

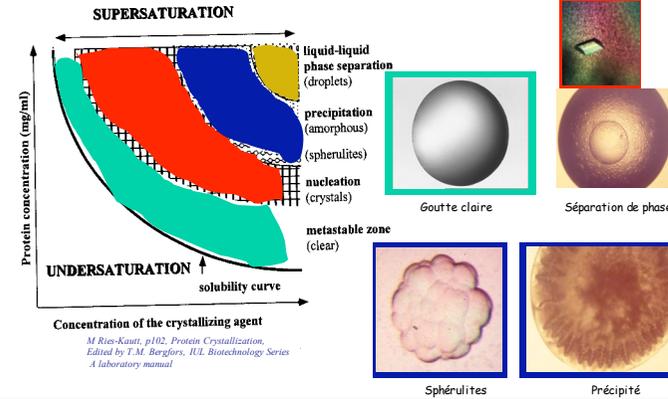
D'où vient l'information structurale et que vaut-elle ?

La cristallisation

L'information cristallographique

- Notions de base sur la diffraction
- Qu'est-ce que la résolution d'une structure ?
- La précision des coordonnées atomiques.
- Fiabilité d'une structure.
- L'extension de l'information structurale à des protéines homologues de structure inconnue.

Objectif : cristal tridimensionnel, 100 μm dans la plus petite dimension (à partir de 15 μm), monocristallin.

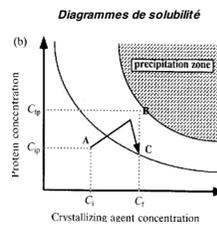


Méthodes de cristallisation

Diffusion de vapeur

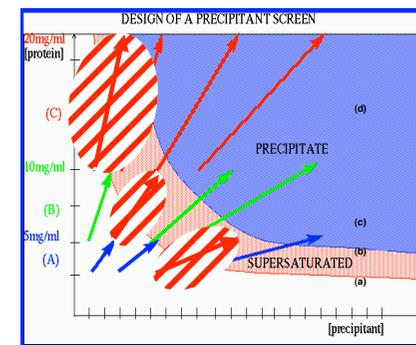
Hanging Drop with Protein

Reservoir with Precipitant



Goutte: typiquement 2 μl protéine + 2 μl de tampon de cristallisation (de 1 à 50 μl) Puits: 0,5 à 1 ml.
Temps d'équilibration: de 24 h (sels) à 10 jours (PEG)
Observation des gouttes et manipulation des cristaux aisées

Cribles matriciels et diagramme de solubilité



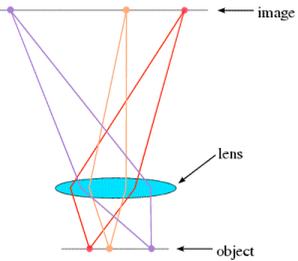
Cribles statistiques

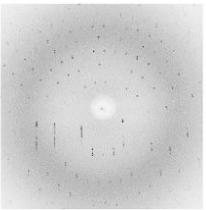
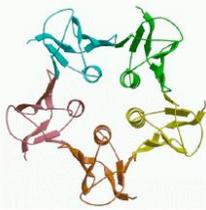



Nombre de cristallisations rapportées pour les différentes conditions du crible de Jancarik & Kim (d'après HamptonResearch)

	1	2	3	4	5	6
A	1 MPD 30% 0.02M CaCl2 NaAcO (4.6) pH 5.3	2 Na Tartrate 0.4M pH 6.9	3 NH4PO4 0.4M pH 4.4	4 AmS 2.0M Tris HCl pH 8.5	5 MPD 30% 0.2M NaCitrate Na Hapes 7.5	6 PEG 4K 30% 0.2M MgCl2 Tris HCl 8.5 pH 8.8
B	7 NaAcO 1.4M Na Caco 6.5	8 2-propanol 30% 0.2M NaCitrate Na Caco 6.5 pH 7.2	9 PEG 4K 30% 0.2 M NH4AcO Na Citrate (5.6) pH 6.7	10 PEG 4K 30% 0.2 M NH4AcO NaAcO (4.6) pH 6.1	11 NH4PO4 1.0M Na Citrate (5.6) pH 5.0	12 2-propanol 30% 0.2M MgCl2 Na Hapes 7.5
C	13 PEG 400 30% 0.2M NaCitrate Tris HCl (8.5) pH 9.3	14 PEG 400 28% 0.2M CaCl2 Na Hapes (7.5) pH 6.9	15 PEG 4K 30% 0.2 M AmS Na Caco (6.5) pH 6.9	16 LiSO4 1.5M NaHapes (7.5) pH 7.9	17 PEG 4K 30% 0.2M LiSO4 Tris HCl (8.5) pH 9.2	18 PEG 8K 20% 0.2M MgAcO2 Na Caco (6.5) pH 6.8
D	19 2-propanol 30% 0.2M NH4AcO Tris HCl (8.5) pH 8.9	20 PEG4K 25% 0.2M AmS NaAcO (4.6) pH 5.1	21 MPD 30% 0.2M MgAcO2 Na Caco (6.5) pH 9.2	22 PEG 4K 30% 0.2M NaAcO Tris HCl (8.5) pH 7.4	23 PEG 400 30% 0.2M MgCl2 Na Hapes (7.5) pH 7.4	24 2-propanol 20% 0.2M CaCl2 NaAcO (4.6) pH 4.9

Les 24 premières conditions



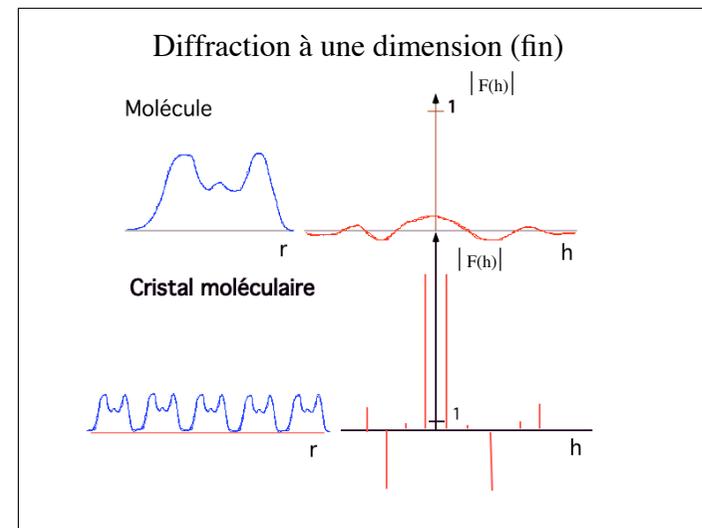
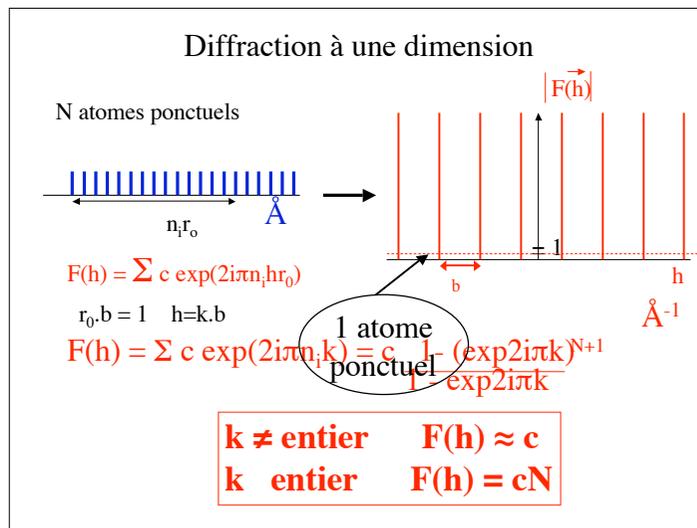
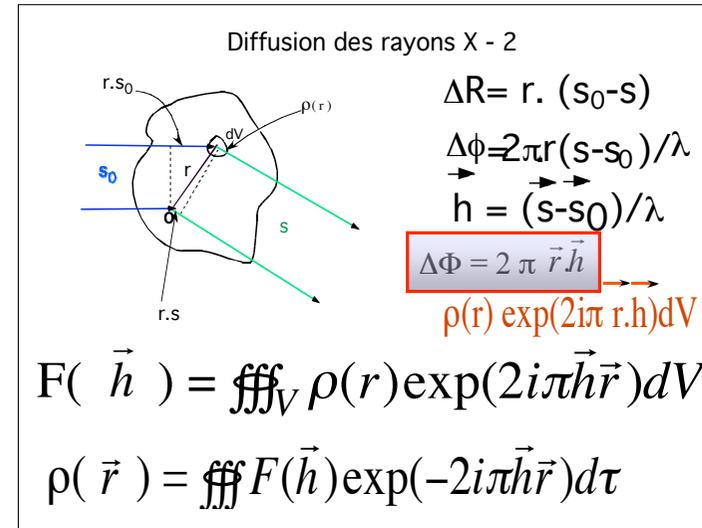
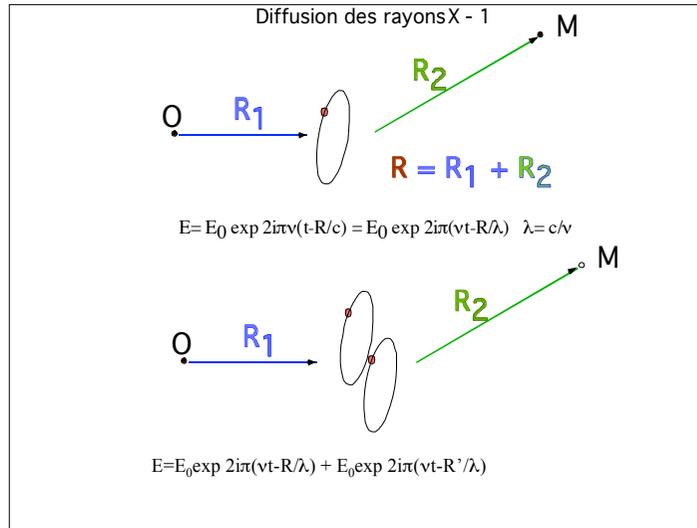
La cristallisation

L'information cristallographique

- Notions de base sur la diffraction
- Qu'est-ce que la résolution d'une structure ?
- La précision des coordonnées atomiques.
- Fiabilité d'une structure.
- L'extension de l'information structurale à des protéines homologues de structure inconnue.

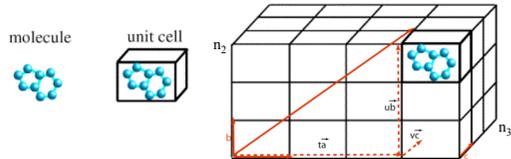
Diffraction des Rayons X

- Diffusion par un objet
- Diffraction par un objet périodique
- Résolution



Diffraction à 3 dimensions

1 dimension : $F(h) = \sum c \exp(2i\pi n_i k) = c \frac{1 - (\exp 2i\pi k)^{N+1}}{1 - \exp 2i\pi k}$
 3 dimension



$$F(\vec{h}) = \sum_{n_1} f(\vec{h}) \exp(2i\pi(\tau a + u b + v c)h) \quad n_1$$

$$F(\vec{h}) = f(\vec{h}) \sum_{l=0}^{n_1} \exp[2i\pi l \vec{a} \cdot \vec{h}] \times \sum_{m=0}^{n_2} \exp[2i\pi m \vec{b} \cdot \vec{h}] \times \sum_{v=0}^{n_3} \exp[2i\pi v \vec{c} \cdot \vec{h}]$$

$$\vec{a} \cdot \vec{h} = h$$

$$\vec{b} \cdot \vec{h} = k$$

$$\vec{c} \cdot \vec{h} = l$$

$$\vec{a} \cdot \vec{h} = h$$

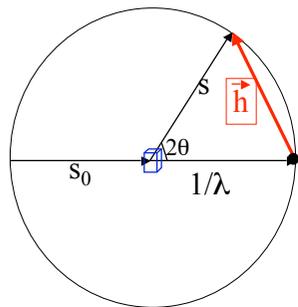
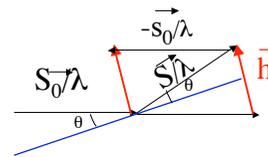
$$\vec{b} \cdot \vec{h} = k \iff \vec{h} = h \vec{a}^* + k \vec{b}^* + l \vec{c}^*$$

$$\vec{c} \cdot \vec{h} = l$$

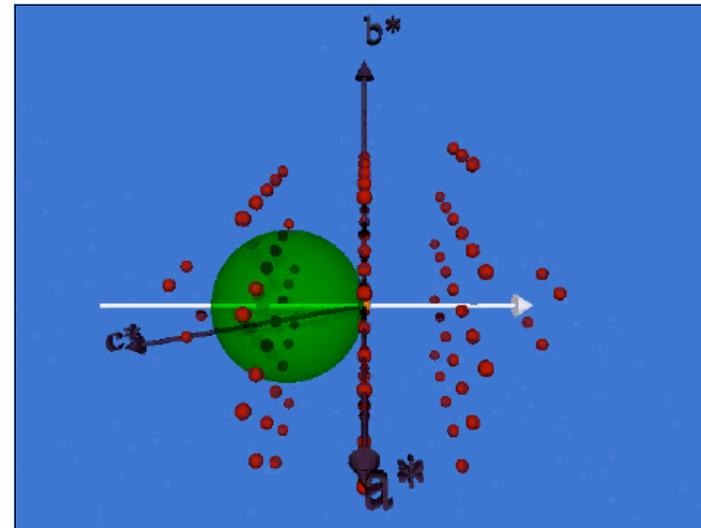
$$\vec{a} \cdot \vec{a}^* = 1 \quad \vec{b} \cdot \vec{a}^* = 0 \quad \vec{c} \cdot \vec{a}^* = 0$$

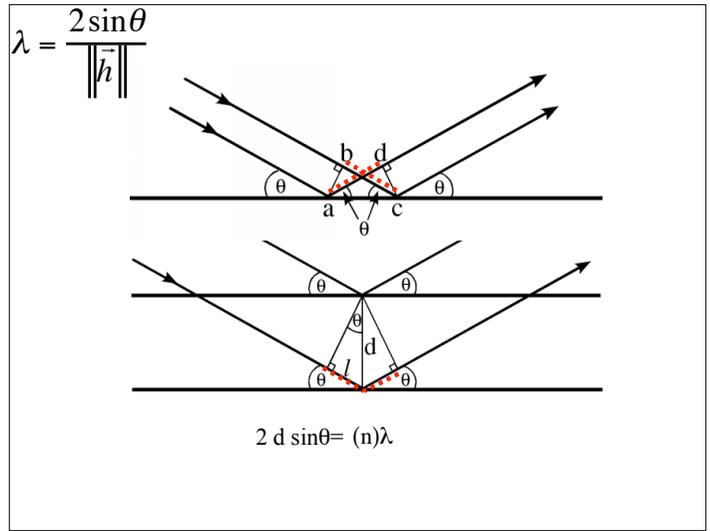
$$\vec{a} \cdot \vec{b}^* = 0 \quad \vec{b} \cdot \vec{b}^* = 1 \dots\dots$$

Diffraction \iff h, k et l entiers



$$\|\vec{h}\| = \frac{2 \sin \theta}{\lambda}$$

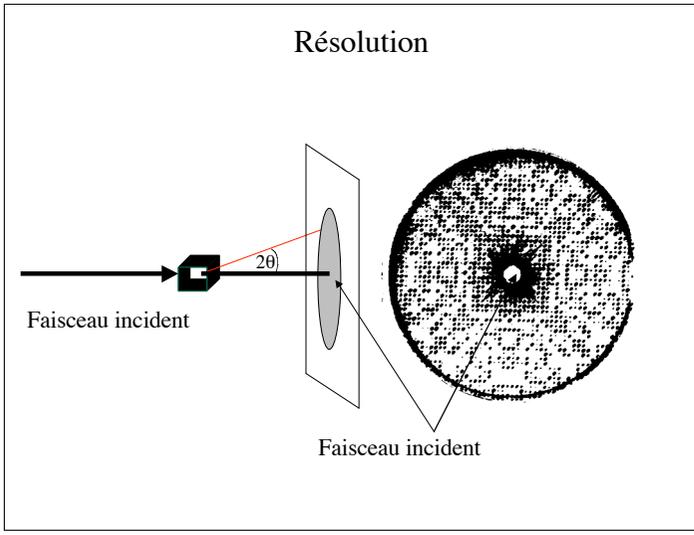
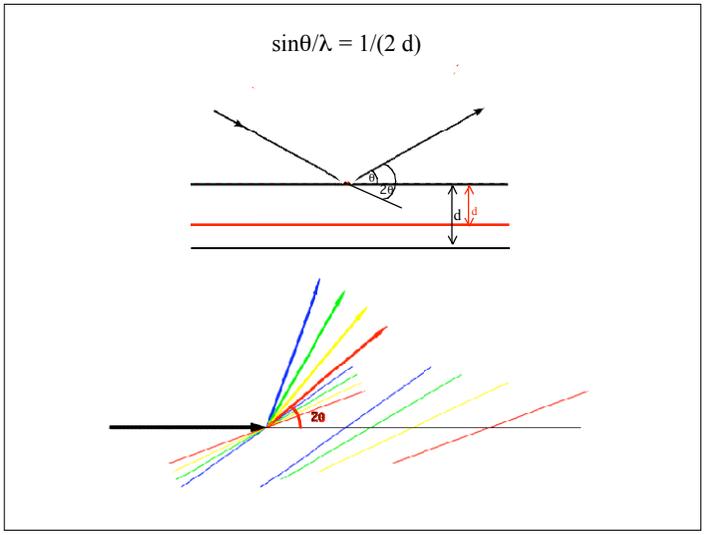




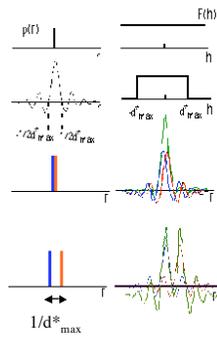
La cristallisation

L'information cristallographique

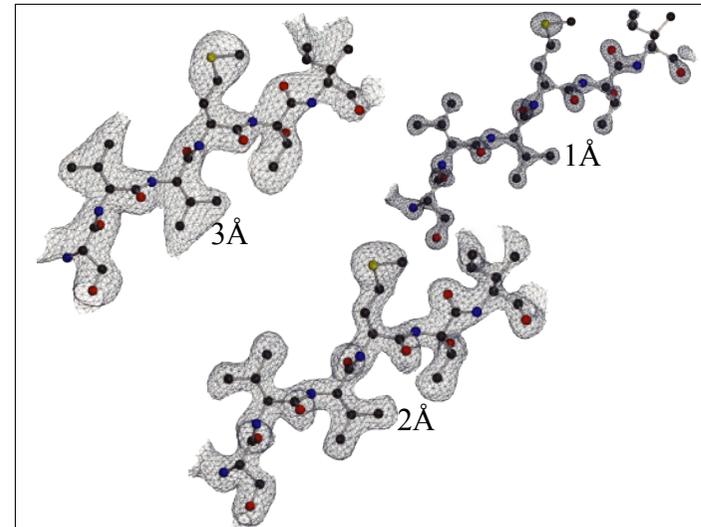
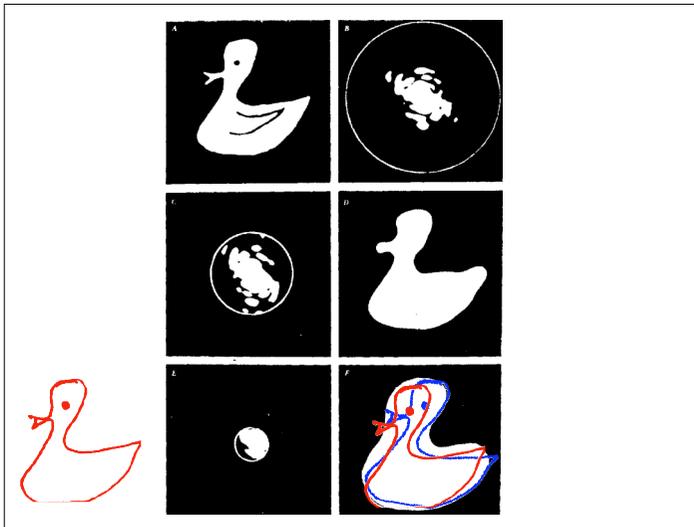
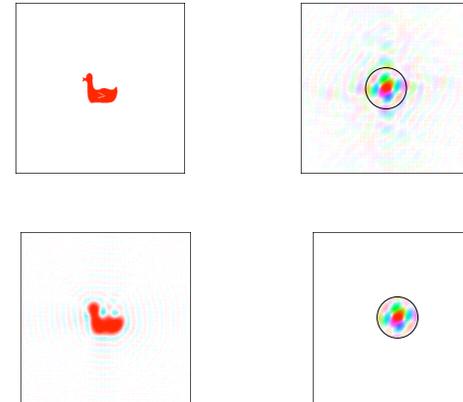
- Notions de base sur la diffraction
- Qu'est-ce que la résolution d'une structure ?
- La précision des coordonnées atomiques.
- Fiabilité d'une structure.
- L'extension de l'information structurale à des protéines homologues de structure inconnue.



Résolution (1 dimension)



Résolution (2 dimensions)



La cristallisation

L'information cristallographique

- Notions de base sur la diffraction
- Qu'est-ce que la résolution d'une structure ?
- La précision des coordonnées atomiques.
- Fiabilité d'une structure.
- L'extension de l'information structurale à des protéines homologues de structure inconnue.

Pour chaque atome :

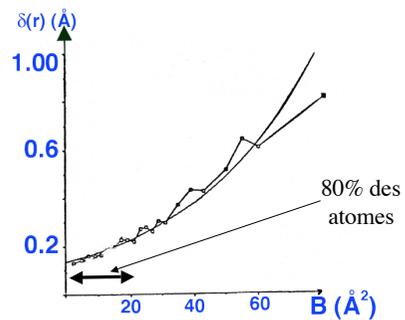
- 3 coordonnées : x, y, z
- 1 facteur d'agitation thermique

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

Amplitude des vibrations de l'atome

Précision des structures de protéines

Résolution	3 Å	1.7 Å
Précision moyenne	0.6 Å	0.2 Å



La cristallisation

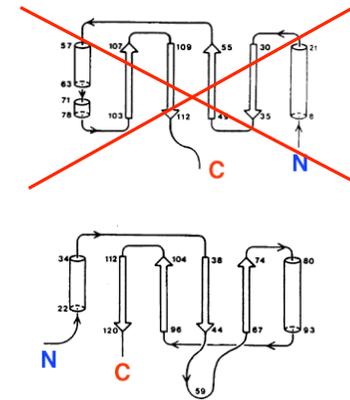
L'information cristallographique

- Notions de base sur la diffraction
- Qu'est-ce que la résolution d'une structure ?
- La précision des coordonnées atomiques.
- Fiabilité d'une structure.
- L'extension de l'information structurale à des protéines homologues de structure inconnue.

Le problème cristallographique est sous déterminé

Resolution	Observations/paramètres (x,y,z, B)
3.5Å	0.5
3.0Å	0.8
2.5Å	1.4
2.0Å	2.8
1.5Å	6.2

La petite sous-unité de la RuBisCO 8-(15 kD +55 kD)
Résolution : 2.5 Å



Fiabilité d'une structure
Facteur d'accord cristallographique

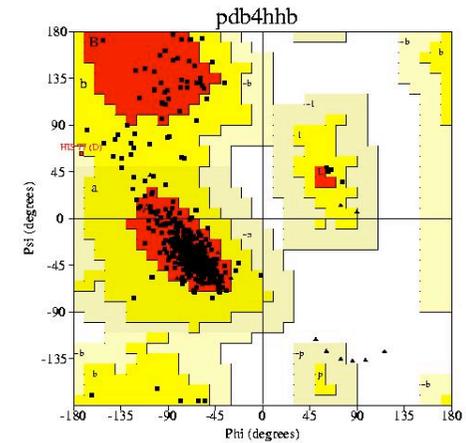
$$\rho(\vec{r}) = \sum_{\text{atomes}} \rho(\vec{r}_i)$$

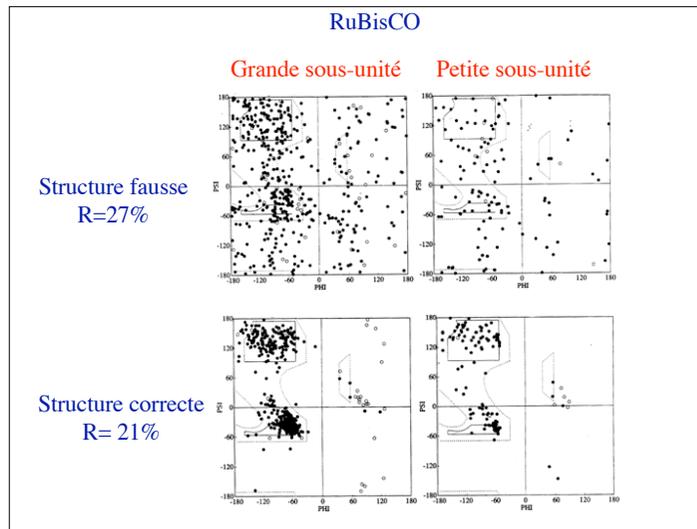
$$F_{\text{calc}}(\vec{h}) = \mathcal{F}\left(\sum_{\text{atomes}} \rho(\vec{r}_i)\right) = \sum_{\text{atomes}} \mathcal{F}(\rho(\vec{r}_i))$$

$$F_{\text{calc}}(\vec{h}) = \sum_{\text{atomes}} f(\vec{h}) \exp 2i\pi\vec{h}\vec{r}_i$$

$$R = \frac{\sum_{\vec{h}} \left| |F_{\vec{h}}^{\text{obs}}| - |F_{\vec{h}}^{\text{calc}}| \right|}{\sum_{\vec{h}} |F_{\vec{h}}^{\text{obs}}|}$$

$$R \approx 0.18 \leftrightarrow 0.22$$



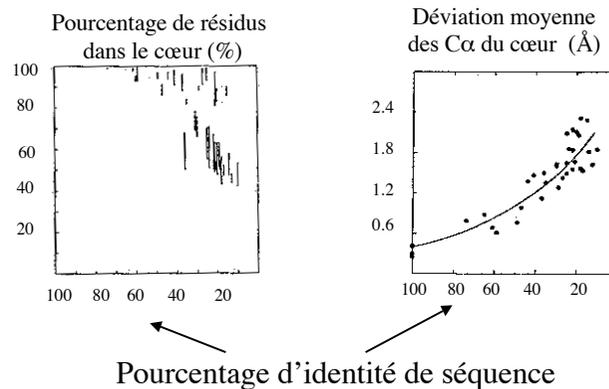


La cristallisation

L'information cristallographique

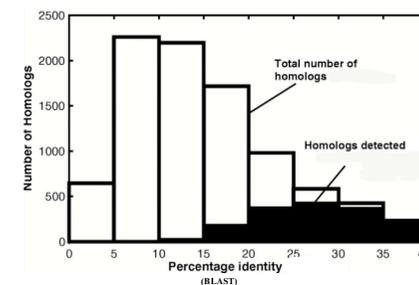
- Notions de base sur la diffraction
- Qu'est-ce que la résolution d'une structure ?
- La précision des coordonnées atomiques.
- Fiabilité d'une structure.
- L'extension de l'information structurale à des protéines homologues de structure inconnue.

Similitude de séquences et ressemblance structurale



Chothia et Lesk (1986) EMBO J., pp 823-6

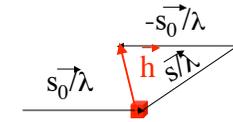
Reconnaissance d'une homologie



S. E. Brenner et al. PNAS Vol 95 pp 6073-6078 (1998)

Comment on détermine la structure d'une protéine

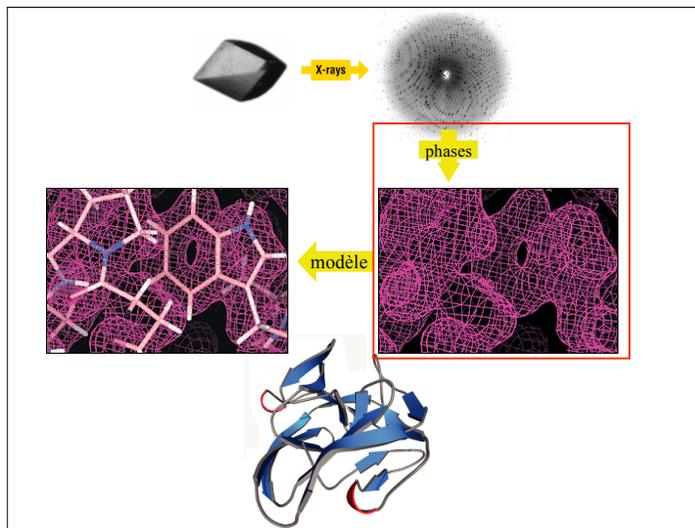
- Remplacement Moléculaire
- Remplacement Isomorphe
- Construction du modèle
- Affinement



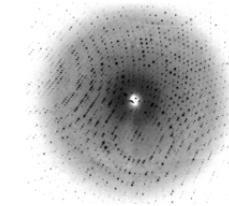
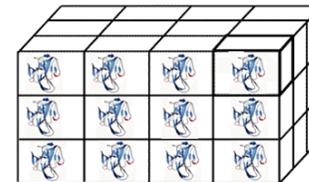
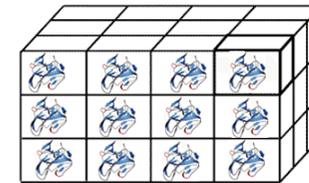
$$\vec{h} = (\vec{s} - \vec{s}_0) / \lambda$$

$$F(\vec{h}) = \iiint_V \rho(r) \exp(2i\pi\vec{h}\vec{r}) dV$$

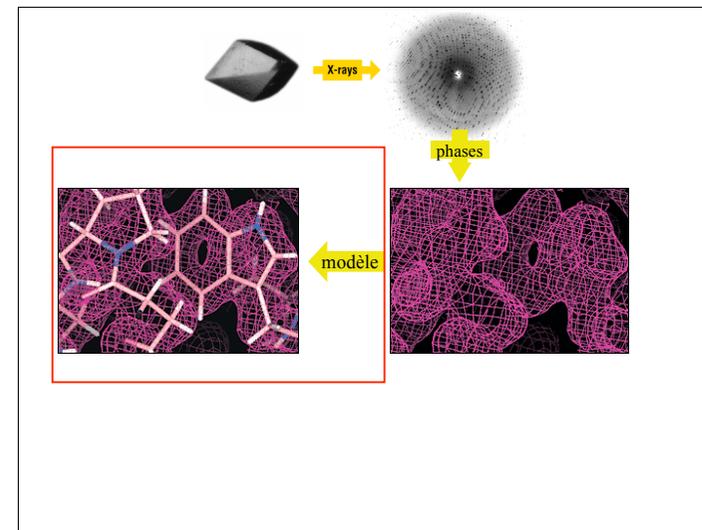
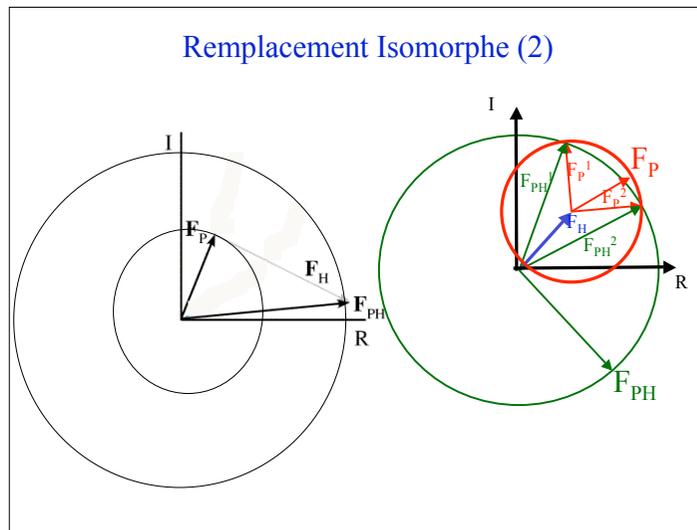
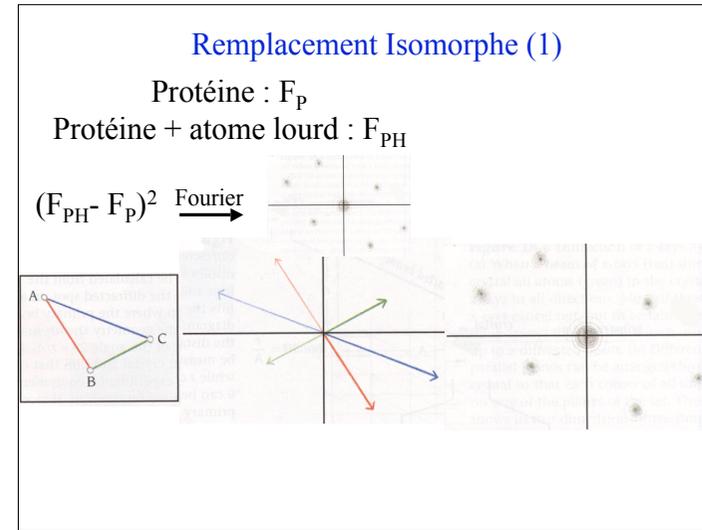
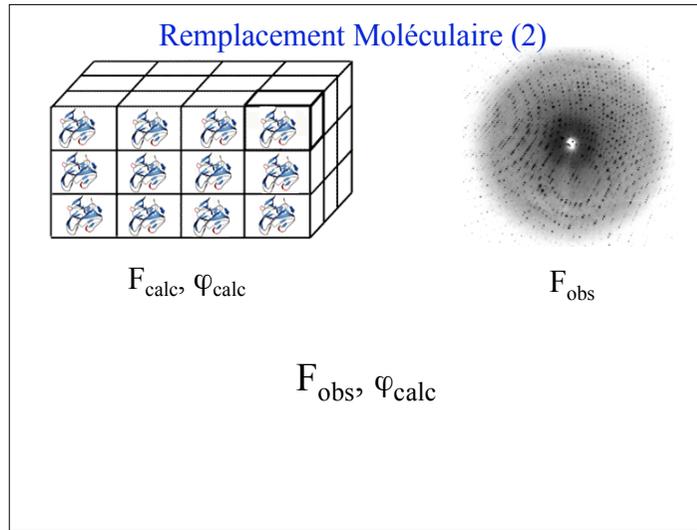
$$\rho(\vec{r}) = \iiint F(\vec{h}) \exp(-2i\pi\vec{h}\vec{r}) d\tau$$



Remplacement Moléculaire (1)



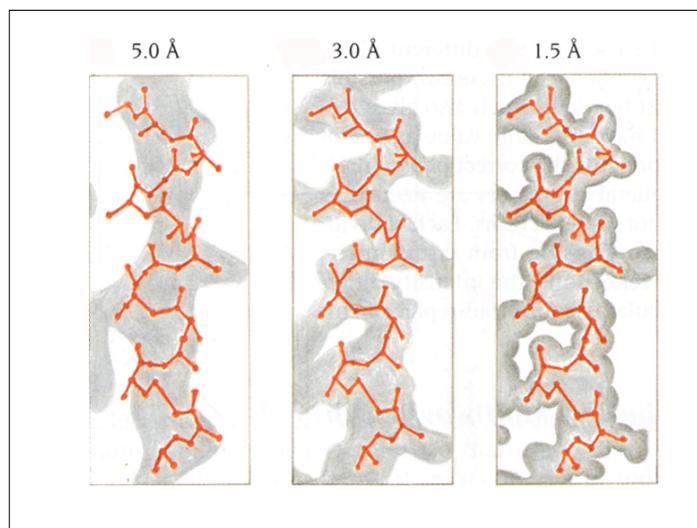
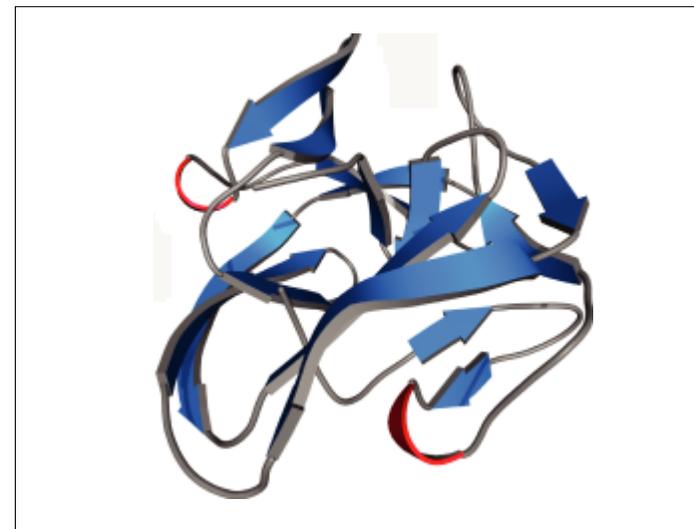
$$\alpha, \beta, \gamma, t_x, t_y, t_z$$



Affinement

$$F_h^{calc}(\vec{r}_i) = \mathcal{F}\left(\sum_{atoms} \rho(\vec{r}_i)\right) = \sum_{atoms} \mathcal{F}(\rho(\vec{r}_i))$$

$$R(\vec{r}_i) = \frac{\sum_h ||F_h^{obs} - |F_h^{calc}(\vec{r}_i)||}{\sum_h |F_h^{obs}|}$$



Ce qu'il faut "absolument" retenir (1)

- L'observation de la densité électronique nécessite de séparer diffusion des rayons X et reconstruction de l'image
- La diffusion des RX par des molécules n'est observable que via l'interférence constructive de la diffusion de nombreuses molécules
- La diffraction s'interprète comme la réflexion par une série de plans dont la distance est d'autant plus petite que l'angle entre rayons incident et diffracté est grand

Ce qu'il faut "absolument" retenir (2)

- La résolution détermine la précision des coordonnées atomiques et la fiabilité du modèle
- Deux critères objectifs permettent de préjuger de la justesse d'un modèle atomique : facteur R et diagramme de Ramachandran
- La structure d'une protéine est semblable à celles des protéines de séquence semblable
- On détecte de façon fiable (faux positifs < 1%) par alignement de séquences des protéines de même structure et qui ont plus que 20% - 25% d'identité de séquence