησιμοποιούνται για την κατασκευή καινούριου, καλύτερου χάρτη.

Πηγές Πληροφοριών

http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/Course/Basic_phasing/Phasing.html

<http://www.ysbl.york.ac.uk/~cowtan/fourier/fourier.html>

<http://journals.iucr.org/d/issues/2003/11/00/ba5050/ba5050.pdf>

T.L. Blundell & L.N. Johnson (1976), "Protein Crystallography", Academic Press: London.

Jan Drenth (1994), "Principles of Protein X-ray Crystallography", Springer-Verlag: New York.

D. Sherwood (1976), "Crystals, X-rays and Proteins", Longman: London.
Rupp, B. (2009). Biomolecular Crystallography. Hamden: Garland Science.

Ευγενία Πεχλιβανή, Εργασία Μεταπτυχιακού Μαθήματος 2011