

# Röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat

---

*TÁMOP-4.1.2.A/1-11/1-2011-0025*

Dr. Bényei Attila, Ph.D. egyetemi docens

Debreceni Egyetem TEK Fizikai Kémiai Tanszék

Debreceni Egyetem OEC Gyógyszerészi Kémiai Tanszék

[benyei.attila@science.unideb.hu](mailto:benyei.attila@science.unideb.hu)

Dr. Harmat Veronika Ph.D. egyetemi adjunktus

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Kémiai Intézet, Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium

MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport

[veronika@chem.elte.hu](mailto:veronika@chem.elte.hu)

<b>Előszó</b>	<b>7</b>
<b>Jelmagyarázat</b>	<b>9</b>
<b>1. Bevezetés, a röntgensugárzás tulajdonságai (Bényei Attila)</b>	<b>10</b>
<i>Irodalom</i>	10
1.1. Az alapkísérlet: olajfolt a víztócsán	12
1.2. A röntgensugárzás mint elektromágneses hullám	13
1.3. A röntgensugárzás különleges tulajdonságai	13
1.4. A röntgensugárzással kapcsolatos biztonsági előírásokat be kell tartanunk	14
1.5. Hullámok kölcsönhatásai, visszaverődés, elhajlás és interferencia	15
1.6. A röntgendiffrakció kiegészíti a spektroszkópiai szerkezet-meghatározási módszereket	16
1.7. Milyen kérdésekre ad választ a röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat?	17
1.8. Mire nem válaszol a röntgendiffrakció?	18
<b>2. A kristályosítás termodinamikája és kinetikája, egykristályok növelése (Bényei Attila)</b>	<b>19</b>
<i>Irodalom</i>	19
2.1. A szilárd anyagok szerkezetét a hosszú távú rendezettség határozza meg	20
2.1.1. Az elemi cella: a legkisebb kristálytani egység, amiből a teljes kristály felépíthető a cella élek mentén való eltolással	20
2.1.2. Az aszimmetrikus egység a szupramolekuláris entitás: A tércsoport szimmetriáját rá alkalmazva belőle az elemi cella felépíthető	21
2.2. A kristályosítás mint elválasztási, tisztítási eljárás	23
2.3. A kristályképződés termodinamikai leírása	23
2.3.1. A fázisdiagram megadja azokat az állapotjelző $(p, c, V, T)$ tartományokat, amelyeknél a különböző fázisok termodinamikailag stabilisak	23
2.3.2. A kétfázisú rendszerek az egyensúlyi görbétől távolabbi pontba is eljuttathatók például túlhűtéssel vagy túlhevítéssel	24
2.4. A folyadék – gőz és a szilárd anyag – oldat fázisegyensúly leírása	25
2.4.1. Fizikai modellel az ideális gázok állapotegyenlete értelmezhető, reális gázokat első közelítésben a van der Waals-egyenlet írja le	25
2.4.2. A gőz-folyadék fázisátmenet van der Waals gázok esetén	26
2.4.3. A nukleációs és a metastabil zónák határai kísérletesen meghatározhatóak	28
2.4.4. Egykristályok előállításához a rendszert kellő ideig a metastabil zónában kell tartani	29
2.5. A kristályosítás kinetikája	29
2.5.1. A gócképződés kinetikája nemlineáris differenciálegyenletekkel írható le	30
2.5.2. A kristályok növekedéséhez mikroszkopikus vagy makroszkopikus keveredésre van szükség	30
2.5.3. A kristályok növekedési sebességét és a kristály jellemző méretét az határozza meg, hogy milyen messze van a rendszer az egyensúlytól	30
2.6. Hasznos tanácsok egykristályok növelésére	31
2.6.1. Az egykristályok a tökéletesen fejlett kristályok	32

2.6.2. Egykristályok előállítására a legegyszerűbb módszer a lassú bepárlás	32
2.6.3. A hőmérséklet csökkentésével általában csökken az oldékonyság	32
2.6.4. Rossz oldószert vagy lecsapószert diffundáltatva az oldatba elérhetjük a metastabil zónát	33
2.7. Jó tanácsok: Mit csináljunk, és mit ne csináljunk egykristály növelésekor?	35
<b>3. Kristályok szerkezete, szimmetriája, tércsoportok (Bényei Attila)</b>	<b>36</b>
<i>Irodalom</i>	36
3.1. A geometriai szimmetria csoportelmélettel axiomatikusan leírható (Bényei Attila és Harmat Veronika)	37
3.2. Az elemi cellában és az aszimmetrikus egységben egy vagy több ismétlődő motívum található (Bényei Attila és Harmat Veronika)	40
3.3. Három dimenziós tér 230 tércsoport szerint tölthető ki maradéktalanul egyforma idomokkal	41
3.4. Az ásványtanból ismert hét kristályrendszer és a 14 Bravais-rács	42
3.5. Kizárólag a (h,k,l) Miller-indexek és az elemi cella paraméterei (a,b,c, $\alpha, \beta, \gamma$ ) határozzák meg a rácssíkok távolságát	45
3.6. A diffrakció geometriai leírása: a Bragg-egyenlet, reciprok tér és Ewald-gömb	47
3.7. A molekulák elhelyezkedése a rácsban: a szoros térkitöltés kényszere. A $18 \text{ \AA}^3$ szabály és a segítségével nyerhető információ	52
3.8. Matematikai kiegészítés (Harmat Veronika).	53
<b>4. A röntgendiffrakciós kísérlet, adatgyűjtési technikák és stratégiák (Bényei Attila)</b>	<b>57</b>
<i>Irodalom</i>	57
4.1. Az első lépés, a probléma felismerése, az anyag előállítása és egykristály növelése	57
4.2. A megfelelő kristály kiválasztása, rögzítése, centírozása	58
4.3. A szerkezet-megoldás kritikus pontja az elemi cella és a helyes tércsoport meghatározása; szisztematikus hiányok	61
4.4. A diffraktométer főbb részei (Harmat Veronika)	66
4.5. Adatgyűjtés, pontdetektor vs. térdetektor	69
4.6. Az alacsony hőmérséklet előnyei és hátrányai, a folyékony nitrogénnel kapcsolatos néhány balesetvédelmi szempont	71
<b>5. A krisztallográfiai fázisprobléma, a direkt módszerek alapjai, szerkezet-megoldás kis molekulák esetén (Harmat Veronika, Bényei Attila)</b>	<b>72</b>
<i>Irodalom</i>	72
5.1. Matematika: a diffrakciós kép, mint az elektronsűrűség Fourier transzformáltja (Harmat Veronika)	74
5.2. Intermezzo a Fourier transzformációról: a lényeg megragadásának eszköze	79
5.3. A felbontás és a fázisprobléma, szemléletes kép Fourier Kacsával és Fourier Macskával	82
5.4. A fázisprobléma megoldásának lehetőségei, nehézatom módszer	84
5.5. A diffrakciós mintázat szimmetriájának és a szisztematikus hiányoknak a származtatása a kristályszimmetriából (Harmat Veronika)	85
5.6. A direkt módszerek: gyors és hatékony eljárás a fázisprobléma megoldására kis molekulák esetén	91

5.7. Alternatív módszerek, charge flipping	94
<b>6. Szerkezetek finomítása, rendezetlenség kezelése (Bényei Attila)</b>	<b>95</b>
<i>Irodalom</i>	95
6.1. A legkisebb négyzetek módszere	96
6.2. A diffrakciós adatok finomítása: illesztés több száz dimenzióban	98
6.3. Nem idealizált kristályok diffrakciós képe	99
6.3.1. A rácsban fellépő makroszkopikus domének hatása	100
6.3.2. A rács torzulása	102
6.3.3. A molekulaserkezet torzulása	104
6.4. Kiralitás és tércsoportok	105
6.4.1. Tiszta királis anyagok számára lehetséges és enantiomorf tércsoportok összefoglaló neve: királis tércsoport	106
6.4.2. Enantiomerek 1:1 mólarányú elegye: racemátok	106
6.4.3. Enantiomerek tetszőleges elegye, ikerkristályok	107
6.4.4. Az abszolút konfiguráció meghatározásának független és elvileg mindig alkalmazható módszere az egykristály röntgendiffrakció	107
<b>7. Krisztallográfiai eredmények validálása és közlésük, a CIF fájl (Bényei Attila)</b>	<b>109</b>
<i>Irodalom</i>	109
7.1. A szerkezet-meghatározás eredménye: rács- és molekulaserkezet	110
7.2. Az adatok uniformizálása és platformok közötti átvihetősége kiemelt jelentőségű	110
7.3. A CIF szótár példa lehet más területeken is (Powder CIF, mmCIF, sasCIF)	114
7.4. A krisztallográfiai eredmények validálása	115
7.5. Krisztallográfiai eredmények közlése – kis molekulák esete	117
<b>8. A röntgen és neutron pordiffrakció mint ujjlenyomat módszer (Bényei Attila)</b>	<b>118</b>
<i>Irodalom</i>	118
8.1. A pordiffrakciós felvétel a rács ujjlenyomata	118
8.2. A polimorfia jelensége	123
8.3. A neutron diffrakcióról	124
<b>9. Számítógépes programok, WINGX, PLATON, ORTEP, MERCURY, SHELX (Bényei Attila)</b>	<b>125</b>
<i>Irodalom</i>	125
9.1. All in one ingyen, a WINGX programcsomag	126
9.2. Kimerítő krisztallográfiai számítások a PLATON programmal	128
9.3. A megjelenítés elsődleges fontossága, az ORTEP és a MERCURY	129
9.4. A SHELX, az egyik legtöbbet hivatkozott program	131
<b>10. Cambridge Structural Database (CSD) használata (Bényei Attila)</b>	<b>132</b>
<i>Irodalom</i>	132

10.1. A CSD történetéről	133
10.2. A CSD a szupramolekuláris kémia kincses ládája	134
10.3. A CSD felépítése	135
10.4. A CSD adatbázis segítségével megoldandó feladat, számolási gyakorlat	136
<b>11. Fehérjék röntgendiffrakciós vizsgálata, fehérjék kristályosítása (Harmat Veronika)</b>	<b>136</b>
<i>Irodalom</i>	136
11.1 Fehérjék kristályosítása, történeti áttekintés: az első hemoglobin kristályoktól a vírus és riboszóma kristályokig	137
11.2. Hogyan növeljük fehérjénk kristályosodási hajlamát? Tisztítás, komplexek, új konstrukciók	139
11.3. A kristályosítási fázisdiagram fehérjéknél, kristályosítási módszerek és stratégiák	140
11.4. Előzetes szűrés: minél több lehetőség kipróbálása gazdaságosan	144
11.5. Mi van a cseppben? A kísérletek értékelése	146
11.6. A kristályosítási körülmények optimalizálása	148
<b>12. A fázisprobléma megoldása fehérjék esetén, MIR, MR, MAD alapjai (Harmat Veronika)</b>	<b>150</b>
<i>Irodalom</i>	150
12.1 Fázisprobléma megoldás – a fehérjeszerkezetből és méretből következő sajátosságok	151
12.2. A Patterson-függvény	151
12.3. Izomorf helyettesítés	154
12.3.1. A többszörös izomorf helyettesítés lépései	156
12.3.2. Differencia elektronsűrűségi térképek	162
12.3.3. A kezdeti elektronsűrűségi térkép javítása: sűrűségmódosító módszerek	163
12.4. Anomális szórás módszere	166
12.5. Molekuláris helyettesítés	170
<b>13. Fehérjék szerkezeti elemei, NMR, SAXS módszerek (Harmat Veronika)</b>	<b>175</b>
<i>Irodalom</i>	175
13.1 Fehérjék felépítése, a szerkezet szerveződési szintjei	176
13.2. A fehérjeszerkezet vizsgálata SAXS módszerekkel	178
13.3. Fehérjekristallográfia: az első elektronsűrűségi térképtől a szerkezetig	181
13.3.1. Modellépítés	182
13.3.2. Szerkezetfinomítás	185
13.4. Fehérje-NMR alkalmazások	191
<b>14. A PDB adatbázis. Grafikus programok használata (Harmat Veronika)</b>	<b>193</b>
<i>Irodalom</i>	193
14.1. A fehérjeszerkezet validálása	194
14.2. A PDB adatbázis, PDB formátum	200

14.3. A fehérjeszerkezet grafikus megjelenítése	203
<b>15. Egykristály röntgendiffrakció a gyakorlatban: egy probléma megoldása részletesen (Bényei Attila, Harmat Veronika)</b>	<b>205</b>
<i>Irodalom</i>	205
15.1. <i>Kismolekulás szerkezet megoldása (Bényei Attila)</i>	206
15.1.1. Az első lépés a megoldandó szerkezeti probléma megfogalmazása és a szükséges eszközök biztosítása	206
15.1.2. A tiszta anyag előállítása és egykristály növelése az első buktató	207
15.1.3. Az első röntgendiffrakciós kísérlet: az elemi cella meghatározása, majd adatgyűjtés 4 napig	208
15.1.4. A szerkezet megoldása megadja a helyes összetételt, a hidrogén atomok is láthatóak	210
15.1.5. A CIF fájl elkészítése után validálható a szerkezet-meghatározás	213
15.1.6. A szerkezet értelmezése, ábrák és videó készítése, majd publikálás	215
15.2. <i>Fehérjeszerkezet megoldása (Harmat Veronika)</i>	217
15.2.1. Lizozim kristályosítása	217
15.2.2. Adatgyűjtés, adatredukció	218
15.2.3. A fázisprobléma megoldása molekuláris helyettesítéssel	220
15.2.4. Modellépítés, szerkezetfinomítás	221
15.2.5. Validálás	224
<b>16. Animációk, videók forgatókönyve</b>	<b>224</b>
16.1. <i>Videók</i>	224
16.2. <i>Interaktív animációk</i>	227
16.3. <i>Nem interaktív animációk</i>	228
<b>17. Szakkifejezések jegyzéke</b>	<b>229</b>

## Előszó

Az 1980-as évek végén, Magyarországon egykristály röntgendiffrakciós mérések elvégzésére az MTA Központi Kémiai Kutatóintézetében (ma MTA Természettudományi Kutatóközpont Szerves Kémiai Intézet) és a Központi Fizikai Kutatóintézetben (ma MTA Wigner Fizikai Kutatóközpont Szilárdtestfizikai és Optikai Intézet) valamint a Chinoin Gyógyszergyárban volt lehetőség. 2012-re szerencsére jelentősen megváltozott a helyzet, megnőtt a készülékek száma és így 1996-tól a Debreceni Egyetemen, 1993-tól az ELTE-n, 2011-től a BME-n illetve 2008-tól az Egis Gyógyszergyárban is végeznek egykristály röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározást. A készülékek közül öt modern térdetektoros készülék: három Rigaku gyártmányú image plate detektoros és kettő Agilent (volt Oxford Diffraction) gyártmányú CCD detektoros diffraktométer. Ha figyelembe vesszük, hogy a nagyobb gyógyszergyárak mindegyikében működik pordiffraktométer - főleg a polimorfiával kapcsolatos kutatások segítésére – valamint hogy PhD hallgatók és postdoc kutatók külföldi látogatásaik során a kémiától a proteomikáig számos területen diffrakciós eredmények felhasználóivá váltak és válnak, jelentősnek mondható az igény a röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat egyetemi szintű oktatására.

A TÁMOP-4.1.2.A/1-11/1-2011-0025 jelű „*Interdiszciplináris és komplex megközelítésű digitális tananyagfejlesztés a természettudományi képzési terület mesterszakjaihoz*” pályázat lehetővé tette, hogy egy új, elektronikusan széles körben elérhető jegyzetet állítsunk össze vegyész MSc. szakos hallgatók és a téma által érdeklődő oktatók és kutatók számára. Természetesen könyv alakban és az interneten számos kitűnő összeállítás elérhető a diffrakció és krisztallográfia témában is. Célunk az volt, hogy elsősorban az ELTE és a Debreceni Egyetem hallgatói számára olyan anyagot állítsunk össze, amelyet a KV2N9145 (ELTE, vegyész MSc. Szerkezetkutatás szakirányán kötelező előadás) és TKME0423 (DE, Röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat választható) tárgyak teljesítésénél jól tudnak hasznosítani. Ezen kurzusok célja az MSc. hallgatóknak az alapképzésen túlmenő elméleti és gyakorlati információkat adni a diffrakciós módszerekről, különös tekintettel az egykristály röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározásról. A tematika része néhány röntgendiffrakciós program megismerése, grafikák és mozgókép készítése, alapvető számítások elvégzése. Az egyetemi kurzusokon az elsajátított tananyag számonkérése kollokviumon történik, de lehetőséget biztosítunk a hallgatók számára projekt munkában bekapcsolódni röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározásokba. Az egyes fejezetekhez megadott tesztkérdések rövid ellenőrzést tesznek lehetővé.

Napjainkban az internet térhódításával az egyetemi oktatás lényeges átstrukturálását kell elérni mind tartalmi, mind formai szempontból. A formát a Pályázat által kötelező Docbook formátum adja, ami a tartalomszolgáltatást teszi előtérbe. A tartalmat a mai hallgatók számára is jól érthetővé és hasznosíthatóvá kívánjuk tenni oly módon is, hogy az alfejezetek címét a konvencionálistól eltérően rövid állítások vagy kérdések formájában fogalmazzuk meg. A megértést segíti a jelentős ábra anyag valamint számos animáció, néhány interaktív eszköz és videofelvétel is. Ezeket részben mi készítettük, részben az internetről oktatási célra szabadon használható anyagok illetve az interaktív programok szerzőitől engedélyt kaptunk a felhasználásukra. A jegyzet írása során támaszkodtunk az interneten elérhető forrásokra. A linkek a jegyzet írásakor működtek, a TÁMOP pályázat fenntartási szakaszában rendszeresen ellenőrizzük őket.

Az [IUCr](http://www.iucr.org/) (Nemzetközi Krisztallográfiai Unió, International Union of Crystallography, <http://www.iucr.org/> ) a krisztallográfia és a diffrakció népszerűsítésére is törekszik. 2012 júliusában Marokkó javaslatára a 2014-

es évet az ENSZ a Krisztallográfia Nemzetközi Évének (IYCR2014) nyilvánította (<http://www.iycr2014.org/>). Munkánkkal ezekhez a tudományt népszerűsítő erőfeszítésekhez is megpróbálunk hozzájárulni. Az IYCR2014 logója, amit számos az eseményhez kapcsolódó rendezvény és közlemény tartalmaz:



1. ábra. Az IYCr2014 logója

A wikipedia vonatkozó oldalaira is hivatkozunk, de meg kell jegyezni, hogy a szabadon szerkeszthetőség eredményeként a természettudománnyal foglalkozó wikipedia oldalak is tartalmaznak pontatlanságokat. A tudományterület nagy alakjainak életrajza számos tanulságot szolgáltat a mai kutatóknak is.

Magyarországon diffrakciós vizsgálatokkal néhány kutatóintézetben és egyetemen foglalkoznak a méréseket részben nemzetközi együttműködésben végezve:

MTA Wigner Fizikai Kutatóközpont (röntgen- és neutrodiffrakció, röntgen holográfia)

MTA Természettudományi Kutatóközpont (egykristály- és pordiffrakció, szupramolekuláris kémia, *ab initio* szerkezetmeghatározás, fehérjekrisztallográfia)

MTA ATOMKI (pordiffrakció)

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont (fehérjék tisztítása és kristályosítása)

MTA SZBK Enzimológiai Intézet (fehérjekrisztallográfia)

ELTE (fehérjekrisztallográfia, EXAFS, pordiffrakció)

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem (pordiffrakció, elektron- és neutrodiffrakció, fehérjekrisztallográfia)

Debreceni Egyetem (egykristály röntgendiffrakció, kis molekulák és fehérjék)

Szegedi Tudományegyetem (SAXS, pordiffrakció)

Az elektronikus tansegédlet összeállításánál figyelembe vettük oktatási tapasztalatainkat és azt az igényt, hogy a közölt információk a témával behatóan foglalkozó elismert kutatókon kívül a matematikai alapokat nem teljesen ismerő felhasználók és egyetemi hallgatók számára is jól hasznosíthatóak legyenek. A tananyagban kutatási tapasztalataink összefoglalását megpróbáljuk a napi munkában is kézzelfogható és jól hasznosítható, modern formában átadni. Ebben is támaszkodunk a témában korábban megjelent egyetemi jegyzetekre és könyvekre.<sup>1,2,3,4</sup>

Köszönet Bodor Andrea, Oszlányi Gábor és Mezey Rita tanácsaiért és Dr. Böcskei Zsolt lektor munkájáért.

Budapest, Debrecen, 2012. december

<sup>1</sup> Kálmán Alajos: Kémiai Krisztallográfia I, A röntgenkrisztallográfia alapjai, ELTE, Budapest, 1981

<sup>2</sup> Böcskei Zsolt: Röntgendiffrakció (egyetemi jegyzet) 1998.

<sup>3</sup> Gubicza Jenő és Zsoldos Lehel: Röntgendiffrakció, <http://szft.elte.hu/~gubicza/szilfizjegyzet/rontgendiffrakcio.pdf>

<sup>4</sup> J.M. Schultz: Az anyagvizsgálat diffrakciós módszerei, Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1987



## Jelmagyarázat

A Docbook formátum miatt jelentősen csökkentenünk kellett a jelöléseket. A jelölésekhez az MS Word szövegszerkesztő egyenletszerkesztőjét használtuk. A krisztallográfiai és bonyolultabb matematikai jelöléseknél grafikusán, kép formátumban rögzítettük az egyenleteket. Az egyenletekben és a szövegben a vektorokat vastag betű, a skalárokat dőlt betű jelöli.

Bejelentkezés a tesztkérdésekhez a Debreceni Egyetem Moodle oldalán:

Felhasználó: hallgato

Jelszó: Hallgato\_12

# 1. Bevezetés, a röntgensugárzás tulajdonságai (Bényei Attila)

## Irodalom

Amit a kristályokról középiskolában is tudni kell! Az IUCR oktatási anyaga, cseh, arab, holland, spanyol, lengyel nyelven is

- <http://www.iucr.org/education/pamphlets/20>

Amit a diffrakcióról egy vegyésznek (gyógyszerész, biológus, vegyészmérnök) tudni kell. Alapvető fizikai-kémiai összefüggések, a röntgendiffrakciós módszer alapkollégium szintű leírása:

- P.W. Atkins, Fizikai Kémia, II., 21. fejezet, Diffrakciós Módszerek, Tankönyvkiadó Budapest, 1992.

Érdemes megnézni Faigel Gyula előadását a Mindentudás Egyetemén (2005), Mire jó a röntgenvonalzó

<http://mindentudas.hu/elodasok-cikkek/item/97-mire-j%C3%B3-a-r%C3%B6ntgenvonalz%C3%B3?-az-atomi-szerkezet-meghat%C3%A1roz%C3%A1sar%C3%B6ntgensug%C3%A1rz%C3%A1ssal.html>

Általános bevezetés a röntgendiffrakció elméletébe, röntgensugárzás keletkezése, kristályok szimmetriája, egykristály és pordiffrakció és sok más hasznos információ, az IUCR oktatási segédlete

- <http://www.iucr.org/education/pamphlets/2>

Modern szemléletű tömör leírás a röntgendiffrakciós módszerekről:

- Harmat Veronika: Röntgendiffrakció *in* Kémia, Főszerkesztő: Náray-Szabó Gábor, Akadémiai Kiadó, Budapest, 2006, 640-657.

A krisztallográfia leírása minimális matematikával, a mikroszkóp analógiája, az IUCR oktatási segédlete

- <http://www.iucr.org/education/pamphlets/15>

Az egykristály röntgendiffrakció előnyös és hátrányos tulajdonságai, tanulságos esetek

- P.G. Jones: Crystal growing, Chemistry in Britain, 17 (1981) 222-225.
- [http://www.iucr.org/\\_data/assets/pdf\\_file/0013/3055/crystal\\_growing\\_pgi.pdf](http://www.iucr.org/_data/assets/pdf_file/0013/3055/crystal_growing_pgi.pdf)

A fehérjekrisztallográfia egy modern tankönyve

- Bernhard Rupp Biomolecular Crystallography. Principles, Practice and Application to Structural Biology, Garland Science, Taylor and Francis, New York, 2010.

A röntgendiffrakció első 50 évéről szóló visszaemlékezések

- <http://www.iucr.org/publ/50yearsofxyraydiffraction>

Az egykristály röntgendiffrakció az egyik legnagyobb hatékonyságú szerkezetvizsgáló módszer és nagyban hozzájárul a kémia és a szerkezeti biológia napjainkban tapasztalható dinamikus fejlődéséhez. A kémia alapvetően egy összehasonlításra alapuló tudomány: összehasonlítjuk a különböző funkciós csoportok reaktivitását az adott körülmények között és az ebből levont következtetések alapján értelmezzük a tervezett reakció termékeloszlását is. A spektroszkópai szerkezet-meghatározási módszerek túlnyomó többsége is összehasonlításra alapul: az NMR, IR, UV-VIS stb. spektrumok jellemző paramétereit (kémiai eltolódás, felhasadás, csatolás, abszorpciós sáv helye stb.) összevetjük a korábbi tapasztalataink alapján megismert szokásos értékekkel valamint a megtanult kivételekkel, azonosítjuk a szerkezeti részeket és egyéb információk felidézésével (kiindulási anyag, reaktánsok, reaktivitás az adott körülmények között) javaslatot teszünk a szerkezetre.

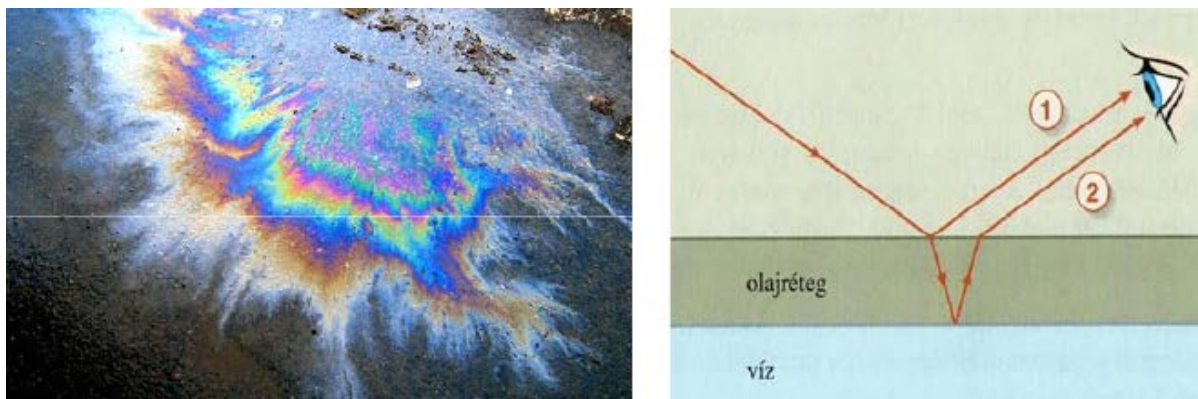
Az egykristály röntgendiffrakció a fentiekkel összehasonlításban abszolút módszer, mert nem igényel lényegi kémiai információt a vizsgált rendszerről. Kis molekulák esetén sok esetben még az összetétel ismerete sem szükséges a teljes szerkezet sikeres meghatározásához. Fehérjék esetén sem létszükséglet (elvben) az aminosav-sorrend ismerete, például esetenként röntgendiffrakcióval ellenőrizni lehet, hogy a génben kódolt aminosav sorrend utólagos érési és egyéb átalakulások során esetleg hogyan módosult az aktív fehérjében (poszt-transzlációs módosítások, a fehérjelánc részleges hidrolízise stb.). 'Mindössze' a vizsgálandó anyagból megfelelő minőségű egykristályt kell növesztetni (2. fejezet). Ez néhány esetben, például makromolekulák vizsgálatánál elég nehezen teljesíthető feltétel (11.1. fejezet), de ha már van egykristályunk, akkor a diffrakciós képből számítások segítségével meghatározható az elektronsűrűség eloszlása az elemi cellában. Ezzel mind a rács, mind a molekula teljes szerkezete a szilárd fázisban értelmezhető, beleértve nem csak a molekulán belüli, hanem az intermolekuláris kölcsönhatásokat is.

A röntgendiffrakció ugyanakkor egy mindent vagy semmit módszer. A spektroszkópai módszerek nagyon értékes támpontot adnak akkor is, ha csak egy-egy molekularészletre jellemző információt tudunk azonosítani (IR sáv helye, NMR kémiai eltolódás és/vagy csatolási állandó). Ezzel szemben, ha sikerül is egykristályt növelni és megtörténik a diffrakciós adatgyűjtés, de valamilyen ok miatt (pl. elemi cella vagy szimmetria nem pontos azonosítása) nem tudjuk megoldani a fázisproblémát a drága röntgendiffrakciós mérésből leszűrhető következtetés nulla lehet. Esetleg csak a molekula közelítő méretét, vagyis a benne lévő atomok számát tudjuk megbecsülni a  $18 \text{ \AA}^3$  szabály segítségével (3.7. fejezet). Sikeres szerkezet-megoldás esetén a számítási probléma legalább tízszeres túlhatározottsága miatt (ami kis molekuláknál alapkövetelmény) a röntgendiffrakciós szerkezettel nem állhat ellentétben spektroszkópai adat. Természetesen előfordulhat, hogy a mért kristály nem reprezentatív a teljes mintára nézve (pl. több komponensű rendszerből melyik anyag vált ki), illetve figyelembe kell venni az oldószer és a szilárd fázis eltérő hatását a szerkezetre (a konformációra; de akár a tautomer egyensúly is eltolódhat). Ez utóbbi kis molekuláknál esetenként nehezen megítélhető, de fehérjék esetén, mivel a molekulák közötti, a kristályt összetartó kölcsönhatások lényegesen gyengébbek, mint a vizsgálandó molekulán belüli intramolekuláris kölcsönhatások, a röntgendiffrakciós módszerrel meghatározott szerkezet általában jó támpontot ad a fehérje működésének megértéséhez. Megjegyezzük, hogy az oldatban mozgékony ('dinamikus') régiók konformációs viszonyaira röntgendiffrakcióval csak közvetett, és sokszor félrevezető információt kapunk, mivel a kapott térszerkezet a kristályban stabilizált konformációjú molekulák átlagos atomi pozícióit mutatja, a mozgékonyaságra a B-faktorokból lehet következtetni. Az oldatbeli mozgásokról NMR

módszerek segítségével lehet nemcsak szerkezeti (pl. konformer egyensúly), de dinamikai (konformációs mozgások időskálája) információt is kapni, igaz, a vizsgálható molekuláknak méretkorlátja van. Mint mindig, az igazság most is a két véglet között van: a merev és az adott körülmények között dinamikus szerkezeti részek összjátékának megértése jelenti a fehérje működésének leírását.

## 1.1. Az alapkísérlet: olajfolt a víztócsán

Ezt a jelenséget már mindenki tapasztalta. Az olajfolt a vízen elszíneződést eredményez (1.1.1. ábra). Az olajfolt felületéről és a vízről visszavert fénysugarak útkülönbsége az olajréteg vastagságától és a beesési szögtől függ. Az olajrétegről visszavert 1-es fénysugár mivel egy kisebb törésmutatójú (levegő) és egy nagyobb törésmutatójú (olaj) közeg határáról verődött vissza  $180^\circ$ -os fázisváltást szenved, ami  $\lambda/2$  útkülönbségnek felel meg, ahol  $\lambda$  a fény hullámhossza az olajrétegben. Feltételezzük, hogy az olaj törésmutatója nagyobb, mint a vízé (ami a gyakorlatban fennáll mivel általában  $n_{\text{olaj}}=1.4$ , míg  $n_{\text{víz}}=1.3$ ), ezért a 2-es fénysugár fázisa nem változik a vízről történő visszaverődéskor. Ha a réteg vastagsága közel  $\lambda/2$ , akkor a 2-es és 1-es fénysugár közötti útkülönbség  $\lambda$  (feltételezve, hogy az olajrétegben a fény a felületre majdnem merőlegesen halad). Tehát az 1 és 2 sugár közötti teljes fáziskülönbség  $\pi$  (vagyis félhullámhossz), aminek eredményeképpen az adott  $\lambda$  hullámhosszú sugarak kioltják egymást, így a visszavert nyalámban ez a szín nem jelenik meg, hanem a komplementer színt látjuk. Ahol változik a rétegvastagsága vagy a beesési szög, más hullámhosszú fény kerül kioltásra a fehér fényből és ezért látjuk a színes foltokat! A jelenség magyarázatához felhasználtuk a fény hullámtermészetét, a fénysugarak visszaverődését és interferenciáját. A kísérlet lehetővé teszi, hogy kiszámoljuk az olajréteg vastagságát és így közvetlen adatot kapjunk a molekulák méretéről. Részletesebb magyarázat: <http://fejesoptika.uw.hu/interferencia.htm>.



1.1.1. ábra Olajfolt vízen és a látott kép értelmezése

A diffrakciós kísérletben is ezeket a momentumokat figyelhetjük meg: a térben periodikus kristály rácsíkjaiban lévő molekulák elektronfelhőjéről szóródnak a röntgensugarak és egymással interferálnak. A szóródás rugalmas, azaz a foton a teljes energiáját visszakapja az elektronfelhőtől. Mivel a diffrakciós kísérletben az egyforma atom- vagy molekularétegek nagyon sokszor (millió nagyságrendben) térben rendezetten ismétlődnek, ezért az interferáló elektromágneses hullámok kísérletileg észlelhető intenzitású diffrakciós pontokat eredményeznek. A fényvel végzett diffrakciós mérésekhez képesti

alapvető különbség abban rejlik, hogy a szórásban résztvevő elektromágneses sugárzás hullámhossza töredéke ( $10^{-4}$  szerese) a látható fény hullámhosszának, ezért a sokkal kisebb atomi távolságokról kapunk információt. Hasonló kísérletet mutat egy átlátszó függönydarab és lézeres mutató segítségével az 1.1.1. videó. A szálak közötti réseken fényelhajlás történik. Mivel itt a szálak távolsága összemérhető a fénysugár állandó hullámhosszával a fényelhajlás miatt találkozó hullámok interferálnak, ezért a diffrakciós képen világos és sötét foltokat látunk. A leírás analóg a Bragg-egyenlet levezetésénél alkalmazottal (3.6. fejezet).

1.1.1. Video: [Diffrakciós kép egy lézeres mutatópálca segítségével](#)

## 1.2. A röntgensugárzás mint elektromágneses hullám

A tágabb értelemben vett fény, azaz elektromágneses sugárzás (1.3.2. ábra), mind hullám, mind részecske természetű. A terjedés irányára és egymásra merőleges elektromos és mágneses tér rezeg, energia terjed tova térben. A fény, mint hullám transzverzális hullám ([http://hu.wikipedia.org/wiki/Transzverzális\\_hullám](http://hu.wikipedia.org/wiki/Transzverzális_hullám)). Az elektronfelhőn való szóródás a következő egyszerű modell alapján képzelhető el: a változó elektromos tér hatására egy töltés (elektron) rezgésbe jön és elektromágneses sugárzást, fényt bocsát ki. Az elektronfelhőn rugalmasan szóródik a fény, ha nem változik meg a hullámhossza. A foton azonban rugalmatlanul is kölcsönhatásba léphet az anyaggal, amikor átadja energiájának egy részét vagy esetleg energiát nyer az anyagból. A diffrakció során a hullámhossz állandó, az első esettel van dolgunk. Ha sok elektron rezeg azonos fázisban, nagyobb a szórt fény intenzitása. A protonok nagy tömege miatt azok szórási hozzájárulása elhanyagolható.

## 1.3. A röntgensugárzás különleges tulajdonságai

Bár korábban is voltak tapasztalatok a Lénárd Fülöp által először készített katódsugárcsőből kilépő különleges sugárzásra, azt 1895. november 12-én Wilhelm Conrad Röntgen alapos vizsgálatoknak vetette alá. A néhány nap múlva beküldött publikációban X-sugárzásnak (angolul X-ray) nevezi a különleges jelenséget, amit angol nyelvterületen továbbra is X-ray, más országokban röntgensugárzás néven ismerünk. Ma már tudjuk, hogy a röntgensugárzás is fény, azaz elektromágneses sugárzás (<http://en.wikipedia.org/wiki/X-ray>, 1.3.2. ábra) az alábbi jellemzőkkel:

Hullámhossz: 0,1-100 Å, azaz 0,01-10 nm.

Következmény: az atomok közötti távolságokkal összemérhető hullámhossz miatt a röntgensugárzás az atomok világából ad információt (távolságok illetve irányok).

Frekvencia:  $10^{16}$ - $10^{18}$  Hz.

Energia: 1-100 keV, azaz  $10^3$ - $10^5$  kJ/mol

Következmény: a molekulával rugalmatlanul (részecskeként, energiájuk átadással) ütköző röntgen fotonok minden kémiai kötést (kb. 100 kJ/mol) szétrobbantanak. Szerencsére ennek valószínűsége viszonylag kicsi,

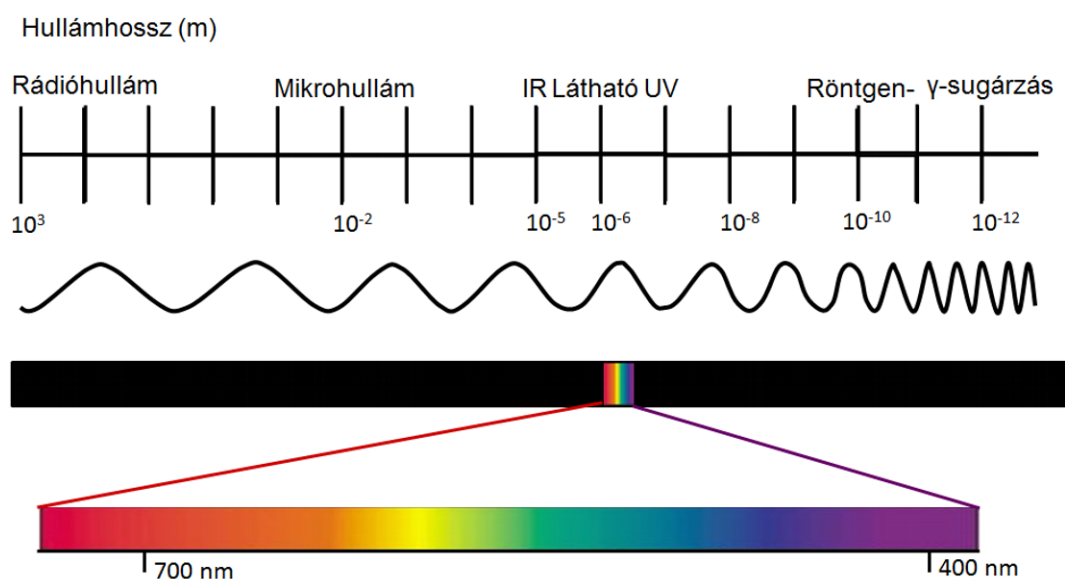
(kicsi a hatáskeresztmetszet). A röntgensugárzás a rendszámától és a röntgen foton energiájától függő mértékben (<http://www.nist.gov/pml/data/xraycoef/index.cfm>) elnyelődik az anyagban. Az intenzitás csökkenését az 1.3.1. ábrán bemutatott exponenciális függvény, írja le ahol  $\rho$  a sűrűség,  $l$  az úthossz,  $\mu$  az abszorpciós együttható (1/mm),  $\mu/\rho$  a tömegabszorpciós együttható és  $\rho l$  a felületi sűrűség.

$$I = I_0 e^{-\left(\frac{\mu}{\rho}\right)\rho l}$$

1.3.1. ábra. A röntgensugárzás abszorpciója ( $\rho$  a sűrűség,  $l$  az úthossz,  $\mu$  az abszorpciós együttható,  $\mu/\rho$  a tömegabszorpciós együttható és  $\rho l$  a felületi sűrűség.

Az abszorpciós együttható meghatározásának nehéz atomot tartalmazó szerkezetek és/vagy olyan kristályok esetén van jelentősége, amelyek egy vagy két dimenziója nagyon eltér, például túszerű vagy lapka kristályok (15.1. fejezet). Ugyanakkor a röntgensugárzás terjedésének sebessége minden anyagban közel a fénysebesség, azaz minden anyag törésmutatója (<http://www.physicsclassroom.com/class/refrn/u14l1d.cfm>) a röntgen tartományban közel egységnyi. Ezért nem tudunk a röntgen tartományban működő lencsét készíteni!

### Az elektromágneses spektrum



1.3.2. ábra. Az elektromágneses spektrum

## 1.4. A röntgensugárzással kapcsolatos biztonsági előírásokat be kell tartanunk

Balesetvédelmi és élettani szempontból a röntgensugárzás a megszüntethető ionizáló sugárzások kategóriájába tartozik. A vele végzett munkával kapcsolatban a vonatkozó törvények, rendeletek és szabványok előírásait kell alkalmazni. A röntgendiffrakciós készülék működtetését az illetékes hatósággal (korábban ANTSZ, most az illetékes Megyei Kormányhivatal Népegészségügyi Szakigazgatási Szerve) engedélyeztetni kell. Mint minden készüléknél a gyártónak vállalnia kell, hogy a készülék megfelel a

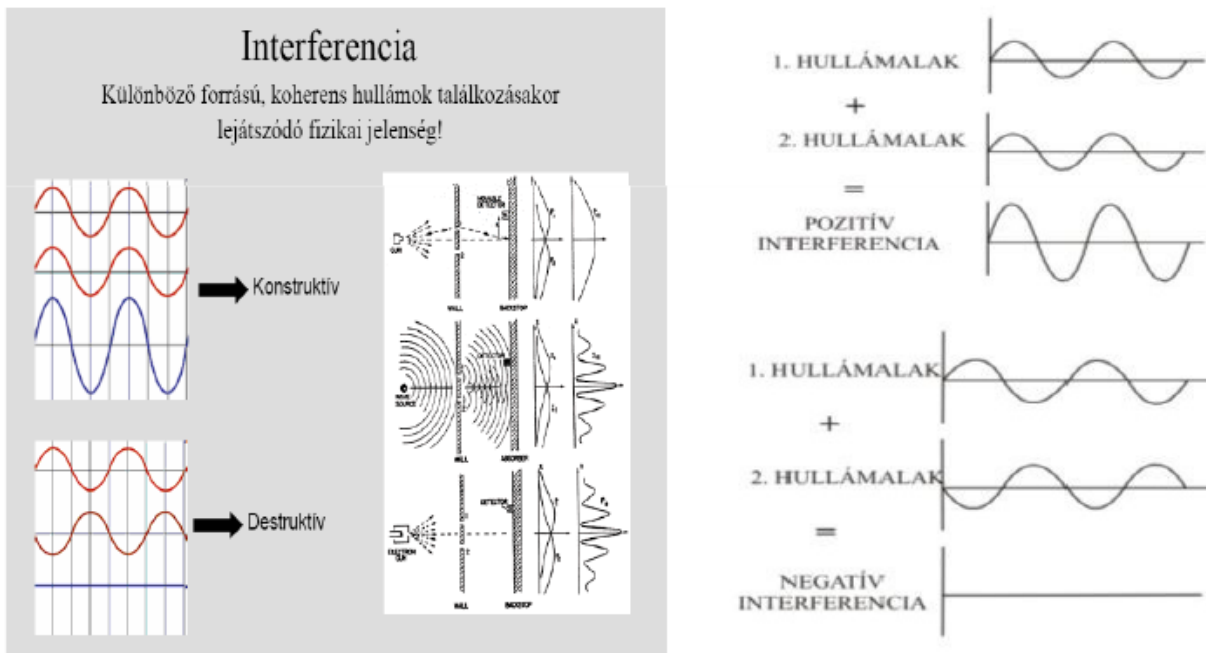
vonatkozó balesetvédelmi előírásoknak. A készüléket csak a megfelelő képzésben (bővített sugárvédelmi tanfolyam és ötévenkénti továbbképzés) részesült személy kezelheti. Külföldön nagy intenzitású szinkrotron forrásoknál végzett munka során is kötelező elvégezni a megfelelő sugár- és munkavédelmi tanfolyamot.

Néhány fontosabb rendelet és szabvány:

16/2000. (VI. 8.) EüM rendelet:	Az atomenergiáról szóló 1996. évi CXVI. törvény egyes rendelkezéseinek végrehajtásáról
11/2010. (III. 4.) KHEM rendelet:	A radioaktív anyagok nyilvántartásának és ellenőrzésének rendjéről, valamint a kapcsolódó adatszolgáltatásról
MSZ 824:1999	Sugárzás elleni védelem orvosi és állatorvosi röntgenmunkahelyeken
MSZ 836:1999	Sugárzás elleni védelem röntgenberendezést alkalmazó ipari radiográfiai munkahelyeken
MSZ 14341:1990	Külső röntgen- és gamma-sugárzások dozimetriája
MSZ IEC 846:1995	Béta-, röntgen- és gamma-sugárzási dózisegyenérték- és dózisegyenérték-teljesítménymérők sugárvédelmi célra

## 1.5. Hullámok kölcsönhatásai, visszaverődés, elhajlás és interferencia

Már a mechanikai hullámok vizsgálatánál találkozunk a hullámok érdekes tulajdonságaival, a visszaverődéssel, az elhajlással és az interferenciával. Ezek könnyen értelmezhetők a Huygens-Fresnel elv alapján, ami szerint a hullámfront minden pontja elemi hullámok kiinduló pontja. Hullámok találkozása, vagyis interferencia esetén a találkozó hullámok frontjai erősítik vagy gyengítik egymást (1.5.1. ábra és [http://opt.physx.u-szeged.hu/oktatas/Fiz\\_inf\\_1/levelezo/12\\_01.pdf](http://opt.physx.u-szeged.hu/oktatas/Fiz_inf_1/levelezo/12_01.pdf)), mintázat alakul ki. A mikroszkóp esetén a lencse összegyűjti és újrafókuszálja az interferált fénysugarakat, létrehozza a tárgy nagyított képét és így elvégzi a Fourier-transzformációt. Sajnos, a röntgen tartományban nem egyszerű dolog lencsét készíteni, mivel ahogy korábban említettük, minden anyag törésmutatója egyhez nagyon közeli érték. A látható fényt másképpen is tudjuk fókuszálni. A modern írásvetítőkben egy nagyméretű, nagy törésmutatójú lencse helyett egy üveglapot találunk és az ezen lévő megfelelő szélességben átlátszatlaná tett körkörös sávok olyan interferenciát hoznak létre, amik lencseként nagyított képet eredményeznek (Fresnel-féle zónák). A röntgensugárzás hullámhossza miatt egy ilyen a röntgen tartományban működő lencse elkészítése nagy technológiai kihívást jelent. Atomi mérettartományba eső, megfelelően változó köröket kell belemarnunk az anyagba. Mindenesetre ezt az elvet alkalmazva már ma is létezik a lágy röntgensugarakkal működő röntgen mikroszkóp ([http://en.wikipedia.org/wiki/X-ray\\_microscope](http://en.wikipedia.org/wiki/X-ray_microscope)).



1.5.1. ábra Hullámok erősítő és gyengítő interferenciája

Az 1.1.1. videó bemutatta, hogy az interferencia képek hogyan szemléltethetők egy lézeres mutatópálca és egy darab átlátszó függönyanyag segítségével. Mivel a szálak távolsága összemérhető a lézer fény hullámhosszával a pontszerű fényforrás helyett kereszt alakban elhelyezkedő, a szélek felé gyengülő fénypontokat látunk. A diffrakció matematikáját az 5. fejezetben tárgyaljuk részletesebben.

## 1.6. A röntgendiffrakció kiegészíti a spektroszkópiai szerkezet-meghatározási módszereket

A röntgendiffrakció sok esetben a végső szerkezetbizonyítási módszer. Természetesen nem helyettesítheti a spektroszkópiai módszereket, inkább azok kiegészítőjének tekinthető. Oldatok, több komponensű rendszerek vizsgálatánál és különösen, ha csak részleges szerkezeti információra van szükségünk a spektroszkópiai módszerek előnye nyilvánvaló. Az egykristály röntgendiffrakció néhány előnyös és hátrányos tulajdonságát az 1.6.1. ábra foglalja össze. Bár a készülék ára jelentős (egy modern diffraktométer ára 4-500 ezer EUR), az árat a kapott értékkel összevetve kell figyelembe venni. Kismolekulák esetén is fontos, hogy a teljes szerkezetet tudjuk meghatározni és az ezen információ megszerzésére alkalmas más módszerek alkalmazásához jelentős időt, vegyszert és emberi erőforrást kell mozgósítani. Azt is figyelembe kell venni, hogy sok esetben jelenleg nincs olyan alternatív módszer, amivel hasonló pontossággal ezek az információk megszerzhetőek lennének. Ez fokozottan igaz a fehérjeszerkezetekre.



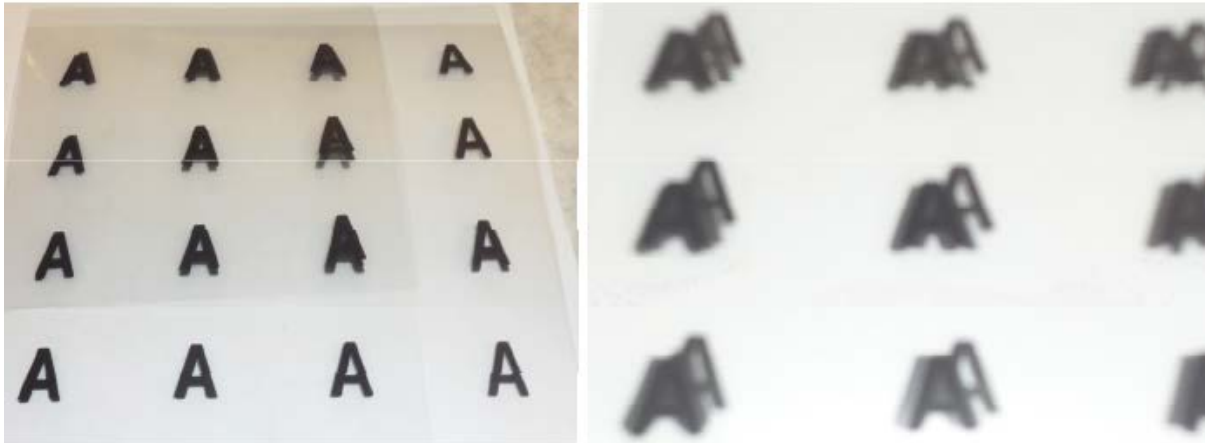
# Egykristály röntgendiffrakció

- Előnyök
  - Teljes szilárd fázisú szerkezet meghatározása, igazolása
  - Független módszer
  - Abszolút konfiguráció meghatározására is alkalmas
  - 0 kémiai információval is működik (szennyezők)
- Hátrányok
  - Egykristályra van szükség, ehhez tiszta anyag kell
  - Drága(?)
  - Néhány helyen elérhető

1.6.1. ábra. Az egykristály röntgendiffrakció néhány előnyös és hátrányos tulajdonsága

## 1.7. Milyen kérdésekre ad választ a röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat?

A röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat eredménye az elemi cella paramétereinek és szimmetriájának (a rács szerkezete) megfelelő periodicitású elektronsűrűség. A vizsgált makroszkopikus kristályban egyszerre  $10^{16}$ - $10^{19}$  ismétlődő egységtől (elemi cellától) kapott jel hozza létre a diffrakciós mintázatot. Ez a rendkívül hatékony erősítés teszi lehetővé, hogy makroszkopikus eszközeinkkel a mikrovilágról (az atomok világáról) kapjunk információt. Ugyanakkor a különböző elemi cellákban eltérő helyen lévő atomokat kiátlagolva, egyszerre látjuk. Az átlag kialakításában szerepet játszik, ha nem egykristályunk van (iker kristály), vagy ha a kristályban rácshibák vannak, illetve az a tény hogy a molekulák mindig egy egyensúlyi helyzet körül rezegnek. Eredményként az elektronsűrűség átlagolt képét kapjuk (térbeli átlag a kristályban, és időbeli átlag a mérés ideje alatt), ami esetenként elmosódott lesz (1.7.1. ábra). A rendezetlenséget és modellezését részletesen a 6.3. fejezetben elemezzük.



1.7.1. ábra: Egymásra szuperponált elmozdulások kis (a) és nagy (b) amplitúdó esetén (írásvetítő fólia)

Az elektronsűrűség interpretálásához az elektronsűrűség maximumaiba atomokat helyezünk és így kémiai már jól értelmezhető térszerkezetet, a molekulák és ionok képét kapjuk. Ezzel az egyszerűsítéssel nem mindig élhetünk. A rendezetlen szerkezetek nem mindig értelmezhetőek jól. Ha egy atomcsoport elhelyezkedésére két lehetőség van (pl. egy funkciós csoport alternatív konformációi) és ezek betöltöttsége összemérhető (60:40 – 40:60) általában modellezhető a rendezetlenség. Ha ezek a feltételek nem állnak fenn, akkor az elmosódott részt érdemes az elektronsűrűséggel leírni, tehát modellezetlenül hagyni. Fehérjék esetén általában az oldószer vízmolekulák nagy része és az anyalúgból származó egyéb molekulák, ionok nem definiálhatók az elektronsűrűség térképen, diffúz elektroneloszlást adnak. Ez annak köszönhető, hogy a fehérjemolekulák közötti viszonylag nagy tér az oldatfázishoz hasonlító. Rendezetlenek lehetnek a fehérjemolekula egyes felszíni oldalláncai, vagy hurokrégiói is, olyannyira, hogy az elektronsűrűségi térképen nem azonosítható egyetlen dominánsan jelenlevő helyzetük sem. Sajnos esetenként fontos molekulák vagy részletek is elmosódottak pl. cukor részek, esetenként az aktív centrumban lévő molekula vagy a kritikus vízmolekulák. Ilyenkor egyéb módszerekkel nyert kémiai és szerkezeti információkat használhatunk a szerkezet helyes interpretálásához.

Tehát a röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározás megadja

- a rács szerkezetét, elemi cella paramétereit és szimmetriáját
- az elemi cellában lévő atomok minőségét és koordinátáit

Ezekből az atomi koordinátákból közvetlenül megadható az atomok konnektivitása, a molekula 3 dimenziós szerkezete és a molekulák között fellépő másodlagos kötések geometriai jellemzői. Vagyis az egykristály röntgendiffrakció 4C módszer (composition, constitution, conformation, configuration).

## 1.8. Mire nem válaszol a röntgendiffrakció?

Mint minden nagy hatékonyságú módszert, az egykristály röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározást is szakértelemmel és körültekintően kell alkalmazni. A mérés jelentős költsége miatt célszerű a vizsgálandó szerkezeti problémát jól definiálni és spektroszkópiai módszerekkel is keresni a megoldást.

A gyakorlatban a krisztallográfus sokszor szembesül azzal a problémával, hogy az előállított egykristály szerkezete messze nem a várt vegyületé, hanem a ligandum, egy bomlástermék, illetve szeretlen szennyező kristályosodott ki. Egy másik gyakori probléma, hogy a szerkezet már ismert és így a drága műszeridőt és szellemi erőforrásokat hiába használtuk.

Több komponensű anyag kristályosítása esetén, még ha képződnek is egykristályok, gondos vizsgálatok szükségesek annak igazolására, hogy a meghatározott szerkezet valóban reprezentatív a mintára nézve.

Nagyon fontos mindig gondolni arra, hogy a kivált kristály egy energia (szabadentalpia) minimumot jelent. Éppen ezért reaktív vagy katalitikus rendszerek vizsgálatánál az egykristály diffrakciós módszerrel kapott szerkezet egy köztitermék szerkezete. Az, hogy ennek mi a jelentősége a teljes rendszerre nézve további vizsgálatokat igényel. Ugyanakkor az egykristály röntgendiffrakciós módszer saját gyengeségei és hibaforrásai is sok fejtörést okoznak a gyakorlatban. Sokszor kihívást jelent a rendezetlen szerkezetek modellezése. A hibás tércsoport választás (tárgyalásuk: 3. fejezet) miatti tévedést R.E. Marsh amerikai krisztallográfus neve után marshingnak is nevezik, aki az adatbázis minden frissítésekor közzétette azt a jó néhány tucat szerkezetet, amik legalábbis gyanúsak a szimmetria szempontjából.

[Teszt](#)

## 2. A kristályosítás termodinamikája és kinetikája, egykristályok növelése (Bényei Attila)

### Irodalom

A 'crystal growing' kulcsszavakra a Google 55 millió találatot adott (2012 december).

Alapvető fizikai-kémiai összefüggések, fázisátmenet termodinamikai leírása:

- P.W. Atkins, Fizikai Kémia, I-III. Tankönyvkiadó, Budapest, 1992.

A kristályosítással és a polimorfiával kapcsolatos tudnivalók, különösen gyógyszeripari alkalmazások

- Farkas Béla, Révész Piroska: A kristályosítástól a tablettázásig- Anyagvizsgálati módszerek és technológiai eljárások kézikönyve, Universitas Szeged, 2007

Bodor Beáta PhD dolgozata a kristályosítás számos kérdését feldolgozza

- [http://konyvtar.uni-pannon.hu/doktori/2002/Bodor\\_Beata\\_dissertation.pdf](http://konyvtar.uni-pannon.hu/doktori/2002/Bodor_Beata_dissertation.pdf)

Kristályosítással, röntgendiffrakciós mérésre alkalmas egykristály kristály növeléssel kapcsolatos oldalak

- [http://xray.tamu.edu/pdf/notes/note\\_crystal\\_growth.pdf](http://xray.tamu.edu/pdf/notes/note_crystal_growth.pdf)
- [http://dwb4.unl.edu/Chem/CHEM869V/CHEM869VLinks/laue.chem.ncsu.edu/web/student\\_xtal.html](http://dwb4.unl.edu/Chem/CHEM869V/CHEM869VLinks/laue.chem.ncsu.edu/web/student_xtal.html)
- <http://www.cryst.chem.uu.nl/lutz/growing/growing.html>

- <http://xray.chem.ualberta.ca/xray/GrowXtal.html>

A nukleáció és kristály növekedés elmélete

- Nucleation Theory and Applications. Ed. J.W.P Schmelzer, Wiley, 2005

## 2.1. A szilárd anyagok szerkezetét a hosszú távú rendezettség határozza meg

Amorfnak nevezük azokat az anyagokat, amelyekben **nincs** hosszú távú rendezettség. Ilyenek például az üveg és a műanyagok általában. A mindennap használt ólomkristály elnevezés például amorf üveget, nem kristályos anyagot jelöl. A kristályos anyagokban periodikusan ismétlődő egységeket találunk és így bennük van hosszú távú rendezettség. Természetesen a definíció határait ebben az esetben is részletesen vizsgálni kell az adott rendszerben. Egyes anyagokban, így például a folyadékkristályokban a molekulák orientáltak. A cellulóz szálak esetén egy dimenziós periodicitást találunk a szerkezetben és ezért száldiffrakciós kép is készíthető róluk. Egy különleges esetet jelentenek a kvázikristályok amiknek a felfedezését 2011-ben Nobel-díjjal ([http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2011/press.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2011/press.html)) ismerték el. A kvázikristályokban a rendezettség szimmetriája nem teszi lehetővé a tér hézagmentes kitöltését, de találunk bennük periodicitást.

### 2.1.1. Az elemi cella: a legkisebb kristálytani egység, amiből a teljes kristály felépíthető a cella élek mentén való eltolással

A kristályos anyagokban a periodicitást az adja, hogy a kristály egy kis részletét (elemi cella) a cella élek mentén eltolva a teljes makroszkopikus kristályt megkaphatjuk ([http://www.chem.elte.hu/departments/altkem/tarczay/altkem/%C1K\\_emeltsz\\_Krist%E1lyok&szimmetria.pdf](http://www.chem.elte.hu/departments/altkem/tarczay/altkem/%C1K_emeltsz_Krist%E1lyok&szimmetria.pdf)). Egykristályról beszélünk, ha ez az ismétlődés folytonos az egész mintatér fogatban. Az elemi cella tehát a rács legkisebb egysége, ami mutatja a rács szimmetriáját. Maga a kristályrács absztrakció: pontjainak térbeli elhelyezkedése mutatja, hogy milyen irányokban és távolságokban ismétlődnek a kristályt felépítő szerkezeti elemek. Az atom- és ionrácsos kristályokban az atomok/ionok gyakran a rácpontokban helyezkednek el, molekularácsos kristályokban azonban legtöbbször nem. Az elemi cella létrejöttére már régóta rendelkezünk bizonyítékkal. Valószínű, hogy már az ókori görögök is észrevették, hogy egy nagyobb, közel hibamentes kristály összetörésével kapott kisebb kristály hasonlít az eredetire. Lehet, sőt valószínű, hogy Démokritosz atomelméletét is inspirálta a kristályokon végzett ilyen jellegű megfigyelés. Az ásványtan fejlődése elvezetett a lapszögek állandósága törvényének megfogalmazásához a XVII. században (Nicolaus Steno, [http://hu.wikipedia.org/wiki/Nicolaus\\_Steno](http://hu.wikipedia.org/wiki/Nicolaus_Steno)). Ma már tudjuk, hogy az elemi cella, mint a kristály legkisebb egysége nem oszthatatlan ([atomosz](http://hu.wikipedia.org/wiki/Atommodell), <http://hu.wikipedia.org/wiki/Atommodell>), mert benne ionok, atomok, molekulák vannak. Másrészt a kristályok darabolásával nem tudunk eljutni az elemi cellához, mivel olyan mennyiségű energiát kell a rendszerrel közölnünk az elemi cellára történő feldarabolásához, ami az elemi cella létrehozásában kulcsszerepet játszó másodlagos kötések (főleg molekularácsos vegyületek esetén), sőt az elemi cellát alkotó molekulákban fellépő kovalens kötések is felszakítaná

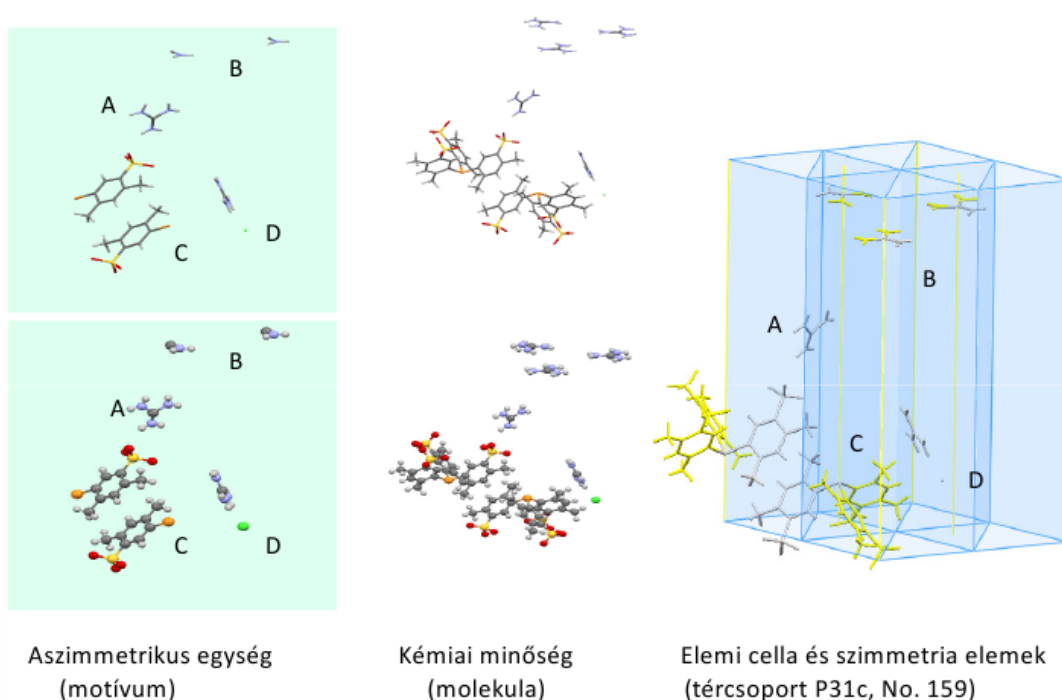
([http://www.ruf.rice.edu/~biy/Selected%20papers/98PRB\\_Surface.pdf](http://www.ruf.rice.edu/~biy/Selected%20papers/98PRB_Surface.pdf)). Az is igaz, hogy tökéletes kristály nincsen. A kristály felépülése során illetve a szennyeződések miatt mindig fellépnek rácshibák (<http://www.vilaglex.hu/Lexikon/Html/Racshiba.htm>). Ezekkel az anyagtudomány és a szilárdtest fizika kiterjedten foglalkozik, megemlíjtjük, hogy a rácshibák felismerésében úttörő szerepe volt Polányi Mihálynak ([http://www.kfki.hu/chemonet/polanyi/02\\_12/03-pmelete.pdf](http://www.kfki.hu/chemonet/polanyi/02_12/03-pmelete.pdf)).

Az elemi cella egy paralelepipedon, három dimenzióban három vektorral (**a,b,c** bázisvektorok, amelyek jobbsodrású rendszert alkotnak), azaz hat paraméterrel (cellaparaméterek) írható le. Az oldalak hosszát *a,b,c*, az általuk bezárt szöveget *α,β,γ* jelöli. Az egykristály röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározás során mindhárom irányban kb. 0,05-0,3 mm-es kristályokkal dolgozunk, ami azt jelenti, hogy kis molekulák esetén ezt a makroszkopikus kristályt  $10^{16}$ - $10^{19}$  elemi cella alkotja, de fehérjék esetén is több milliárd elemi cellát vizsgálunk.

### **2.1.2. Az aszimmetrikus egység a szupramolekuláris entitás: A tércsoport szimmetriáját rá alkalmazva belőle az elemi cella felépíthető**

Az aszimmetrikus egységet a szupramolekuláris minőségnek (egységnek) nevezhetjük, amire a tércsoport szimmetriáját alkalmazva belőle az elemi cella felépíthető. A röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározás gyakorlatában nagyon fontos, hogy az aszimmetrikus egységben a vizsgált molekula vagy ionpár, annak részlete vagy többszöröse található. A 2.1.2.1. ábra egy olyan esetet mutat, amikor az aszimmetrikus egységben egyszerre található általános pozícióban lévő guanidinium kation (A) és speciális pozícióban, a háromfogású forgástengelyen lévő guanidinium kation (B) aminek harmada van az aszimmetrikus egységben. Ugyancsak a háromfogású tengelyen van két foszfin molekula (C, egyharmad molekula) illetve általános pozícióban a klorid ion (D).

A tércsoport (P31c) szimmetria elemeit alkalmazva az aszimmetrikus egységre megkapjuk az elemi cellát. Szükségszerű, hogy az elemi cella tartalmára és a kémiai minőségként megjelölt 'molekulára' teljesüljön az elektroneutralitás elve. Ez fontos információ lehet, mert esetenként segít eldönteni, hogy például vízmolekula vagy hidroxid ion van a komplexünkben. A hidrogén atomok helye ugyanis nem mindig határozható meg a röntgendiffrakciós mérésből (15.1. fejezet).



2.1.2.1. ábra. Aszimmetrikus egység és elemi cella egy érdekes szerkezetben

A szimmetria soha nem tud egy szénatomot foszforatómmá változtatni, de megjegyezzük, hogy főleg szervetlen sók esetén gyakori, hogy egy iont a rácsban más kémiai minőségű ion helyettesít (pl. szilikátok, Al-Mg-Fe). Ez a jelenség a röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározásban nem mint szimmetria, hanem a betöltöttség vagy esetleg a rendezetlenség leírásával szerkezetfinomítási problémaként merül fel. Rendszerint  $Z$ -vel jelölik az elemi cellában lévő molekulák számát és  $Z'$ -vel azt a számot, amit úgy kapunk, hogy ezt elosztjuk a szimmetria alapján lehetséges ekvivalens pozíciók számával. Vagyis  $Z'$  azt fejezi ki, hogy hány molekula van az aszimmetrikus egységben. Itt a molekula a kémiai entitást jelöli, tehát a diffrakciós szerkezet-meghatározás során általában egy ionpárt is molekulának nevezünk. A  $Z'$  érték fontos szerkezeti információt adhat. Ha  $Z'$  kisebb, mint 1, akkor a molekulának vagy annak egy részletének rendelkeznie kell szimmetriával és a molekulának speciális pozícióban kell lennie a rácsban. Ez például fémkomplexben a koordinációt már jelzi (pl. bisz-komplexünk van). Persze ha a molekula szimmetrikus, akkor a megfelelő szögeknek pontosan a kristálytani szimmetria által meghatározott értéknek kell lenni (pl.  $180^\circ$ ,  $90^\circ$  vagy  $60^\circ$ stb.) és ennek fontos kémiai és spektroszkópai (IR, NMR) következményei/vonatkozásai lehetnek. Hasonlóan, a 2.1.2.1. ábrán B-vel jelölt guanidinium ionokban minden C-N kötés egyforma hosszúságú, míg az A-vel jelöltekben eltérőek is lehetnek ezek a kötéstávolságok.

$Z'$  egynél nagyobb értéke is jelzés lehet. Például racemátok (enantiomerek 1:1 elegye) kristályosodhatnak úgy, hogy a tükörképi pár molekulák a rácsban is úgy helyezkednek el, hogy a másik enantiomer a rács inverziós centruma miatt teljesen azonos konformációjú (pl. a rács középpontosan szimmetrikus) mivel a két enantiomer koordinátái az elemi cellában a szimmetria által meghatározott pontos összefüggésben

vannak. Az is lehet azonban, hogy az enantiomerek nem pontosan a szimmetriaelem által megadott helyen vannak a rácsban. Ekkor például  $Z'=2$ , tehát a két enantiomer konformációja valamilyen mértékben eltérhet. Ha a racemát anyag olyan rácsban kristályosodik, ami a rezolvált királis molekulák számára engedélyezett, de  $Z'=1$ , akkor a spontán rezolválódás érdekes jelenségét tapasztaljuk és a kristályok racém konglomerátumot alkotnak, vagyis külön tudjuk válogatni – legalábbis elvben – a balra és jobbra forgató kristályokat, ahogy Pasteur tette.

## 2.2. A kristályosítás mint elválasztási, tisztítási eljárás

A kristályosítás során egy túltelített oldatból szilárd fázisban válik ki az anyag, vagyis az elválasztandó anyagot folyékony fázisból szilárd fázisba visszük. Természetesen a kivált anyag lehet amorf vagy kristályos. A kristallitok vagyis a kristályszemcsék méretétől függően az anyag lehet porszerű (mikrokristályos) vagy makrokristályos, egykristályokból álló. A kristályosítást számos helyen alkalmazzák az iparban is. Előnyei között megemlíthetjük a nagy szelektivitást, vagyis a termék tisztítását is elvégezhetjük, ha a kristályokra tapadt oldószer maradványok és bennük lévő zárványok eltávolítására további mosási és szárítási lépéseket is alkalmazunk: az ipari célú kristályosítás kiegészítésére számos utóműveletet végeznek. A szilárd anyag elválasztását a legtöbbször szűréssel végzik, amit mosás, szárítás, aprítás stb. követhet. A kristályosítás további előnye, hogy jól kezelhető, nagy tisztaságú terméket ad. Hátránya, hogy amint később látni fogjuk, a kristályosítás leírása mind elméleti, mind kísérleti szempontból nehéz, ami a konkrét rendszerekben reprodukálhatósági problémát jelenthet. Ezzel különösen a léptéknövelésnél kell számolnunk. Az ipari alkalmazások nagymértékben ösztönzik a kristályosodás megértése irányuló kutatásokat. Gyógyszerek előállításánál a fő szempontok között van a kontrollált szemcseméret és a tisztaság. Egykristályok kontrollált előállítását a napelemek előállításától a mikrochipekig számos alkalmazás igényli.

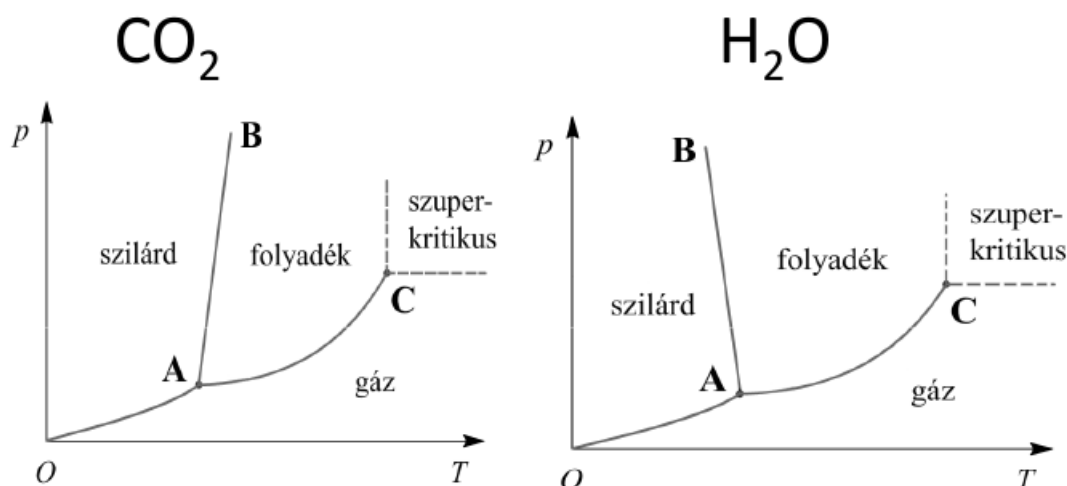
## 2.3. A kristályképződés termodinamikai leírása

A kristályok képződésének leírásánál azt kell figyelembe vennünk, hogy a kristálykiválásnál az egyensúlytól távol lévő, messze nem ideális, több komponensű rendszerekről van szó. Először részletesen megvizsgáljuk az egy komponensű, kétfázisú rendszerek fázisdiagramját (2.3.1.1. ábra), különös tekintettel arra, hogy hogyan és milyen mértékben téríthetjük el a rendszert az egyensúlyi görbétől. Ezek után a kristályosítás fázisdiagramján (2.4.4.1. ábra) bemutatjuk, hogy az egyensúlytól távol lévő rendszereket hogyan tudjuk befolyásolni és egykristályokat előállítani.

### 2.3.1. A fázisdiagram megadja azokat az állapotjelző ( $p, c, V, T$ ) tartományokat, amelyeknél a különböző fázisok termodinamikailag stabilisak

A fázisdiagram mutatja a rendszer állapotát egyensúlyban. A tartományok közötti határvonalak a fázishatárok és megmutatják azokat a paraméter értékeket ( $p-T$  vagy  $p-V$ ), amelyeknél a két fázis együtt

van jelen. A Gibbs-féle fázistörvény (szabadsági fokok száma + fázisok száma = komponensek száma + 2) kijelöli a biztos pontokat. Például egy komponensű rendszerekben a hármaspont (vagyis a szilárd-folyadék- gőz egyensúly, 2.3.1.1. ábra. A) és a kritikus pont (ahol a folyadék és gőzfázis közötti sűrűségkülönbség eltűnik, 2.3.1.1. ábra C) paraméterei ( $p, T$ ) állandóak. A 2.3.1.1. ábra szén-dioxid és a víz esetén a  $p$ - $T$  síkon mutatja a fázisdiagramot. A víz különleges voltát jelzi az AB szakasz negatív meredeksége, ami azzal kapcsolatos, hogy a jég sűrűsége kisebb, mint a vízé. A tengelyeken nem tüntettünk fel skálát, a kitüntetett A és C pontok koordinátái szén-dioxid esetén A(216,55K ; 517Pa), C(304,1K ; 7,38  $10^6$ Pa). Víz esetén A(273,16K ; 611,7Pa), C(647,3K ; 2,21  $10^7$ Pa).



2.3.1.1. ábra. A szén-dioxid és a víz fázisdiagramja. Magyarázat a szövegben.

### 2.3.2. A kétfázisú rendszerek az egyensúlyi görbétől távolabbi pontba is eljuttathatók például túlhűtéssel vagy túlhevítéssel

A rendszert kisebb-nagyobb mértékben eltéríthetjük az egyensúlyi görbétől. Túlexpandálással vagy hirtelen összenyomással, ha a hőmérsékletet változtatjuk, akkor túlhűtéssel vagy túlhevítéssel a 2.4.1.1. ábrán zölddel jelzett részre is eljuttathatjuk a rendszert. Ilyen tapasztalatai mindenkinek vannak: a tészta főzéséhez forralt víz néha túlhevül, és ha a sót a túlhevített vízbe tesszük a forrás robbanásszerűen indul meg. Gyakori és veszélyes jelenség a mikrohullámú sütőben melegített folyadék túlhevülése (<http://www.youtube.com/watch?v=HKC37PoELbo>).

A túlhűtött víz előállítása sok türelmet igényel. Dr. Härtle Károly készített egy érdekes videót (2.3.2.1. video) amit az engedélyével bemutatunk.

2.3.2.1. video [Túlhűtött víz](#)



Nátrium-szulfát oldatból magunk is könnyedén létrehozhatunk tútelített rendszert, kb. 900 g nátrium-szulfátot 100 cm<sup>3</sup> vízzel 95°C-ra melegítve homogén oldatot kapunk és visszahűtve a kristályosodás rázásra sem indul meg. Egy kristályszemcse hatására azonnal beindul a kristályok kiválása és ezt valós időben mutatja a 2.3.2.2. videó. A hőmérséklet emelkedése jelzi, hogy a kristályosodás exoterm folyamat.

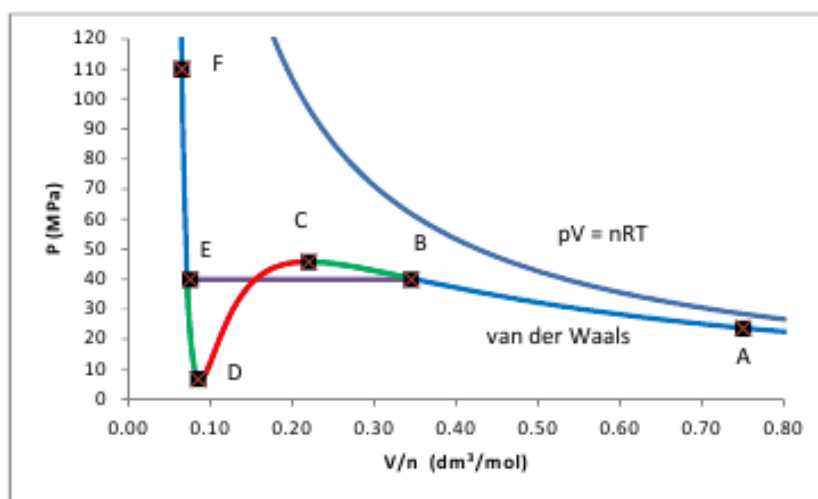
2.3.2.2. videó: [Nátrium-acetát kristályosítása](#)

## 2.4. A folyadék – gőz és a szilárd anyag – oldat fázisegyensúly leírása

A kristályosodás termodinamikai leírásához először a jóval egyszerűbb, egy komponensű rendszerekben a folyadék-gőz egyensúlyt tanulmányozzuk. Az itt szerzett ismeretek lehetővé teszik, hogy kvalitatív képet alkossunk a több komponensű rendszerekről. Ezek közé tartoznak a tútelített oldatok is, melyekből kristályok választhatók ki.

### 2.4.1. Fizikai modellel az ideális gázok állapotegyenlete értelmezhető, reális gázokat első közelítésben a van der Waals-egyenlet írja le

Szigorúan véve egyedül az ideális gázok jól ismert  $p = \frac{nRT}{V}$  állapotegyenletének tudjuk az atomi szintű magyarázatát megadni a statisztikus gázelmélet segítségével (2.4.1.1. ábra,  $pV=nRT$  görbe). A reális rendszerek magas hőmérsékleten és/vagy alacsony nyomáson jó közelítéssel követik ezt az egyenletet, de a pontosabb leírásuk felé az első lépés a  $p = \frac{nRT}{V-nb} - a\left(\frac{n}{V}\right)^2$  van der Waals-egyenlet bevezetése, melyben a  $b$  paraméter segítségével figyelembe vesszük, hogy a teret kitöltő részecskék nem pontszerűek az  $a$  paraméter segítségével pedig hogy közöttük az anyagi minőségtől függő vonzó kölcsönhatás van. Ha ezt az egyenletet ábrázoljuk a  $p$ - $V$  síkon a hőmérséklet állandó értéke mellett a 2.4.1.1. ábra alsó, minimumot és maximumot is mutató görbét kapjuk.



2.4.1.1. ábra. Ideális és reális (van der Waals) gáz állapotdiagramja. A zölddel jelölt nyomás-móltérfogat paraméterek esetén a rendszer metastabil.

## 2.4.2. A gőz-folyadék fázisátmenet van der Waals gázok esetén

Bár ez az egyenlet is csak egy közelítés a valós rendszerekre, értékes következtetéseket vonhatunk le belőle. Felvetődik a kérdés, hogy van-e fizikai értelme a görbe maximumának és minimumának? Ha egykomponensű rendszerünk az A állapotban van (2.4.1.1. ábra) és feltételezzük, hogy követi a van der Waals-egyenletet akkor a B pontig komprimálhatjuk egyensúlyi lépésekben. Amennyiben továbbra is termodinamikai egyensúlyban van a rendszer, akkor a B pontban megjelenik a folyadék fázis és az E pontig folytatva az összenyomást csak a gáz és a folyadék fázis térfogatának aránya változik. Mivel a folyadék fajlagos térfogata jóval kisebb, mint a gázé, ezért  $p$ - $V$  síkon egy gyakorlatilag vízszintes BE szakaszon találhatóak a rendszert leíró állapotjelzők. Az E pontban az anyag teljes mennyisége kondenzálódott és mivel a folyadékok gyakorlatilag összenyomhatatlanok komprimálás hatására a rendszer egy jóval meredekebben emelkedő görbén (EF) halad az F végállapotig. A rendszer expandáltatásával, vagyis a nyomás csökkentésével a folyamat a fordított irányba is lejátszódik egyensúlyi lépéseken keresztül. A hőmérséklet változtatásával is halmazállapot változásokat érhetünk el. Valós rendszerek esetén hasonló görbéket kapunk ([http://en.wikipedia.org/wiki/Phase\\_diagram](http://en.wikipedia.org/wiki/Phase_diagram)). Mint korábban kísérletekben bemutattuk a folyadékok túlhűthetők/túlhevíthetők illetve állandó nyomáson túlexpandálhatóak. Nem egyensúlyi körülmények között a B ponttól egy ideig a zöld görbén haladhat a rendszer, de egy kis rázás vagy góc hatására a rendszer 'átugrik' a BE egyenesre és cseppfolyósodik az anyag egy része. A fordított irányban is igaz, hogy a rendszer túlexpandálásával az E pontból tovább haladhat valameddig a zöld izotermán a rendszer. A BC és DE görbék a metastabil rendszer viselkedését írják le. A görbének az ábrán pirossal jelzett CD szakaszára azonban sohasem juthatunk el. (További magyarázat: <http://www.gps.caltech.edu/~asimow/tutorial1.html>)

A következő lépésben a tárgyalást kiterjesztjük több komponensű rendszerekre. A termodinamikából ismert, hogy  $k$  komponensű rendszerben a szabadentalpia (Gibbs energia,  $G = H - TS$ ) infinitezimális változását a 2.4.2.1. ábrán szereplő összefüggés írja le (a kémiai termodinamika alapegyenlete), ahol  $T$  a hőmérséklet,  $p$  a nyomás,  $n_i$  az  $i$ -edik komponens molszáma,  $Vdp$  a térfogati munka,  $SdT$  a hőközlés és  $\mu_i$  az  $i$ -edik komponens kémiai potenciálja, vagyis parciális moláris szabadentalpiája.

$$dG(T, p, n_i) = Vdp - SdT + \sum_{i=1}^k \mu_i dn_i \quad \text{ahol} \quad \mu_i = \left( \frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{T, p, n_{j \neq i}}$$

2.4.2.1. ábra. A kémiai termodinamika alapvető egyenlete.

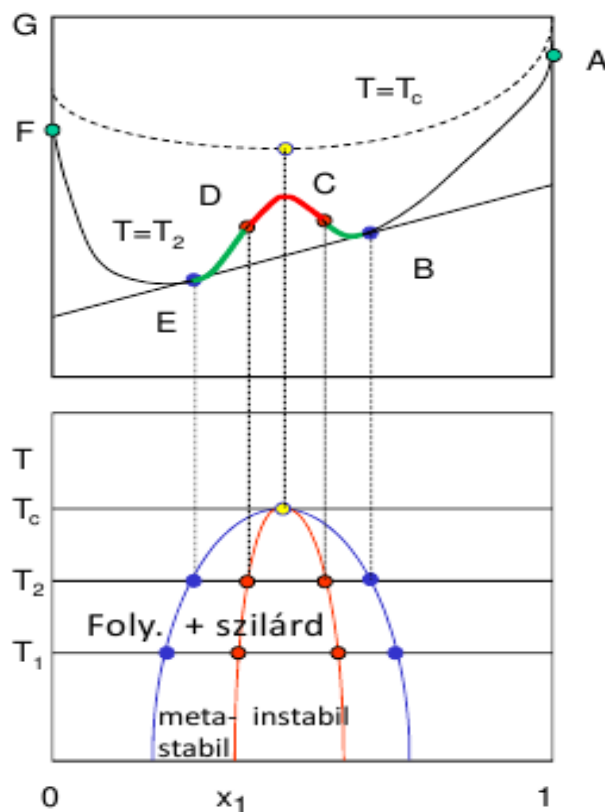
Állandó nyomás és hőmérséklet esetén az összefüggés a 2.4.2.2. ábrán bemutatott alakra egyszerűsödik.

$$dG(T, p, n_i) = \sum_{i=1}^k \mu_i dn_i$$

2.4.2.2. ábra. A szabadentalpia változása több komponensű rendszerben ( $T, p$  állandó).

Egyensúlyban  $dG=0$ , azaz fázisegyensúlyban a kémiai potenciálok azonosak minden fázisban az egyes komponensekre.

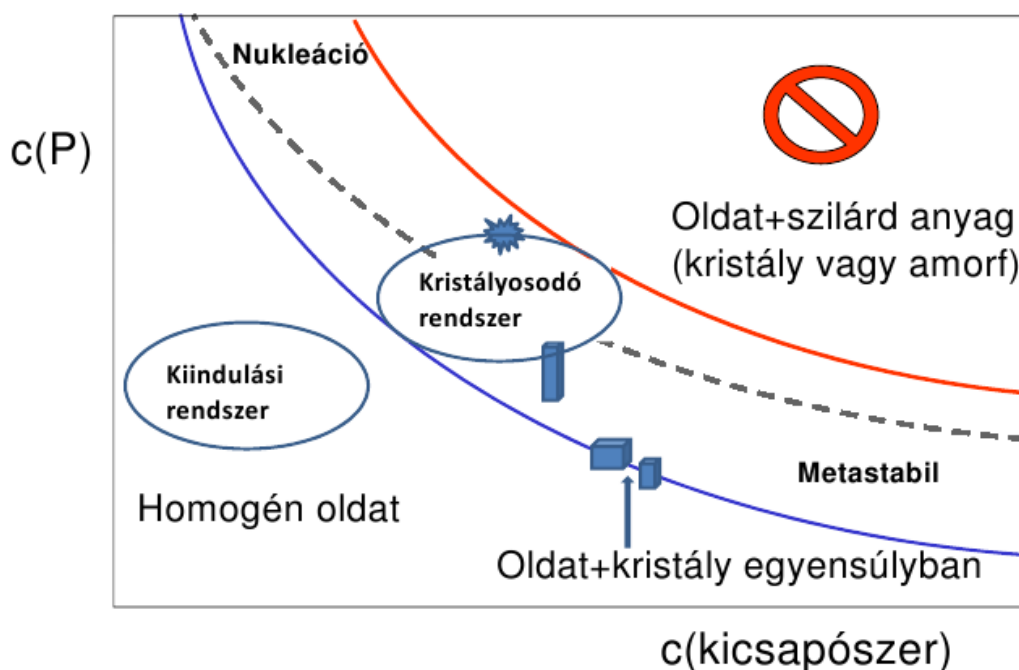
A 2.4.2.3. ábra mutatja a szabadentalpia koncentráció függését (felső,  $G$ - $x$  görbe) kétkomponensű, rendszerben, ami lehet két korlátozottan elegyedő folyadék, vagy oldat és kivált szilárd anyag. A rendszer az egyensúlytól távol is csak olyan állapotban lehet, amelyre a  $\left(\frac{\partial^2 \bar{G}}{\partial x_1^2}\right) > 0$  feltétel teljesül. Adott  $T_2$  hőmérsékleten a tiszta 1-es komponenshez (A pont) adagolva a másik komponenst a B pontig elegyednek, homogén oldatunk van. Egyensúlyi rendszerben B-ben megjelenik a szilárd anyag vagy a másik folyadék fázis, de a rendszer metastabilis állapotban is tartható és egészen a C móltört eléréséig homogén is lehet a rendszer (zöld görbe). Mivel a C-D szakaszon nem teljesül a  $\left(\frac{\partial^2 \bar{G}}{\partial x_1^2}\right) > 0$  feltétel ezért ilyen koncentrációviszonyok között biztosan megjelenik a másik fázis. Ha a hőmérséklet  $T_c$  akkor egy kritikus elegyedési pontra zsugorodik az instabil tartomány illetve a hőmérséklet változtatásával ( $T_1$ ) a metastabil régió jelentősen kiterjeszthető (2.4.2.3. ábra alsó  $T$ - $x$  görbe). A B-C és a D-E tartományt binodálisnak is nevezik, mivel a két fázis egyidejűleg jelen lehet (<http://en.wikipedia.org/wiki/Binodal>). A C-D szakaszt spinodálisnak nevezik ([http://en.wikipedia.org/wiki/Spinodal\\_decomposition](http://en.wikipedia.org/wiki/Spinodal_decomposition)) és az ide juttatott rendszerben termodinamikai szükségszerűség, hogy az anyag teljes térfogatában azonnal meginduljon a fázisok szeparálódása, nincs szerepe a nukleációnak.



2.4.2.3. ábra. Két komponensű, reális rendszer  $G$ - $x$  diagramja (fent) és  $T$ - $x$  diagramja (lent).

### 2.4.3. A nukleációs és a metastabil zónák határai kísérletesen meghatározhatóak

A gőz-folyadék fázisátmenetre tett megfontolások a szilárd anyag – olvadék vagy szilárd anyag - oldat rendszerekre és így a kristályképződés termodinamikai leírásának alapjaként is alkalmazhatóak. Ezek a rendszerek lényegesen bonyolultabbak, a komponensek között szerepel az oldószer, az oldott anyag, sok esetben lecsapószer is alkalmazunk, és persze mindig vannak szennyezők. Ekkor is meghatározhatunk egyensúlyi görbéket. Ha az anyagunk (pl. protein) koncentrációját a lecsapószer koncentrációjának függvényében ábrázoljuk, felvehetjük a fázisdiagramot. Az egyensúlyi görbe (2.4.3.1. ábra kék vonal) jelenti azt a határt, ami alatt telítetlen oldat, a kék görbén egyensúlyban lévő telített oldat és szilárd anyag van. A körülmények módosításával túltelített homogén oldatot hozunk létre. A közvetlenül a kék görbe fölötti részt metastabil zónának nevezünk. A  $\left(\frac{\partial^2 \bar{G}}{\partial x_1^2}\right) > 0$  feltétel miatt a piros vonallal jelölt tartományon túl már nem lehet homogén oldatból álló rendszerünk. A kék és piros görbe közötti tartomány szilárd anyag és olvadék/oldat felé eső részét nukleációs zónának nevezik. A metastabil és a nukleációs zónák közötti határ (2.4.3.1. ábra szaggatott görbe) megtalálása már különösen nehéz, de esetleg nincs is rá szükségünk. Az biztos, hogy a nukleációs zónában lévő rendszerből az intenzív göcképződés hatására gyorsan apró kristályok válnak ki, míg ha kevés a góc és a rendszer a metastabil zónában van egykristályt kaphatunk. A zónahatárok feltérképezése különösen a fehérjék kristályosításához fontos (11. fejezet). Az, hogy a rendszer milyen trajektórián mozog a kristályosodás során mind elméletileg, mind kísérletileg nehezen leírható. A rendszert a hőmérséklet és koncentráció változtatásával vagy lecsapószer hozzáadásával mozgathatjuk a fázistérben, de a diffúzió és a kristály növekedési és oldódási sebességének viszonya befolyásolja a trajektóriát. Törésmutató vagy fényszórás méréssel, esetleg ultrahang terjedési sebesség méréssel követhetjük a csapadék kiválását vagy visszaoldódását, ami segít feltérképezni az egyensúlyi határgörbéket a különböző paraméterek (hőmérséklet, oldószer összetétel, lecsapószer koncentráció, pH stb.) függvényében.

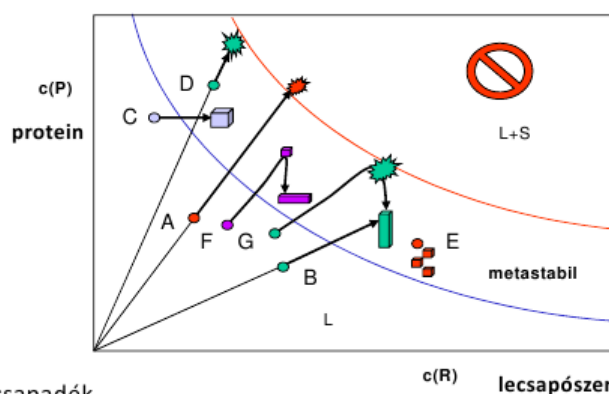


2.4.3.1. ábra. A kristályosítás fázisdiagramja

## 2.4.4. Egykristályok előállításához a rendszert kellő ideig a metastabil zónában kell tartani

Mindezek alapján a trükk egyszerű, bár esetenként nehéz megvalósítani. Kellő ideig a metastabil zónában tartva a rendszert egykristályokat kaphatunk (2.4.4.1. ábra B,C,E,F,G). Az, hogy mit jelent a kellő idő az adott rendszer sajátja. Esetenként néhány óra alatt szép egykristályok nőnek, máskor hónapokig vagy évekig kell várni, esetleg kísérletek ezreivel kell feltérképezni a fázisdiagramot. A mikrokristályok oldhatósága nagyobb, mint a nagyobb kristályoké a felületi energia miatt ([http://en.wikipedia.org/wiki/Solubility\\_equilibrium](http://en.wikipedia.org/wiki/Solubility_equilibrium)) és így átkristályosíthatók nagyobb méretű egykristállyá, vagyis a rendszert a nukleációs zónából vissza tudjuk vinni a metastabil zónába (2.4.4.1. ábra, G), és persze a körülmények változtatásának hatására több kristálymódosulat, polimorf is kiválhat, ahogy a 2.4.4.1. ábra mutatja (B,E,F,G). A fehérjék kristályosításáról lásd a 11. fejezetet és például a [http://www.ruppweb.org/xray/tutorial/pc\\_of\\_crystallization.htm](http://www.ruppweb.org/xray/tutorial/pc_of_crystallization.htm) oldalt.

### Kristályosítási kísérletek fázisdiagramon



A: Gyors bepárlás, mikrokristályos csapadék

**B: Lassú bepárlás, egykristály, 1. módosulat kristályai**

**C: Lecsapószer lassú hozzáadása, dialízis módszer**

D: Gyors bepárlás a metastabil zónából indulva, mikrokristályok

**E: Átkristályosodás a metastabil zónában, 2. módosulat**

**F: Bepárlás, kristályok növekedése, 3. polimorf**

**G: Mikrokristály kiválása, majd átkristályosodás**

2.4.4.1. ábra. A szilárd anyag – oldat fázisdiagram, egykristályok képződése

## 2.5. A kristályosítás kinetikája

A kristályosodás termodinamikájának leírása is elég empirikus, de a kinetika pontos leírása még nagyobb nehézségekbe ütközik (felhasználva: <http://oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/mezgaz/bioelvalmuveletek/krist/Krist%E1lysz%EDnes.pdf>).

### 2.5.1. A gócképződés kinetikája nemlineáris differenciálegyenletekkel írható le

Az első lépés a gócok képződése. A gócot, ha csak a szilárd fázisban is megtalálható anyagból állnak homogénnek, ha egy más anyag, vagy porszem működik gócként heterogén gócnak és gócképződésnek szokták nevezni. Mivel a  $\mu\text{m}$  alatti méretű porszemcsék teljes kizárása gyakorlatilag lehetetlen, a kizárólag homogén gócképződés bizonyítása nehéz. Ugyancsak nehézségekbe ütközik a gócok pontos számának detektálása és persze mechanikus hatásra (keveredés) a gócok összetörhetnek, másodlagos gócképződés lép fel. Az egykristályok előállításához fontos megfigyelés, hogy a kristályosodás-beoldódás ciklus során a gócok száma csökken, összetapadnak, illetve a kis gócok feloldódnak. Ha kevesebb a góc, nagyobb az esély, hogy egykristályt tudunk növelni. A kristályosodás-beoldódás ciklust periodikusan sokszor elvégezhetjük a hőmérséklet szűk tartományban történő változtatásával.

Mindenesetre a kísérletek azt mutatják, hogy a gócok számának ( $N$ ) időbeli változását nemlineáris kinetikával írhatjuk le ( $i > 1$ ), ha  $c$  az aktuális koncentráció (túltelített oldat),  $c^*$  pedig az egyensúlyi koncentráció (2.5.1.1. ábra),  $k$  a kinetikai együttható, ami függ a hőmérséklettől és egyéb tényezőktől.

$$\frac{dN}{dt} = k \cdot (c - c^*)^i$$

2.5.1.1. ábra. A gócképződés sebességét nemlineáris kinetika írja le.

### 2.5.2. A kristályok növekedéséhez mikroszkopikus vagy makroszkopikus keveredésre van szükség

A létrejött gócok növekedéséhez a góc környezetében újra túltelített rendszernek kell kialakulni. Ha a célunk egykristály növelése, ennek lassan kell történnie, tehát a diffúciónak kell engedni a főszerepet. Így tudunk elegendő időt biztosítani a kis kristályok visszaoldódására a nagyok hasznára, másrészt pedig a lassú növekedés miatt kevesebb kristályhiba lesz. Egykristályok növelésekor a rendszert nem szabad keverni vagy rázogatni, még mozgatni is csak lassan, elővigyázatosan hogy ne hozzunk létre turbulens áramlást a rendszerben. Ha a cél kristályok szabályozott előállítása pl. elválasztási folyamatként, akkor a konvekció által meghatározott anyagáram biztosítása nagyon fontos, mivel ezt viszonylag széles tartományban jól tudjuk befolyásolni. A keveréssel és a hűtési sebesség befolyásolásával elérhetjük, hogy a túltelítettség mértéke közel azonos legyen az egész mintatér fogatban.

### 2.5.3. A kristályok növekedési sebességét és a kristály jellemző méretét az határozza meg, hogy milyen messze van a rendszer az egyensúlytól

A kristályok tömegének ( $M$ ) változását időben lineáris differenciálegyenlet írja le és elsődlegesen a túltelítettség mértéke, vagyis az aktuális koncentráció és az egyensúlyi koncentráció különbsége határozza meg. Ha a sebesség-meghatározó a diffúzió, akkor a szorzótényező a  $k$  tömegátadási együttható (ami

függvénye a diffúziós állandónak, a viszkozitásnak, sűrűségnek stb.) és  $A$  a kristály felülete (2.5.3.1. ábra), vagyis Fick I. törvényét írhatjuk fel az adott esetre.

$$\frac{dM}{dt} = k \cdot A \cdot (c - c^*)$$

2.5.3.1. ábra. A diffúzióval kontrollált kristálynövekedési sebesség

Amennyiben a konvekció nem hanyagolható el a tömegátadás két egymást követő folyamat eredménye. A 2.5.3.2. ábrán szereplő egyenletben  $k$  a keverés intenzitásától és az oldat tulajdonságaitól (pl. viszkozitás) függő sebességi állandó, míg  $\kappa$  a felületi reakciósebességi állandó ami a hőmérséklettől függ. A felület folyamatosan változik a kristály növekedésekor, ezért ez a leírás a gyakorlatban nehezen alkalmazható.

$$\frac{dM}{dt} = \frac{1}{\frac{1}{k} + \frac{1}{\kappa}} A \cdot (c - c^*)$$

2.5.3.2. ábra. A kristály tömegének növekedését leíró differenciálegyenlet ha a konvekciós anyagáram nem hanyagolható el. Magyarázat a szövegben.

A fentieket összegezve a kristály hosszirányú ( $l$ ) növekedési sebessége (2.5.3.3. ábra) csak a túltelítettség mértékétől függ ( $\Phi_A$  és  $\Phi_V$  a felülettől illetve a térfogattól függő konstansnak tekinthető alaktényezők és  $\rho$  a sűrűség). A rendszer a közel egyenletes kristálméret-eloszlás elérésére törekszik. Másrészt viszont, ha a kristályosodás termodinamikailag közel egyensúlyi rendszerben történik fellép az Ostwald érés jelensége ([http://en.wikipedia.org/wiki/Ostwald\\_ripening](http://en.wikipedia.org/wiki/Ostwald_ripening)). Nagyobb kristályok képződése termodinamikailag kedvezőbb. Mivel a kisebb kristályok felületi energiája nagyobb, ezek idővel feloldódnak és így rovásukra a nagyobb kristályok tovább növekedhetnek. Másképpen megfogalmazva:  $c^*$  a telített oldat koncentrációja makroszkópikus kristályokra vonatkozóan, de kis méretű (különösen  $\mu\text{m}$ -es vagy az alatti) kristályok oldhatósága nagyobb (folyadék-gőz rendszerekre lásd Kelvin-egyenlet, [http://en.wikipedia.org/wiki/Kelvin\\_equation](http://en.wikipedia.org/wiki/Kelvin_equation)).

$$\frac{dl}{dt} = \frac{2\Phi_A}{\Phi_V \cdot \rho} \cdot \frac{1}{\frac{1}{k} + \frac{1}{\kappa}} \cdot (c - c^*) = k_g \cdot (c - c^*)$$

2.5.3.3. ábra. A kristály hosszának növekedési sebessége adott irányban. További magyarázat a szövegben.

## 2.6. Hasznos tanácsok egykristályok növelésére

A röntgendiffrakciós vizsgálatokra alkalmas egykristályok előállításához a legfontosabb tanács a türelem és a gondos kísérleti munka. A 2.6.1. video bemutatja a lizozim kristályosodását egy éjszaka alatt. A lizozim kristályosítására a 15.2.1. fejezetben egy jól működő receptet is közlünk.

2.6.1. videó. [Lizozim kristályosodása](#)

### 2.6.1. Az egykristályok a tökéletesen fejlett kristályok

A röntgendiffrakciós mérésre alkalmas egykristályokkal szemben ideális körülmények között a következő követelmények teljesülnek.

- ‘Tökéletesen’ fejlett, azaz nem gömbszerű, síklapok határolják.
- Lehetőleg 0,1-0,5 mm minden irányban hogy teljes mértékben a röntgensugárban legyen a mérés során.
- Anyalúgban tartjuk, hogy ne veszítse el a kristály felületén vagy benne lévő oldószer molekulákat.
- Nem kenőcsös, krémes állagú.
- Csillogó kristályok, melyek polarizált fényben sem mutatnak feszültséget és fázishatárokat.
- Lehetőleg nem tűszerű vagy lapka, mert ezek mérése körülményesebb, de a morfológiát nehéz befolyásolni.

Persze az élet nem mindig egyszerű, sokszor olyan kristályokkal kell dolgoznunk, és akár sikeres is lehet a szerkezet-meghatározás, amelyek nem teljesítik a fenti követelményeket. A nagyobb kristályok darabolásával, a kristály szemcsék óvatos szétválasztásával a látható összenövési határokon kiválaszthatjuk az adott készletből a mérésre legmegfelelőbb egykristályt. A fehérjék kristályosításával kapcsolatban lásd a 11. fejezetet.

### 2.6.2. Egykristályok előállítására a legegyszerűbb módszer a lassú bepárlás

Talán ez a leggyakrabban alkalmazott módszer kis molekulák kristályosítására. Sokszor az asztalon felejtett oldatból is megfelelő kristályok válnak ki. Természetesen a göcök számának csökkentése és a bepárlás sebességének lassítása tovább segít. Hasznos a kristályosítandó oldatot parafilmmel lezárni megakadályozandó a porszemek behullását és a parafilmen ütött néhány lyuk biztosítja a lassabb bepárlódást is. Alacsony forráspontú (pl. éter, diklórmétán) vagy magas forráspontú (DMSO, DMF) oldószerek ennél a módszernél kerülendők és persze arra is vigyázni kell, hogy az oldószer gőzök ne oldják a parafilmet.

### 2.6.3. A hőmérséklet csökkentésével általában csökken az oldékonyság

Az oldékonyság csökkenését a hőmérséklet-csökkenés hatására (exoterm oldáshő) az ipari egykristály előállító berendezések is kihasználják. Egykristályok előállítására a forró és közel telített oldatot lassan hagyjuk lehűlni, esetleg egy nagyobb forró vízzel telt Dewar edényben vagy a kikapcsolt termosztátban hagyva lassíthatjuk a lehűlést. A hőmérséklet periodikus változtatásával a göcök számát tudjuk csökkenteni, ha a telített oldatot addig hűtjük, míg egy kevés szilárd anyag jelenik meg, majd újra felmelegítjük a rendszert a feloldódás eléréséig. Ehhez jól használható egy programozható termosztát, de



mivel a közeg keringetése mindig rezgéseket is eredményez az utolsó lépésben célszerű a termostát kikapcsolásával hagyni lehűlni a rendszert és várni az egykristályok képződését. Ez a módszer jól alkalmazható levegőre érzékeny anyagok esetén is. A Laborexport Kft. által kifejlesztett kristályosító készülékben (2.6.3.1. ábra) az elvékonyított kémcsőben telített oldat van és az üvegeszköz alján szilárd anyagot is hagyunk. Az alsó rész hőmérséklete  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ami oldódást és lassú lamináris áramlás kialakulását okozza, az anyag felfelé halad ahol a hőmérséklet  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a metastabil zónában lévő rendszerünk van és várhatóan itt egykristályok növekednek. A kémcső alját periodikusan  $40\text{-}70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hőmérsékletre is fűthetjük, ami a lamináris áramlás perturbálását eredményezi. A készülék nagy előnye, hogy nem tartalmaz mozgó alkatrészt, nincs rázkódás és inert közegben is lehet vele kristályosítani.

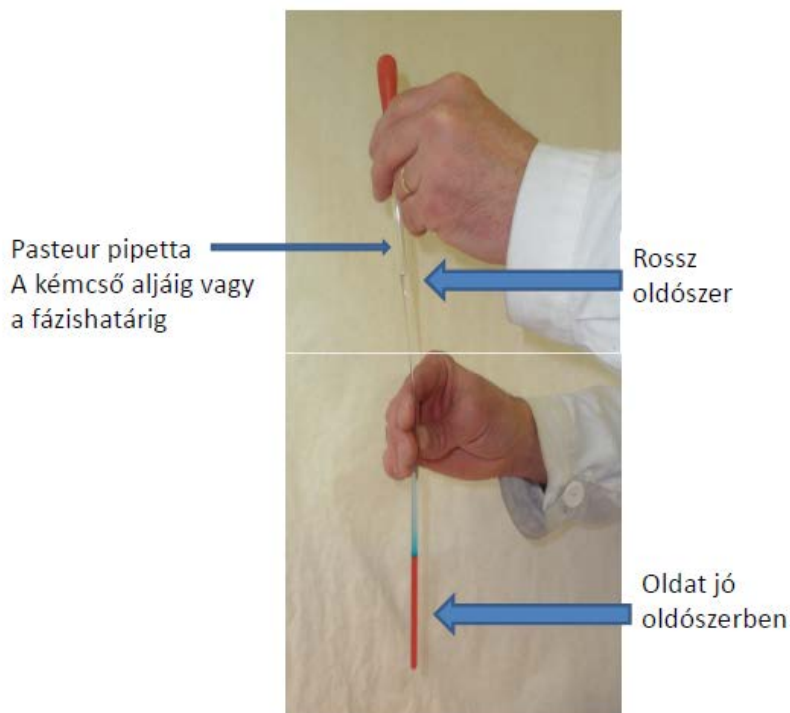


2.6.3.1. ábra Egykristályok előállítására alkalmas készülék

#### **2.6.4. Rossz oldószert vagy lecsapószert diffundáltatva az oldatba elérhetjük a metastabil zónát**

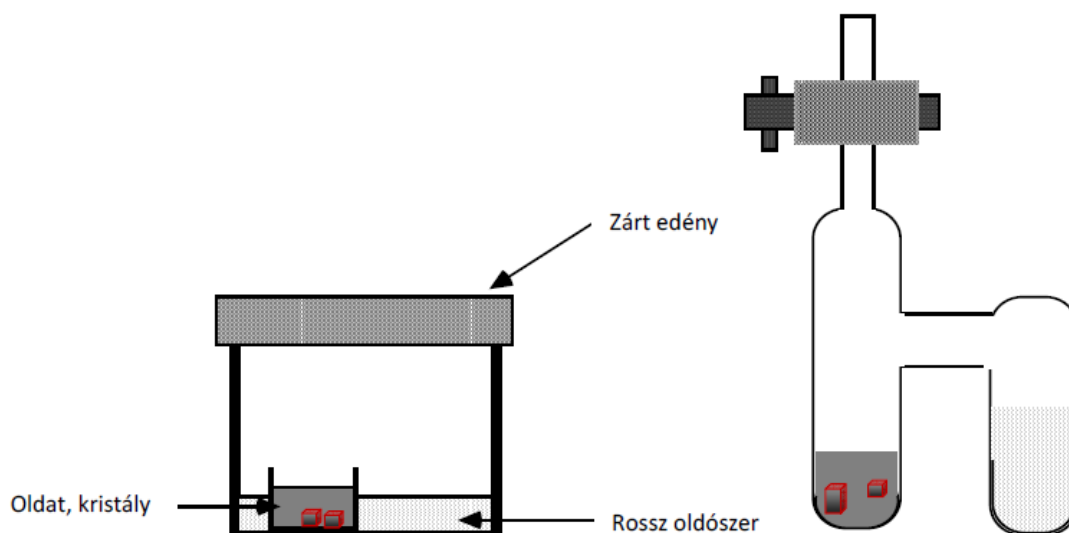
Egy másik nagyon gyakran alkalmazott módszer azt használja ki, hogy az oldhatóságot úgy is csökkenthetjük, hogy az anyag jó oldószerehez egy vele elegyedő rossz oldószert adagolunk, és így lassan elérjük a metastabil zónát majd az oldhatósági határt: szilárd formában kiválik az anyag. A diffúzió segítségével a két oldószert keveredése kellően lassú (2.6.4.1. ábra). A sikeres kísérlethez természetesen előzetesen fel kell deríteni az anyagunk oldhatósági tulajdonságait (jó és rossz oldószert), esetenként több oldószert kombinációját is alkalmazhatjuk (víz- metanol-hexán) különböző térfogatarányokban. A tapasztalatok szerint néhány nap vagy hét alatt válnak ki egykristályok ilyen rendszerekben. Az etil-acetát (bepárláskor) illetve a hexán - etil-acetát elegy sokszor bizonyult jó oldószert kombinációnak. Nem célszerű

nagy koncentrációk alkalmazása, mivel akkor a szennyezők mennyisége is jelentős. Ha a bediffundáló oldószer kis mennyiségére is megindul a csapadék kiválás, akkor célszerű tiszta jó oldószert is rétegezni az oldatra és erre a lecsapószert. Ha a rárétegzéskor csapadék válik ki (2.6.4.1. ábra) a jó oldószer diffúziója miatt a kristályok általában később feloldódnak és a határretegtől távolabb várhatjuk egykristályok megjelenését az üvegre tapadva.



2.6.4.1. ábra. Egykristály növelése rossz oldószert rétegezve az oldatra.

A diffúzió sebességét csökkenthetjük, ha a rossz oldószert a gőztéren át juttatjuk a rendszerbe (2.6.4.2. ábra). Ha az eszközt hűtőszekrénybe helyezzük a kristálykiválás több hónap alatt következik be. Ebben az esetben célszerű olyan rossz oldószert választani, aminek már kis mennyisége is jelentősen csökkenti az oldhatóságot, de persze elegendik a jó oldószerral.



2.6.4.2. ábra. Egykristály növelése gőztéren át történő diffúzióval

## 2.7. Jó tanácsok: Mit csináljunk, és mit ne csináljunk egykristály növelésekor?

Általában a következő tanácsokat adhatjuk röntgendiffrakciós vizsgálatra alkalmas egykristályok előállításához:

Ellenion megváltoztatásával a rácskölcsönhatásokat drasztikusan befolyásolhatjuk (merev ionok, PPN<sup>+</sup> (Trifenil[(trifenilfoszforanilidén)amino]foszfónium, nagyon nagy térkitöltésű kation), BPh<sub>4</sub><sup>-</sup>, szulfonátok)

- Törekedjünk merev H-hidas szerkezetek kialakítására (guanidinium kation)
- A pH változtatás fontos eszköz protonálódásra vagy deprotonálódásra alkalmas anyag esetén a rendeződés befolyásolására
- Ha nem sikerül egykristályt növelni próbálkozzunk másik származék kristályosításával. Egy szubsztituens cseréje hasznos lehet, és a megválaszolható szerkezeti problémát esetleg nem befolyásolja
- Adalékok és beoltás segítheti a kristály kiválását (11. fejezet).

Végezetül néhány tanács, mit érdemes elkerülni:

- NE kristályosítsunk reaktív rendszereket
- NE rázogassuk az edényünket
- NE kristályosítsunk nem tiszta, több komponensű rendszereket
- NE engedjük teljesen bepárolódni az anyagot (anyalúg maradjon a kristályon)
- NE használjuk a ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, SiF<sub>6</sub><sup>-</sup>, Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> ionokat (lehetőség szerint, mivel hajlamosak rendezetlenségre vagy annak indukálására).
- NE használjunk könnyen párolgó oldószereket (lehetőség szerint, mivel könnyen a rács összeomlását okozza az oldószer eltávozása).

[Teszt](#)

### 3. Kristályok szerkezete, szimmetriája, tércsoportok (Bényei Attila)

#### Irodalom

A szimmetria és a tércsoportok szemléletes leírása, az IUCR oktatási segédlete

- <http://www.iucr.org/education/pamphlets/13>

A szimmetria a krisztallográfiában, szimmetria műveletek, tércsoportok, franciául, az IUCR oktatási segédlete

- <http://www.iucr.org/education/pamphlets/6>

A tércsoportok és a szimmetria műveletek szemléletes leírása gyakorló feladatokkal, az IUCR oktatási segédlete

- <http://www.iucr.org/education/pamphlets/14>

Szimmetria a művészetben

- Hermann Weyl: Szimmetria Gondolat, Budapest, 1982

Hargittai Magdolna és Hargittai István számos könyvet és cikket írt a szimmetriáról

- Hargittai István: Szimmetria – egy kémikus szemével, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1983
- Hargittai István, Hargittai Magdolna: Fedezzük fel a szimmetriát, Tankönyvkiadó, Budapest, 1989
- Hargittai István, Hargittai Magdolna: Képes szimmetria, Galenus Gyógyszerészeti Kiadó, Budapest,
- <http://members.iif.hu/visontay/ponticulus/rovatok/hidverok/hargittai.html>

Tudománytörténeti érdekességek szimmetria vonatkozásokkal

- Hargittai István, Hargittai Magdolna: Szimmetriák a felfedezésben, Vince Kiadó, Budapest, 2003

M.C. Escher grafikái:

- <http://www.mathe.tu-freiberg.de/~hebisch/cafe/mce/escher.html>

Tércsoportok diagramjai:

- <http://img.chem.ucl.ac.uk/sgp/mainmenu.htm>

### 3.1. A geometriai szimmetria csoportelmélettel axiomatikusan leírható (Bényei Attila és Harmat Veronika)

A mindennapokban és a tudományban a 'szimmetrikus' kifejezést számos esetben alkalmazzuk. Szimmetrikus lehet egy zenemű, egy arc, egy elmélet is. A modern fizika megszületését a XX. század elején nagyban segítette a szimmetria szerepének felismerése. Az LHC-ben (Large Hadron Collider) napjainkban végzett kísérletek is közvetlen kapcsolatban vannak a szimmetria illetve a szimmetriasértések megértésével. 2008-ban a Nobel díjat ([http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/physics/laureates/2008/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/2008/)) ebben a témában elért eredményekért kapták japán kutatók, de még nagyon messze vagyunk a szimmetria szerepének teljes feltérképezésétől a fizikai világban!

A krisztallográfiában és a diffrakciós szerkezet-meghatározásban a geometriai szimmetriának van jelentősége, ezért a szimmetriát csak ebben az értelemben, vagyis térbeli pontok közötti kapcsolatként vizsgáljuk. Szimmetria művelet az a tevékenység, amit végrehajtva az alakzaton a tőle megkülönböztethetetlen (de vele nem azonos) párját vagy enantiomer párját kapjuk. Szimmetria elem vagy szimmetria operátor olyan geometriai transzformáció, ami generálja a megfelelő szimmetriaműveletet.

A szimmetria csoportelméleti alapokon axiomatikusan tárgyalható. Csoportoknak a matematikában (<http://hu.wikipedia.org/wiki/Csoport>) olyan struktúrákat nevezünk, melyek két-két tagja között definiálunk egy hozzárendelést (műveletet). Ezt rendszerint szorzásnak nevezzük és rá teljesülnek a következő feltételek:

- A művelet (szorzás) eredménye is tagja a csoportnak
- A művelet (szorzás) asszociatív, azaz  $(AB)C=A(BC)$
- Létezik egység elem (E)
- Minden elemnek létezik inverze ( $A^{-1}$ ), amelyre  $AA^{-1} = A^{-1}A = E$

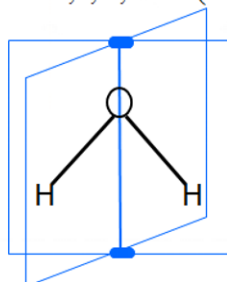
A szokásos értelemben használt szorzás művelet kommutatív is, azaz  $AB=BA$ . Az ilyen csoportokat kommutatív vagy Abel csoportnak nevezzük. A szimmetriát leíró csoportokra ez a feltétel nem mindig teljesül, vagyis a szimmetria műveletek sorrendje is számít.

A molekulák mint izolált egységek szimmetriájának leírására a pontcsoportokat használjuk, a vízmolekula példáját mutatja a 3.1.1. ábra. A pontcsoport olyan szimmetria műveletek csoportja, amelyek mindegyike legalább egy pontot változatlanul hagy. A krisztallográfiai pontcsoport olyan pontcsoport, ami pontrácsot önmagába visz át. A krisztallográfiai pontcsoportok száma 32, ezekben a forgástengely például csak 1,2,3,4 vagy 6 fogású lehet, a többi szimmetriaelemet lásd később. A nem krisztallográfiai pontcsoportok megadják a molekulák és például a kvázikristályok szimmetriáját. Ezekben bármilyen fogású forgástengely lehet, tehát számuk végtelen. A krisztallográfiai és nem krisztallográfiai pontcsoportok összefoglaló neve általános pontcsoportok. A kvázikristályok szerkezetének értelmezésénél különösen fontosak az 5-fogású forgástengelyt tartalmazó pontcsoportok.

Pl.: H<sub>2</sub>O C<sub>2v</sub> szimmetriájú, a csoportelemek: 1, 2, m, m' (Hermann-Mauguin szimbólumok)

Szorótábla:

	1	2	m	m'
1	1	2	m	m'
2	2	1	m'	m
m	m	m'	1	2
m'	m'	m	2	1



3.1.1. ábra. A vízmolekula szimmetriája C<sub>2v</sub> pontcsoport - a molekulaszimmetriát leíró pontcsoportok jelölésére a Schönflies szimbólumok használata terjedt el (ugyanennek a pontcsoportnak a kristallográfiában elterjedt Hermann-Mauguin jelölése: mm2).

A szimmetria műveletek meghatározzák az egymással ekvivalens pontok (pl. a kristályban az atomok) koordinátáit. Fizika tanulmányainkból tudjuk, hogy a koordináta-rendszer szerencsés megválasztása segítheti a jelenség egyszerűbb leírását. A diffrakció jelenségének értelmezésére és a szerkezet leírására több koordináta-rendszert alkalmazunk, az ezek közötti átlépést a transzformációs mátrixok teszik lehetővé.

- A rács önmaga kifeszít egy koordináta-rendszert, amiben a tengelyek irányát és az egységet az elemi cella bázisvektorai határozzák meg. Az atomok rácsban elfoglalt helyének leírására célszerű választás, ha az atomok koordinátáit ebben a koordináta-rendszerben, ún. frakcionális koordinátaként adjuk meg. Ez nem minden esetben ortogonális koordináta-rendszer, de a rácsban való tájékozódást egyszerűsíti (a szimmetria-ekvivalens atomok koordinátái egyszerűbb formában adhatók meg, mint a Descartes koordináta-rendszerben). Az origó egy cellaél mentén való eltolás mértékéig tetszőleges, de egyes tércsoportokban az elemi cellán belül is több lehetőség van az origó kijelölésére.
- Az atomok helyét megadhatjuk ortogonális koordináta-rendszerben is, amelyben az egységek mindhárom irányban egyformák (pl. nm, vagy Å), a megfelelő transzformáció után (Descartes koordináta-rendszer). Ennek előnye, hogy a makroszkopikus világunkkal jobban összevethető, de fontos, hogy az ortogonalizálás előtt felmérjük, hogy milyen szimmetria szerint megadott rácsrészletek lesznek szükségesek a vizsgálatokhoz. Például ha a kémiai molekula speciális pozícióban van a rácsban vagy a hosszabb távú rendezettség vizsgálata a cél, akkor az ortogonalizálás előtt a teljes molekulát illetve több elemi cellát kell kijelölnünk, hogy a teljes koordinációt figyelembe tudjuk venni. Az ortogonalizációs (<http://en.wikipedia.org/wiki/Orthogonalization>) mátrixot és annak inverzét a kristallográfiái programok kiszámolják.
- A diffrakciós kísérletben a kristályt a diffraktométer által megadott koordináta-rendszerben vizsgáljuk. A kristályt 3 vagy 4 tengely körül forgatjuk. Ezek metszéspontja az origó, ami a diffraktométer mechanikájával és beállításával szembeni fontos követelményt jelent: a tengelyeket akár tized μm pontossággal kell beállítani. Kis molekulák esetén a forrás-kristály-detektor távolságok állandóak, térdetektoros készülékeknél a detektor-kristály távolságot a

rácsállandó nagyságától függően lehet és célszerű változtatni (ld. 4. fejezet). Szerencsére a diffraktométert működtető software a méréssel kapcsolatos koordináta transzformációkat elvégzi, és ha szükséges, figyelembe veszi a redundanciát 4 forgástengely esetén.

- Sok esetben célszerű egy, a molekulához kötött koordináta-rendszer alkalmazása, amit Z mátrixnak ([http://en.wikipedia.org/wiki/Z-matrix\\_%28chemistry%29](http://en.wikipedia.org/wiki/Z-matrix_%28chemistry%29)) neveznek. Az atomok  $x,y,z$  koordinátái (Descartes vagy a rácshoz kötött koordináta-rendszerben) helyett használhatjuk a kötéstávolságokon, kötésszögeken és diéderes szögeken (belső koordináták) alapuló helymegjelölést. Mivel a kémia miatt ezekre a paraméterekre közvetlenül tudunk tenni szigorúbb vagy enyhébb megkötéseket a molekula ill. funkciós csoportok geometriájára vonatkozó előzetes ismereteink (pl. szerkezeti adatbázisból) felhasználásával, jelentősen lecsökkenthető a független paraméterek száma. Ennek például a pordiffrakciós adatokból történő szerkezet meghatározásnál lehet fontos szerepe, amikor az adatpontok korlátozott száma miatt a finomítandó paraméterek számát is csökkenteni kell. Molekulageometria optimalizálásánál, számítástechnikai kémiai feladatoknál is a Z-mátrixot használják.
- A rács Fourier transzformálja a reciprokrács, aminek részletes leírása a 3.6. fejezetben található. A diffrakciós maximumok és értelmezési tartományuk, illetve a reciprokrács szimmetriája a kristályszimmetriából levezethető.

Mindegyik koordináta-rendszer jobbsodrású. A szimmetriaelemek csoportot alkotnak. A szimmetriaelemekhez azokat a mátrixokat rendeljük, amelyeket a koordináta vektorral szorozva megkapjuk az adott transzformációt. A szimmetria miatt az atomok koordinátái között egzakt összefüggés van. Ebből következően a molekulákban (vagy molekularészletekben ha speciális helyzetben van, 2.1.2.1. ábra) a kötéstávolságok és a kötésszögek is azonosak. A szimmetria ekvivalens atomi koordináták kiszámítása adott atom helyvektorából ( $\mathbf{r}=(x,y,z)$ ) a szimmetria operátor forgatási mátrixának és eltolási vektorának felhasználásával:  $\mathbf{r}'=[C]\mathbf{r}+\mathbf{t}$ . A szimmetria ekvivalens pozíciók kiszámítására példákat a 3.8. fejezetben mutatunk.

Makromolekulák kristályaiban csak azok a szimmetriaoperátorok fordulhatnak elő, amik nem változtatják meg a sztereogén centrumok (kiralitáscentrumok) konfigurációját, mivel a természetes fehérjékben és nukleinsavakban az aminosav- és cukor-egységeknek csak az egyik enantiomerje fordul elő. E szimmetriaoperátorok a következők (Hermann-Mauguin jelöléssel; néhány szemléltető ábra a 3.8. fejezetben található):

- Egységoperátor: 1
- Forgástengelyek: 2, 3, 4, 6
- Csavartengelyek:  $2_1, 3_1, 3_2, 4_1, 4_2, 4_3, 6_1, 6_2, 6_3, 6_4, 6_5$

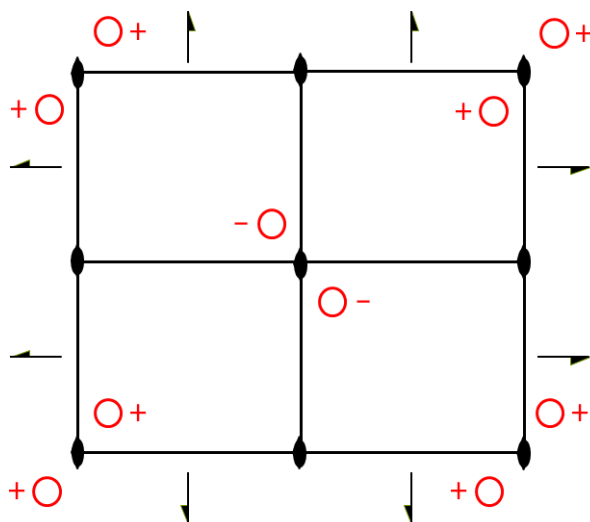
Kismolekuláknál további szimmetria operátorok lehetségesek akirális szerkezetek, vagy rezolválatlan racém elegyek esetén:

- Inverziós centrum:  $i$
- Tükörsík:  $m$
- Csúszósíkok:  $a, b, c, n, d$  (jelölésük:  $a,b,c$ : a megfelelő cellaél irányába csúsztatja a tükrözött molekulát,  $n$ : mindkét, a síkkal párhuzamos cellaél irányába csúsztat,  $d$ : a gyémántrácsban előforduló csúszósíkok)

- Inverziós forgatás: -3, -4, -6
- Csavartengely, vagy forgástengely inverziós centrummal: 2/m, 3/m ...

A tércsoportok felsorolása a Nemzetközi Krisztallográfiai Táblázatok A kötetében található. Ez tartalmazza többek között a következőket:

- Az elnevezésük (nagy betű: rácstípus, majd a kitüntetett térirányok szimmetria operátorai), a kristályrendszer, megfelelő pontcsoport.
- Diagramjuk (egy vagy több jellemző nézet, a szimmetria operátorok elhelyezkedésével és a szimmetria ekvivalens pozíciókkal, példa: 3.1.2. ábra)
- A szimmetria operátorok és a szimmetria ekvivalens pozíciók koordinátái
- Az aszimmetrikus egység mérete és elhelyezkedése. (Szerkezet-meghatározáskor csak ezeknek az atomoknak kell meghatároznunk a koordinátáit, a többi atom koordinátái ezekből kiszámíthatók.)
- Kioltási szabályokhoz kapcsolódó reflexiók feltételek.



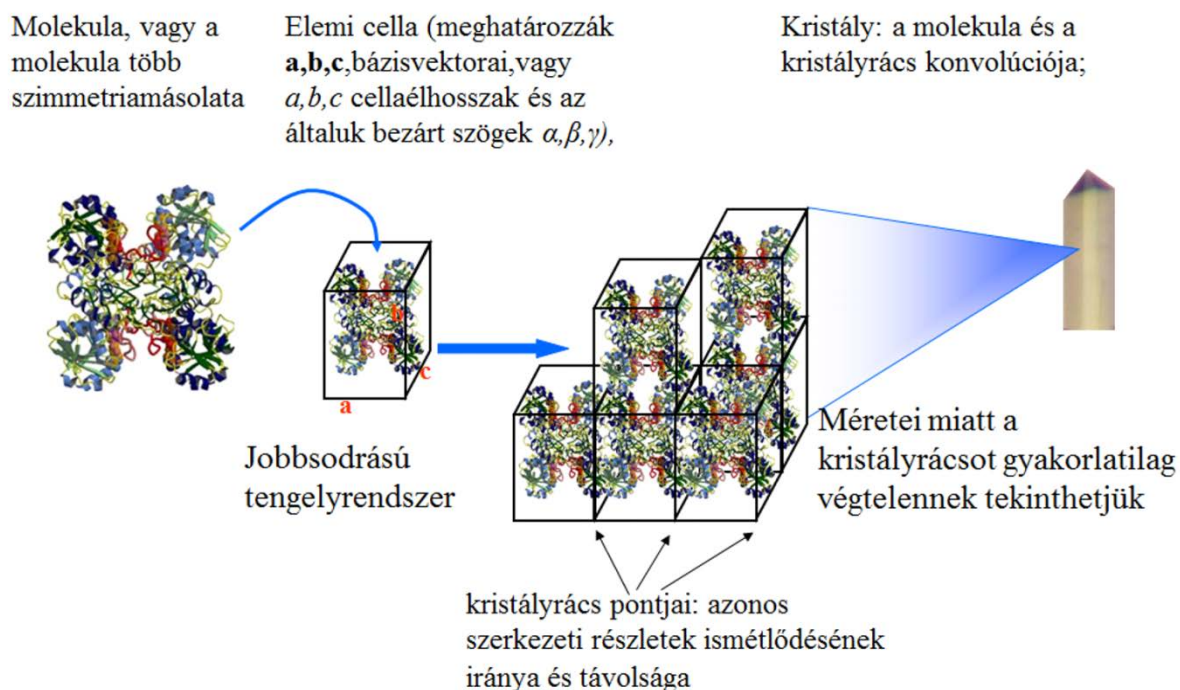
3.1.2. ábra Elemi cella diagramja, példa. Tércsoport  $P2_12_12$  (18., ortorombos kristályrendszer), a diagram az elemi cella sematikus képe a c tengely irányából nézve. A Hermann–Mauguin szimbólum feloldása: P: primitív cella,  $2_12_12$  a három kitüntetett térirányból kettőben (ortorombos tércsoportoknál a cellaélekkel párhuzamosan) kétfogású csavartengelyek, egyben kétfogású forgástengely fut (fekete jelek). A piros jelek az ekvivalens pozíciókat szimbolizálják (a + és – jel az ábrázolt sík alatt ill. fölött elhelyezkedő atomra utal, az enantiomer pár másik tagját vessző jelöli (ebben a tércsoportban nincs ilyen)). Az aszimmetrikus egység az elemi cella negyede.

## 3.2. Az elemi cellában és az aszimmetrikus egységben egy vagy több ismétlődő motívum található (Bényei Attila és Harmat Veronika)

Az elemi cella a kristály legkisebb egysége, amit az elemi cella élei mentén eltolva belőle a teljes makroszkopikus kristály felépíthető (lásd még: 2.1.1. fejezet). Az aszimmetrikus egységet a szupramolekuláris minőségnek nevezhetjük, amire a tércsoport szimmetriáját alkalmazva belőle az elemi



cella felépíthető (lásd még: 2.1.1. fejezet). A kristályokban megengedett szimmetria operátorok hézagmentes térkitöltést biztosítanak, 5-, 8- vagy 10-fogású szimmetriát csak a kvázikristályokban találunk. A kristály a rács és az ismétlődő motívum (az elemi cella tartalma) konvolúciójaként áll elő (3.2.1. ábra).



3.2.1. ábra. A kristály felépülése: a rács és a motívum együttesen adja az elemi cellát amit eltolva a kristály felépül.

Előfordul, hogy az aszimmetrikus egységben a molekulából több található. Makromolekulák kristályainál ezeknek a konformációja általában gyakorlatilag megegyezik (eltekintve a felszíni, mozgékony aminosav oldalláncoktól) – pontosan ez, az oldatban is stabil térszerkezet teszi lehetővé, hogy a fehérjék kristályosíthatók legyenek. Ez a konformációs hasonlóság teszi lehetővé, hogy a lokális, nemkristallográfiai szimmetriát (3.8.5. ábra) kihasználjuk szerkezetfinomításkor és modellépítéskor, sőt, a nagy saját-szimmetriával rendelkező vírusok esetén a fázisprobléma megoldása is ezen alapul. A röntgendiffrakció egyik nagy előnye, hogy a leírás elvileg hasonló, ha a motívum egy fématom, egy kis molekula vagy egy fehérje komplex.

### 3.3. Három dimenziós tér 230 tércsoport szerint tölthető ki maradéktalanul egyforma idomokkal

A krisztallográfiában 230 tércsoport segítségével tudjuk leírni három dimenzióban az kristály szimmetriáját. Míg a pontcsoportok zárt alakzatok szimmetriáját írják le, szimmetria operátoraik egy ponton mennek keresztül, addig a tércsoportokban a szimmetriaoperátorok, és ismétlődő (atomi) mintázatok a tér három dimenziójában végtelenül ismétlődnek (a kristályok véges kiterjedésűek, de az elemi cella és a kristály méretbeli különbségéből adódik, hogy a végtelen sokszoros ismétlődést

tartalmazó matematikai modell a gyakorlatban jól működik). A szimmetriaműveletek megismerését a [pointgroup.exe](http://pointgroup.exe) interaktív program segíti.

A kibontás után a WIN95 alkönyvtárból 64 bites operációs rendszer alatt is fut a pointgrp.exe programot.

A kis molekulákat tartalmazó CSD adatbázisban lévő kb. 600000 szerkezet vizsgálata azt mutatja, hogy a szerkezetek eloszlása a tércsoportok között nagyon nem egyenletes. Néhány tércsoport nagyon kitüntetett, míg másokban csak elvétve kristályosodnak anyagok (3.3.1. ábra). A.I. Kitaigorodszkij megjósolta, hogy a szoros térkitöltés eredményeként a molekulárcsós vegyületek inkább a monoklin és ortorombos rendszerben kristályosodnak és ez egyenlenséget okoz a tércsoportok megjelenési számában. A fehérje szerkezeteket tartalmazó PDB adatbázisban is azt találjuk, hogy az egyes tércsoportok előfordulási gyakorisága messze nem egyenletes.

**Cambridge Structural Database**  
1 January 2012

**CSD Space Group Statistics – Space Group Frequency Ordering**

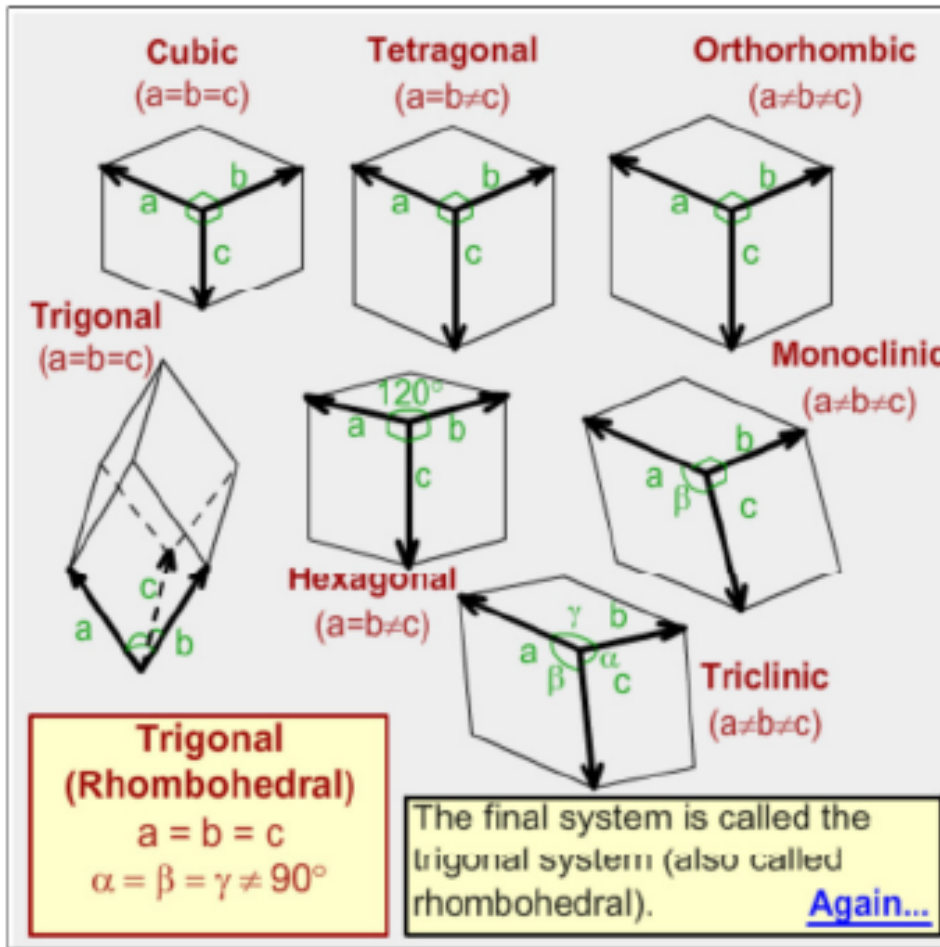
Space group frequency ranking for the 592,938 CSD structures for which the space group is fully defined. Statistics for enantiomorphous space groups are as reported in the CSD.

Rank	SG No.	Space Group	No. in CSD	% of CSD
1.	14	P21/c	206840	34.9
2.	2	P-1	140772	23.8
3.	15	C2/c	48584	8.2
4.	19	P212121	45008	7.6
5.	4	P21	31429	5.3
6.	61	Pbca	20490	3.5
7.	33	Pna21	8234	1.6
8.	62	Pnma	6837	1.2
9.	9	Cc	6318	1.1
10.	1	P1	5664	1.0
11.	60	Pbcn	5161	0.9
12.	5	C2	5006	0.8
13.	29	Pca21	4319	0.7
14.	13	P2/c	3703	0.6

3.3.1. ábra. A leggyakoribb tércsoportokban talált szerkezetek száma a CSD adatbázisban, [http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/csd/statistics/stats\\_sgrankorder\\_Jan2012.pdf](http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/csd/statistics/stats_sgrankorder_Jan2012.pdf)

### 3.4. Az ásványtanból ismert hét kristályrendszer és a 14 Bravais-rács

Az ásványtanban is tanult (<http://hu.wikipedia.org/wiki/Krist%C3%A1lyszerkezet>) hét kristályrendszert mutatja a 3.4.1. ábra. Az elemi cella alakja meghatározza, hogy milyen szimmetriaelemek fordulhatnak elő az adott kristályban, ugyanis a kristálybeli szimmetriaoperátorok a kristályrács pontjait egymásba viszik (pl. kétfogású forgatás feltételezi, hogy a tengely merőleges a kristályrács valamely síkjaira - pl. az elemi cella egyik lapjára; négyfogású forgatás feltételezi, hogy a tengelyre merőleges elemi cella-lap négyzet, tehát itt az elemi cella négyzet alapú egyenes hasáb).



3.4.1. ábra. A hét kristályrendszer,

<http://www.materials.ac.uk/elearning/matter/Crystallography/3dCrystallography/7crystalsystems.html>  
 applet

Kristályrendszer	Megkötések a cella paraméterekre	Elemi cella paraméterek száma
Triklin (háromhajlású)	nincs, $a \neq b \neq c$ , $\alpha \neq \beta \neq \gamma$	6 ( $a, b, c, \alpha, \beta, \gamma$ )
Monoklin (egyhajlású)	$a \neq b \neq c$ , $\alpha = \gamma = 90^\circ$ vagy $\alpha = \beta = 90^\circ$	4 ( $a, b, c, \beta$ vagy $a, b, c, \gamma$ )
Rombos	$a \neq b \neq c$ , $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	3 ( $a, b, c$ )
Tetragonális (négyzetes)	$a = b \neq c$ , $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	2 ( $a, c$ )
Trigonális	$a = b \neq c$ , $\alpha = \beta = 90^\circ$ , $\gamma = 120^\circ$ vagy $a = b = c$ , $\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$	2 ( $a, c$ vagy $a, \alpha$ )
Hexagonális (hatszöges)	$a = b \neq c$ , $\alpha = \beta = 90^\circ$ , $\gamma = 120^\circ$	2 ( $a, c$ )
Szabályos (kübös)	$a = b = c$ , $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	1 ( $a$ )

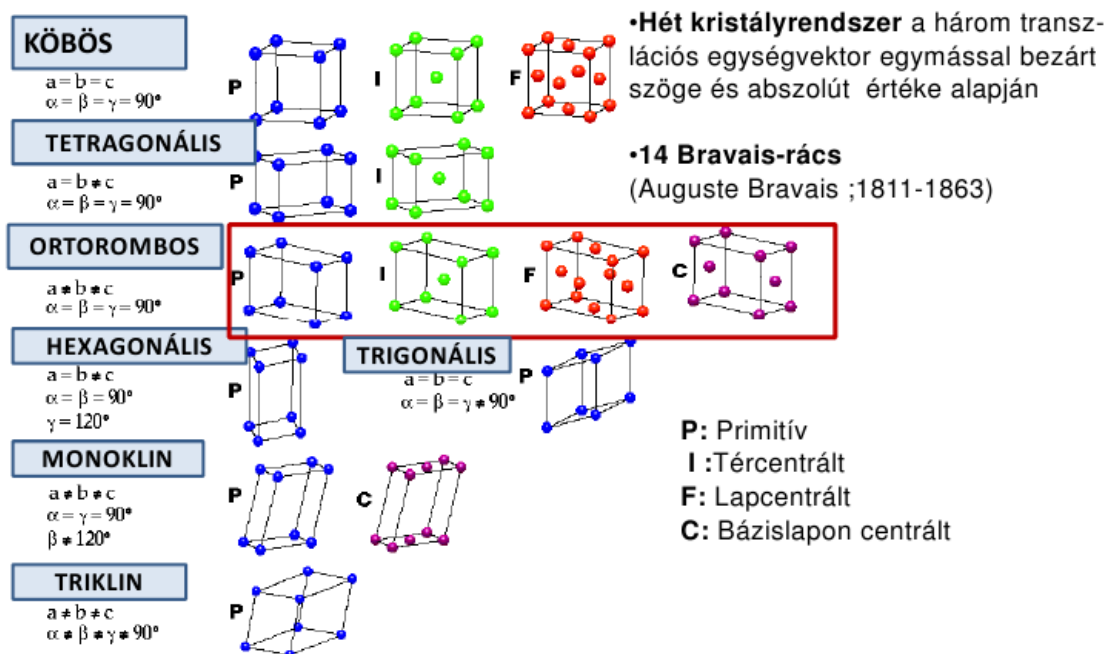
3.4.2. ábra. Az elemi cella paraméterei a hét kristályrendszerben.

Az elemi cella paramétereit a hét kristályrendszerben a 3.4.2. ábra mutatja. Ezek szerint az elemi cella leírása minimum 1 (kübös rendszer), maximum 6 (triklin rendszer) paramétert igényel. A diffrakciós kísérletben ehhez adódik az orientációs mátrix 9 paramétere. Általában törekszünk az elemi cellát standard elrendezésben (standard setting) közölni (pl. monoklin rendszerben a  $\beta$  szög tér el  $90^\circ$ -tól és úgy

választjuk meg az elemi cellát, hogy az nagyobb, legyen, mint  $90^\circ$ . Egy gyakorlati probléma az a jelenség, ha a szögek értéke véletlenül nevezetes szög (pl.  $90^\circ$ ). Ekkor a diffrakciós mérés kezdetén a valóságos kristályszimmetriánál tévesen magasabb szimmetriára következtethetünk az elemi cella alakjából. Természetesen a szimmetria nem alacsony vagy magas, ezt a pongyola megfogalmazást annak jelzésére szoktuk használni, hogy kevesebb vagy több szimmetria elem van a tércsoportban. Mint minden kísérletes módszernél a mérési hibát is figyelembe kell venni, azaz az elemi cellát néhány reflexióból meghatározva a szögek néhány tized fokkal eltérhetnek a szimmetria által megköveteltől és az egyforma hossz értékek eltérése néhány század Å lehet. Például a CSD adatbázis 2012. novemberi frissítésében kb. 600000 szerkezetből 38 illetve 83 találat van arra, hogy az elemi cella mindhárom szöge  $89,8^\circ - 90,2^\circ$  tartományban van a tércsoport viszont P1 illetve P-1, vagyis a rács triklin és nem ortorombos. Egy másik keresés azt mutatja, hogy kb. 31000 olyan szerves molekulaszervezet van, amelyre  $R < 5\%$  (jó minőségű szerkezet-meghatározás) és a kristályrendszer ortorombos. Ezek közül 60 szerkezetre az elemi cella a és b paramétere 0.01 Å különbséggel megegyezik, vagyis a cella tetragonális is lehet(ne). Ilyen és hasonló esetekben fokozott gondossággal kell eljárni a tércsoport meghatározásakor.

Számos esetben a kristálybeli szimmetriáknak megfelelő elemi cella nem a rácsban felvehető legkisebb térfogatú paralelepipedon (primitív cella, jele: P), hanem kétszeres vagy négyszeres térfogatú centrált cella (tércentrált, jelölése: I; (minden) lapcentrált, jelölése: F; vagy bázislapon centrált jelölése A (az elemi cella **bc** lapja), B (**ac** lap) illetve C (**ab** lap), ami már nemcsak a sarkain tartalmaz rácspontokat (pl. monoklin kristályrendszerben az egyik cellaél kitüntetett, merőleges a másik kettőre, vele párhuzamos kétfogású forgás- és csavartengelyek és rá merőleges tükör- vagy csúszósíkok megengedettek). Az elemi cella centráltsága alapján a 3.4.3. ábrán bemutatott 14 Bravais-rács definiálható.

















## Kristályrendszerek



3.4.3. ábra Bravais-rácsok

([http://www.chem.elte.hu/departments/altkem/tarczay/altkem/%C1K\\_emeltsz\\_Krist%E1lyok&szimmetria.pdf](http://www.chem.elte.hu/departments/altkem/tarczay/altkem/%C1K_emeltsz_Krist%E1lyok&szimmetria.pdf)).

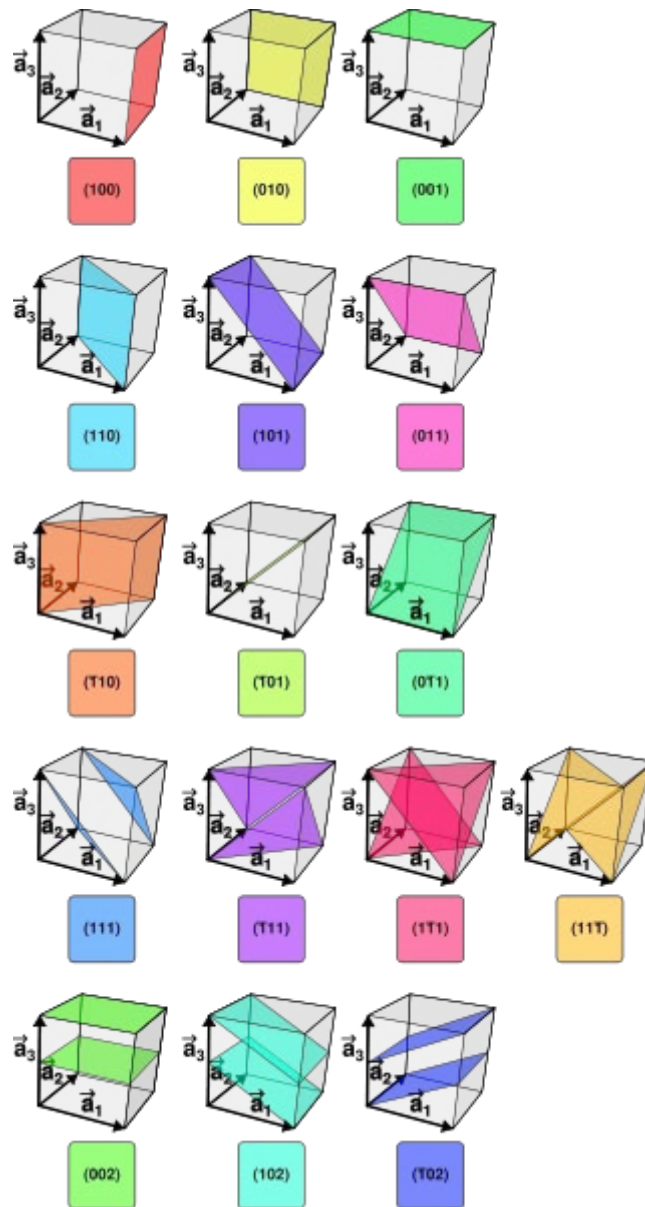
Összességében a szimmetriaelemek kombinációja a 3.4.4. ábrán felsorolt 32 kristályosztályt adja és ebbe sorolható be a 230 tércsoport. A szimmetriaelemek jelölésére a nemzetközi jelölést alkalmazzuk.

Rendszer	Az osztály neve	Nemzet-	Schoen-	Szimmetriaelemei
		közi	flies-	
		jele		
háromhajlású (triklin)	1. pedionos	1	$C_1$	Z
	2. véglapos	$\bar{1}$	$C_i$	
egyhajlású (monoklin)	3. szfenoidos	2	$C_2$	1 
	4. dómás	$m$	$C_s$	1 $m$
	5. prizmás	$2/m$	$C_{2h}$	1 (  + $m$ )
rombos	6. diszfenoidos	222	$D_2$	1  + 1  + 1 
	7. piramisos	$mm2$	$C_{2v}$	1  + 1 $m$ + 1 $m$
	8. dipiramisos	$mmm$	$D_{2h}$	1 (  + $m$ ) + 1 (  + $m$ ) + 1 (  + $m$ )
négyzetes (tetragonális)	9. piramisos	4	$C_4$	1 
	10. diszfenoidos	$\bar{4}$	$S_4$	1 
	11. dipiramisos	$4/m$	$C_{4h}$	1 (  + $m$ )
	12. trapezoéderes	422	$D_4$	1  + 2  + 2 
	13. ditetrag. piramisos	$4mm$	$C_{4v}$	1  + 2 $m$ + 2 $m$

3.4.4. ábra a 32 kristályosztály és szimmetriaelemek.

### 3.5. Kizárólag a $(h,k,l)$ Miller-indexek és az elemi cella paraméterei $(a,b,c,\alpha,\beta,\gamma)$ határozzák meg a rácssíkok távolságát

Az ásványtanban is ismert Miller-indexek ([http://en.wikipedia.org/wiki/Miller\\_index](http://en.wikipedia.org/wiki/Miller_index)) a makroszkopikus kristályrácsban való tájékozódást teszik lehetővé. A 3.5.1. ábra köbös rendszerben mutat néhány síkot (síksereget) és a hozzájuk tartozó Miller-indexet. Definíció szerint a  $h$  Miller-index annak az értéknek a reciproka, ami megmutatja, hogy egy rácsponton átmenő sík (vagyis a végtelen rács és végtelen sokszoros ismétlődés miatt végtelen síksereg) az elemi cella  $a$  paraméterének hányadrésznél metszi az  $x$  tengelyt. A  $k$  és  $l$  Miller-index hasonlóan az  $y$  és  $z$  tengelyre vonatkozó metszéspontot jelzik. Ha a sík párhuzamos a tengellyel, akkor a Miller-index 0.



3.5.1. ábra. Miller-indexek köbös rácsban, [http://en.wikipedia.org/wiki/Miller\\_index](http://en.wikipedia.org/wiki/Miller_index)

A 3.5.1. ábráról jól látszik, hogy köbös rendszer esetén az  $(1,0,0)$  és hasonlóan a  $(0,1,0)$  és  $(0,0,1)$  síkok  $d_{hkl}$  távolsága az elemi cella  $a$  paraméterével egyenlő. Más rácsíkok távolsága is kiszámítható egyszerű geometriai megfontolások alapján. A többi kristályrendszerben a  $d_{hkl}$  távolságok a 3.5.2. ábrán bemutatott képlettel adhatók meg. Triklin rendszerben a felírt összefüggés a legbonyolultabb, más kristályrendszerekben egyszerűsödik, de minden esetben kizárólag a  $(h,k,l)$  Miller-indexektől és az elemi cella  $a, b, c, \alpha, \beta, \gamma$  paramétereitől függ a rácsíkok távolsága.

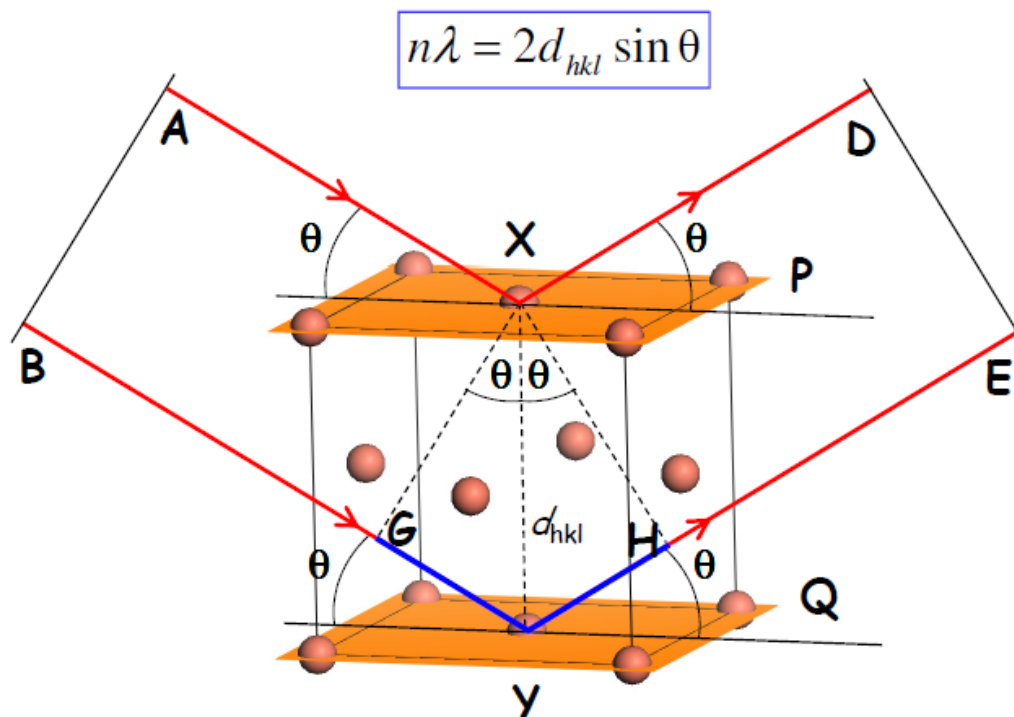
Kristályrendszer	$\frac{1}{d_{hkl}^2}$
Köbös	$\frac{h^2+k^2+l^2}{a^2}$
Tetragonális	$\frac{(h^2+k^2)}{a^2} + \frac{l^2}{c^2}$
Ortorombos	$\frac{h^2}{a^2} + \frac{k^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2}$
Hexagonális	$\frac{4(h^2+k^2+hk)}{3a^2} + \frac{l^2}{c^2}$
Trigonális (romboédes)	$\frac{(h^2+k^2+l^2)\sin^2\alpha+2(hk+hl+kl)(\cos^2\alpha-\cos\alpha)}{a^2(1-2\cos^3\alpha+3\cos^2\alpha)}$
Monoklin	$\frac{h^2}{a^2\sin^2\beta} + \frac{k^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2\sin^2\beta} - \frac{2hlc\cos\beta}{ac\sin^2\beta}$
Triklin	$\frac{\frac{h^2}{a^2}\sin^2\alpha + \frac{k^2}{b^2}\sin^2\beta + \frac{l^2}{c^2}\sin^2\gamma + \frac{2hk}{ab}(\cos\alpha\cos\beta - \cos\gamma) + \frac{2kl}{bc}(\cos\beta\cos\gamma - \cos\alpha) + \frac{2lh}{ca}(\cos\gamma\cos\alpha - \cos\beta)}{1 - \cos^2\alpha - \cos^2\beta - \cos^2\gamma + 2\cos\alpha\cos\beta\cos\gamma}$

3.5.2. ábra. A  $d_{hkl}$  rácssík távolságok kiszámítása a hét kristályrendszerben.

### 3.6. A diffrakció geometriai leírása: a Bragg-egyenlet, reciprok tér és Ewald-gömb

Ha összevetjük a hullámok erősítő és gyengítő interferenciájáról az 1.5. fejezetben leírtakat valamint a rácssíkok  $d$  távolságának meghatározásáról a 3.5. fejezetben mondottakat, akkor eljutunk a diffrakció jelenségének geometriai leírásához, amit először William Henry Bragg és fia, William Lawrence Bragg ismertek fel 1913-ban és ezért 1915-ben Nobel-díjat kaptak. A 3.6.1. ábra mutatja a diffrakció jelenségét és a Bragg-egyenlet levezetését (ld. még <http://www.eserc.stonybrook.edu/ProjectJava/Bragg/>). Ha az A és B elektromágneses hullámok visszaverődnek az egymástól  $d_{hkl}$  távolságra lévő P és Q rácssíkokról valamint a D és E visszavert hullámok *interferálnak*, akkor tapasztalunk erősítő interferenciát, ha a fénysugarak  $\theta$  hajlásszöge a P síkhoz képest, az elektromágneses hullám  $\lambda$  hullámhossza és a  $d$  távolság között az  $n\lambda=2d\sin\theta$  összefüggés van.  $n$  egész szám. A jelenség megérthető, ha figyelembe vesszük, hogy a rácssíkok azt mutatják meg, hogy milyen távolságban és irányban vannak egyforma szerkezeti részletek a kristályban. Az ezekről szóródott sugárkomponensek egyforma amplitúdójúak, de az, hogy erősítő vagy gyengítő interferenciájuk lesz-e az útkülönbségüktől (a 3.6.1. ábrán GY és HY szakaszok hosszának összege, ami  $2d\sin\theta$ ) függ. Ha nagyon sok síksereg van egymás alatt (makroszkopikus kristály), csak akkor kapunk detektálható intenzitást, ha maximálisan erősítő az interferencia (az útkülönbség a hullámhossz

egész számszorosa), egyéb esetekben az erősítés és gyengítés síkról síkra változik, végeredményben kioltást tapasztalunk. A diffrakció feltételének levezetését 3 dimenzióban az 5.1. fejezetben mutatjuk be.



3.6.1. ábra. A Bragg-egyenlet levezetése

A Bragg-egyenlet egyszerűsége ellenére alkalmas a pordiffrakciós felvételek értelmezésére (8. fejezet). A diffrakció jelenségének pontosabb, hullámelméleti leírását az 5. fejezetben tárgyaljuk.

A Miller-indexek definiálják a végtelen rácsban az egyes síkokat és így a makroszkopikus kristályban való tájékozódást szolgálják. Ha a 3.5.1. ábrán egyszerre több síkot jelölünk, akkor az ábrázolás nagyon hamar átláthatatlanná válik. Az elemi cellából felépülő direkt rácsához célszerű hozzárendelni egy reciproktér rácsot. Ebben minden egyes  $d$  távolsággal jellemezhető rácscsíksereknek egy pont felel meg. A reciproktér rács szerkesztéséhez minden síkhoz tekintünk egy rá merőleges  $\mathbf{d}$  vektort, amelynek a hossza a  $d$  rácscík távolság. A 3.5.2. ábra egyenleteiből kitűnik, hogy minél nagyobbak a  $h, k, l$  indexek vagy a  $\theta$  szórási szög (Bragg-szög) a Bragg-egyenletből, annál rövidebb a  $\mathbf{d}$ . Végülis minden, az origóból induló  $\mathbf{d}$  vektor az elemi cellában marad. A rácscíkok távolságát például ortorombos rendszerben a 3.6.2. ábra egyenlete adja meg, ami átrendezhető a 3.6.3. ábra egyenletébe.

$$d_{hkl} = \frac{1}{\sqrt{\frac{h^2}{a^2} + \frac{k^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2}}}$$

3.6.2. ábra. A rácscíkok távolsága ( $d_{hkl}$ ) ortorombos rendszerben



$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{h^2}{a^2} + \frac{k^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2}$$

3.6.3. ábra. A reciprok ráctávolság négyzete ortorombos rendszerben.

Bevezetjük a reciprok cella paramétereit ( $\mathbf{a}^*$ ,  $\mathbf{b}^*$  és  $\mathbf{c}^*$ ) és a reciprok rácssík távolságát ( $d^*$ ) a 3.6.4. egyenlet szerint.

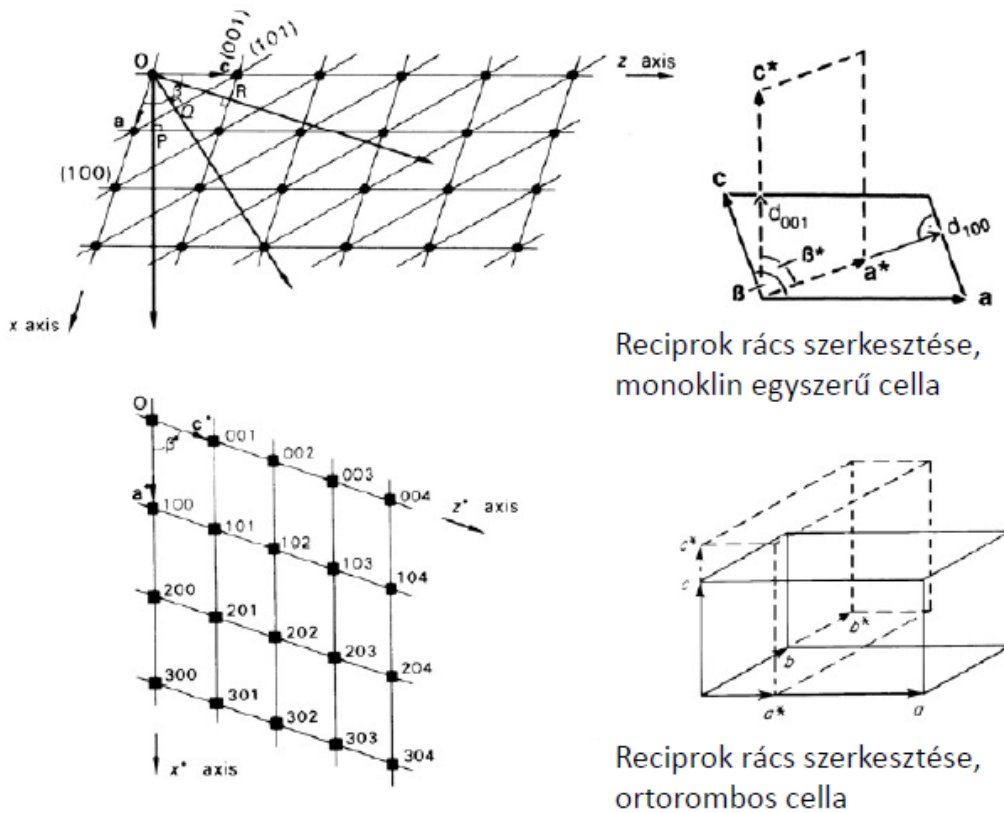
$$d^* = \frac{1}{d}, \quad a^* = \frac{1}{a}, \quad b^* = \frac{1}{b}, \quad c^* = \frac{1}{c}, \quad \alpha = \beta = \gamma = \alpha^* = \beta^* = \gamma^* = 90^\circ$$

$$d_{hkl}^{*2} = \left( \frac{1}{d_{hkl}} \right)^2 = h^2 a^{*2} + k^2 b^{*2} + l^2 c^{*2}$$

3.6.4. ábra Reciprok rácsparaméterek, ortorombos rendszer

Nem meglepően a definiáló egyenletet kaptuk vissza, azaz  $d^*$  annak a vektornak a hossza, ami az origóból indul és a  $(h\mathbf{a}^*, k\mathbf{b}^*, l\mathbf{c}^*)$  pontba mutat! Itt  $a, b, c$  a normál (valós térben)  $a^*, b^*, c^*$  pedig a reciprok rács által kifeszített térben az elemi cella illetve a reciprok cella hosszparaméterei,  $h, k, l$  a Miller-indexek. Vektoriálisan  $\mathbf{a}^*$  azaz  $x^*$  tengely merőleges a  $(\mathbf{b}, \mathbf{c})$  síkra,  $\mathbf{b}^*$  azaz  $y^*$  tengely merőleges az  $(\mathbf{a}, \mathbf{c})$  síkra és  $\mathbf{c}^*$  azaz  $z^*$  tengely merőleges az  $(\mathbf{a}, \mathbf{b})$  síkra. Ez fordítva is igaz, a direkt tér (aminek vektorai  $\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}, \mathbf{d} \dots$  vagyis amiben a kristály van) tengelyei merőlegesek reciprok rácssíkokra. A direkt tér egy síkserege tehát megfelel a reciprok rács egy pontjának, amelynek helyvektora  $1/d$  hosszúságú, és merőleges a síkseregre. A Bragg-egyenlet alapján a diffrakciós kép diszkrét maximumokból áll. Míg a Bragg-egyenlet 1 távolságdimenziót tartalmaz ( $d$ ) a szórási irányok 3 dimenziós leírása a reciprokrács segítségével történik. A diffrakciós mintázat, mint függvény (pl. intenzitás) ezért a reciprokrács pontjain van értelmezve, a szórt sugarakat reflexióknak nevezzük, utalva a Bragg-törvény síkon való tükröződéshez hasonló ábrájára (ld. még 5.1. fejezet). Egy síksereghez több reflexió is tartozik (Bragg-egyenletben  $n$ ), ennek megfelelően a reciprokrács pontok helyzetét leíró indexhármas nem feltétlenül relatív prímelek, ezek a szórási, vagy Laue indexek. Ezzel szemben a síkseregek, vagy makroszkopikus kristálylapok helyzetét leíró Miller-indexek relatív prímelek.

A 3.6.5. ábra mutatja a reciprok cella szerkesztését monoklin és ortorombos rendszerben. Ha az elemi cella szögei nem  $90^\circ$ -osak (triklin rendszer) a reciprok cellaparaméterek felírása komplikáltabb (3.6.6. ábra).



Reciprok rács szerkesztése, monoklin egyszerű cella

Reciprok rács szerkesztése, ortorombos cella

3.6.5. ábra Reciprok rács szerkesztése

$$V = \frac{1}{V^*} = abc \sqrt{1 - \cos^2 \alpha - \cos^2 \beta - \cos^2 \gamma + 2 \cos \alpha \cos \beta \cos \gamma}$$

$$V^* = \frac{1}{V} = a^* b^* c^* \sqrt{1 - \cos^2 \alpha^* - \cos^2 \beta^* - \cos^2 \gamma^* + 2 \cos \alpha^* \cos \beta^* \cos \gamma^*}$$

$$a^* = \frac{bc \sin \alpha}{V} \quad b^* = \frac{ac \sin \beta}{V} \quad c^* = \frac{ab \sin \gamma}{V}$$

$$a = \frac{b^* c^* \sin \alpha^*}{V^*} \quad b = \frac{a^* c^* \sin \beta^*}{V^*} \quad c = \frac{a^* b^* \sin \gamma^*}{V^*}$$

$$\cos \alpha^* = \frac{\cos \beta \cos \gamma - \cos \alpha}{\sin \beta \sin \gamma} \quad \cos \beta^* = \frac{\cos \alpha \cos \gamma - \cos \beta}{\sin \alpha \sin \gamma} \quad \cos \gamma^* = \frac{\cos \alpha \cos \beta - \cos \gamma}{\sin \alpha \sin \beta}$$

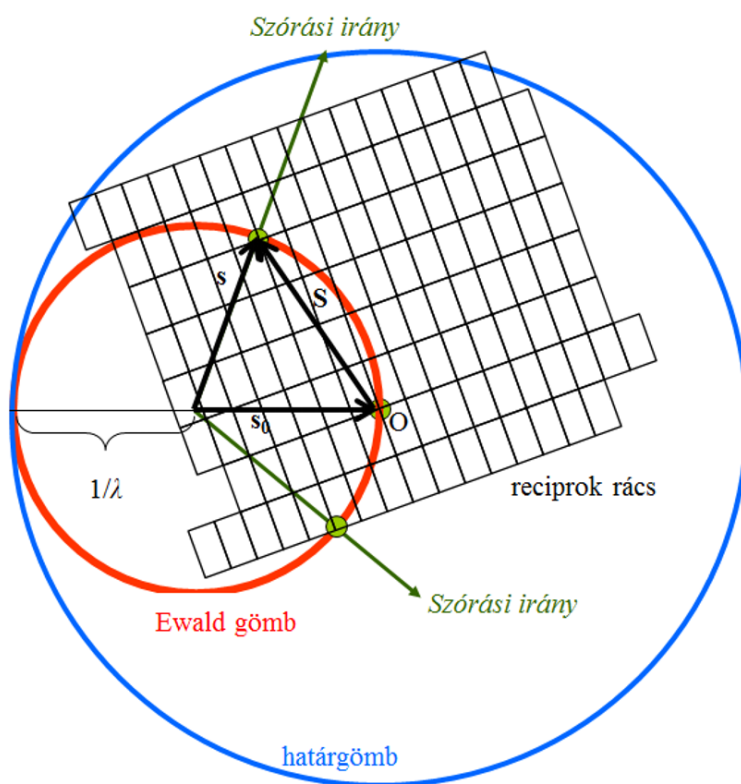
$$\cos \alpha = \frac{\cos \beta^* \cos \gamma^* - \cos \alpha^*}{\sin \beta^* \sin \gamma^*} \quad \cos \beta = \frac{\cos \alpha^* \cos \gamma^* - \cos \beta^*}{\sin \alpha^* \sin \gamma^*} \quad \cos \gamma = \frac{\cos \alpha^* \cos \beta^* - \cos \gamma^*}{\sin \alpha^* \sin \beta^*}$$

3.6.6. ábra. A direkt és reciprok cella paraméterek triklin rendszerben.

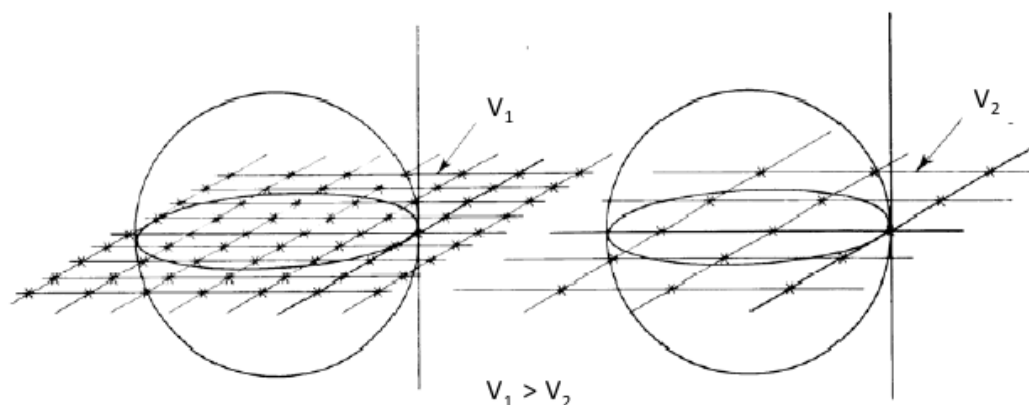
A képlet használatára számos reciprokrács paramétert számoló program van az interneten, egy példa: [http://www.ruppweb.org/new\\_comp/reciprocal\\_cell.htm](http://www.ruppweb.org/new_comp/reciprocal_cell.htm).

A Bragg-egyenlet figyelembe vételével a reciprokrács segítségével megszerkeszthetők (lásd pl. <http://www.ruppweb.org/xray/tutorial/ewald.htm>) a diffrakciós irányok (3.6.7. ábra). Azokra a reciprokrács pontokra teljesül a diffrakció feltétele, amik az Ewald-gömbön vannak. A kristály forgatásakor ugyanúgy elfordul a reciprokrács is – más reflexiók is detektálhatók lesznek. A  $2/\lambda$  sugarú határgömbön kívüli pontok viszont soha nem metszik az Ewald-gömböt. Ezeket a reflexiókat adott hullámhosszon nem tudjuk mérni, rövidebb hullámhosszt választva kell elvégezni a mérést. (Mivel a kristályok nem tökéletesek, a reflexiók nem egy-egy adott szögértéknél, hanem kis szögtartományban mérhetők - ez a mozaicitás. Az Ewald-gömb ábrázoláson ezt úgy jelezhetjük, hogy a reciprokrács pontok kiterjedéssel rendelkeznek.)

Amennyiben az elemi cella valamelyik paramétere nagyobb, a reciprokrács térben sűrűbben vannak a rácspontok a megfelelő irányban (3.6.8. ábra). Tehát az egykristály diffrakciós adatgyűjtéskor, mivel monokromatikus röntgensugárzást alkalmazunk, a kristályt forgatni kell (különböző orientációkban kell exponálni), hogy a határgömbön belüli összes reflexiót detektálni tudjuk. A Laue-felvételek készítésekor polikromatikus röntgensugárzást használunk, így a kristály egy adott orientációjában a reflexiók nagy része detektálható, azonban a reflexiók átlapolása által okozott adatvesztés miatt ez utóbbi módszert csak speciális esetekben (időfelbontásos mérések) alkalmazzák. A diffrakciós kísérlet szimulációját az XrayView program (4.4. fejezet) mutatja be.



3.6.7. ábra. Az Ewald-gömb, magyarázat a szövegben.



3.6.8. ábra. Az elemi cella méretének hatása a megfigyelhető reflexiókra (reciprok térben)

### 3.7. A molekulák elhelyezkedése a rácsban: a szoros térkitöltés kényszere. A $18 \text{ \AA}^3$ szabály és a segítségével nyerhető információ

Az, hogy a rácsban MIÉRT úgy illeszkednek a molekulák, ahogy tapasztaljuk nagyon nehéz kérdés és a kristályszerkezet jóslása még gyerekcipőben jár. Néhány kutatócsoport intenzív erőfeszítései a CSD által szervezett vakteszteken ([http://www.ccdc.cam.ac.uk/about\\_ccdc/science\\_profile/structure\\_prediction/](http://www.ccdc.cam.ac.uk/about_ccdc/science_profile/structure_prediction/)) részleges eredményt hoznak, de az általános megoldás még messze van. A szerkezeti képlet ismeretében a kristályszerkezetet ma még nem tudjuk megbízhatóan megjósolni.

A.I. Kitaigorodszkij orosz szerkezeti kémikus alapvető munkái rámutattak a szoros illeszkedés fontosságára a molekuláris vegyületek esetén is (lásd még 3.3. fejezet). Fémek esetén a szoros térkitöltés viszonylag könnyen megvalósul, mivel egyforma átmérőjű gömbök vannak a rácsban. A szerves molekulák alakja azonban nagyon anizotróp is lehet és a tér kitöltéséhez a komplementaritásnak kell érvényesülni (nemcsak molekula alakja, de a kölcsönhatások tekintetében is). Bár a konvex és konkáv részek egymáshoz illeszkednek a szoros illeszkedés gyakran így is csak üres térrészek közbeiktatásával teljesülhet. Ezekben a térrészekben vákuum van, aminek létrehozása nagy energia befektetését jelent és ez a hajtóereje a szoros illeszkedésnek. A röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározás során megkapjuk a teljes kristályra vett átlagos elektronsűrűséget az elemi cellában. A molekulák között esetleg található nagyobb üregekben is találhatunk elektronsűrűséget, ami (sok esetben rendezetlenül elhelyezkedő) oldószer molekuláknak felelhet meg. Ha másodlagos kölcsönhatások, különösen hidrogénkötések, irányított elrendeződést eredményeznek a beékelődő molekulákkal, a létrejött szerkezetek szupramolekuláris kémiai problémák vizsgálatát teszik lehetővé. Ha az üres térrész kicsi, erre nincs lehetőség. Egy vízmolekula a kristályrácsban kb.  $45 \text{ \AA}^3$  teret foglal el, ezért az ennél nagyobb üres térrészek vizsgálatát mindig el kell végezni. A szoros elrendeződés kényszere van a háttérben egy nagyon fontos gyakorlati megfigyelésnek. Az elemi cellában az egy nem hidrogén atomra jutó térrész általában  $18 \text{ \AA}^3$  körüli érték függetlenül az atom minőségétől. Az elemi cella paramétereinek és így az elemi cella térfogatának meghatározása már fontos szerkezeti információt hordozhat. Ha az elemi cella térfogatát elosztjuk  $18 \text{ \AA}^3$ -

al és az ekvivalens pozíciók számával megkapjuk, hogy hány atom van az aszimmetrikus egységben. Az aszimmetrikus egységben a kémiai entitás (molekula vagy ionpár), annak többszöröse vagy a molekula és a rács szimmetria által egyaránt megengedett tört része lehet. A szerkezet-meghatározás első szakaszában még nem biztos, hogy a tércsoportot teljes bizonyossággal ismerjük. Mivel az ekvivalens pozíciók száma csak néhány értéket vehet fel (1,2,4,8 illetve ritka esetekben 3 vagy 6) akár a szerkezet meghatározása nélkül, pusztán az elemi cella ismeretében válaszolni tudunk arra a kérdésre, hogy milyen a fémkomplex geometriája. Például ha az elemi cella triklin és a mérete olyan, hogy az atomok száma alapján csak a fémkomplex fele lehet az aszimmetrikus egységben, akkor a fématomnak inverziós centrumban kell lennie és a ligandumok transz helyzetűek. Vagyis a komplex lineáris, síknégyzetes vagy oktaéderes. Más kristályrendszerben a forgástengely vagy a tükörsík miatt a speciális pozícióban lévő molekula még kisebb része is lehet az aszimmetrikus egységben (2.1.2.1. ábra)

Annyiban pontosítani kell, hogy a nem hidrogén atomok térfogat igénye nem pontosan  $18 \text{ \AA}^3$ , általában 17 és  $18,5 \text{ \AA}^3$  között változhat és a szervesetlen sók nem követik ezt a szabályt. A 15.1. fejezetben bemutatott gyakorlati példában is alkalmazzuk a  $18 \text{ \AA}^3$  szabályt.

### 3.8. Matematikai kiegészítés (Harmat Veronika).

A szimmetria ekvivalens koordináták számítása az  $\mathbf{x}'=[\mathbf{C}]\mathbf{x}+\mathbf{t}$  egyenlet alapján történik, ahol  $[\mathbf{C}]$  a  $3 \times 3$  méretű rotációs mátrix,  $\mathbf{t}$  pedig a translációs szimmetriák eltolási komponense. Ha a számításokat frakcionális koordinátarendszerben végezzük, a transzformált koordináták alakja egyszerű lesz. Az elemi cellán belüli origóválasztás (ld. még 5.5. fejezet) következtében a szimmetria operátorok az elemi cellában kitüntetett helyeken vannak (pl. az origóban,  $\frac{1}{4}$  vagy  $\frac{1}{2}$  cellaélnél). (A 3.8.1. ábrán néhány tipikus példa látható.)

Kiindulási pont:  $(x,y,z)$

**Inverziós centrum:**

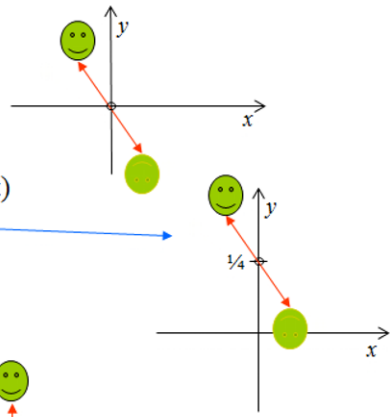
$\bar{1} (0,0,0) \quad (x,y,z) \rightarrow (-x,-y,-z)$

Inverziós centrum eltolása

$\bar{1} (\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, \frac{1}{2}) \quad (x,y,z) \rightarrow (1-x, 1-y, 1-z) = (-x, -y, -z) *$

(ld. P1 cellában a többszörös inverziós centrumokat)

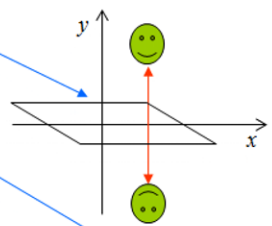
$\bar{1} (0, \frac{1}{4}, 0) \quad (x,y,z) \rightarrow (-x, \frac{1}{2}-y, -z)$



**Tükörsík:**

$m (x,0,z) \quad (x,y,z) \rightarrow (x,-y,z)$

$m (x, \frac{1}{4}, z) \quad (x,y,z) \rightarrow (x, \frac{1}{2}-y, z)$

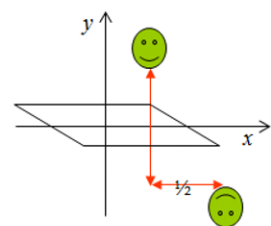


**Csúszósík:**

$a (x,0,z) \quad (x,y,z) \rightarrow (\frac{1}{2}+x, -y, z)$

$a (x, \frac{1}{4}, z) \quad (x,y,z) \rightarrow (\frac{1}{2}+x, \frac{1}{2}-y, z)$

$n (x,y,0) \quad (x,y,z) \rightarrow (\frac{1}{2}+x, \frac{1}{2}+y, -z)$

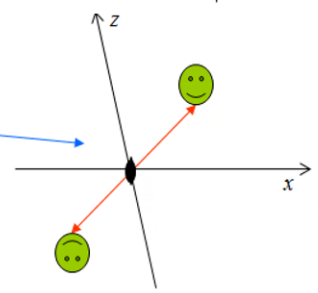


\* az inverziós centrum felezi a két atom közötti vektort, tehát koordinátái:  $(\frac{x+1-x}{2}, \frac{y+1-y}{2}, \frac{z+1-z}{2})$

**Kétfogású forgástengely:**

$2 (0,y,0) \quad (x,y,z) \rightarrow (-x,y,-z)$

$2 (\frac{1}{4},y,0) \quad (x,y,z) \rightarrow (\frac{1}{2}-x,y,-z)$



**Kétfogású csavartengely**

$2_1 (0,y,0) \quad (x,y,z) \rightarrow (-x, \frac{1}{2}+y, -z)$

$2_1 (\frac{1}{4},y, \frac{1}{4}) \quad (x,y,z) \rightarrow (\frac{1}{2}-x, \frac{1}{2}+y, \frac{1}{2}-z)$

**Négyfogású forgástengely**

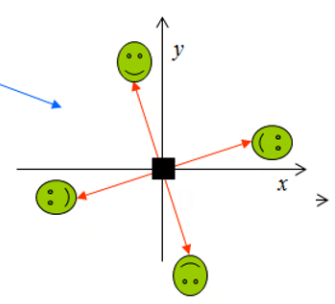
$4 (0,0,z) \quad (x,y,z) \rightarrow (-y,x,z) (-x,-y,z) (y,-x,z)$

**Négyfogású csavartengely**

$4_1 (0,0,z) \quad (x,y,z) \rightarrow (-y,x, \frac{1}{4}+z) (-x,-y, \frac{1}{2}+z) (y,-x, \frac{3}{4}+z)$

$4_3 (0,0,z) \quad (x,y,z) \rightarrow (-y,x, \frac{3}{4}+z) (-x,-y, \frac{3}{2}+z) (y,-x, \frac{9}{4}+z)$

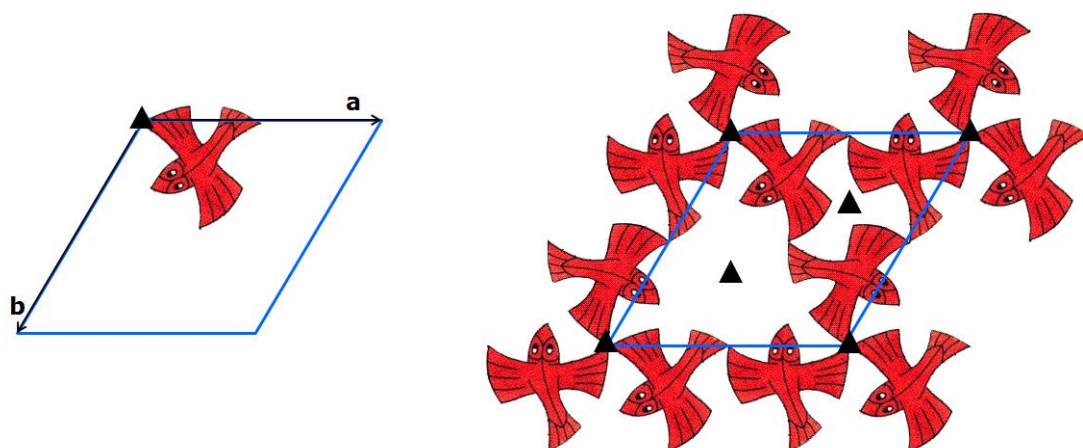
azaz:  $(x,y,z) \rightarrow (y,-x, \frac{1}{4}+z) (-x,-y, \frac{1}{2}+z) (-y,x, \frac{3}{4}+z)$



3.8.1. ábra Egy kis koordináta geometria: szimmetria ekvivalens atomi pozíciók számítása néhány szimmetria operátor esetén. (Az ábrákon a figurák arc- és hátoldala nem egyforma.)

A tércsoportok Hermann-Mauguin szimbóluma magában foglalja a kitüntetett térirányokban található szimmetriaelemek típusát. Ezek azonban egyfelől a kristályon belüli ismétlődés következtében az elemi cellán belül is több példányban fordulnak elő, amelyek a molekulák „szempontjából” nem ekvivalensek (3.8.2. ábra), másfelől kombinációik további, a tércsoport szimbólumában nem szereplő operátorokat

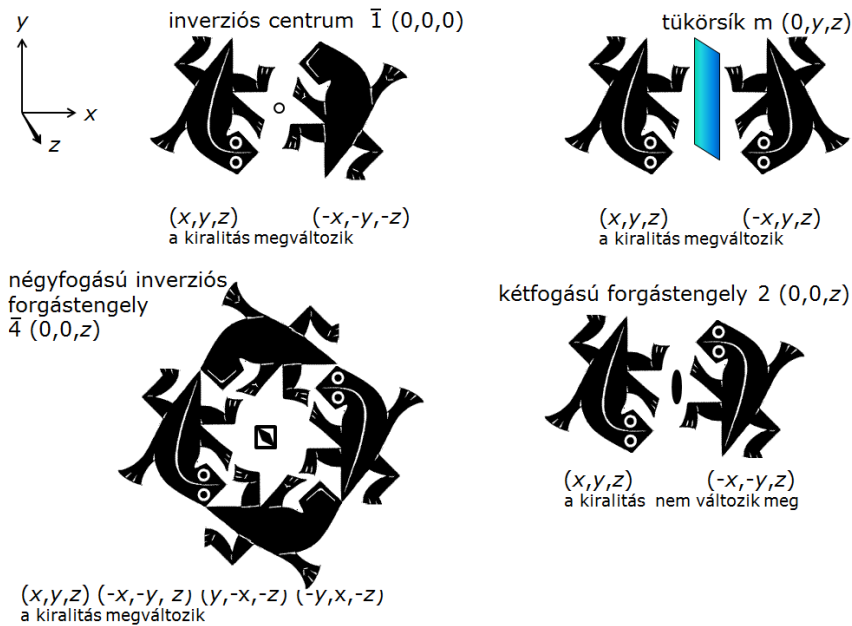
hoznak létre bizonyos tércsoportokban (pl. kétfogású forgás- vagy csavartengely és rá merőleges tükör- vagy csúszósík inverziós centrumot).



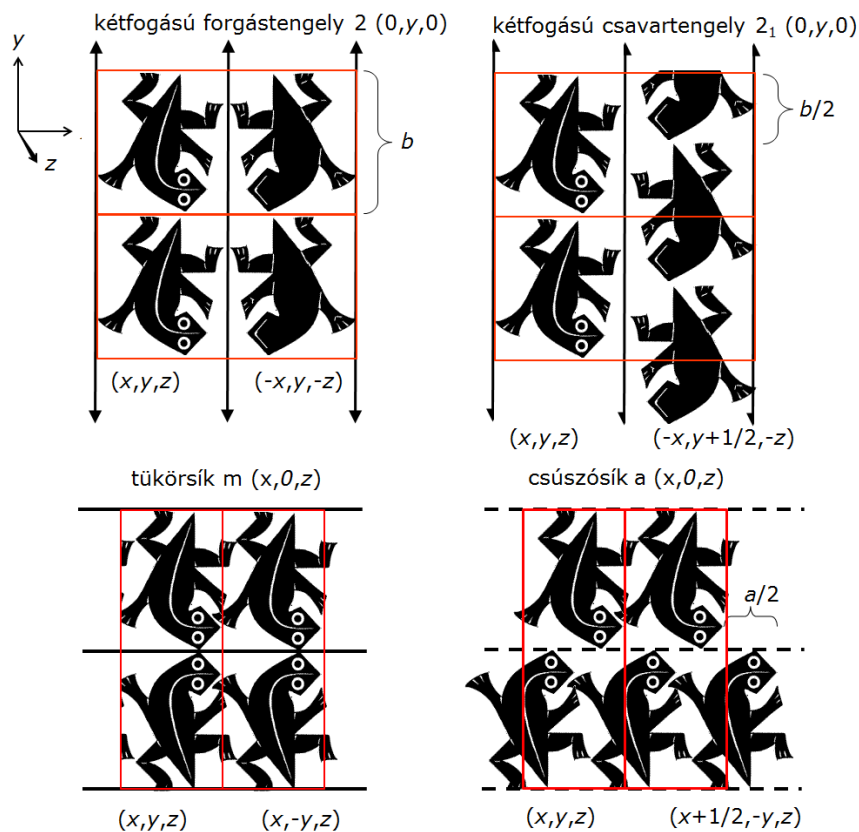
3.8.2. ábra. A kristálybeli eltolásos ismétlődés miatt az elemi cellában a szimmetria operátorok több példányban is megjelennek. Példa P3 tércsoportra ( $a=b$ ,  $\alpha=\beta=90^\circ$ ,  $\gamma=120^\circ$ ,  $3(0,0,z)$ ). Az aszimmetrikus egységből (egy madár) az origóban lévő forgástengely (bal oldali kép) szimmetria ekvivalenseket generál, amelyeket a kiindulási elemi cellába transzformálva felfedezhető az elemi cella belsejében levő további két háromfogású tengely (jobb oldali kép).

Kristályokban megengedett szimmetria operátorok (példák: 3.8.3. ábra): hézagmentes térkitöltést biztosítanak, ezért a forgástengelyek közül csak a 2-, 3-, 4- és 6-fogású létezik kristályokban kristallográfiai operátorként. A forgástengely és tükörsík pontcsoportokban és tércsoportokban is létező szimmetria operátorok. A tércsoportokban translációs megfelelőik (csavartengely, csúszósík) is léteznek a kristálybeli eltolásos ismétlődés miatt. Molekulárcsos kristályokban gyakran fordulnak elő, mert a különböző méretű csoportokat tartalmazó, 'szabálytalan alakú' molekulák számára a forgástengelyeknél és tükörsíkoknál szorosabb térkitöltést biztosíthatnak (3.8.4. ábra).

Fehérjekristályokban gyakori jelenség, hogy az aszimmetrikus egységben a molekula több példányban van jelen, és ezek konformációja eltekintve néhány kisebb szerkezeti részlettől, megegyezik. A molekulák nagyfokú konformációs, szerkezeti hasonlósága azzal magyarázható, hogy a fehérje másodlagos, harmadlagos, negyedleges szerkezetét meghatározó másodlagos kölcsönhatások együttesénél összességükben sokkal kisebb erőt jelentenek a kristályt összetartó, molekulák közötti másodlagos kölcsönhatások. A kristallográfiailag független molekulákat egymásba vivő operátorokat nemkristallográfiai szimmetria operátoroknak nevezzük (3.8.5. ábra). A molekulák hasonlósága, vagyis a nemkristallográfiai szimmetria felhasználható a fázisprobléma megoldására (vírusok szerkezete), a rossz minőségű, nehezen értelmezhető elektronsűrűségi térkép átlapolással történő javítására (sűrűségmódosító módszerek) és szerkezet finomításokra mért adat/szerkezetet meghatározó paraméterek számarányának javítására. Kismolekulás kristályoknál ezzel szemben az egymástól kristallográfiailag független molekulák konformációja általában különbözik, ekkor nem beszélhetünk nemkristallográfiai szimetriáról.

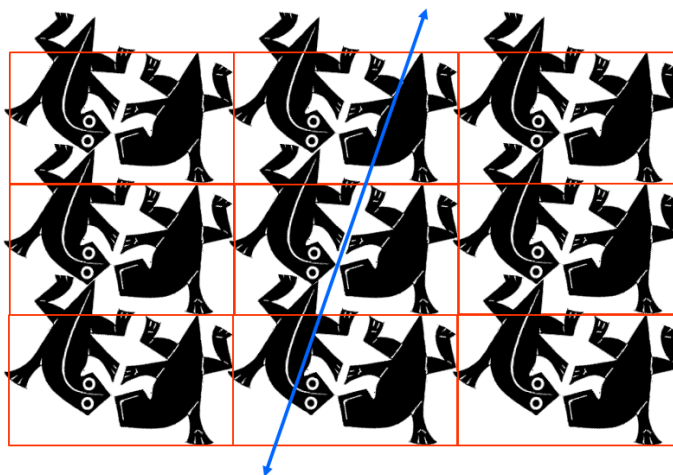


3.8.3. ábra Néhány kristallográfiai szimmetria (a fejezetben felhasznált motívumok M.C.Escher grafikáiról származnak)



3.8.4. ábra. A forgástengely és tükörsík (balra) valamint translációs megfelelőik (jobbra), a tükör- és csúszósík összehasonlítása (elemi cella: piros). A bal oldali ábrákon éppen összeérnek a gyíkok (ami megfelel a kristályt 3 dimenzióban összetartó másodlagos kölcsönhatásoknak), míg a megfelelő translációs szimmetriák esetén közelebb kellene őket tolni egymáshoz (a jobb felső ábrán vízszintes, a jobb alsón függőleges irányban), hogy minden irányban érintkezzenek, az elemi cella kisebb, a térkitöltés szorosabb lesz. (Az ábrákon kétfogású tengelyek láthatók. A koordináták frakcionális koordinátarendszerben vannak felírva. A szimmetria ekvivalens koordináták felírásakor vegyük figyelembe a kristálybeli eltolásos ismétlődést: pl.  $x$  megfelel  $1+x$ -nek.)





3.8.5. ábra Nemkristallográfiai szimmetria. Az ábrán késsel jelölt kétfogású forgástengely csak a két középső gyíkot viszi át egymásba, lokálisan hat. A gyík-párok tagjai kristallográfiaileg függetlenek egymástól, környezetük (kristálykontaktusaik) különbözik, együttesen alkotják az aszimmetrikus egységet.

### Teszt

## 4. A röntgendiffrakciós kísérlet, adatgyűjtési technikák és stratégiák (Bényei Attila)

### Irodalom

A röntgendiffrakció egyik alapvető tankönyve

G.H. Stout, L.H. Jensen: X-ray structure determination – a Practical guide, 2nd edition, John Wiley & Sons, New York, 1989

Modern szemléletű, praktikus alapmű, a német kiadás fordítása.

W. Massa: Crystal structure determination, Springer, Berlin, 2000

### 4.1. Az első lépés, a probléma felismerése, az anyag előállítása és egykristály növelése

Mint minden természettudományos feladatnál, alapvető a probléma szabatos megfogalmazása, ez akár fél sikert is jelenthet. Ha tudjuk, milyen szerkezeti kérdést akarunk megválaszolni (pl. anomer szén konfigurációja/szupramolekuláris mintázat vagy egyszerű szerkezet igazolás) kiválaszthatjuk a szükséges eszközöket. Magyarország 2000-ben csatlakozott az ESRF-hez (European Synchrotron Radiation Facility),

Európa 2012-ben is legsokoldalúbb felhasználású szinkrotron sugárforrásához és ezt kihasználva eredményesen lehet pályázni mérési időre szinkrotron forráshoz Grenoble-ba; de egyéni pályázati úton a többi szinkrotron forrás is elérhető. Persze nem érdemes ágyúval löni a verébre, a modern egykristály diffrakciós készülékek házon belüli adatgyűjtéssel is számos probléma megoldására alkalmasak. 2012. decemberében hazánkban öt egyetemi/akadémiai kutatói készülék és egy gyógyszergyári egykristály diffraktométer működött. A módszer gyakorlati jelentőségét jelzi, hogy pl. a Texas A and M Egyetemen (College Station, USA), egy teremben van négy egykristály diffraktométer és egy SAXS készülék (4.1.1. ábra).

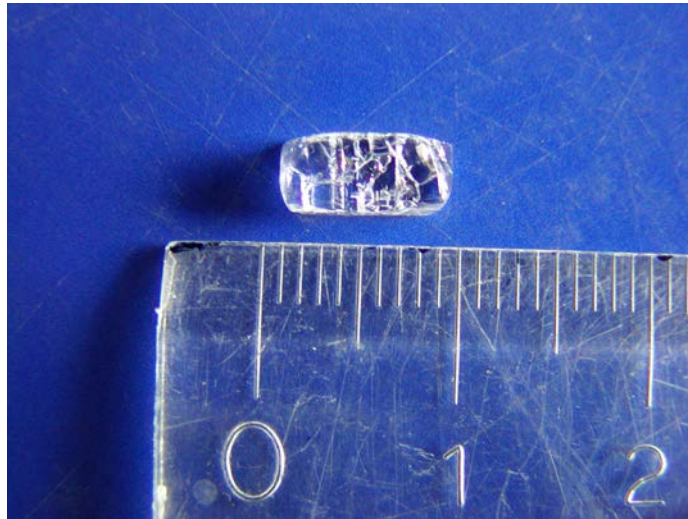


4.1.1. ábra. Négy diffraktométer és egy SAXS készülék egy teremben a TAMU-n (Texas A and M University, College Station, USA).

A szerkezeti probléma körvonalazása után/közben elő kell állítani az anyagot, tisztítani kell és a 2. fejezetben ismertetett nehézségeket legyőzve egykristályt kell növelni.

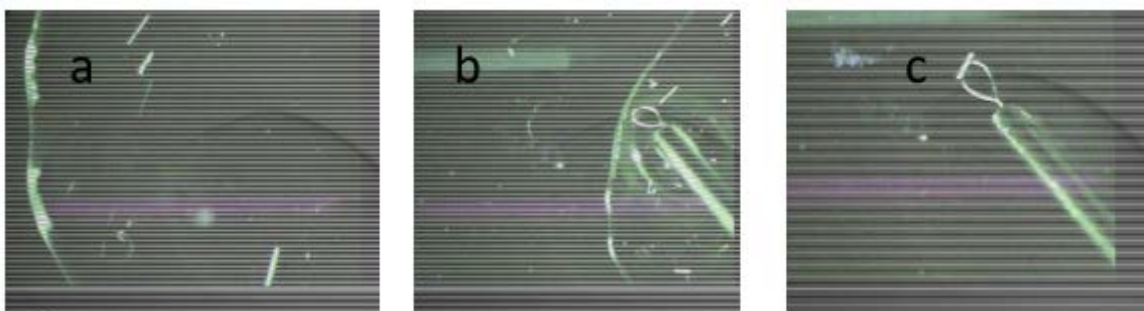
## 4.2. A megfelelő kristály kiválasztása, rögzítése, centírozása

Ha vannak egykristályaink, akkor válogathatunk közöttük. Ha egyetlen egykristályunk (4.2.1. ábra) van, levágunk vagy lepattintunk (szó szerint) róla egy valóban közel tökéletes kristály darabot, ami megfelel a mérésekhez a 2.6.1. alfejezet követelményei szerint. A szerves molekulák és a fehérjék kristályai puhák, a fémkomplexek kristályai általában keményebbek, míg a szervesetlen szennyezők kristályai kemények. A darabolással feszültséget vihetünk a kristályba, ami az egykristály jelleg romlását jelenti. A kristály vágását paraffin olaj (vagy perfluorozott szénhidrogén olaj) alatt, hegyes tűvel vagy éles pengével célszerű végezni. A fehérjekristályok annyira érzékenyek mechanikai hatásokra, hogy darabolásuk általában nem végezhető el, esetleg ikerkristályok óvatos szétválasztására van lehetőség, amit általában az anyalúgban végzünk.



4.2.1. ábra. Méretes egykristály, jól látszik, hogy nem tökéletes, de darabolás után mérhető volt

Egy polarizációs mikroszkóp sokat segíthet a jó minőségű egykristály kiválasztásához, amit egy finom mozdulattal vagy egy mylarból vagy kevlarból készült gyűrűre, vagy epoxi ragasztóval egy üveg hegyre rögzítünk (4.2.2. ábra)

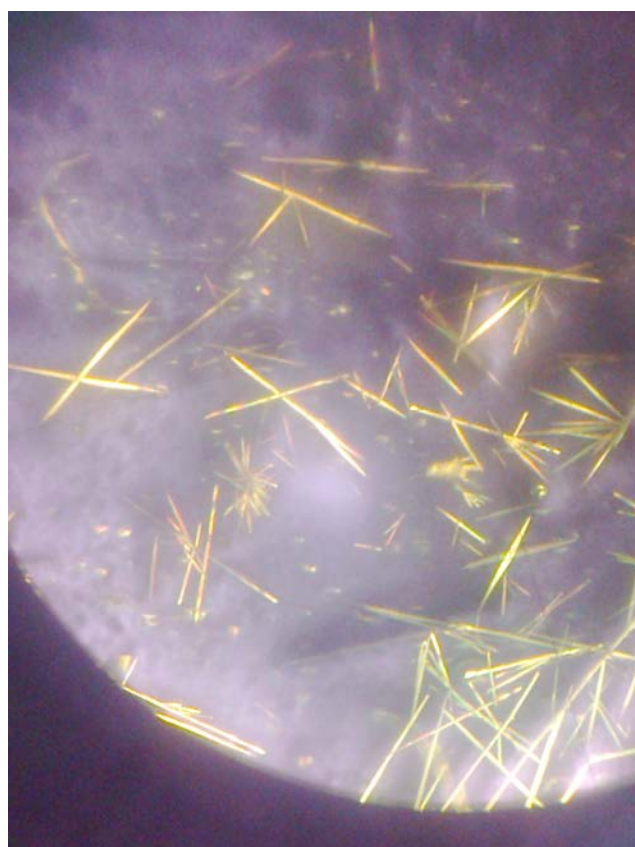


4.2.2. ábra. Egykristály kiválasztása és rögzítése

Ha a kristályok nagyon aprók és túszerűek (4.2.3. ábra) nehézségekbe fog ütközni a mérés (kis kristálytérfogat és anizotrópia), ilyenkor célszerű nagyobb teljesítményű detektorral, szinkrotron sugárzással mérni. A rögzített kristályt behelyezzük a pontdetektoros (4.2.4. ábra) vagy térdetektoros (4.2.5. ábra) készülékbe és úgy centírozzuk a goniométer fej segítségével, hogy a diffraktométer tengelyeinek metszéspontja a kristály tömegközéppontján haladjon át és a kristály majd a mérés során bármilyen orientációban teljesen a röntgensugárban legyen (4.2.1. video). Elindítjuk a mérést, és ha térdetektoros készülékünk van, az első diffrakciós felvételen (elemi cella mérettől függően) több tucat vagy akár több száz reflexiót kapunk (4.2.2. video), pontdetektoros készüléken a kristály és detektor forgatása során a beütés számból ellenőrizhetjük, hogy vannak reflexióink.

4.2.1. video: [Centrírozás](#)

4.2.2. video: [Adatgyűjtés kezdete.](#)



4.2.3. ábra. Vékony, tűszerű kristályok.



4.2.4. ábra. Pontdetektoros négykörös diffraktométer (Bruker-Nonius MACH3, Debreceni Egyetem)



4.2.5. ábra. Tér-detektoros készülék, Bruker-AXS SMART, Texas A and M University, College Station

### 4.3. A szerkezet-megoldás kritikus pontja az elemi cella és a helyes tércsoport meghatározása; szisztematikus hiányok

A cél, hogy első lépésként meghatározzuk az elemi cellát, a szisztematikus hiányok (5. fejezet) alapján a tércsoportot, az orientációs mátrixot (indexelés) és jellemezzük a kristály minőségét. Pontdetektoros készülék esetén a reciprokn térben véletlenszerűen gyűjtünk 20-25 reflexiót. Mivel a detektor-kristály és a röntgen forrás-kristály távolság általában állandó, minden reflexió négy szögadattal adható meg egy négykörös diffraktométerrel amiből három adat független és így összesen 60-75 adatunk van. Ezekre az adatokra a software illeszti az elemi cella hat és az orientációs mátrix kilenc (összesen 15) paraméterét, tehát a probléma pontdetektoros készülék esetén is túlhatározott. Ha a kristályunk egykristály, általában sikeres az elemi cella meghatározása, az elemi cella paramétereinek alapján keresünk egy esetleg nagyobb (tércentrált, lapcentrál vagy bázislapcentrál) cellát több szimmetria elemet tartalmazó ('magasabb') kristályrendszerben illetve tércsoportban. A főleges mérés elkerülésére itt célszerű egy keresést is végezni a CSD adatbázisban az elemi cella paramétereiket elég nagy toleranciával megadva. Nincs lehangolóbb, mint egy több napos mérés után (pontdetektor) konstatálni, hogy a szerkezetet már leközlötték! A szisztematikus hiányokat a mérés kezdetekor is felderíthetjük, de a tapasztalat szerint célszerűbb ezeket egy teljesebb adatkészlet birtokában keresni és a tércsoportot akkor meghatározni.

Tér-detektoros készülék használatakor elvileg nem szükséges az elemi cella és a tércsoport ismerete a sikeres adatgyűjtéshez, azonban itt is a felvételek kiértékelésének első lépése az indexelés, majd a cellaparaméterek és kristályorientáció ismeretében megtörténik az egyes reflexiókazonosítása a diffrakciós felvételeken, majd integrálásuk, ami a reflexiót alkotó képpontok összintenzitásának megállapítása a környező háttér intenzitásának levonása után (az intenzitások hibája csökkenthető a profil illesztett

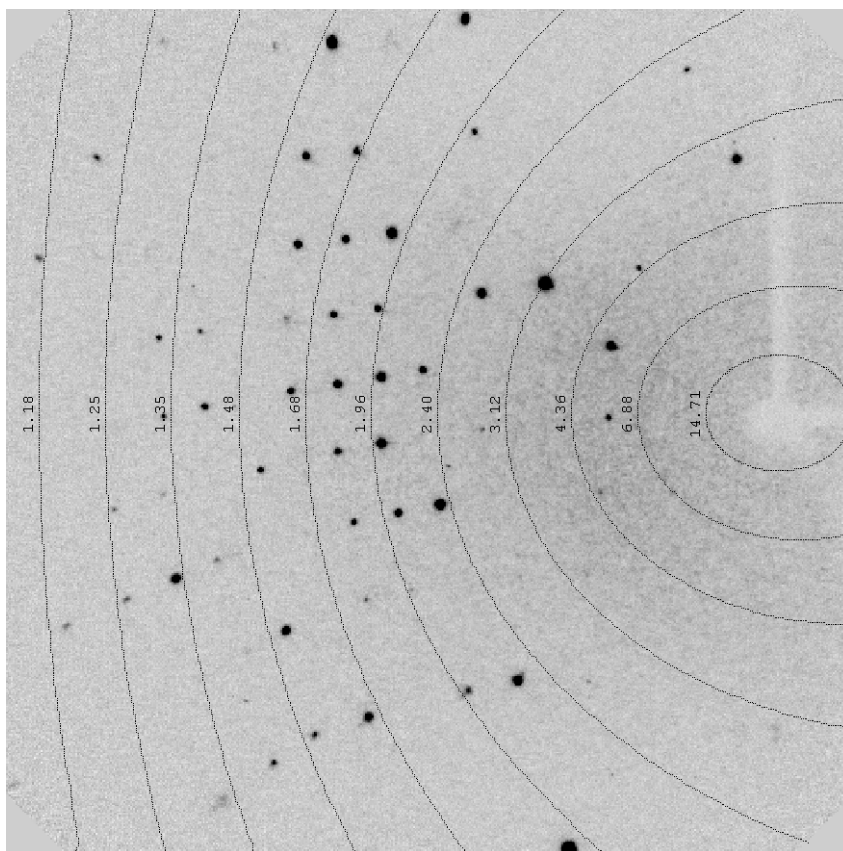
intenzitások

számításával;

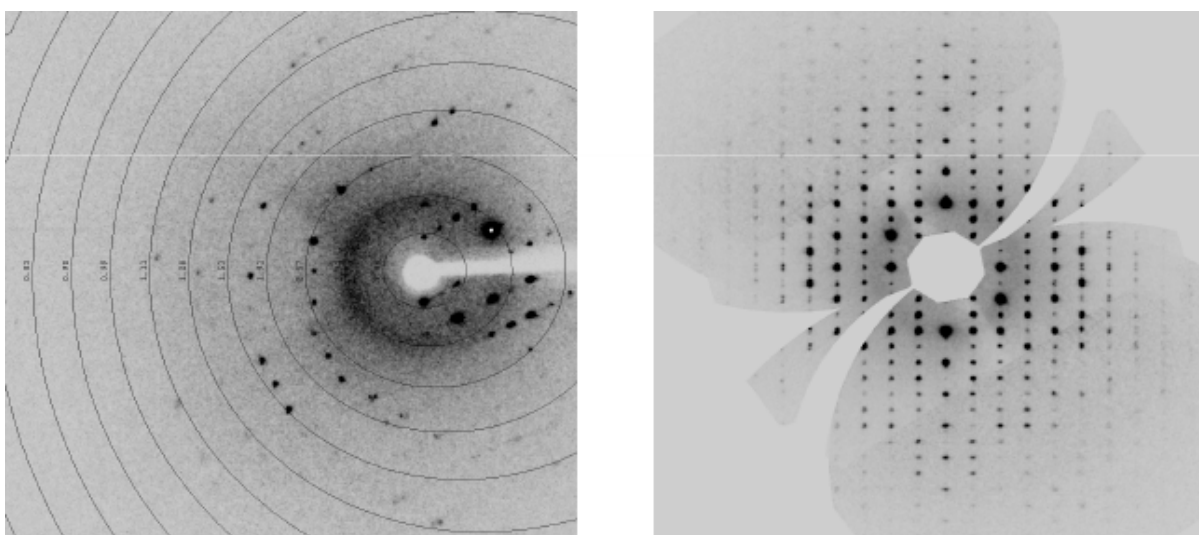
[http://krzys.med.virginia.edu/CrystUVa/wladek\\_processing.php#integration](http://krzys.med.virginia.edu/CrystUVa/wladek_processing.php#integration)

, <http://xgen.iit.edu/IUCr96X-GEN.pdf>). Mégis, kis molekuláknál is célszerű néhány diffrakciós képet (frame) felvenni a kristály különböző orientációiban (4.3.1. ábra), meghatározni az elemi cellát, a kristály minőségét, esetleg a mozaikos kristály (4.3.2. ábra) helyett másikat választani, vagy ha ikerkristályunk van

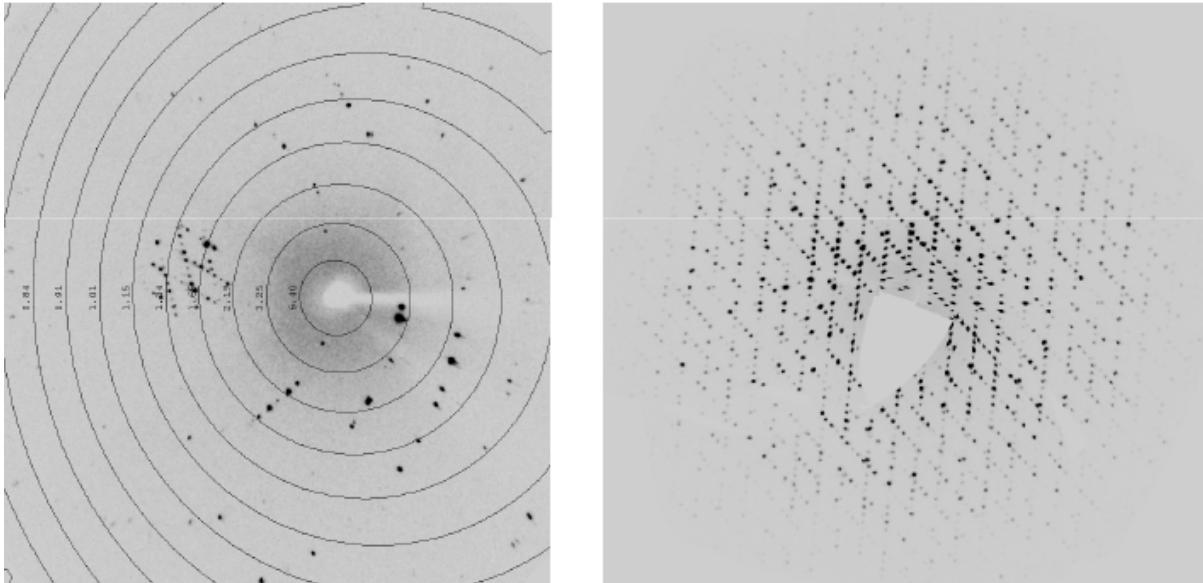
(4.3.3. ábra) újból kristályosítani. Ezután lehet célirányosan optimalizálva elkezdni az adatgyűjtést. A diffraktométer működtető programok a CSD kismolekulás szerkezeti adatbázis azonnali lekérdezését is elvégzik (ha van előfizetésünk rá). Az elemi cella és az indexelés ellenőrzésére a reciprokrácsban is célszerű megvizsgálni a talált reflexiókat.



4.3.1 ábra. Jó minőségű kristályról készült felvétel (frame)



4.3.2. ábra. Mozaikos kristályról készült röntgendiffrakciós felvétel és az elemi cella meghatározása után a  $(0,k,l)$  reciprokrács sík megjelenítése kompozit ábrán.



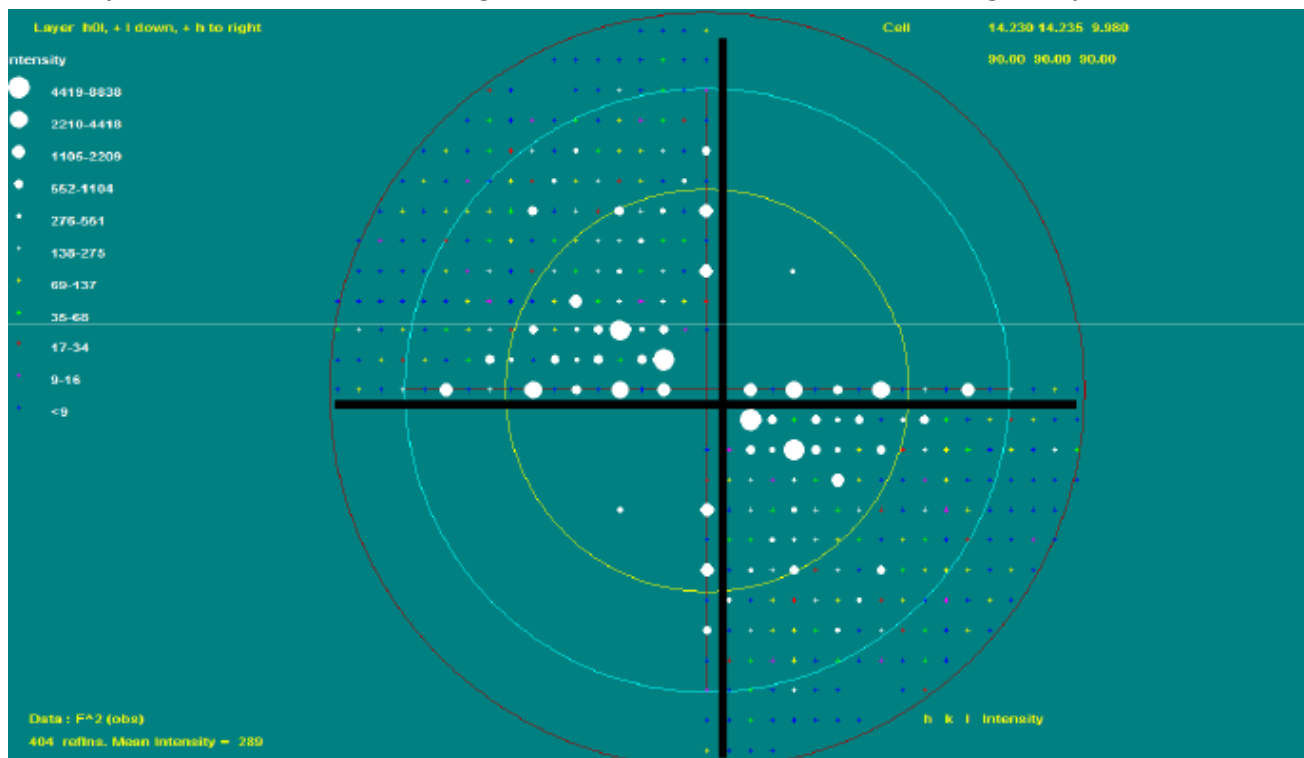
4.3.3. ábra. Ikerkristályról készült felvétel és  $(h, l, l)$  sík

Az elemi cella ismeretében a következő feladat a szimmetria és a tércsoport meghatározása. A gyakorlat azt mutatja, hogy a szerkezet-megoldás sikertelenségének leggyakoribb oka a rossz elemi cella és/vagy tércsoport. A szimmetria felderítésében segítségünkre van a diffrakciós mintázat szimmetriája és a szisztematikus hiányok, amelyekből translációs szimmetriák (csavartengely, csúszósík illetve A, B, C, F vagy I centrált elemi cella) meglétére következtetünk (A szisztematikus hiányok megjelenését részletes magyarázatát a diffrakció hullámelméleti leírásán keresztül az 5.5. fejezetben tárgyaljuk.). A diffrakciós képen bizonyos reflexiók intenzitása a hibahatáron (a diffrakciós felvétel zajszintjén) belül 0, azaz a diffraktált sugarak mindig kioltják egymást. A 4.3.4. ábrán jól látható, hogy az  $x$  és  $y$  tengelyen alternálva erős (fehér) és nagyon gyenge (kék) reflexiókat látunk. Az ábrán kézzel jelölt többi (nem a tengelyekre eső) kis intenzitású reflexiók mindegyike hordoz szerkezeti információt. A csavartengelyek illetve a csúszósíkok meglétére vagy hiányára azok a reflexiók hordoznak információt, melyekre a  $(h, k, l)$  indexek legalább egyike 0. A cella centráltsága esetén az összes reflexióra kiterjedő kioltási szabály van (pl.  $h+k$  páratlan: C bázisra centrált).

A reciproktérnek, a reflexiók összességének a szimmetriája pontcsoport szimmetria, és a kristályszimmetriából következik. A tényleges kristályszimmetriát az összes mért reflexió birtokában, a reciproktér szimmetriáját ellenőrizve állapítható meg (4.3.5. ábra, levezetés: 5.5. fejezet). Például ha a kristályban kétfogású forgás- vagy csavartengely van az  $a$  tengellyel párhuzamosan, a megfelelő irányban ( $h$ ) forgástengely jelenik meg a diffrakciós mintázatban, emellett csavartengely esetén szisztematikus hiányok is jelentkeznek  $(h, 0, 0)$  reflexiók. A kristálybeli inverziós centrum meglétére az összes reflexió intenzitásának együttes vizsgálatából következtethetünk (a normalizált szerkezeti tényező,  $E$  függvényeinek várható értéke). A diffrakciós adatok feldolgozása során az alkalmazott program ezek együttes vizsgálatát javaslatot tesz a tércsoportra. (4.3.6. ábra). A szisztematikus hiányok létét a mért reflexiók száma, azok átlagos intenzitása és az intenzitás adatok szórása alapján kell eldönteni, de ha például ha a kristályunk nagyon gyengén szór, iker és/vagy az adatok minősége nem megfelelő, bizonytalanság léphet fel, hogy valóban fellépnek-e az adott rendszerben a szisztematikus hiányok.

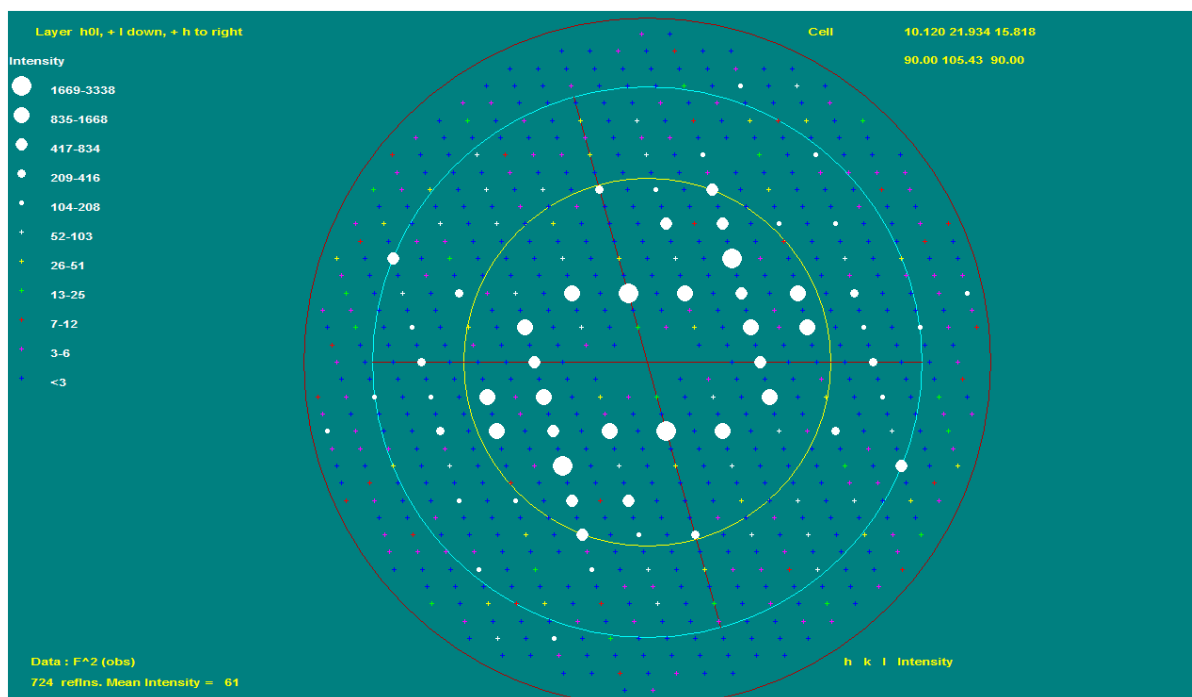
Abból, hogy a kristálybeli szimmetriák megfelelői megjelennek a diffrakciós mintázatban, következik, hogy a minél nagyobb fokú a kristálybeli szimmetria, annál kisebb cikkelyét kell vizsgálnunk a reciproktérnek a reciproktér fennmaradó részét a szimmetriák generálják ebből. Mivel azonban az adatgyűjtési stratégia felállításakor (a mérést vezérlő program végzi el) jellemzően még csak néhány tucat reflexiót mértünk meg csak az elemi cella geometriáját ismerjük, a reflexiók közötti szimmetriaviszonyokat nem. Fennáll a veszélye, hogy az elemi cella geometriája alapján magasabb szimmetriára következtetünk, mint a valóságos –végeredményben az adatgyűjtési stratégiánk hibás lesz, a reflexiók egy részének nem mérjük meg egyik szimmetria ekvivalensét sem. Az elemi cella és/vagy a tércsoport hibás megadására intő jel lehet, ha az elemi cella két oldala egyenlő és/vagy két nem  $90^\circ$ -os szög egyenlő. Ekkor mindenképpen ellenőrizni kell, hogy pusztán az elemi cella paramétereiből meg tudunk-e adni egy más kristályrendszerbe tartozó elemi cellát (pl. monoklint triklin helyett) és esetleg célszerűbb ebben elvégezni az adatgyűjtést.

Az elemi cella helyes megadásához szükség lehet egyéb, kémiai információ figyelembe vételére. Ha nem lépnek fel szisztematikus hiányok (pl. P1 és P-1 tércsoport) a molekula és az elemi cella méretének ismeretében (3.7. fejezet) is el tudjuk dönteni a cella centroszimmetrikusságát, inverziós centrum jelenlétét (hány molekula fér el az elemi cellában). A Cc (No. 9) és C2/c (No. 15) tércsoportok azt az esetet mutatják, hogy a kétfogású csavartengely és a C centráliság miatti szisztematikus hiányok kombinációja miatt két tércsoport nem különböztethető meg pusztán a szisztematikus hiányok alapján. A magasabb szimmetriájú tércsoportból a szimmetria sérülésével (pl. a molekulák közti kis konformációs különbségek) az alacsonyabb szimmetriájú Cc tércsoportba juthatunk. Mindenképpen ajánlatos a teljes szerkezet (az atomi koordináták) ismeretében ellenőrizni, hogy van-e további szimmetriaelem (pl. inverziós centrum) a rácsban. Ha optikailag tiszta anyagunk van az csak P1-ben kristályosodhat míg a racemát esetén a P-1 gyakoribb tércsoport. A szisztematikus hiányok, de még az atomi koordináták ismeretében sem tudunk különbséget tenni az egymás tükörképi párjaként megadható tércsoportok között (6.4.1. fejezet, pl. P3<sub>1</sub>, No. 144 és P3<sub>2</sub>, No. 145), ha kémiai kísérletekből vagy az anomális szórás röntgendiffrakciós méréséből nem tudjuk a molekulában lévő sztereogén centrumok illetve a rács abszolút konfigurációját.



4.3.4. ábra. Szisztematikus hiányok a  $(h,0,l)$  síkon (Reflexió feltétel:  $(h,0,0)$   $h=2n$  és  $(0,0,l)$   $l=2n$ ,  $n$  páros)



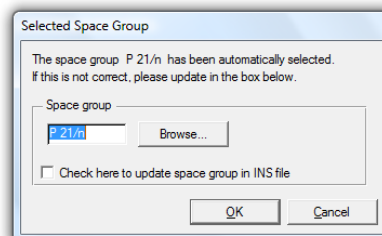


4.3.5. ábra. A reciprok tér képe mutatja az adott tércsoportra jellemző szimmetriát (kétfogású forgás- vagy csavartengely  $k$  irányban)

1 1 2/m      0.443      8285      4013      0.626      2.065

Highest diffraction symmetry with reasonable value of  $R(int)$  is 2/m  
Highest diffraction symmetry compatible with the cell metrics is 2/m

Group	Cond.	Op.	All	Odd	Cut1	Cut2	Cut3	<I/sI>	Op.	No.
h00	h=2n+1		12	6	0	0	0	0.9	21..	1
0k0	k=2n+1		19	9	0	0	0	0.4	.21.	2
00l	l=2n+1	..21	46	22	2	2	2	2.1		3
0k1	k=2n+1	b..	830	424	233	177	113	10.2		4
0k1	l=2n+1	c..		414	220	167	108	10.5		5
0k1	k+l=2n+1	n..		420	217	164	101	9.6		6
h01	h=2n+1	.a.	535	283	87	69	50	6.5		7
h01	l=2n+1	.c.		267	87	69	50	6.9		8
h01	h+l=2n+1			268	2	0	0	0.5	.n.	9
hk0	h=2n+1	..a	324	204	144	129	113	27.3		10
hk0	k=2n+1	..b		114	55	43	31	10.0		11
hk0	h+k=2n+1	..n		206	143	130	108	26.2		12
hk1	k+l=2n+1	A..		4319	1946	1276	753	7.2		13
hk1	h+l=2n+1	.B.		4312	1885	1237	719	7.0		14
hk1	h+k=2n+1	..C		4417	2051	1389	836	8.1		15
hk1	h+k+l=2n+1	I		4403	1988	1335	794	7.8		16
hk1	not all odd/even	F		6524	2941	1951	1154	7.5		17
h00	h=4n+1	.41..		9	3	2	2	13.7		18
0k0	k=4n+1	..41.		14	4	3	2	7.4		19
00l	l=4n+1	..41		34	12	11	8	7.3		20
0k1	k+l=4n+1	d..		622	312	238	144	9.5		21
h01	h+l=4n+1	.d.		400	76	63	39	4.5		22
hk0	h+k=4n+1	..d		265	177	154	127	23.2		23



Candidate space groups (NS = non-standard setting) :

H-M symbol	No.	Centric	Laue class	M	R(int)	N(obs)	CSD	ICSD	CFOM	
P 21/n	NS	14	yes	2/m	4	0.032	1122	69616	2866	2.028

4.3.6. ábra. Az adatfeldolgozó program a reciprok tér szimmetriájára ( $R_{int}$  – a szimmetria ekvivalensnek tekintett reflexiók egyezésének mérőszáma) és a szisztematikus hiányokra alapozva javaslatot tesz a tércsoportra.

Az adatgyűjtés során tehát az első lépés néhány (pontdetektoros készülék) vagy néhány tucat (tér-detektoros készülék) reflexió gyűjtése. Ezek szórási irányából a mérésvezérlő program meghatározza a reciprok rács paramétereit (3.6. fejezet) és ebből az elem cella paramétereit és az orientációját leíró paramétereket (5.1. fejezet). Ezek ismeretében bármely reflexióhoz számítható, hogy milyen kristály

orientációban detektálható, és milyen irányú lesz a szórt sugárnyaláb, tehát a mérési stratégia felállítható. A mérési stratégia része: a reciprok térmelyik részét kell az összes szükséges/detektálható reflexió gyűjtéséhez megmérni. Ennek eldöntéséhez fontos információk a szükséges/elérhető maximális felbontás; a cellaparaméterekből következtetett valószínű kristályrendszer; szükség van-e a Friedel-párokra (5.5. fejezet);, milyen expozíciós idő szükséges, azaz mennyi időt szánunk a mérésre; hogyan kerülhető el a reflexiók átlapolása a detektoron. A mérés elvégzése után az összes reflexió birtokában történik a cellaparaméterek további finomítása, a tércsoport meghatározása és a szimmetria ekvivalens reflexiók átlagolása. Ennek során korrekcióba kell venni a kristály abszorpcióját, röntgensugárban való időbeli bomlását, szórásának anizotrópiáját. Az adatkészlet belső egyezését (szimmetria ekvivalens reflexiók és a többszörösen mért reflexiók intenzitása egyezésének mértéke) R-faktorral mérjük ( $R_{int}$ ,  $R_{merge}$  vagy  $R_{sym}$ , 4.3.7. ábra). A szerkezet-meghatározásban az egy elemi cella szórását leíró függvényt, a szerkezeti tényezőt használják (5.1. fejezet). A reflexiók szerkezeti tényezői az intenzitásokból számíthatók: A szerkezeti tényező négyzete arányos az intenzitással, és a számításakor alkalmazott képlet tartalmazza az egy elektron okozta szórás függvényét; az Ewald-gömb egységnyi felülete felé szórt intenzitás hullámhossz-függését; a szórt intenzitás függését a kristálytérfogattól, az elemi cella térfogatától, és a beeső intenzitástól; emellett az abszorpciók korrekciót; a Lorentz korrekciót (a kristály forgatásakor a különböző reflexiók különböző sebességgel haladnak át az Ewald-gömbön); és a röntgensugár polarizációjának irányfüggését korrigáló tényezőt (<http://esilrhc1.esi.umontreal.ca/~syguschj/cours/BCM6200/Electron%20density%20equations.pdf>).

$$R_{int} = \frac{\sum_{\mathbf{h},j} |I_j(\mathbf{h}) - \langle I(\mathbf{h}) \rangle|}{\sum_{\mathbf{h},j} I_j(\mathbf{h})}$$

4.3.7. ábra Az  $R_{int}$  kifejezése ( $I_j(\mathbf{h})$  a  $\mathbf{h}$  Laue indexhármassú reflexió  $j$ -edik méréséből kapott adatok,  $\langle I(\mathbf{h}) \rangle$  az átlagos mért intenzitása).

#### 4.4. A diffraktométer főbb részei (Harmat Veronika)

Az egykristálydiffrakciós kísérletekhez alkalmazott röntgendiffraktométerek monokromatikus röntgensugárzást használnak (kivételek: Laue-felvételek, ld. következő bekezdés), aminek minél nagyobb intenzitásúnak és jól fókuszálnak kell lennie. A kristály forgatását, a detektor kiolvasását, és ha forgatható, akkor a mozgatását, valamint a röntgenablak nyitását/csukását számítógép vezérli. Hasznos kiegészítő az alacsony hőmérsékletű mérést biztosító alacsony hőmérsékletű feltét, és a minták gyors cseréjét, a kristályok szűrését lehetővé tevő mintacserélő robot. A diffraktométer főbb részei: sugárforrás, optika (a röntgensugár monokromatizálására, leszűkítésére és fókuszálására), goniométer a kristállyal, a kristály centrálását segítő kamera vagy mikroszkóp, direktsugárfogó, detektor (4.4.1. ábra).



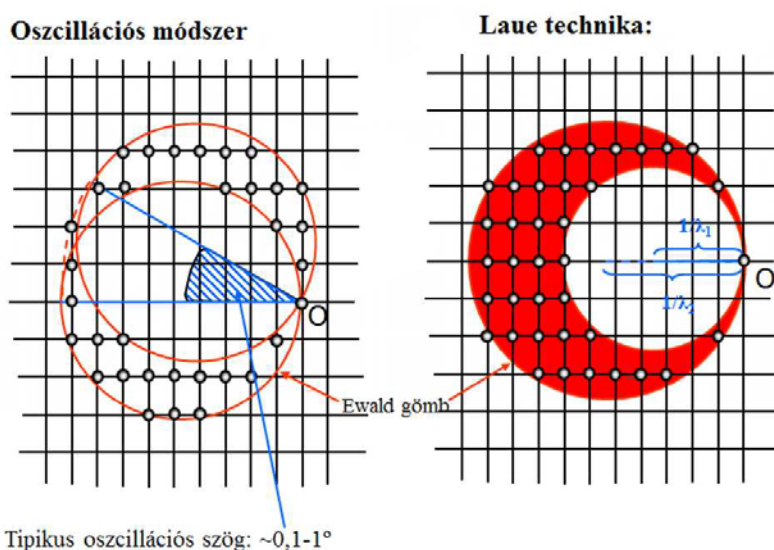
4.4.1.ábra A diffraktométer részei. (Balra: diffraktométer forgóanódos sugárforrással, image plate detektorral; jobbra: mérőállomás a DESY szinkrotronnál CCD detektorral. 1: sugárforrás, 2: optika, 3: goniométer; 4: kamera; 5: hideg nitrogéngáz fúvókája (alacsony hőmérsékletű méréshez); 6: detektor; 7: direktsugár fogó

A röntgendiffrakciós alkalmazások a neutrondiffrakciós módszerekkel szemben azért olyan elterjedtek, mert könnyen elérhetőek a sugárforrások otthoni mérések számára is („házi” diffraktométerek): ezek a katódsugárcsövek. Mivel a hullámhossznak a vizsgált távolságok mérettartományába kell esnie (atom-atom távolságok a mintában), és minél intenzívebb monokromatikus sugárzásra van szükség, a források leggyakrabban rezes vagy molibdént tartalmaznak anódként és a vizsgálatokhoz a folytonos fékezési sugárzásban megjelenő éles maximumok közül a legintenzívebbet, a  $K\alpha$  karakterisztikus röntgensugárzást használják. Ez az anód L $\rightarrow$ K héjak közti elektronátmenetének felel meg (tulajdonképpen dublett az s és p pályák közti kis energiakülönbség miatt, de a két maximumot legtöbb monokromátor nem választja el). (A röntgenső működéséről bővebben pl.: [http://nightowl.sote.hu/oktatas/BME2011/anyagok/Rtg\\_FF.pdf](http://nightowl.sote.hu/oktatas/BME2011/anyagok/Rtg_FF.pdf); a röntgenső emissziós spektrumának függése a teljesítménytől: [http://nasa.web.elte.hu/NewClearGlossy/Flash/Bremsstrahlung\\_PhysHelp/currpd.html](http://nasa.web.elte.hu/NewClearGlossy/Flash/Bremsstrahlung_PhysHelp/currpd.html);  $K\alpha$  hullámhosszak Cu: 1,54187 Å, Mo: 0,710747 Å). A zárt források igényelnek a legkevesebb karbantartást. Az ún. forgóanódos forrásokban az anód hatékonyabb hűtése érdekében az anód egy forgó dob, aminek mindig más részér éri az elektronnyaláb. Ezekben a jobb hűthetőség miatt nagyobb teljesítmény és intenzívebb röntgensugárzás érhető el, de a mozgó alkatrészek miatt a vákuumot vákuumszivattyúkkal kell fenntartani. A házon belüli röntgenforrások legújabb generációja a microsource. Ezekben elektronoptikai eszközök segítségével elérik, hogy a röntgensugárzás csak egy nagyon kis térszögben keletkezzen, de fényességük megközelíti az első és második generációs szinkrotronokét. Egy további előny, hogy a nagy foton fluxust nagy energia hatékonysággal tudjuk elérni, mivel a forrás fogyasztása 100W körüli és a hűtés is kevésbé energiaigényes. Mivel a diffraktométer folytonos üzemben működik ez jelentősen csökkenti a fenntartási költségeket és a mikroforrások karbantartás igénye is alacsony, nem tartalmaznak mozgó alkatrészt.

A szinkrotron sugárforrások részecskegyorsítók, amelyekben relativisztikus sebességre gyorsított elektronokat vagy pozitronokat mágnesek segítségével egy tárológyűrűben keringetnek. Mivel ezek nem egyenes vonalú egyenletes mozgást végeznek, tehát gyorsulnak, sugároznak- az elektromágneses sugárzás hullámhossza a mágnesek segítségével szabályozható (összefoglaló a működésről és

alkalmazásokról az ESRF honlapján: <http://www.esrf.eu/about/synchrotron-science>). Előnyük a hagyományos sugárforrásokhoz képest, hogy a jobb fókuszálás és nagyobb intenzitás miatt a fényesség akár több, mint tíz nagyságrenddel nagyobb (gyengébben szóró és sokkal kisebb kristályok-mikrokristályok is vizsgálhatók; pordiffrakciós felvételekből szerkezet meghatározása), a változtatható hullámhossz (fázisprobléma megoldása anomális szórás módszerével, 12.4. fejezet), fehér röntgensugárzás és felvételek akár 100 ps időközönként (időfelbontásos felvételek Laue technika alkalmazásával; bővebben: <http://cars9.uchicago.edu/biocars/pages/timeresolved.shtml>). A legnagyobb fényességű sugárforrások, a szabad elektron lézerek lineáris felépítésű gyorsítók, a bennük előállított röntgensugár fényessége további 9 nagyságrenddel nagyobb ([http://www.xfel.eu/sites/site\\_xfel-gmbh/content/e63594/e65073/e126274/e134413/9Barends\\_FELNanocrystallography\\_2\\_eng.pdf](http://www.xfel.eu/sites/site_xfel-gmbh/content/e63594/e65073/e126274/e134413/9Barends_FELNanocrystallography_2_eng.pdf)). Ezekkel nanométer mérettartományban lévő kristályok is vizsgálhatók, azonban a mintával közölt nagy energia miatt új mérési és kiértékelési módszerre van szükség, mert a kristály expozíciójkor hirtelen elbomlik, teljes adatkészlet csak sok kristály felhasználásával kapható.

Az optikai eszközök szerepe monokromatikus (egykristály monokromátorok, szűrők, tükrök) és jól fókuszált sugár (fókuszáló tükör rendszerek, Fresnel lencsék) előállítása. A monokromatikus és polikromatikus (fehér) röntgensugárzással történő mérés közti különbség megérthető az Ewald-gömb segítségével (4.4.2. ábra). Monokromatikus sugár esetén a kristályt forgatni kell, hogy az összes lehetséges reflexió detektálható legyen. Tér-detektor használata esetén, ami több reflexió detektálását teszi lehetővé egyidejűleg, a kristály forgatása úgy történik, hogy a teljes szögtartományt kis szeletekre ( $0,1-5^\circ$ ) osztjuk, és egy-egy felvétel expozíciója közben a kristály mindig a következő kis szögtartományban oszcillál (pl.  $0-1^\circ$ ,  $1-2^\circ$ ,  $2-3^\circ \dots$ ; oszcillációs technika). A fehér röntgensugárzással készített felvétel úgy értelmezhető, mintha az adott hullámhossztartományban Ewald-gömbök végtelen sorozata metszené a reciprokrácsot, így a kristály forgatása nélkül is nagyon sok reflexiót mérünk. Ezt a módszert nem alkalmazzák hagyományos feladatokra (szerkezet-meghatározás), mert még nagyon jó minőségű kristály esetén is nagy az adatvesztés a reflexiók átlapolása miatt. Alkalmazási területe időfelbontásos krisztallográfia: a kristályban zajló folyamatokról (pl. enzimreakció) pillanatfelvételeket, molekuláris mozt készítünk.



4.4.2. ábra Az oszcillációs mérési módszer és a Laue technika esetén egy felvételen megjelenő reflexiók (a megfelelő reciprokrács pontok gömbökként vannak ábrázolva). Az oszcillációs módszernél a kristályt, és így a reciprokrácsot kis szögtartományban oszcilláltatjuk (az ábrán: a reciprokrács-hoz képest az Ewald-gömböt a másik irányban oszcilláltatjuk). Laue technika: a különböző hullámhosszoknak megfelelő Ewald-gömbök sorozata (piros) nagy térrészt metsz a reciprokrácsból.

Ahhoz, hogy minden lehetséges reflexiót meg tudjuk mérni, több tengely körül kell forgatni a kristályt. Ezt valósítják meg a négykörös diffraktométerek (3 tengely körül forog a kristály, a pontdetektor pedig a  $2\theta$  körön mozog). Újabban különböző  $\kappa$ -elrendeződésű goniométereket alkalmaznak, amelyek forgatószerkezete kompaktabb, ezért kevesebb olyan szögkombináció van, ahol a diffraktométer részei ütköznenek. Ha az Ewald-gömb méretéhez képest kis térfogatú régiót akarunk mérni a reciproktérből (gyengén szóró kristály, tipikusan fehérjekristály), elég, ha egy tengely körül forog a kristály: ekkor az Ewald-gömb amerikai fánk alakú térrészt hasít ki a reciprokrácsból, a kimaradó középső lyuk hiányozni fog, de kis felbontás esetén ez csak kis térrész, a lyuk kiszélesedését nem tartalmazza. A hiányzó reflexiók helyett szimmetriától és kristály-orientációtól függő módon van esély rá, hogy szimmetria ekvivalens reflexiókat tudunk mérni.

A kristályról szórt sugarakat különböző elven működő detektorokkal tudjuk detektálni. A nem szóródott sugarakat a direkt sugárfogó (beam stop) árnyékolja le. A szintillációs (pont-) detektorokkal egyenként mérhetők a reflexiók, ezért a mérési idő függ a reflexiók számától, ami viszont az elemi cella méretétől: minél nagyobb az elemi cella annál sűrűbben helyezkednek el a reciprokrács pontok a reciproktérben. Emiatt makromolekulás kristályok mérésekor (több száz ezer-millió reflexió) nem alkalmazhatók, csak kismolekuláknál (néhány ezer reflexió). A két dimenziós detektorok (térdetektorok) gyors mérést tesznek lehetővé, mert egyszerre több reflexiót detektálnak, és a mérési idő nem függ a szerkezet méretétől. Házi diffraktométereknél sok helyen image plate detektort használnak, ami offline kiolvasású detektor, ezért szinkrotronoknál, ahol egy-egy felvételnél az expozíciós idő néhány másodperc lehet, nem célszerű használatuk. Előnyük a nagy felület, illetve a CCD detektorokénál jobb felület/ár arány (működésük fotostimulált lumineszcencián alapul, [http://en.wikipedia.org/wiki/Photostimulated\\_luminescence](http://en.wikipedia.org/wiki/Photostimulated_luminescence)). A CCD detektorok előnye, hogy online kiolvasásúak, először szinkrotron sugárforrásoknál terjedtek el. Az utóbbi években a nagyméretű CCD-k ára lecsökkent, és egyre inkább elterjednek a házi diffraktométerekben, fehérjekrisztallográfiai (a kiolvasási idő megspórolása kompenzálhatja az image plate-nál lényegesen kisebb felület miatti idővesztéseket) és kismolekulás alkalmazásoknál is (a mérési idő lerövidül a pontdetektorral összehasonlítva, ld. 4.5. fejezet). (Az image plate és CCD detektorok működéséről: <http://neutrons.ornl.gov/conf/NXS2008/Presentations/Sol%20M.%20Gruner%20-%20Detectors%20II.pdf>). Újabb típusú, egyelőre még kevésbé elterjedt detektorok a szilárd pixeldetektorok, amelyek a nagy felület, gyors kiolvasás és nagy dinamikus intenzitásstartomány előnyeit egyesítik (<http://journals.iucr.org/j/issues/2006/04/00/he5345/he5345.pdf>, [http://www.slac.stanford.edu/econf/C0604032/talks/snic\\_broennimann.pdf](http://www.slac.stanford.edu/econf/C0604032/talks/snic_broennimann.pdf)).

## 4.5. Adatgyűjtés, pontdetektor vs. térdetektor

Az adatgyűjtési stratégia kialakításához is figyelembe kell venni a megoldandó feladatot. Ha az abszolút konfiguráció meghatározása a cél, célszerű minél több Friedel-pár reflexió megmérése. Térdetektoros készüléknél hasznos minél nagyobb redundanciát beállítani, hogy a szimmetria -ekvivalens reflexiókat többször megmérjük. Többszöri mérésből történő átlagolással javítható a jel/zaj viszony, és csökkenthető a detektorhibából, a gömbnek síkra való levetülésének korrekcióba vételében történő hibákból és véletlenszerű intenzitás-ingadozásból eredő hiba. A redundancia növelésének akadálya lehet a kristály sugár általi károsodása.

Mivel a pontdetektor minden csúcsnál méri a bal hátteret, a csúcst és a jobb hátteret ezzel pontosabb integrál mérést végez az intenzitásra és elegendő a szimmetria által ekvivalens reflexiókat egyszer mérni, vagyis a redundancia általában 1.

Az adatgyűjtés elkezdéséhez számos döntést kell hozni. Természetesen a cél minél teljesebb adatkészlet gyűjtése minél nagyobb jel/zaj viszonyal, nagy redundanciával, de minimális idő alatt. Egy segítség: <http://people.mbi.ucla.edu/sawaya/m230d/Data/data.html>. Térdetektoros készüléknél a főbb állítható és állítandó paraméterek

- A detektor-kristály távolság, célszerűbb nagyobbra venni nagy elemi cella (reflexiók átlapolásának elkerülése), vagy ha a kristály rosszul diffraktál (teljes detektorfelület kihasználása)
- Az adatgyűjtési idő: , ha hosszabb a felvételek adatgyűjtési ideje javul a jel/zaj viszony. Óvatosan kell eljárni pl. a fémkomplexek esetén, mert a detektort telítésbe vihetik.
- Oszcillációs szög, különösen nagy elemi cellánál és nagy oszcillációs szögnél a csúcsok átlapolhatnak
- Az adatgyűjtés teljes ideje. Alacsony hőmérsékletű mérésnél a sugárkárosodás kevésbé jelentkezik. A térdetektoros készüléknél célszerű a nagy redundancia.

Pontdetektoros készüléknél az elemi cella alacsony szimmetriája, lényegesen megnöveli az adatgyűjtés idejét. Térdetektoros készüléknél ez kisebb probléma. Pontdetektornál célszerű periodikusan (1-2-óránként) intenzitás kontrol reflexiókat újra mérni, hogy lássuk, mennyit bomlott a kristály. Orientációs kontrol reflexiókkal ellenőrizzük, hogy a kristály esetleg elmozdult, ezt az orientációs mátrix újraszámolásával korrigálhatjuk. Ezzel szemben a térdetektoros készüléknél a kezdeti elemi cella pontatlan paraméterei nem okoznak problémát az adatgyűjtés során.

Az interneten számos programletölthető a röntgendiffrakciós adatgyűjtés szemléltetésére, itt az XrayView programot említjük (<http://phillips-lab.biochem.wisc.edu/xrayviewuse.html> , George Phillips engedélyével). A program működését szemlélteti a 4.5.1. videó. Az OPTION CONTROLS menüben a rácsparemetereket, a kristályra vonatkozó és néhány paramétert (pl. mozaikosság) és a kísérleti paraméterek egy részét (hullámhossz, felbontás), a GENERAL CONTROLS menüben a diffraktométerre vonatkozó főbb paramétereket tudjuk beállítani (a forgatás szögét, detektor távolságot, megfigyelési szöget stb.)

A kristályt a forráshoz képest minden irányban elforgatva felvesszük a szórás képet. A diffrakciós feltételt az Ewald-gömb adja meg, ennek szerkesztését a 3.6. fejezetben mutattuk be. Mindenesetre, ha a detektorunk térdetektor, akkor igaz, hogy egyszerre a reciprok tér egy nagyobb részletét látja. Azonban ahogyan a video is mutatja, gömböt kell síkra vetíteni, ami a készülék mérési hibáján kívül is torzítást okoz. Ha a csúcsokat egyedileg mérjük pontdetektorral ez a hiba sokkal kisebb mértékű mivel a reciprok térnek csak egy nagyon kis részletét tapogatójuk le a detektorral. Fémkomplexek vizsgálatánál a pontdetektor másik előnye a nagy dinamikus tartomány (több százezer), a fématom miatt gyakran előforduló nagyon nagy csúcsokat és a kis csúcsokat lineáris érzékenységgel méri. Térdetektoros készüléket a nagy csúcsok telítésbe visznek, azaz a kis csúcs mellett a nagyok intenzitása torzul. Proporciónális wire frame detektáláson alapuló nagyon hatékony térdetektort (GADDS) akár tönkre is tehet, ha szervesen sötét nagy intenzitású réz sugárzással mérjük. A detektor itt tulajdonképpen egy xenonnal töltött kamra egymáshoz nagyon közel kifeszített fémhuzalokkal és a röntgen fotonok által létrehozott kisülést detektáljuk. Ha nagy a sugárzás intenzitása a fémhuzalok összeérhetnek a röntgenfotonok által létrehozott kisülés hatására.

Természetesen a nagy gyorsaságuk miatt a jövő a térdetektoros készülékeké. Pontdetektorral naponta 600-1000 reflexiót érdemes mérni a kellő pontosság eléréséhez. A mérendő reflexiók száma kis molekuláknál körülbelül a nem hidrogén atomok száma szorozva 100-zal, tehát 20 atomos (kis) molekulát 2-3 napig, 40 atomosat, ha nincs szerencsénk, és a kristályrendszer triklin, 2 hétig kell mérni (2 hét alatt stabilitási, a röntgen sugárzás miatti bomlási egyéb problémák is felmerülnek). Térdetektoros készülékkel gyakorlatilag a molekula méretétől függetlenül néhány óráig tarthat egy mérés. A reciprok tér felderítésének egy animált előrehaladását mutatja a 4.5.2. videó.

4.5.1. videó [Adatgyűjtés](#) szimulálása az XrayView programmal

[XrayView software](#)

4.5.2. videó. [A reciprok tér animáltan.](#)

## **4.6. Az alacsony hőmérséklet előnyei és hátrányai, a folyékony nitrogénnel kapcsolatos néhány balesetvédelmi szempont**

Az alacsony hőmérsékleten történő mérés előnye, hogy alacsony hőmérsékleten a hőmozgás jelentősen lecsökken, ezért jobb minőségű diffrakciós adatkészlet gyűjthető a kristályról, és pontosabb szerkezetmeghatározás lehetséges. A másik fő előny főleg fehérjekristályok vizsgálatánál jelentkezik. A röntgen sugárzás hatására gyökök keletkeznek a kristályban és ezek másodlagos reakciók során csökkentik a kristály rendezettségét. Ezek a folyamatok különösen gyorsan károsítják a fehérjekristályokat. A fehérjemolekulák közötti üregeket, csatornákat (oldószercsatornák), amelyek a kristály térfogatának 20-80%-át teszik ki, víz (és az anyalúgból származó kismolekulák, ionok) tölti ki. A víz radiolízise és az oldószercsatornában a gyökionok diffúzióval történő vándorlása miatt a kristály nagyon gyorsan károsodik. Az oldószercsatornák tartalmának alacsony hőmérsékleten való „megdermesztésekor” a gyökionok már nem tudnak vándorolni, a kristály sugárzás általi károsodása jelentősen lassítható. Az alacsony hőmérsékletet úgy kell megválasztani (100 K), hogy a víznek ne kristályos, hanem amorf módosulata legyen stabilis, így a kristály víztartalma és a kristályt körülvevő cseppecske ne képezhessen mikrokristályos jeget, ami egyrészt a kristályt veszélyeztetné a fagyáskor bekövetkező térfogatváltozás miatt, másrészt szórása elfedné a fehérjekristály szórását („jéggyűrűk”) adatvesztést okozva. Fagyálló adalékok adagolásával (krio védőanyagok, pl. többértékű alkoholok, polietilén glikol, esetleg nagy koncentrációjú sók) érhető el, hogy a lehűlés folyamata alatt se képződhessen kristályos jégfázis. Szinkrotron forrásnál történő méréseknél a nagyon nagy intenzitású röntgen sugárzás további trükköket tesz szükségessé, pl. a kristálynak csak egy nagyon kis részletét exponáljuk erősen fókuszált sugárzással és a következő diffrakciós felvételt már egy másik kristályrészen vesszük fel.

A folyékony nitrogén súlyos égési sérüléseket okozhat. Térfogatának 700-szorosára tágul elpárolgáskor, ami robbanásveszélyt jelent –teljesen lezárt edényben nem szabad tárolni. Ha a belelélegzett levegőben az oxigén koncentrációja lecsökken 21%-ról 18%-ra (mert pl. 1 liter nitrogén hirtelen elpárolgott a helyiségben és nem volt szellőzés) szédüléssel és ájulással járó tünetek léphetnek fel. A folyékony nitrogénnel kapcsolatos balesetvédelmi szabályokat be kell tartani: Folyékony nitrogénnel csak jól szellőző

helyiségben, védőeszközöket használva, fokozott figyelemmel szabad dolgozni és veszély esetén legyen segítség elérhető közelségben. A biztonsági szelepek ne legyenek lefagyva, lezárva.

[Teszt](#)

## 5. A krisztallográfiai fázisprobléma, a direkt módszerek alapjai, szerkezet-megoldás kis molekulák esetén (Harmat Veronika, Bényei Attila)

### Irodalom

A fázis probléma és a direkt módszer részletes leírása, az IUCR oktatási segédlete:

- <http://www.iucr.org/education/pamphlets/17>

Egy klasszikus:

Herbert Hauptman: The phase problem of x-ray crystallography Rep. Prog. Phys (1991) 1427-1454. [http://www.ecs.umass.edu/~mettu/ece697s/papers/X-ray%20crystallography/hauptman\\_phase\\_problem.pdf](http://www.ecs.umass.edu/~mettu/ece697s/papers/X-ray%20crystallography/hauptman_phase_problem.pdf)

Alapvető munkák a fejezet megértéséhez:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2852296/>
- Böcskei Zsolt: Röntgendiffrakció (egyetemi jegyzet) 1998.
- J. P. Glusker, M. Lewis, M. Rossi: Crystal Structure Analysis for Chemists and Biologists, John Wiley & Sons, 1994
- Jan Drenth, Jeroen Mesters: Principles of Protein X-Ray Crystallography, Springer

Felhasznált ábrák:

- M.C. Escher grafikái: <http://www.mathe.tu-freiberg.de/~hebisch/cafe/mce/escher.html>

Tércsoportok diagramjai:

- <http://img.chem.ucl.ac.uk/sgp/mainmenu.htm>

Kevin Cowtan képekgyűjteménye a Fourier transzformációról, Fourier Kacska és Fourier Macska bemutatása és sok más érdekesség

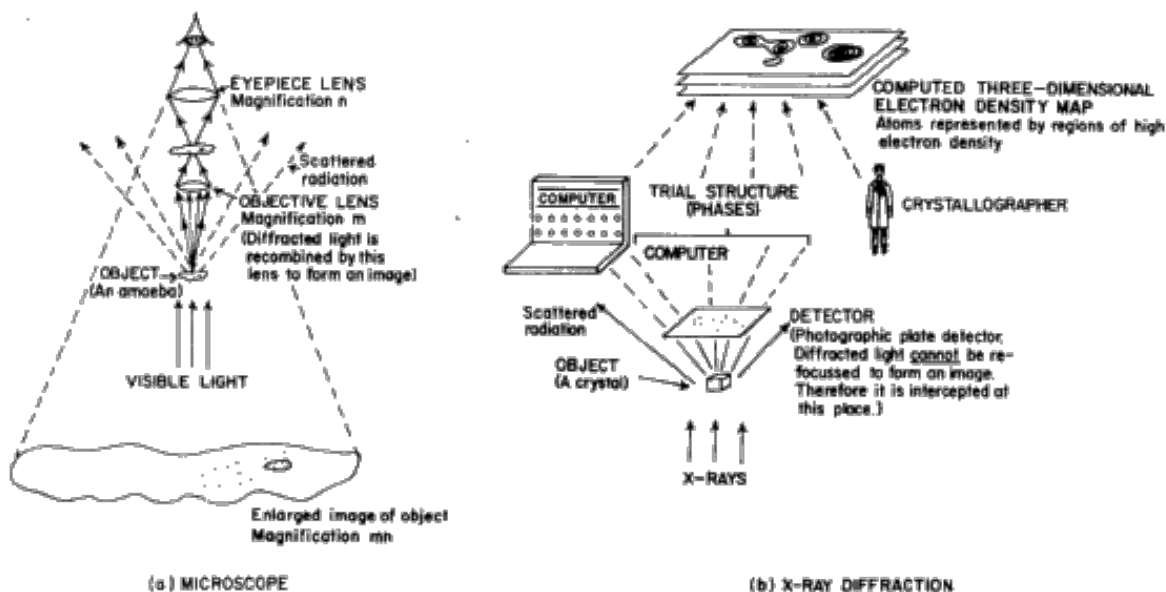
- <http://www.ysbl.york.ac.uk/~cowtan/fourier/fourier.html>



A charge flipping módszer Oszlányi Gábor és Sütő András jelentős érdemeket ért el az algoritmus kidolgozásában

- <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?sc5009>

A röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat elvének matematikai levezetések nélküli bemutatására az 5.1. ábrán látható, az optikai mikroszkóppal való analógiát szokták bemutatni



5.1. ábra. A diffrakció és a mikroszkóp analógiája

A mikroszkópban látható fényel megvilágítva a tárgyat a tárgyról szóródik a fény egy része és lencsék (szemlencse és tárgylencse) segítségével a fotonok által tárgyról hozott információt úgy rendezzük (a szóródott sugarakat újrakusáljuk), hogy létrejön a tárgy nagyított képe. A lencsék működésének alapja, hogy a fény terjedési sebessége a különböző közegben különböző. Sajnos, a röntgen tartományban ez nem teljesül, a röntgensugárzás minden közegben közel azonos sebességgel terjed (1. fejezet; törésmutatója közel 1 minden anyagra, [henke.lbl.gov/optical\\_constants/getdb2.html](http://henke.lbl.gov/optical_constants/getdb2.html)). Egykristály diffrakció esetén a röntgen sugárzással olyan mintát (egykristály) világítunk meg, amelyet a vizsgálandó tárgy, az elemi cella nagyon sok ( $10^{16}$ - $10^{19}$ ) azonos elrendezésű másolata alkot. Ekkor is magába kódol a szórt sugárzás az egykristály (minta) szerkezetére (elektronsűrűségi felhőjére) vonatkozó információt. Mivel lencsét nem tudunk csinálni a röntgen tartományban, a refókuszátlan szórt sugarakat, a diffrakciós képet detektáljuk, és szellemi valamint számítógépes munkával állítjuk elő a tárgy képét: dekódoljuk az információt és kiszámítjuk az elektronsűrűség térképét. Ehhez néhány órá, több hónapos vagy akár több éves munka kell a feladat bonyolultságától függően. A diffrakciós kép a mikroszkópban is megjelenik egy kitüntetett helyen, a diffrakciós síkban. A diffrakciós kép sajátja, hogy a mintáról azonos szög alatt szóródott sugarak találkoznak egy-egy pontjában. Ebben a fejezetben azt mutatjuk meg, hogy mi történik a fényel (röntgen fotonnal) a kristállyal történő kölcsönhatáskor és hogyan tudjuk a dekódolást elvégezni.

## 5.1. Matematika: a diffrakciós kép, mint az elektronsűrűség Fourier transzformáltja (Harmat Veronika)

A Bragg-egyenlet (3. fejezet) egy dimenzióra egyszerűsítve segít megérteni, hogy miért diszkrét pontokból áll a rácsok, diffrakciós képe. Ez a tulajdonság minden periodikus szerkezetre, így az egykristályokra is igaz. A röntgensugárzás hullámtermészete miatt egyes helyeken csúcsokat, másutt hiányokat tapasztalunk a diffrakciós képben. A csúcsok helyét tehát a fény hullámhossza (a diffrakciós kísérletben monokromatikus sugárzást használunk) és a rácssíkok  $d_{hkl}$  távolsága határozza meg. Ez a  $d_{hkl}$  távolság pedig kizárólag a rács, az elemi cella paramétereitől és a  $(h,k,l)$  Miller-indexektől függ, tehát részben dekódoltuk az információt: a mért  $\theta$  értékekből a rácssíkok  $d_{hkl}$  távolsága meghatározható. A pordiffrakciós mérések kiértékelése (8. fejezet) ezen alapul. Az, hogy milyen  $\theta$  értéknél vannak csúcsok ujjenyomat szerűen jellemzi a rácsot. A következőkben a 3 dimenziós kristály röntgen szórásának levezetése következik. A röntgensugárzást, mint elektromágneses hullámot, amit az amplitúdó ( $A$ ), fázis ( $\varphi$ ), és hullámhossz segítségével írhatjuk le ( $\lambda$ , nem változik ún. szabad elektronokról való szóródáskor). Az 5.1.1. ábrán látható képlettel leírt hullám, komplex függvény, a fázistól függő  $i$ -szer szinuszos és koszinuszos tagok összege. A több hullám eredőjeként létrejövő hullám grafikus ábrázolásakor koszinusz (vagy szinusz) görbék megjelenítése és összeadása helyett sokkal könnyebb és szemléletesebb az Argand diagramon való ábrázolás: itt a hullámot a komplex számsíkon egy pont (a pontba mutató helyvektor) reprezentálja (hossza:  $A$ , a valós tengellyel bezárt szöge  $\varphi$ ; a valós és imaginárius tengelyre eső vetületei  $A\cos\varphi$  és  $A\sin\varphi$ ). Hullámok összeadása elvégezhető a vektorok összeadásaként az Argand diagramon.

### Hullám

megjelenítése vektorként az Argand diagramon,

$$\mathbf{A} = A \exp i\phi = A(\cos \phi + i \sin \phi)$$

Hullámok összegzése :

$$\mathbf{A}_1 + \mathbf{A}_2 = A(\exp i\phi_1 + \exp i\phi_2)$$

Argand diagram:

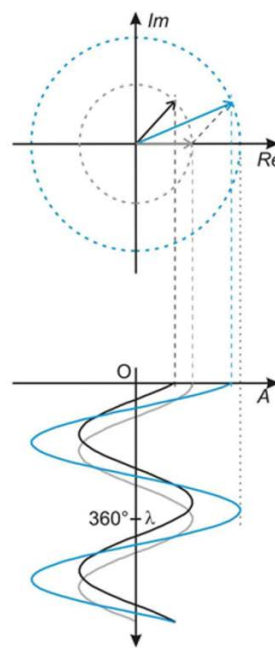
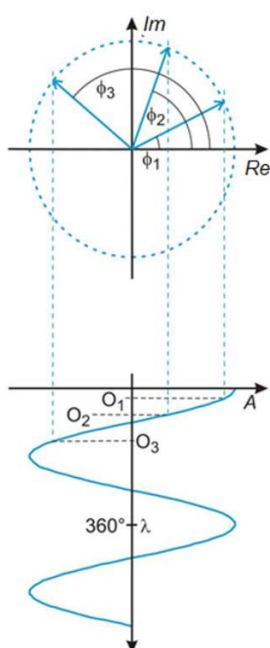
A vektor hossza az

Amplitudó ( $A$ ).

A  $\phi$  fázis az origó

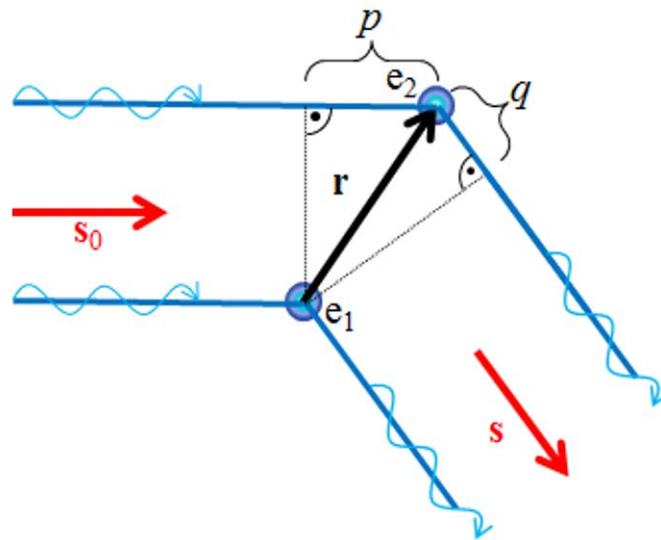
megválasztásától függ.

$\lambda$  a hullámhossz



5.1.1. ábra. A röntgensugár, mint elektromágneses hullám leírása és megjelenítése

Egy pontszerű részecske a szórása tériránytól független. Több részecskéről szórt sugarak összeadódnak- az eredő szórás már tériránytól függő lesz. Tekintsük két egyforma szórócentrumról ( $e_1$  és  $e_2$  elektronok) szórt sugárzást (5.1.2. ábra)!



5.1.2. ábra Szóródás két elektronról

A két hullám összeadódik, fáziskülönbségük az útkülönbségüktől ( $p+q$ ) függ:  $\lambda$ -nyi úton változik a fázis  $360^\circ$ -ot, azaz  $2\pi$ -t, tehát  $p+q$  útkülönbség esetén a fáziskülönbség  $2\pi(p+q)/\lambda$  (5.1.3. ábra). Legyen  $\mathbf{s}_0$  és  $\mathbf{s}$  a beeső és szórt sugár irányába eső  $1/\lambda$  hosszúságú vektor!  $p$  és  $q$   $\mathbf{r}$  vektornak  $\mathbf{s}_0$  és  $\mathbf{s}$  irányú egységvektorokra eső vetülete lesz (skaláris szorzattal kifejezve  $\mathbf{r}(\mathbf{s}_0\lambda)$  és  $\mathbf{r}(\mathbf{s}\lambda)$  ).

$$\Delta\phi = 2\pi(p+q)/\lambda$$

$$p+q = \mathbf{r}(\lambda\mathbf{s}) - \mathbf{r}(\lambda\mathbf{s}_0) = \lambda\mathbf{r}(\mathbf{s}-\mathbf{s}_0) = \lambda\mathbf{r}\mathbf{S}$$

$$\mathbf{T}(\mathbf{S}) = A [\exp 2\pi i\phi_1 + \exp 2\pi i(\phi_1 + \mathbf{r}\mathbf{S})] = A \exp 2\pi i\phi_1 [1 + \exp 2\pi i\mathbf{r}\mathbf{S}]$$

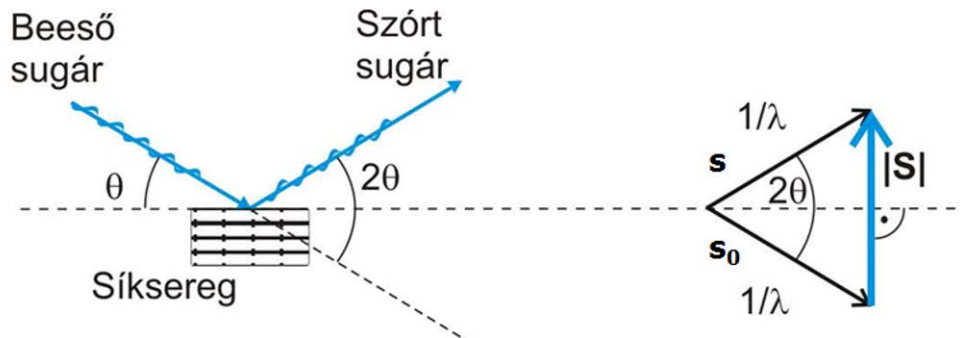
5.1.3. ábra. A két hullám fáziskülönbsége, és kifejezése  $\mathbf{s}_0$  és  $\mathbf{s}$  vektorokkal, és a behelyettesítés után kapott eredő hullám,  $\mathbf{T}(\mathbf{S})$

Ha az origó az 1. elektronon van, az 1. elektronról szórt sugár fázisa  $\phi_1=0$ . Ha az origót eltoljuk  $-\mathbf{R}$  vektorral, mindkét fázis egyformán megváltozik:  $\phi_1=2\pi\mathbf{R}\mathbf{S}$  értékkel.

Az  $\mathbf{S}$  szórási vektorral jellemezhetjük a szórás irányát (5.1.4. ábra). Megmutatható, hogy a Bragg-törvénnyel összefüggésben  $\mathbf{S}$  a síksereg merőleges (a síksereg normálisának irányába esik), és hossza  $n/d$ .

$$\mathbf{S} = \mathbf{s} - \mathbf{s}_0$$

$$S = 2 \sin \theta / \lambda$$



5.1.4. ábra. A szórási vektor

Az 5.1.2. ábrán bemutatottal analóg módon egy, az origóban levő gömbszimmetrikus atom szórása az infinitezimálisan kicsi térrészekben levő elektronok (a térrész elektronsűrűsége) szórájának összege (mivel az elektronfelhő folytonos, nem szummája, hanem integrálja) (5.1.5. ábra). Mivel az atomot gömbszimmetrikusnak tekintjük, a kifejezés a koszinuszos tagra egyszerűsödik, fázisa 0, és nem függ a szórási iránytól (5.1.5. ábra).  $\theta=0^\circ$ -nál  $f_j$  értéke az atomon lévő elektronok számával egyezik meg. Ha a röntgensugárzás rugalmatlanul is kölcsönhatásba lép az anyaggal, azaz anomális szórástörténik akkor komplex számként kell  $f_j$ -t is felírni amit a fázis probléma megoldásánál és abszolút konfiguráció meghatározásánál használunk ki.

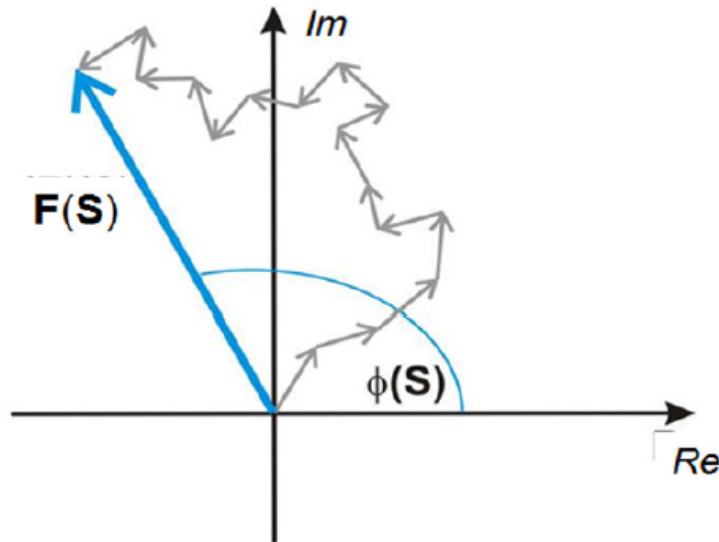
$$f(\mathbf{S}) = \int_{V_{atom}} \rho_{atom}(\mathbf{r}) \exp(2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}) d\mathbf{r}$$

$$f(\mathbf{S}) = \int_{V_{atom}} \rho_{atom}(\mathbf{r}) \cos(2\pi \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}) d\mathbf{r}$$

5.1.5. ábra. Az atomi szórástényező,  $f(\mathbf{S})$

Az elemi cella tartalmáról szóradott sugárzás függvénye a szerkezeti tényező:  $\mathbf{F}(\mathbf{S})$  Felírható az elemi cella térfogatelemeiben vett elektronsűrűségekre illetve az egyes atomok  $f_j$  szórási hozzájárulásának összegeként a fentiekhez hasonló megközelítés szerint (5.1.6. ábra).

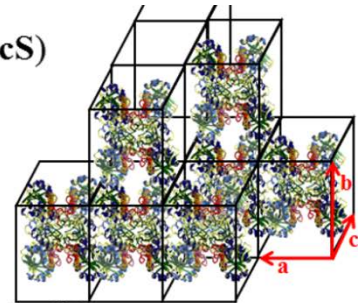
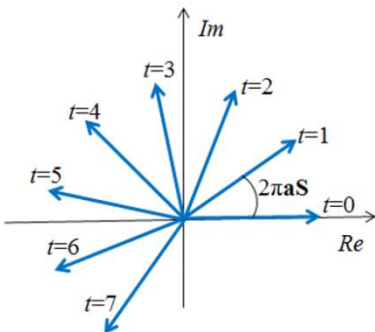
$$\mathbf{F}(\mathbf{S}) = \int_{V_{cell}} \rho_{cell}(\mathbf{r}) \exp(2\pi i \mathbf{r} \mathbf{S}) d\mathbf{r} = \sum_{j=1}^n f_j(\mathbf{S}) \exp(2\pi i \mathbf{r}_j \mathbf{S})$$



5.1.6. ábra. A szerkezeti tényező,  $\mathbf{F}(\mathbf{S})$ : a teljes elemi cella tartalmának szórási függvénye

A kristályban a választott origóhoz (az egyik elemi cella origója) képest valamely elemi cella origójának helye:  $t\mathbf{a}+u\mathbf{b}+v\mathbf{c}$  ( $\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}$  az elemi cella bázisvektorai,  $t, u, v$  egész). A kristály szórása az elemi cellák szórásának összegeként írható fel (5.1.7. ábra). Az összegzések nagyszámú elemi cellára (makroszkopikus kristály) nullát adnak, ha  $\mathbf{a}\mathbf{S}$ ,  $\mathbf{b}\mathbf{S}$  vagy  $\mathbf{c}\mathbf{S}$  skaláris szorzatok nem egészek, mivel a  $2\pi t\mathbf{a}\mathbf{S}$  fáziseltolódások (és hasonlóan  $2\pi u\mathbf{b}\mathbf{S}$  és  $2\pi v\mathbf{c}\mathbf{S}$  fáziseltolódások) 0 és  $2\pi$  között különféle értéket vesznek fel, oly módon, hogy a különböző  $t$  értékekhez tartozó hozzájárulások (különböző elemi cellák szórási hozzájárulása) kioltják egymást (ld. Argand diagram, 5.1.7. ábra). Tehát a diffrakció feltétele 3D-ban:  $\mathbf{a}\mathbf{S}$ ,  $\mathbf{b}\mathbf{S}$  vagy  $\mathbf{c}\mathbf{S}$  egész szám. Ez a három egyenlet a Laue-feltételek.

$$\mathbf{K}(\mathbf{S}) = \mathbf{F}(\mathbf{S}) \sum_t \exp(2\pi i t\mathbf{a}\mathbf{S}) \sum_u \exp(2\pi i u\mathbf{b}\mathbf{S}) \sum_v \exp(2\pi i v\mathbf{c}\mathbf{S})$$



Az összegzések nagyszámú elemi cellára nullát adnak, ha  $\mathbf{a}\mathbf{S}$ ,  $\mathbf{b}\mathbf{S}$  vagy  $\mathbf{c}\mathbf{S}$  nem egész.

**Laue feltételek:**  $\mathbf{a}\mathbf{S}=h$ ,  $\mathbf{b}\mathbf{S}=k$  és  $\mathbf{c}\mathbf{S}=l$

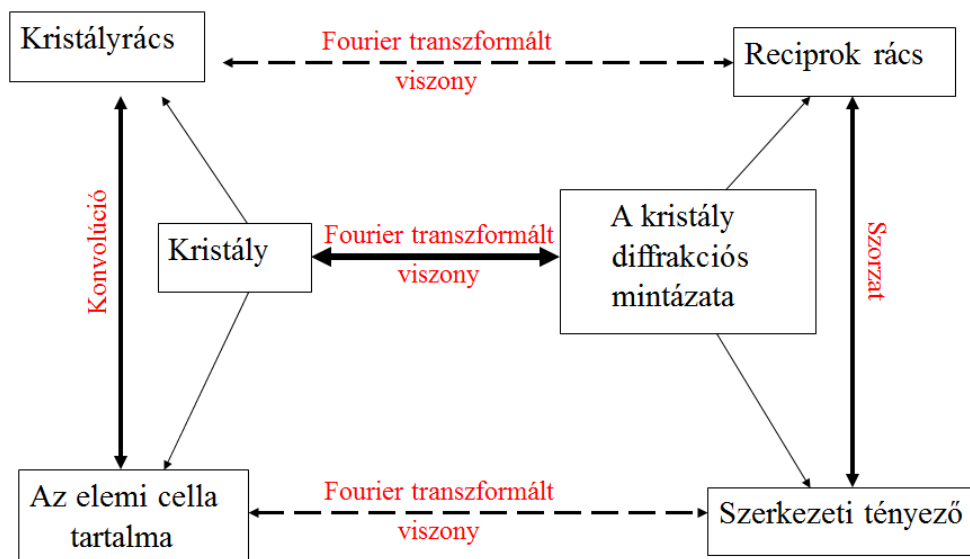
5.1.7. ábra. Az egész kristály szórása, Laue-feltételek

A Laue-feltételeket átrendezve  $(\mathbf{a}/h)\mathbf{S}=1$ ,  $(\mathbf{b}/k)\mathbf{S}=1$  és  $(\mathbf{c}/l)\mathbf{S}=1$ . Tehát az  $\mathbf{a}/h$ ,  $\mathbf{b}/k$  és  $\mathbf{c}/l$  végpontú vektorok vetülete az  $\mathbf{S}$ -re ugyanakkora, ezért az  $\mathbf{a}/h$ ,  $\mathbf{b}/k$  és  $\mathbf{c}/l$  pontok által meghatározott sík merőleges  $\mathbf{S}$ -re. A Laue-feltételek tehát a Bragg-törvény 3D megfelelője:  $\mathbf{S}$  hossza az átrendezett skalárszorzatok alapján  $1/d$ , másrészt definíciója szerint  $2\sin\theta/\lambda$ . A  $(h,k,l)$  számhármast a Laue indexhármast (másik jelölése a szövegben:  $\mathbf{h}$  vektor) A síksereg  $h$ ,  $k$  és  $l$  részre osztja az elemi cella éleit.

Laue-feltételek következménye, hogy az  $\mathbf{S}$  vektorok egy 3D rács pontjaiba mutatnak. Ez a reciprokrács (3.6. fejezet), bázisvektorai:  $\mathbf{a}^*=\mathbf{S}_{(1,0,0)}$ ,  $\mathbf{b}^*=\mathbf{S}_{(0,1,0)}$ ,  $\mathbf{c}^*=\mathbf{S}_{(0,0,1)}$ .

A reciprokrács elemi cellája és a kristályrács elemi cellája közti geometriai viszony a következő:  $\mathbf{b}\mathbf{a}^*=0$ ,  $\mathbf{c}\mathbf{a}^*=0$  stb. ( $\mathbf{S}$  merőleges a síkokra), és  $\mathbf{a}\mathbf{a}^*=1$ ,  $\mathbf{b}\mathbf{b}^*=1$ ,  $\mathbf{c}\mathbf{c}^*=1$  (Laue-feltételek). Egy tetszőleges  $\mathbf{S}$  vektor felírható a reciprokrács bázisvektorainak lineáris kombinációjával, ahol az együtthatók a Laue indexek:  $\mathbf{S}_{(hkl)}=h\mathbf{a}^*+k\mathbf{b}^*+l\mathbf{c}^*$ . Tehát a reflexiók hozzárendelhetők egy 3D rács pontjaihoz, amelyet  $\mathbf{S}$ -sel vagy a  $(h,k,l)$  indexhármassal írhatunk le.

Az kristály elektronsűrűségi függvénye és szórása között Fourier transzformált viszony van (5.1.8. ábra). Megmutatható, hogy az elektronsűrűségi függvény az alábbi képlet szerint számolható (5.1.9. ábra). A mért diffrakciós képből közvetlenül csak az  $F$  amplitúdókat kapjuk meg, a  $\varphi$  fázisokat (a szövegben helyenként  $\alpha$  is jelölheti) a fázisprobléma megoldás során határozhatjuk meg közelítően. A szerkezet (atomi koordináták, a szövegben sokhelyütt: modell) birtokában azonban számíthatjuk a szerkezeti tényezőket (5.1.6. ábra), és így a fázisokat is, amelyek minősége a modell minőségétől (jóságától) függ.



5.1.8. ábra. A kristály és diffrakciós képének viszonya

Összefoglalva: A szórás kép, vagyis a reciprok térben (vektora:  $\mathbf{S}$ ) az egyes reflexiókhoz tartozó szerkezeti tényező, mint komplex függvény ( $\mathbf{F}(\mathbf{S})$ ), az elemi cellában (vektora:  $\mathbf{r}$ ) felírt elektronsűrűség ( $\rho(\mathbf{r})$ ) Fourier transzformáltja. A vegyészek által jobban kedvelt atomicitást felhasználva a szórás függvényt az

elektronsűrűség szerinti integrálás helyett az  $(x_j, y_j, z_j)$  koordinátájú atomok  $f_j$  atomi szórási tényezőinek összegeként adhatjuk meg. (5.1.6. ábra).

Tehát az egykristály mintáról szóródott röntgensugárzás oly módon kódolja (matematikailag: Fourier transzformáció) magában a szerkezeti információt (vagyis az elektronsűrűséget az elemi cellában), hogy minden mért reflexióhoz minden atom minősége és koordinátái hozzájárulnak. (5.1.9. ábra egyenletei).

$$\rho(x,y,z) = 1/V_{cella} \sum_{h,k,l} \mathbf{F}(h,k,l) \exp[-2\pi i(hx+ky+lz)]$$

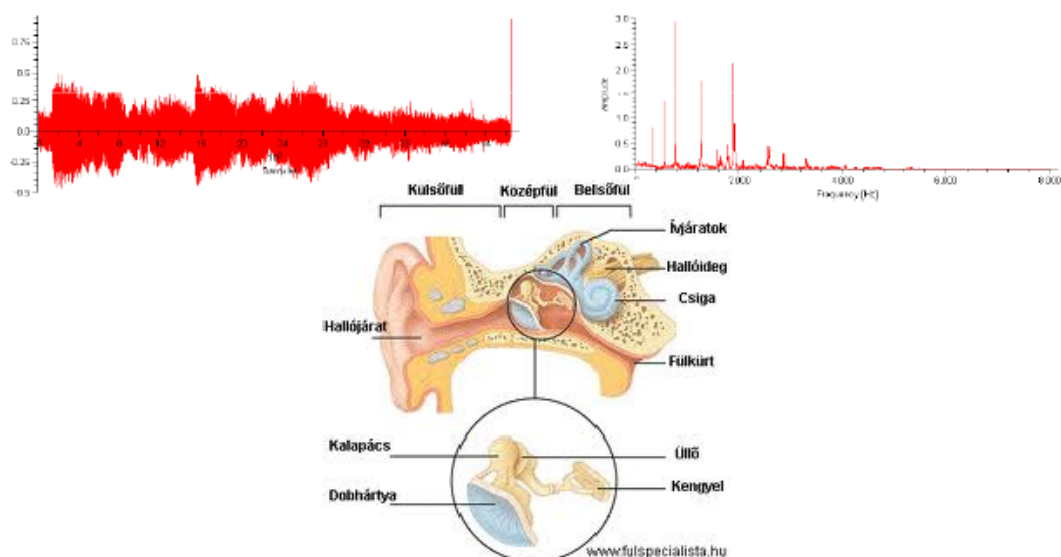
$$\rho(x,y,z) = 1/V_{cella} \sum_{h,k,l} \{F(h,k,l) \exp[i\phi(h,k,l)]\} \exp[-2\pi i(hx+ky+lz)]$$

5.1.9. ábra Az elektron sűrűségi függvény, mint Fourier sor a szerkezeti tényező vektorral ( $\mathbf{F}(\mathbf{h})$ ) illetve az  $F(\mathbf{h})$  amplitúdóval és a  $\phi(\mathbf{h})$  fázissal felírva (a változók vagy a távolság dimenziójú  $\mathbf{r}$  és 1/távolság dimenziójú  $\mathbf{S}$ , vagy a dimenzió nélküli  $\mathbf{x}$  frakcionális koordináták és  $\mathbf{h}$  Laue indexhármass; az  $\mathbf{rS}$  és  $\mathbf{hx}$  skaláris szorzatok értéke megegyezik).

## 5.2. Intermezzo a Fourier transzformációról: a lényeg megragadásának eszköze

A Fourier transzformációt mindenki ismeri, amint az 5.2.1. ábra is mutatja, bár lehet, hogy nem is tud róla.

### Fourier-transzformáció: Időfüggvény felbontása 1/idő, azaz frekvencia függésre

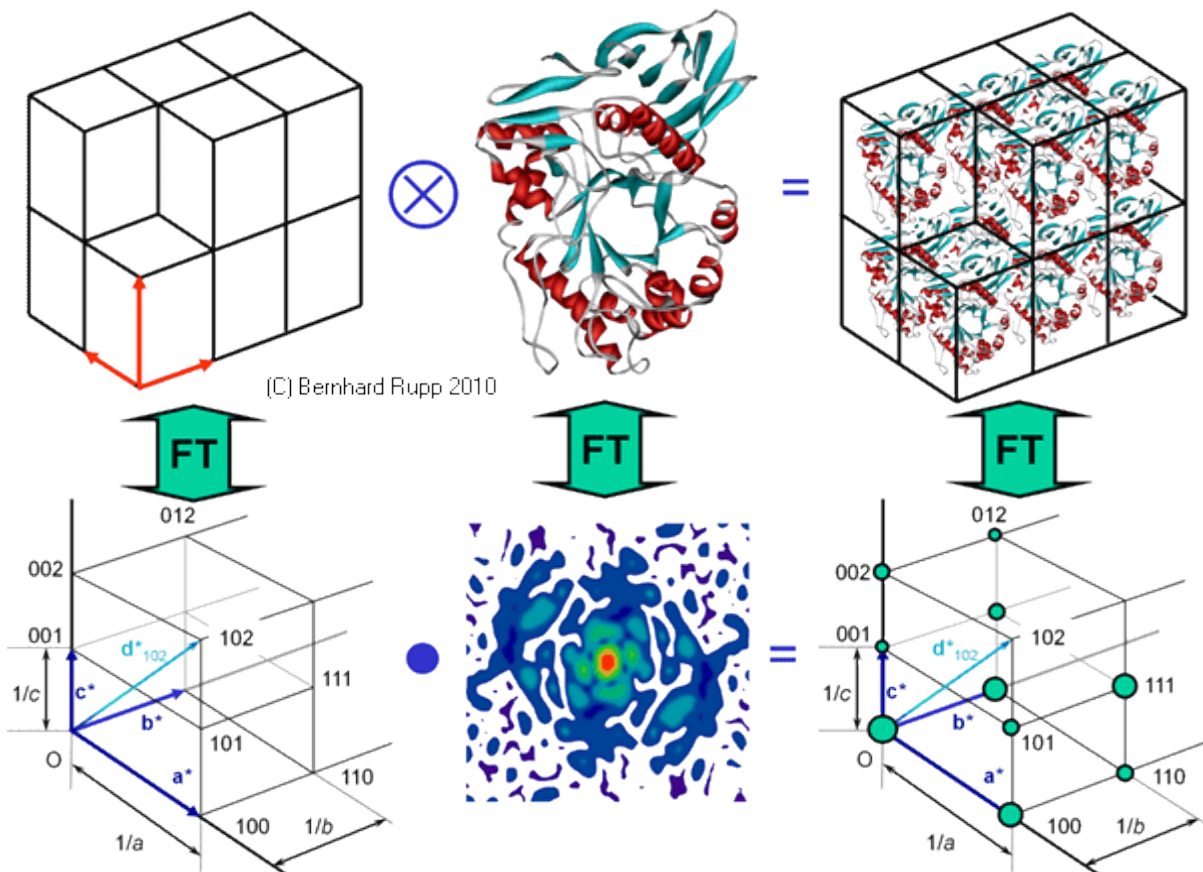


5.2.1. ábra. Egy példa Fourier transzformációra

A hanghullámok longitudinális hullámok, de fülünkben részben mechanikus, részben elektronikus eszközökkel előállítjuk a Fourier transzformáltjukat és agyunk ezt dolgozza fel. A zeneszámokra a teljes amplitúdó-idő függést rögzítve kapjuk a wav fájlt, ami egyetlen CD-re is több száz MB. A lényeg megragadva és elvégezve a Fourier transzformációt a transzformált amplitúdó-frekvencia függést határozzuk meg, ami kitűnő minőséget ad egy néhány MB-os MP3 fájlban is. Ha kellően nagy frekvenciatartományban vesszük figyelembe a jelet, akkor szinte észrevehetetlen a különbség, de az analóg hangrögzítés teszi lehetővé a felharmonikusok pontosabb visszaadását. A Fourier transzformáció tehát a *lényeg* megragadására alkalmas: van információvesztés (felharmonikusok), de ez szabályozható a frekvenciatartomány megválasztásával. Az első esetben (analóg hangrögzítés) az idő, a Fourier transzformáltban ennek reciproka, a frekvencia a független változó. Ebből a példából az is nyilvánvaló, hogy a jelenséget mindkét függvény, a direkt és a Fourier transzformált egyformán helyesen írja le, mindkettő ugyanazt jelenti. Általában minden esetben, ha a feladat a jel megtalálása a zaj mellett, akkor célszerű a Fourier transzformálttal dolgozni, legyen az jelfeldolgozás, képtömörítés vagy időjárás előrejelzés. Ezek után nem meglepő, ha azt mondjuk, hogy a szuperszámítógépek a gépidő jelentős részében Fourier vagy inverz Fourier transzformációt végeznek, az ezeknek megfelelő algoritmus fut rajtuk.

Az egykristály-diffrakciós szerkezetvizsgálatnál a teljes kristályszerkezet Fourier transzformáltja lesz a diffrakciós mintázat (5.2.2. ábra). A teljes kristályszerkezet a rács- és a molekulaserkezet konvolúciójával adható meg. Ezt az 5.2.2. ábrán  $\otimes$  jellel jelöltük. A Fourier transzformáció tulajdonságai szerint a reciprokrácsnak (a kristályrács Fourier transzformáltja) és a molekulatranszformálnak (az elemi cella elektronsűrűsége Fourier transzformáltja) a szorzata ( $\bullet$ ) adja a teljes diffrakciós mintázatot, a reciprokrács pontjaihoz rendelhető mérhető reflexiókat (amplitúdó és fázis). A rács és a reciprokrács, a molekula és transzformáltja valamint a kristályszerkezet és a diffrakciós mintázat között a hidat a Fourier transzformáció adja (5.1. fejezet).





5.2.2. ábra. Az elemi cella, a molekulaszerkezet és a teljes kristályszerkezet valamint Fourier transzformáltjaik viszonya. (Bernhard Rupp: Biomolecular Crystallography, Garland Science, a szerző engedélyével).

A Fourier transzformáció azonosságait és szimmetria tulajdonságait az 5.2.3. ábra mutatja. Nehéz (nagyobb elektronsűrűségű) atomok nagyobb csúcsokat eredményeznek a Fourier transzformáltban, ha a szerkezet fennmaradó részéhez képest jelentős az elektronszámuk. A diffrakciós mintázat inverz Fourier transzformálásakor kapjuk az elemi cella elektronsűrűségét, azonban ez matematikailag egy végtelen összegzés az elméletileg végtelen nagy reciprokrács pontjaira. Gyakorlatban az összegzés véges: véges számú reflexiót mérhetünk adott hullámhosszon (ld. Ewald-gömb, 3.6. fejezet), sőt, lehet, hogy a kristály gyengén szórt, és ennél is kevesebb reflexiót tudunk megmérni. A véges összegzés (sorcsonkítási hiba) az elektronsűrűségben fodrozódásokat okoz (pl. [http://ocw.mit.edu/courses/chemistry/5-067-crystal-structure-refinement-fall-2009/lecture-notes/MIT5\\_067F09\\_lec6\\_artefact.pdf](http://ocw.mit.edu/courses/chemistry/5-067-crystal-structure-refinement-fall-2009/lecture-notes/MIT5_067F09_lec6_artefact.pdf)) minden atom körül, és ez a fodrozódás a nagyobb rendszámú, tehát nagyobb szórési tényezőjű atomok körül magasabb. Ha a feladat átmenetifém hidridjének a vizsgálata ezek a fodrok nehezzé vagy akár lehetetlenné teszik a csak két elektronnal rendelkező hidrid ion azonosítását, célszerű egykristály neutrondiffrakciós mérést alkalmazni, ahol az atomok szóróképessége (atomi szórástényező) nem arányos az elektronszámmal.

### Azonosságok:

$f(t)$  és  $g(t)$  időfüggvények és  $F$  a Fourier transzformált a frekvencia ( $\nu$ ) függvénye, azaz

$$F(\nu) = F[f] = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)e^{-2\pi i\nu t} dt$$

Lineáris kombináció  $F[a_1f(t) + a_2g(t)] = a_1F[f(t)] + a_2F[g(t)]$

Időtengely eltolása  $F[f(t - t_0)] = F[f(t)]\exp(-i2\pi\nu t_0)$

Deriválás  $F\left[\frac{df(t)}{dt}\right] = i2\pi\nu F[f]$

Integrálás  $F\left[\int_{-\infty}^{\infty} f(t) dt\right] = \frac{1}{i2\pi\nu} F[f]$

Konvolúció ( $\otimes$ )  $F[f(t) \otimes g(t)] = F[f(t)] * F[g(t)]$

### Szimmetria tulajdonságok:

páros:  $f(x)=f(-x)$ , pl.  $\cos(x)$       páratlan:  $f(x)=-f(-x)$ , pl.  $\sin(x)$

A függvény (f)	A transzform (F)
páros	páros
páratlan	páratlan
valós és páros	valós és páros
valós és páratlan	képzetes és páratlan
képzetes és páros	képzetes és páros
komplex és páros	komplex és páros
komplex és páratlan	komplex és páratlan
valós páros plusz képzetes és páratlan	valós
valós páratlan plusz képzetes páros	képzetes

5.2.3. ábra. A Fourier transzformáció azonosságai és szimmetria tulajdonságai.

## 5.3. A felbontás és a fázisprobléma, szemléletes kép Fourier Kacsával és Fourier Macskával

A szerkezeti tényező, az elemi celláról szórt sugárzást leíró függvény, az  $\mathbf{F}(h,k,l)$ , egy vektorral jellemezhető komplex függvény (5.1. fejezet), aminek van valós része ( $A$ ) és képzetes része ( $iB$ ). A vektort jellemzi a hossza (amplitúdó) és a vektornak a valós tengellyel bezárt szöge (fázisa). Ez a függvény az elemi cella elektronsűrűségi függvényének a Fourier transzformáltja. A neten sok hely van ahol egy függvény Fourier transzformáltját kiszámíthatjuk (pl. <http://homepages.inf.ed.ac.uk/rbf/HIPR2/fftdemo.htm>). Kevin

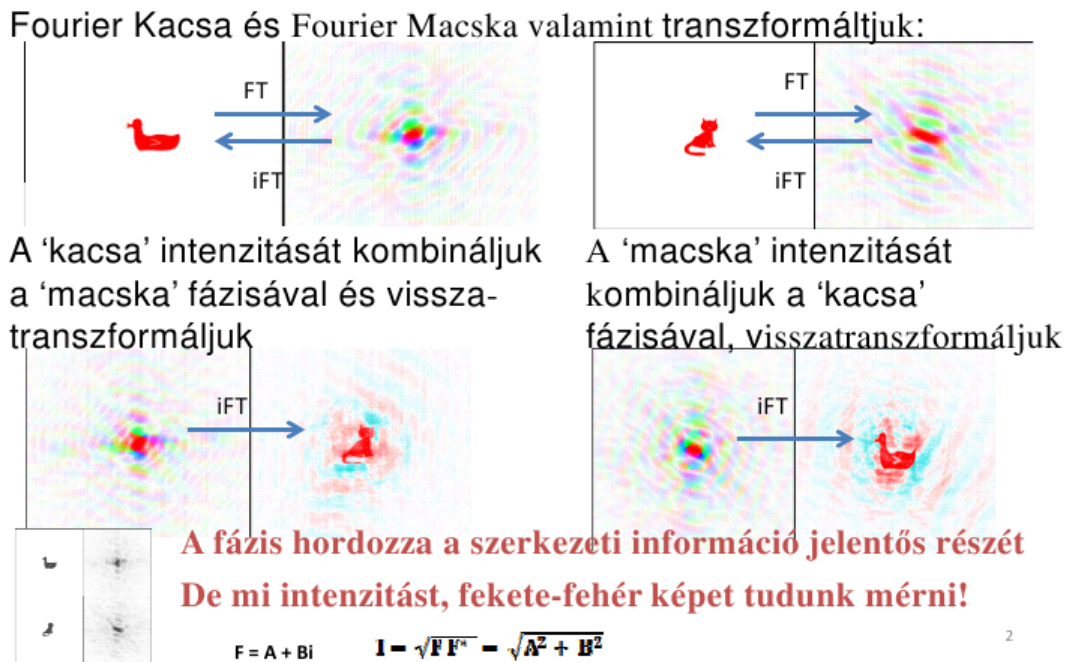
Cowtan végezte el az alábbi játékos számolást, amelyben bemutatta a fázisok jelentőségét az elektronsűrűség kiszámításában. Például ha a függvény értéke 1 egy kacska vagy macska alakján belül és rajta kívül 0, akkor az 5.3.1. ábra felső sorában látható ábrákat kapjuk és a Fourier transzformált kiszámítása (FT) illetve a visszatranszformálás (iFT) után. (A Fourier transzformált, a molekulatranszform folytonos függvény, ebben az ábrázolásmódban a fázist a szivárvány színei jelzik- piros: 0°, világoskék: 180°). A transzformáltak ábrája az eredeti ábránál jóval nagyobb területre terjed ki, elvileg a végtelenben lesz 0. Egy lényeges különbségre itt érdemes rámutatni a mikroszkóp és a diffrakció között. Mikroszkópos módszereknél a felbontás az a legkisebb távolság, aminél két pont még elkülönülten látható. A diffrakciós kép azonban a végtelenig terjed, vagy legalábbis nagy szögekig. A Fourier transzformáltnak viszont minden pontja hordoz információt az eredeti függvényről. Ezért a diffrakció esetén a felbontás azt a legnagyobb  $\theta$  szöveget (illetve az ennek megfelelő  $d$  értéket) jelenti, ahol még megbízhatóan tudjuk a reflexió intenzitását mérni, vagyis az intenzitás a háttér háromszorosa (fehérjekrisztallográfiában kétszerese) vagy annál nagyobb. Az adatok felbontásának hatását mutatja az 5.3.1. video. Látszik, hogy atomi felbontás (1 Å) esetén a lánc minden atomja, még a hidrogének is jól láthatóak, de ha a felbontás rossz, 6 Å, akkor csak nagyon hozzávetőleges következtetést tudunk levonni a molekula alakjára. Az elérhető felbontás függ a kristálytól, az alkalmazott forrástól és a detektor érzékenységétől.

5.3.1. video [A felbontás hatása.](#)

Az 5.3.1. ábrán a szín a fázist kódolja. Ha elvégezzük az adatoknak a második sorban (5.3.1. ábra) jelzett kombinálását, vagyis a fázist (színt) az egyik transzformáltból, a csúcsok nagyságát (amplitúdót) pedig a másik ábráról vesszük és elvégezzük a visszatranszformálást (iFT), akkor bár zajosan, azt az ábrát látjuk, aminek a fázisát használtuk (az elektronsűrűség fodrozódik, pozitív: piros és negatív: világoskék értékeket is felvesz). Tehát a fázis nagyon fontos!

Hanghullámoknál (20 kHz frekvencia) vagy pl. NMR kísérletnél (néhány 100 MHz frekvencia) a fázist be tudjuk állítani illetve meg tudjuk mérni. A röntgen fotonok  $10^{16}$  Hz nagyságrendű frekvenciája azonban kizárja, hogy a fázist befolyásolni vagy mérni tudjuk. Szőke Ábrahám ötlete amin Faigel Gyula, Tegze Miklós és több más kutató is dolgozik, a röntgen foton koherenciáját kihasználva, holografikus módszerrel (<http://en.wikipedia.org/wiki/Holography>) próbálja megoldani ezt a problémát ([http://epa.oszk.hu/00300/00342/00179/pdf/FizSzem\\_EPA00342\\_2005\\_03\\_091-096.pdf](http://epa.oszk.hu/00300/00342/00179/pdf/FizSzem_EPA00342_2005_03_091-096.pdf)). Ez ma még csak speciális esetben járható út, de lehetséges, hogy a jövőben sikerül megoldani a detektálással kapcsolatos kísérleti nehézségeket.

## A fázisprobléma szemléltetése



5.3.1. ábra. A fázisprobléma szemléltetése

## 5.4 A fázisprobléma megoldásának lehetőségei, nehézatom módszer

Ha ismerjük a  $(h, k, l)$  Laue indexű reflexiókhoz tartozó  $\alpha_{hkl}$  fázis szögeket, akkor a szerkezet meghatározása egyszerű, az 5.4.1. ábrán látható képletet kell alkalmazni.

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V_{cella}} \sum_{h,k,l} F(h, k, l) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + \alpha(h, k, l)]$$

5.4.1. ábra. Az  $\alpha_{hkl}$  fázis ismeretében inverz Fourier transzformációval megadható az elektronsűrűség

Sajnos, a fázisokat nem ismerjük és mérni sem tudjuk. A probléma megoldására az első próbálkozások kerülő utat választottak. Ennek lényege, hogy ha nehéz atom is van a molekulában és az inverz Fourier transzformációt az intenzitás adatokkal végezzük, akkor a Patterson térképet kapjuk (részletesebben: 12.2. fejezet), amin a kiugróan nagy csúcsok a nehéz atomok helyére adnak felvilágosítást (pontosabban a nehézatom-nehézatom vektoroknak megfelelő helyeken vannak).  $N$  atom esetén a Patterson térképen  $N(N-1)$  csúcs van az origón kívül, amelyek mindegyike két-két atomot összekötő vektort reprezentál, és a csúcsok magassága a két atom rendszámának (elektronjai számának) a szorzata. Tehát megfelelő skálázás esetén két szénatomot összekötő vektornak megfelelő csúcs  $6 \cdot 6 = 36$  egység magasságú, két uránatom

esetén a magasság  $92 \times 92 = 8464$ , két kénatom esetén  $16 \times 16 = 256$ . Így a Patterson térképen a nehéz atom-nehez atom vektorokat könnyű megtalálni. A nehézatom módszert a fehérjekristallográfiában még ma is alkalmazzák és a 12.3. fejezetben részletesen beszélünk róla. Kis molekulák szerkezet-megoldásánál ma már csak ritkán használjuk. A módszer azért működhet, mert a nehéz atom szórási hozzájárulása a könnyű atomokénál jóval nagyobb, ezért egy vagy néhány nehézatom jelentősen (mérhetően) befolyásolja a szórási képet.

## 5.5. A diffrakciós mintázat szimmetriájának és a szisztematikus hiányoknak a származtatása a kristályszimmetriából (Harmat Veronika)

A szerkezeti tényező 5.1.6. ábra szerinti kifejezéséből megmutatható, hogy a diffrakciós mintázat inverziós szimmetriával rendelkezik (5.5.1. ábra). Ez a Friedel-törvény. Mivel az eddigi levezetések azon a feltevésen alapultak, hogy a szóródás rugalmas, energiaátadás nem történik (szóródás szabad elektronokról; a fizikai háttérrel bővebben: [http://www.crystallography.fr/crm2/fr/congres/nancy2006/Notes-de-cours/Mardi12/Bob-Blessing/XRD\\_Physics\\_Intro\\_Part\\_II.pdf](http://www.crystallography.fr/crm2/fr/congres/nancy2006/Notes-de-cours/Mardi12/Bob-Blessing/XRD_Physics_Intro_Part_II.pdf)), a Friedel-törvény is csak akkor teljesül, ha ez a feltétel teljesül - ellenkező esetben anomális szórásról beszélünk, és a Friedel-törvény sérülése felhasználható a molekula abszolút konfigurációjának meghatározásához vagy a fázisprobléma megoldásához.

Ugyanazon síksereg két oldaláról szóródott reflexiók

$$\mathbf{F}(h, k, l) = \sum_i f_i \exp[2\pi i(hx_i + ky_i + lz_i)] \text{ és}$$

$$\mathbf{F}(-h, -k, -l) = \sum_i f_i \exp[2\pi i(-hx_i - ky_i - lz_i)]$$

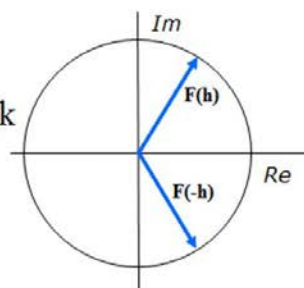
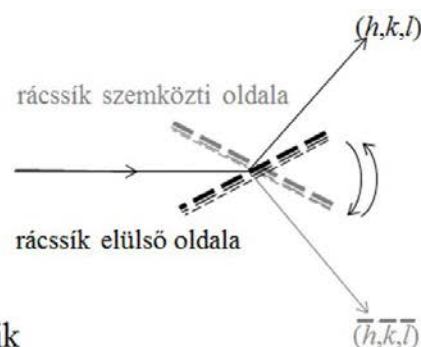
Friedel törvény:

$$\text{Tehát } F(h, k, l) = F(-h, -k, -l) \text{ és } \phi(h, k, l) = -\phi(-h, -k, -l)$$

A diffrakciós mintázat inverziós szimmetriával rendelkezik

$$I(h, k, l) = I(-h, -k, -l)$$

A  $(h, k, l)$  és  $(-h, -k, -l)$  Laue indexű reflexiók a Friedel párok



5.5.1. ábra. A Friedel-törvény ( $x, y, z$  frakcionális koordináták)

Szintén az 5.1.6. egyenletből levezethető, hogy a kristályszimmetriák hogyan jelennek meg a diffrakciós mintázatban (példák: 5.5.2-5.5.4. ábrák, általánosítás: 5.5.5. ábra). A levezetésekben kihasználjuk, hogy az aszimmetrikus egység tartalmát a kristályszimmetria az elemi cellán belül megsokszorozza, és az atomi szórástényezők összegzésében a futóindex így csak az aszimmetrikus egység atomjain megy végig ( $\Sigma_{\text{asu}}$ ), a szumma jel mögött vesszük figyelembe a többi szimmetria ekvivalens atomot. A szimmetria ekvivalens reflexiók kifejezését ezután tagonként összehasonlítva levonható a következtetés köztük levő összefüggésre. Például kétfogású forgás- és csavartengely esetén (5.5.3. ábra) az  $\mathbf{F}(h,k,l)$  és  $\mathbf{F}(-h,k,-l)$  reflexiókat hasonlítjuk össze. Az összegzésben minden  $i$ -edik atom atomi szórástényező hozzájárulása ugyanakkora a két reflexióra ( $f_i$ ). A kétfogású forgástengely esetén fázis-hozzájárulásuk is megegyezik (itt páronként azokat az exponenciális tagokat kell összehasonlítani, amelyekben a skaláris szorzat kifejtésében a  $hx_i$ ,  $ky_i$  és  $lz_i$  tagok előjele páronként megegyezik, kék és piros nyíllal jelöltük). A kétfogású csavartengely esetén viszont minden tagban  $2\pi k/2$  a fáziskülönbség, ami  $180^\circ$ -nak felel meg, ha  $k$  páratlan és  $360^\circ$ -nak (azaz  $0^\circ$ -nak), ha  $k$  páros.

### Szimmetriacentrum

szimmetria ekvivalens pozíciók:  $(x,y,z)$  és  $(-x,-y,-z)$  ekkor

$$\mathbf{F}(h,k,l) = \sum_{\text{asu}} f_i [\exp 2\pi i(hx_i + ky_i + lz_i) + \exp 2\pi i(-hx_i - ky_i - lz_i)] \text{ és}$$

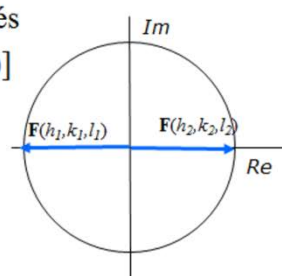
$$\mathbf{F}(-h,-k,-l) = \sum_{\text{asu}} f_i [\exp 2\pi i(-hx_i - ky_i - lz_i) + \exp 2\pi i(hx_i + ky_i + lz_i)]$$

Tehát  $\mathbf{F}(h,k,l) = \mathbf{F}(-h,-k,-l)$

És:

$$\mathbf{F}(h,k,l) = \sum_{\text{asu}} f_i [\exp i(\alpha_i) + \exp i(-\alpha_i)]$$

$$= \sum_{\text{asu}} f_i [\cos \alpha_i + i \sin \alpha_i + \cos \alpha_i - i \sin \alpha_i] = \sum_{\text{asu}} f_i 2 \cos \alpha_i$$



A szerkezeti tényezőnek nincs imaginárius komponense.

A fázis 0 vagy  $\pi$  lehet.

5.5.2. ábra. A diffrakciós mintázat szimmetriája - szimmetriacentrum az elemi cellában

### Kétfogású forgástengely

szimmetria ekvivalens pozíciók:  $(x,y,z)$  és  $(-x,y,-z)$  ekkor

$$\mathbf{F}(h,k,l) = \sum_{\text{asu}} f_i [\exp 2\pi i(hx_i + ky_i + lz_i) + \exp 2\pi i(-hx_i + ky_i - lz_i)] \text{ és}$$

$$\mathbf{F}(-h,k,-l) = \sum_{\text{asu}} f_i [\exp 2\pi i(-hx_i + ky_i - lz_i) + \exp 2\pi i(hx_i + ky_i + lz_i)]$$

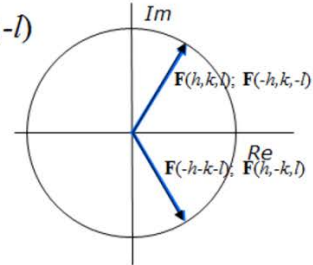
Tehát  $\mathbf{F}(h,k,l) = \mathbf{F}(-h,k,-l)$

$$\text{azaz } F(h,k,l) = F(-h,k,-l), \phi(h,k,l) = \phi(-h,k,-l), I(h,k,l) = I(-h,k,-l)$$

Friedel törvény miatt:  $I(h,k,l) = I(-h,-k,-l)$  és  $I(-h,k,-l) = I(h,-k,l)$

a kétfogású tengelyre merőleges tükörsík megjelenése:

$$I(h,k,l) = I(h,-k,l)$$



A mért intenzitás mintázatban kétfogású forgatás és tükörsík jelenik meg.

### Kétfogású csavartengely:

szimmetria ekvivalens pozíciók:  $(x,y,z)$  és  $(-x,y+1/2,-z)$  ekkor

$$\mathbf{F}(h,k,l) = \sum_{\text{asu}} f_i [\exp 2\pi i(hx_i + ky_i + lz_i) + \exp 2\pi i(-hx_i + ky_i + k/2 - lz_i)] \text{ és}$$

$$\mathbf{F}(-h,k,-l) = \sum_{\text{asu}} f_i [\exp 2\pi i(-hx_i + ky_i - lz_i) + \exp 2\pi i(hx_i + ky_i + k/2 + lz_i)]$$

Tehát  $F(h,k,l) = F(-h,k,-l)$  és

$$\phi(h,k,l) = \phi(-h,k,-l), \quad \text{ha } k \text{ páros}$$

$$\phi(h,k,l) = \phi(-h,k,-l) + \pi, \quad \text{ha } k \text{ páratlan}$$

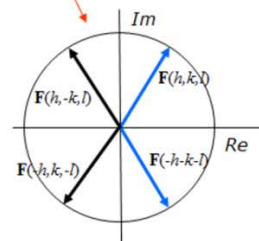
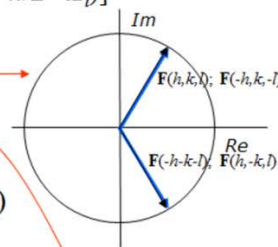
Friedel törvény miatt:  $I(h,k,l) = I(-h,-k,-l)$  és  $I(-h,k,-l) = I(h,-k,l)$

a kétfogású tengelyre merőleges tükörsík megjelenése:

$$I(h,k,l) = I(h,-k,l)$$

A mért intenzitás mintázatban itt is

kétfogású forgatás és tükörsík jelenik meg.



5.5.3. ábra. A diffrakciós mintázat szimmetriája – kétfogású forgástengely vagy kétfogású csavartengely az elemi cellában

### Négyfogású csavartengely (4<sub>1</sub>)

szimmetria ekvivalens pozíciók: (x,y,z) (-y,x,1/4+z) (-x,-y,1/2+z) (y,-x,3/4+z) ekkor

$$F(h,k,l) = \sum_{\text{asu.} f_i} [\exp 2\pi i (hx_i + ky_i + lz_i) + \exp 2\pi i (-hy_i + kx_i + lz_i + l/4) \\ + \exp 2\pi i (-hx_i - ky_i + lz_i + l/2) + \exp 2\pi i (hy_i - kx_i + lz_i + 3l/4)]$$

$$F(-k,h,l) = \sum_{\text{asu.} f_i} [\exp 2\pi i (-kx_i + hy_i + lz_i) + \exp 2\pi i (ky_i + hx_i + lz_i + l/4) \\ + \exp 2\pi i (kx_i - hy_i + lz_i + l/2) + \exp 2\pi i (-ky_i - hx_i + lz_i + 3l/4)]$$

$$F(-h,-k,l) = \sum_{\text{asu.} f_i} [\exp 2\pi i (-hx_i - ky_i + lz_i) + \exp 2\pi i (hy_i - kx_i + lz_i + l/4) \\ + \exp 2\pi i (hx_i + ky_i + lz_i + l/2) + \exp 2\pi i (-hy_i + kx_i + lz_i + 3l/4)]$$

$$F(k,-h,l) = \sum_{\text{asu.} f_i} [\exp 2\pi i (kx_i - hy_i + lz_i) + \exp 2\pi i (-ky_i - hx_i + lz_i + l/4) \\ + \exp 2\pi i (-kx_i + hy_i + lz_i + l/2) + \exp 2\pi i (ky_i + hx_i + lz_i + 3l/4)]$$

Tehát:

$$F(h,k,l) = F(-k,h,l) = F(-h,-k,l) = F(k,-h,l) \quad \text{és} \quad I(h,k,l) = I(-k,h,l) = I(-h,-k,l) = I(k,-h,l)$$

$$\phi(-k,h,l) = \phi(h,k,l) + \pi l/2$$

$$\phi(-h,-k,l) = \phi(h,k,l) + \pi l$$

$$\phi(k,-h,l) = \phi(h,k,l) + \pi l/2$$

A mért intenzitás mintázatban négyfogású forgatás jelenik meg.

5.5.4. ábra. A diffrakciós mintázat szimmetriája – négyfogású csavartengely az elemi cellában (szimmetria ekvivalens atomi pozíciók: ld. 3.8.1. ábra)

A szimmetriaelem felírható egy 3\*3 rotációs mátrix ( $\underline{R}_m$ ) és egy translációs vektor ( $\underline{t}_m$ ) segítségével:

$$\underline{x}_m = \underline{R}_m * \underline{x} + \underline{t}_m$$

Pl. P4<sub>1</sub>  
 m=1 x,y,z  $\underline{R} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$   $\underline{t} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$  m=3 -x,-y,z+1/2  $\underline{R} = \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$   $\underline{t} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0,5 \end{pmatrix}$

m=2 -y,x,z+1/4  $\underline{R} = \begin{pmatrix} 0 & -1 & 0 \\ 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$   $\underline{t} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0,25 \end{pmatrix}$  m=4 y,-x,z+3/4  $\underline{R} = \begin{pmatrix} 0 & 1 & 0 \\ -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$   $\underline{t} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0,75 \end{pmatrix}$

A szimmetria ekvivalens reflexió:

$$\underline{h}_m = \underline{R}_m^T * \underline{h}$$

Pl.

m=1 h,k,l

m=2 k,-h,l

m=3 -h,-k,l

m=4 -k,h,l

Fáziseltolódás:

$$\phi_m = \phi - 2\pi \underline{h} \underline{t}_m$$

$\phi$

$\phi - \pi l/2 = \phi + \pi l/2$

$\phi - \pi l = \phi + \pi l$

$\phi - \pi l/2 = \phi + \pi l/2$

5.5.5. ábra. A diffrakciós mintázat szimmetriája általános esetben; példa P4<sub>1</sub> tércsoport (vö. 5.5.4. ábra)



A szimmetriától függően a reflexióknak kiválasztható olyan csoportja nem centroszimmetrikus tércsoportokban is (nincs inverziós centrum az elmei cellában), amelyre a szimmetria ekvivalens reflexiók egyben Friedel-párok is, ezek a centrikus reflexiók, fázisuk csak két értéket vehet fel:  $\phi$  és  $\phi+\pi$ .

- $P1$ . kétfogású csavartengely  $2_1 (0,0,z)$  esetén ekvivalens pozíciók  $(x,y,z)$  és  $(-x,-y,1/2+z)$ . A  $(h,k,0)$  típusú reflexiók szimmetria ekvivalensei:  $\phi(h,k,0) = \phi(-h,-k,0)$ . A Friedel-törvény miatt viszont a következő összefüggés is teljesül:  $\phi(h,k,0) = -\phi(-h,-k,0)$ . Tehát  $\phi(h,k,0) = -\phi(-h,-k,0) = 0$  vagy  $\pi$  lehet.

Az 5.5. fejezetben tárgyaltak szerint, általánosságban, ha az origót  $-X$  vektorral eltoljuk, a  $h$  Laue indexű reflexió fázisának a változása  $2\pi Xh = 2\pi(Xh+Yk+Zl)$  lesz. Ha a tércsoport ún. megengedett origói közül választunk (az origót egyik megengedett origóról egy másikra toljuk el), lesz a reflexióknak olyan csoportja, amelyeknek nem változik meg a fázisa. Ezek a struktúr-szemiinvariánsok (szerkezeti szemiinvariánsok; például 5.5.6. és 5.5.7. ábrák).

#### Megengedett origó a $4_1$ tengelyen:

A szimmetria ekvivalens pozíciók egyenletei változatlanok maradnak:  $O_1$  és  $O_2$

-Az origó eltolása a  $4_1$  tengely mentén ( $\Delta z$ -vel)  $\rightarrow$

$$\Delta\phi = -2\pi l\Delta z$$

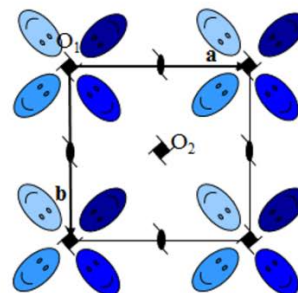
$$(h,k,0) \text{ reflexiók esetén } \Delta\phi = 0$$

-Az origó eltolása más  $4_1$  tengelyre:  $\Delta\phi = -2\pi (h\Delta x + k\Delta y)$

$$O_2 \rightarrow O_2 \quad \Delta\phi = 2\pi(\frac{1}{2}h + \frac{1}{2}k) = \pi(h+k)$$

Struktúr szemiinvariánsok:

$(h,k,0)$  reflexiók fázisa nem változik, ha  $h+k$  páros

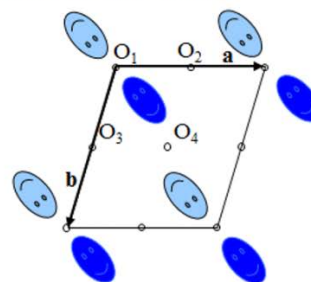


5.5.6. ábra Struktúr szemiinvariáns reflexiók a  $P4_1$  tércsoportban

Megengedett origó az inverziós centrumon:

8 lehetséges origó: a szimmetria ekvivalens pozíciók egyenletei változatlanok maradnak:

- |   |   |
|---|---|
| $O_1 (0,0,0)$   | $O_5 (0,0, \frac{1}{2}) \rightarrow \Delta\phi = \pi l$                           |
| $O_2 (\frac{1}{2}, 0, 0) \rightarrow \Delta\phi = 2\pi(\frac{1}{2}h) = \pi h$ | $O_6 (\frac{1}{2}, 0, \frac{1}{2}) \rightarrow \Delta\phi = \pi(h+l)$             |
| $O_3 (0, \frac{1}{2}, 0) \rightarrow \Delta\phi = \pi k$                      | $O_7 (0, \frac{1}{2}, \frac{1}{2}) \rightarrow \Delta\phi = \pi(k+l)$             |
| $O_4 (\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, 0) \rightarrow \Delta\phi = \pi(h+k)$         | $O_8 (\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, \frac{1}{2}) \rightarrow \Delta\phi = \pi(h+k+l)$ |



Centroszimmetrikus tércsoport, a fázis 0 vagy  $\pi$  lehet, ennek megfelelően  $F(hkl)$  pozitív vagy negatív szám.

Tfel, hogy  $\phi(hkl)=0$   $O_1$ -ben.

$\phi(hkl)$  fázis változása, ha más origót választunk attól függően, hogy  $h, k, l$  páros(e) vagy páratlan(o)

$h, k, l$ paritása	eee	oee	oeo	eeo	ooe	oee	ooo	ooo
0,0,0	+	+	+	+	+	+	+	+
$(\frac{1}{2}, 0, 0)$	+	-	+	+	-	-	+	-
$(0, \frac{1}{2}, 0)$	+	+	-	+	-	+	-	-
$(\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, 0)$	+	-	-	+	+	-	-	+
$(0, 0, \frac{1}{2})$	+	+	+	-	+	-	-	-
$(\frac{1}{2}, 0, \frac{1}{2})$	+	-	+	-	-	+	-	+
$(0, \frac{1}{2}, \frac{1}{2})$	+	+	-	-	-	-	+	+
$(\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, \frac{1}{2})$	+	-	-	-	+	+	+	-

Struktúr szemiinvariáns reflexiók:  $h, k$  és  $l$  is páros

5.5.7. ábra Struktúr szemiinvariáns reflexiók, és az origóválasztás hatása a fázisokra a P-1 tércsoportban. Három megfelelően kiválasztott reflexió fázisát tetszőlegesen megválaszthatjuk, ezzel a lehetséges origók közül kiválasztottuk az egyiket. Pl. Legyen egy (o,e,e) típusú és egy (e,o,e) típusú reflexió fázisa 0 (a koszinusz előjele +). Ekkor a lehetséges origók már csak az eredeti (0,0,0), és a (0,0,1/2) pontban lévőek. Ha például egy (e,o,e) típusú reflexió fázisát is 0-nak választjuk, akkor kiválasztottuk a (0,0,0) origót, ha viszont ezt a fázist  $\pi$ -nek választjuk, akkor a (0,0,1/2) origót választjuk.

Transzlációs elemet tartalmazó szimmetriaoperátorok, vagy centrált rács esetén esetén a diffrakciós képen kioltások figyelhetők meg. Ez felhasználható a tércsoport meghatározására (Pl. az 5.5.3. ábrán bemutatott példában az intenzitás mintázat szimmetriája alapján nem dönthető el, hogy az elemi cella kétfogású forgás- és csavartengelyt tartalmaz. A kioltási szabályok figyelembevételével azonban igen; 5.5.8. ábra).

**Kétfogású csavartengely:** ekvivalens pozíciók  $(x,y,z)$  és  $(-x,y+1/2,-z)$  ekkor

$$\begin{aligned} \mathbf{F}(0,k,0) &= \sum_{\text{asu}} f_i [\exp 2\pi i(0x_i + ky_i + 0z_i) + \exp 2\pi i(0x_i + ky_i + k/2 - 0z_i)] = \\ &= \sum_{\text{asu}} f_i [\exp 2\pi i(ky_i) + \exp 2\pi i(ky_i + k/2)] \end{aligned}$$

A két tag közötti fáziskülönbség:  $2\pi k/2$

Ha  $k$  páros, a két tag közti fáziskülönbség: 0,  $\mathbf{F}(0,k,0) = 2\sum_{\text{asu}} f_i \exp 2\pi i(ky_i)$

Ha  $k$  páratlan, a két tag közti fáziskülönbség:  $\pi$ ,  $\mathbf{F}(0,k,0) = 0$

Reflexió feltétel:  $(0,k,0) \quad k=2n$       Kioltási szabály:  $(0,k,0) \quad k=2n+1$

**Csúszósík a bc síkon:**  $n$   $(0,y,z)$ , ekvivalens pozíciók  $(x,y,z)$  és  $(-x,y+1/2,z+1/2)$  ekkor

$$\mathbf{F}(0,k,l) = \sum_{\text{asu}} f_i [\exp 2\pi i(ky_i + lz_i) + \exp 2\pi i(ky_i + k/2 + lz_i + l/2)]$$

A két tag közötti fáziskülönbség:  $2\pi(k+l)/2$

Ha  $k+l$  páros, a két tag közti fáziskülönbség: 0,  $\mathbf{F}(0,k,l) = 2\sum_{\text{asu}} f_i \exp 2\pi i(ky_i + lz_i)$

Ha  $k+l$  páratlan, a két tag közti fáziskülönbség:  $\pi$ ,  $\mathbf{F}(0,k,l) = 0$

Reflexió feltétel:  $(0,k,l) \quad k+l=2n$       Kioltási szabály:  $(0,k,l) \quad k+l=2n+1$

**Bázislapon centráltrács:**  $C$ ; ekvivalens pozíciók  $(x,y,z)$  és  $(x+1/2,y+1/2,z)$  ekkor

$$\mathbf{F}(h,k,l) = \sum_{\text{asu}} f_i [\exp 2\pi i(hx_i + ky_i + lz_i) + \exp 2\pi i(hx_i + h/2 + ky_i + k/2 + lz_i)]$$

A két tag közötti fáziskülönbség:  $2\pi(h+k)/2$

Ha  $h+k$  páros, a két tag közti fáziskülönbség: 0,  $\mathbf{F}(h,k,l) = 2\sum_{\text{asu}} f_i \exp 2\pi i(hx_i + ky_i + lz_i)$

Ha  $h+k$  páratlan, a két tag közti fáziskülönbség:  $\pi$ ,  $\mathbf{F}(h,k,l) = 0$

Reflexió feltétel:  $(h,k,l) \quad h+k=2n$       Kioltási szabály:  $(h,k,l) \quad h+k=2n+1$

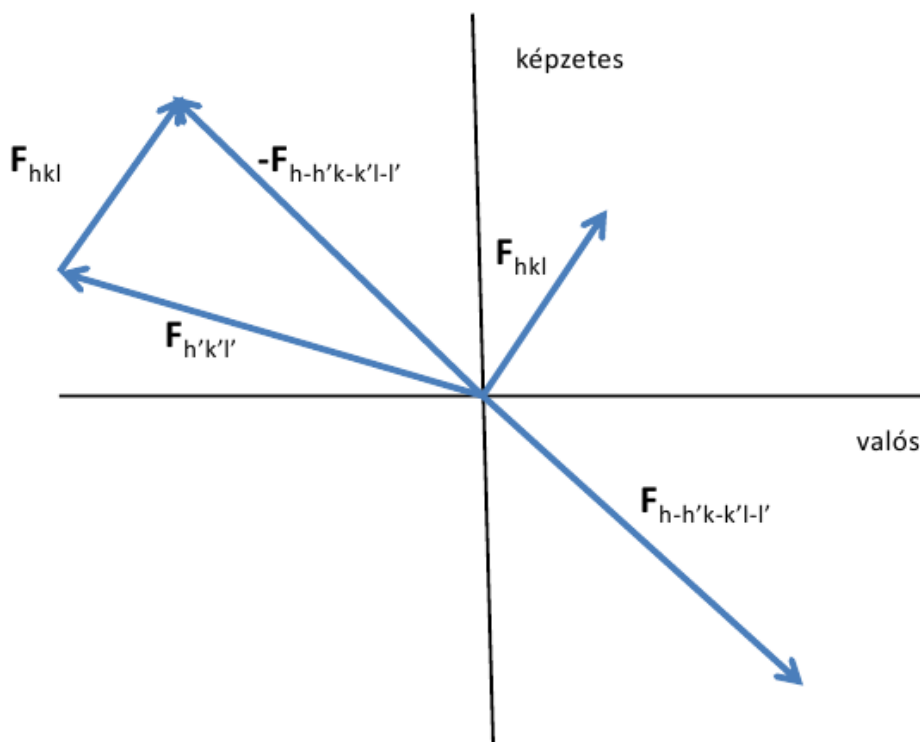
5.5.8. ábra Kioltási szabályok (példák). Csavartengely esetén a reflexiók feltételek egy reciprokrács-vonalra, csúszósík esetén reciprokrács síkra, míg centráltrács típus esetén az összes reflexióra vonatkoznak. (ld. még: [http://goodwin.chem.ox.ac.uk/goodwin/TEACHING\\_files/17\\_handout.pdf](http://goodwin.chem.ox.ac.uk/goodwin/TEACHING_files/17_handout.pdf))

## 5.6. A direkt módszerek: gyors és hatékony eljárás a fázisprobléma megoldására kis molekulák esetén

Az igazi áttörést a röntgendiffrakciós szerkezetmeghatározás alkalmazhatóságában egy olyan módszer jelentette, ami lehetővé tette a szerkezet megoldását a szerkezetre vonatkozó ismeretek nélkül, csak a mért intenzitások felhasználásával kapott fázisösszefüggések alapján. A módszer matematikai alapjairól bővebben: <http://www.iucr.org/education/pamphlets/17/full-text>.

A fázisprobléma megoldása kizárólag a reflexiók intenzitás adataiból jól példázza a tudományos kutatásban végzett szisztematikus erőfeszítéseket, amik végül egy először megoldhatatlannak tűnő probléma átfogalmazásával és több irányból való megközelítésével a megoldásig vezetnek. Az 1930-as évek végére szinte elfogadottá vált, hogy mivel a diffrakciós kísérletben a fázis információt elveszítjük a fázisprobléma kizárólag az intenzitás adatok felhasználásával megoldhatatlan. Ezzel párhuzamosan azonban az 1930-as és az 1940-es években jelentős részeredmények születtek, amik hozzájárultak a fázisprobléma megértéséhez. Végül soron ezek elvezettek a csak könnyű atomokat tartalmazó kis molekulákra is alkalmazható úgynevezett direkt módszerek kidolgozására, amiért J. Karle és H. Hauptman 1985-ben Nobel-díjat kapott ([http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1985/press.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1985/press.html)).

Az első fontos felismerések között volt, hogy a reflexiók intenzitás adataira egyenlőtlenségek írhatók fel (Harker-Kasper egyenlőtlenségek). Például triviális, hogy az  $F_{000}$  a legnagyobb intenzitású reflexió, azaz  $F_{000}^2 \geq |F_{hkl}|^2$ . Mivel az elektronsűrűség sehol sem negatív és mindenütt valós ez megkötést jelent a fázisra. A következő lépésben az intenzitás adatok összehasonlítására bevezették a normalizált szerkezeti tényező fogalmát. Mivel az atomok nem pontszerűek, ezért az  $f_j$  atomi szórási tényezők jelentősen függenek a  $\theta$  diffrakciós szögtől (5.1. fejezet). A reflexiók összehasonlítása előtt ezt figyelembe véve korrigálni kell az  $F_{hkl}$  adatokat és a normalizált szerkezeti tényezőket kell vizsgálni ( $E_{hkl}$ ; a normalizált szerkezeti tényezők így pontszerű atomokból álló szerkezet szórási függvényének felelnek meg, és a velük számított elektronsűrűségi térkép, az E-térkép, éles maximumokat tartalmaz az atomok helyén). Másrészt a fázisproblémát jelentősen egyszerűsíthetjük, ha bevezetjük az atomicitást. Ez azt jelenti, hogy a szerkezet atomokból áll, amelyek helyén elektronsűrűségi maximumok vannak, közöttük viszont kicsi az elektronsűrűség értéke. Az 5.1.6. ábrán bemutatottak szerint az elemi cella minden térfogatelemére vonatkozó integrálás helyett elvégezhetjük az összegzést az atomokra. Mivel a mért reflexiók száma jelentősen meghaladja az atomok számát, a fázisprobléma nem alulhatározott, hanem a gyakorlatban túlhatározott feladat. A szimmetria figyelembe vétele további megkötéseket jelent a fázisokra (5.5 fejezet). Az origó eltolása a fázis változását jelenti, míg az intenzitás változatlan marad. Ha nincs szimmetriaelem az elemi cellában (P1 tércsoport), akkor bármely pont lehet az origó, ha pl. kétfogású forgástengelyeink vannak, akkor az ún. megengedett origónak a tengelyek valamely pontjára kell esnie-ekkor bizonyos reflexiók (szerkezeti szemiinvariánsok) fázisa nem változik, ha az origót egy ilyen megengedett origónak választjuk. Az origó választásának hatását az 5.5.2-5.5.6. ábrák mutatják illetve az International Tables for Crystallography részletesen ismerteti ezeket. Ezek a szerkezeti szemiinvariánsok (vagy struktúr szemiinvariánsok) megkötéseket jelentenek a fázis értékére. Az igazi áttörést a szerkezeti invariánsok felismerése jelentette, amit az 5.6.1. vektorábra szemléltet.



5.6.1. ábra. Vektorábra a direkt módszerek szemléltetésére

Az  $F_{hkl}$  és  $F_{h'k'l'}$  vektorokkal jelzett reflexiók fázisát nem ismerjük. Ha azonban a két vektor összegének ellentettjét vesszük, ami  $-(F_{h-h',k-k',l-l'})$ , akkor ez a három vektor egy vektorháromszöget ad, tehát a harmadik vektor fázisa már kötött (függ az első két vektor fázisától). Másképpen megfogalmazva az  $F_{hkl}$  az  $F_{h'k'l'}$  és az  $F_{h-h',k-k',l-l'}$  triplettet alkot, a szerkezeti tényezők fázisa között valószínűségi alapon összefüggés van: a három fázis összege független az origóválasztástól (szerkezeti invariáns), és nagy valószínűséggel  $0^\circ$ , ha a reflexiók „erősek” (a normalizált szerkezeti tényezőjük értéke nagy). Az összefüggés egyszerűsödik, ha középpontosan szimmetrikus a szerkezet, ekkor a fázis csak  $0^\circ$  vagy  $180^\circ$  lehet, a koszinusza +1 vagy -1. Centroszimmetrikus esetben tehát az, hogy a három fázis összege  $0^\circ$ , annak felel meg, hogy a három koszinusz szorzata pozitív (ha ezt s-el jelöljük (előjel, sign), az előjelek szorzatának nagy valószínűséggel +1-et kell adni), 5.6.2. ábra.

$$s(F_{hkl}) \cdot s(F_{h'k'l'}) \cdot s(F_{h-h',k-k',l-l'}) \approx +1$$

5.6.2. ábra. Valószínűségi megfontolás a fázisok előjelére a direkt módszerek alapja

A direkt módszerek fejlődésében a következő lépést annak vizsgálata jelentette, hogyan lehet a fázisok előjelének a valószínűségét megbecsülni illetve a nagyobb teljesítményű számítógépekkel automatizálhatóvá tenni, sokszor a nyers erőt is használó módszerekké alakítva a fázis kereső algoritmust. A modern szerkezetmegoldó programok kiválasztják azokat a reflexiókat, amelyek olyan

összefüggésekben szerepelnek, amelyekhez nagy valószínűség érték tartozik (startreflexiók). Ezek közül néhány fázisát szabadon meghatározhatjuk, kijelölve ezzel az elemi cella origóját a megengedett origók közül (és bizonyos tércsoportokban az enantiomorfot is), a többinek véletlenszerű fázisokat ad a program. Ezekből a kezdeti reflexiókból aztán levezeti az összes többi reflexió fázisát az összefüggések felhasználásával. Mivel a kezdeti véletlenszerűen megválasztott fázisok nem biztos, hogy jók voltak, jellemezni kell egy mérőszámmal (jósági tényezővel), hogy mennyire jó a fáziskészlet: mivel minden reflexió több összefüggésben is szerepel, a mérőszámmal jellemezhető, hogy a reflexióra különböző összefüggésekből kapott fázis-értékek mennyire egyeznek. Az összes fázis levezetését sokszor, különböző kezdeti fázis-értékekkel végrehajtva végül a jósági tényező segítségével választható ki a legjobb fáziskészlet. Majd a számítógép elvégzi az inverz Fourier transzformációt és megkapjuk az elektronsűrűség adatokat az elemi cellában (E-térkép), és a maximumokhoz atomokat rendelve megkapjuk a modellszerkezetet. Ez lesz az induló modellünk, amit a 6. fejezetben bemutatottak szerint finomítunk (azért hívjuk modellnek a szerkezetet, mert a szerkezetmegoldás további részében még módosulni fog, és még végső állapotában is csak jó, de nem tökéletes leírása lesz a valóságos kristály szerkezetének- hogy mennyire jó, azt az R-faktorral jellemezzük majd).

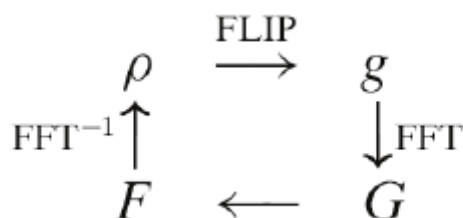
A direkt módszerek sajnos maximum néhány száz atomig működnek, mert ha sok atomunk illetve reflexiónk van, egyre kisebb valószínűséggel teljesül az 5.6.2. ábrán bemutatott feltétel. Fehérjekrisztallográfiában a fázisprobléma megoldására más módszereket használnak, de a direkt módszerek is felhasználhatók pl. a szerkezet nehéz atomokból álló részének szerkezetmeghatározására (lásd 12. fejezet). Egy másik, gyakorlatban tapasztalható hátránya a direkt módszereknek, hogy abban az esetben, ha nehéz atom is van a szerkezetben, de az összetételnél ezt nem vettük figyelembe a módszer nem találja meg a megoldást. Akkor is sokszor sikertelen a megoldás, ha nehéz atomot tételezünk fel, de az nincs a szerkezetben. Viszont ha a könnyű atomok (C,H,N,O) számában vagy minőségében tévedünk akár 10%-al több vagy kevesebb atomot adunk meg, ez általában nem befolyásolja a megoldás sikerességét. A röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározásnak kell(ene) a szerkezetigazolás utolsó lépésének lenni a módszer viszonylagos drágasága miatt, és a kristályosított anyagról készült elemanalízis, MS és spektroszkópiai adatok jelzik (jeleznék) pl. nagy rendszámú atom vagy ion (nehézatomban) jelenlétét. A gyakorlatban azonban a röntgendiffrakciós mérés sokszor párhuzamosan történik az egyéb vizsgálatokkal. Az is lehet, hogy a szerkezet nem egyezik meg a várt szerkezettel, más anyag vált ki a reakcióelegyből pl. nem a fémkomplex, hanem a ligandum. Mindenesetre a  $18 \text{ \AA}^3$  szabály és a tércsoport (esetenként a kristályrendszer) alapján megbecsülhetjük az elemi cellában lévő atomok számát és ha nem sikerül a szerkezetet direkt módszerrel megoldani célszerű az összetételben a nehéz atomokat változtatni és gondolni nagy rendszámú atomokkal/ionokkal történő esetleges vegyületképzésre is.

## 5.7. Alternatív módszerek, charge flipping

Egy új és hatékony módszer a fázisprobléma megoldására a charge flipping módszer. Ez egy iteratív algoritmus, amely felváltva módosítja a direkt és a reciproktér teret, az iteráció egyetlen ciklusa az 5.6.1. ábrán látható. A ciklus kiindulásaként véletlenszerű fázisokat rendelünk a mért szerkezeti tényezőkhöz, majd elektronsűrűségi térképet számítunk ( $F \rightarrow \rho$ ). A ciklus első lépése egy direkt térbeli perturbáció, amely megváltoztatja az elektronsűrűség előjelét, ha az egy kis pozitív küszöbszint alá esik (charge

flipping,  $\rho \rightarrow g$ ). Az így módosított elektronsűrűségből ezután egyszerű Fourier-transzformációval szerkezeti tényezőket számolunk ( $g \rightarrow \mathbf{G}$ ). Harmadik lépésként a számolt fázisok és a mért intenzitásokból származó abszolút értékek felhasználásával új szerkezeti tényezőket állítunk elő ( $\mathbf{G} \rightarrow \mathbf{F}$ ). A ciklust végül inverz Fourier-transzformációval fejezzük be, ez adja a következő ciklus kiindulópontjául szolgáló elektronsűrűséget.

A módszer nagy előnye, hogy nem használja sem a kémiai összetételt, sem az atomicitást, sem a tércsoport szimmetriát, ezeket a teljes elemi cellában megoldott elektronsűrűségből később lehet azonosítani. A charge flipping módszer elvét Oszlányi Gábor és Sütő András dolgozta ki, 2004-es cikkük az alapja minden ezen az elven működő programnak. Egy szemléletes applet letölthető a <http://escher.epfl.ch/flip/> helyről illetve az 5.7.1. interaktív animációval itt is megadjuk. Az appletet Nicolas Schoeni és Gervais Chapuis, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Svájc, készítette, az engedélyükkel tartalmazza a jegyzet.



5.7.1. ábra. Charge flipping algoritmus

[Az 5-7-1-applet](#)

[Teszt](#)

## 6. Szerkezetek finomítása, rendezetlenség kezelése (Bényei Attila)

### Irodalom

Alapvető könyv, a SHELXL program részletes használata esettanulmányokkal, CD melléklettel

- Crystal Structure Refinement – A Crystallographer’s Guide to SHELXL Ed. by P. Müller, Oxford University Press, 2006

Howard Flack alapvető cikkei a kiralitásról és az egykristály röntgendiffrakciós módszer alkalmazásáról abszolút konfiguráció meghatározására, a cikkek nagy része letölthető

<http://crystal.flack.ch/publcn.html>

David Avnir és munkatársai a folytonos szimmetria mérték és a folytonos kiralitás mérték elméletét dolgozták ki és alkalmazzák a legkülönbözőbb kémiai és biokémiai rendszerekre

[http://chem.ch.huji.ac.il/avnir/p\\_symmetry.html](http://chem.ch.huji.ac.il/avnir/p_symmetry.html)

## 6.1. A legkisebb négyzetek módszere

A legkisebb négyzetek módszerét ([http://hu.wikipedia.org/wiki/Legkisebb\\_n%C3%A9gyzetek\\_m%C3%B3dszere](http://hu.wikipedia.org/wiki/Legkisebb_n%C3%A9gyzetek_m%C3%B3dszere)) a tudományban számtalan helyen alkalmazzák. Kellenek hozzá adatok, egy modell és a modellben finomítandó paraméterek, amiket addig változtatunk, míg az eltérések négyzetösszege a modellből számolt és a kísérleti adatok között minimális lesz.

További feltételezésünk, hogy az a függvény, ami megadja a mért értéket a paraméterek függvényében a paraméter szerint deriválható. Még egy nagyon fontos feltételezést teszünk: a hiba véletlen eloszlású. Kis molekulák szerkezetének finomításakor ez jó közelítés. Általában atomi felbontású adataink vannak, ami lehetővé teszi, hogy az egyes atomok koordinátáit és egyéb paramétereit egyszerre finomítsuk. A fehérjekristallográfiában a finomítandó paraméterek nagy száma miatt és mivel az adatok általában nem állnak kellő számban rendelkezésre speciális problémák merülnek fel, erre a 13.3.2. fejezetben térünk ki.

A röntgendiffrakciós finomítás során a mérési adataink az egyes reflexiókhoz tartozó csúcsok intenzitásaiból származtatott szerkezeti tényező abszolút értékek. Van egy kiindulási modellünk is, ami az atomok minőségét és az atomok  $x, y, z$  koordinátáját jelenti, ezt a fázisprobléma megoldásakor kaptuk.

A minimalizálandó mennyiség a mért ( $F_o$ ) és a modellből számított ( $F_c$ ) szerkezeti tényező különbségének négyzete (finomítás  $F$ -re) vagy a mért és számolt szerkezeti tényezőnégyzet eltérésének négyzetösszege (finomítás  $F^2$ -re),  $w_{hkl}$  illetve  $w'_{hkl}$  az egyes reflexiókhoz rendelt súlyfaktor és  $k$  a skálatényező (6.1.1. ábra).

$$\text{minimalizálandó } \sum_{hkl} w_{hkl} (|F_o| - |kF_c|)^2 \quad \text{vagy} \quad \sum_{hkl} w'_{hkl} (F_o^2 - kF_c^2)^2$$

6.1.1. ábra. Legkisebb négyzetek módszere: minimalizálandó mennyiségek

A szerkezeti paraméterek:  $p_i$  lehet az atom 3 koordinátája és 6 atomi mozgástényező paramétere, atomic displacement paraméter, ADP, amit B-faktornak is nevezünk, és azt jelöli, hogy az atom a rácspan az egyensúlyi helyzet körül átlagosan mennyire eltérő pozícióban van. A minimalizálandó függvényt a  $p_i$  paraméterek szerint parciálisan deriválva a minimumban az első derivált 0 (6.1.2. ábra).



$$\sum_{hkl} w(|F_o| - |kF_c|) \frac{\partial kF_c}{\partial p_i} = 0$$

6.1.2. ábra A célfüggvénynek szélső értéke van, ha minden paraméterre parciális deriváltja 0. A paraméterek számával megegyező számú egyenletet kell megoldanunk.

Első közelítésben feltételeztük, hogy a paraméter kis mértékű változásakor  $F_c$  lineárisan változik (6.1.3. ábra), vagyis az induló modellünk lényegében jó. Más szóval az  $F_c$  függvényt Taylor sorba fejtjük (<http://hu.wikipedia.org/wiki/Taylor-sor>) a paraméterek szerint, és a minimalizáló algoritmus során a paraméterek azon  $k$  kis  $\Delta p_i$  változását keressük, amivel a kiindulási értékük eltér a valóságostól. Feltételezzük, hogy a modell csak kis mértékben tér el a valóságos szerkezettől, ezért a Taylor sorban a többszörös deriváltakat tartalmazó tagokat elhanyagoltuk.

$$F_c = F_{c(0)} + \frac{\partial F_c}{\partial p_1} \Delta p_1 + \frac{\partial F_c}{\partial p_2} \Delta p_2 + \dots + \frac{\partial F_c}{\partial p_n} \Delta p_n$$

6.1.3. ábra Az  $F_c$  függvényt Taylor sorba fejtjük a paraméterek szerint.

A 6.1.2. ábra szerinti összes egyenletbe behelyettesítve a 6.1.3. kifejezést, egy egyenletrendszerhez jutunk, amelyben a változók a paraméterek kis  $\Delta p_i$  változásai. Az egyenletrendszert mátrix alakban felírva a formalizmus egyszerű:  $[A] \Delta \mathbf{p} = \mathbf{v}$ , ahol  $\Delta \mathbf{p}$  vektor tartalmazza  $\Delta p_i$ -ket, az  $[A]$  mátrixot és a  $\mathbf{v}$  vektort pedig a 6.1.4. ábra szerint adhatjuk meg.

$$A_{ij} = \sum w \left( \frac{\partial(kF_c)}{\partial p_i} \right) \left( \frac{\partial(kF_c)}{\partial p_j} \right), \quad v_i = \sum w(F_o - kF_c) \left( \frac{\partial(kF_c)}{\partial p_i} \right)$$

6.1.4. ábra Az  $[A]$  mátrix és a  $\mathbf{v}$  vektor elemei, magyarázat a szövegben.

Az  $[A] \Delta \mathbf{p} = \mathbf{v}$  mátrixegyenlet mindkét oldalát balról  $A$  mátrix inverzával balról megszorozva, és figyelembe véve, hogy  $[A]^{-1}[A]=[E]$ , a következő egyenlethez jutunk:  $\Delta \mathbf{p} = [A]^{-1}\mathbf{v}$ . Tehát az  $[A]$  mátrixot invertálva meghatározhatjuk, hogy az egyes paramétereket hogyan kell változtatnunk a minimum megtalálásához. Mivel a 6.1.3. ábrán felírt egyenlet közelítés, a mátrixegyenlet megoldásával nem jutunk el a valóságos szerkezethez, csak a kiindulási modellnél jobban megközelítjük azt. A legkisebb négyzetes finomításkor a mátrixegyenletet többször egymás után megoldva iterálunk, és közelítjük meg a célfüggvény minimumát. A számítógépek fejlődésével lehetővé vált a minimalizálási feladat több száz vagy ezer paraméterre való megoldása kis molekulák esetén néhány másodperc alatt. Az illesztés során meghatározhatjuk a paraméter  $\sigma$  szórását és a finomítandó paraméterek közé egyéb paramétereket, például a Flack paramétert (6.4.4. fejezet), az adatok közé pedig egyéb kötésszög, kötéstávolság adatot is beilleszthetünk. Ezeket az extra adatokat a finomítás során a mért reflexió intenzitásokhoz hasonlóan kezelhetjük, ami a mindig adathiánnyal küzdő fehérjekrisztallográfiában jelentős, lásd 13.3.2. fejezet. A modellszerkezet jóságát elterjedten a krisztallográfiai R-faktorral jellemezzük: ez a legkisebb négyzetes célfüggvényben is megjelenő különbséggel méri a modellszerkezetből számítható adatkészlet eltérését a mért

adatoktól (6.1.5.ábra). (A legkisebb négyzetes módszer bővebb leírása: [http://ww2.chemistry.gatech.edu/~wilkinson/Class\\_notes/CHEM\\_6181\\_spring\\_2003/11\\_refinement.pdf](http://ww2.chemistry.gatech.edu/~wilkinson/Class_notes/CHEM_6181_spring_2003/11_refinement.pdf))

$$R = \frac{\sum_{h,k,l} |F_o(h,k,l) - kF_c(h,k,l)|}{\sum_{h,k,l} F_o(h,k,l)}$$

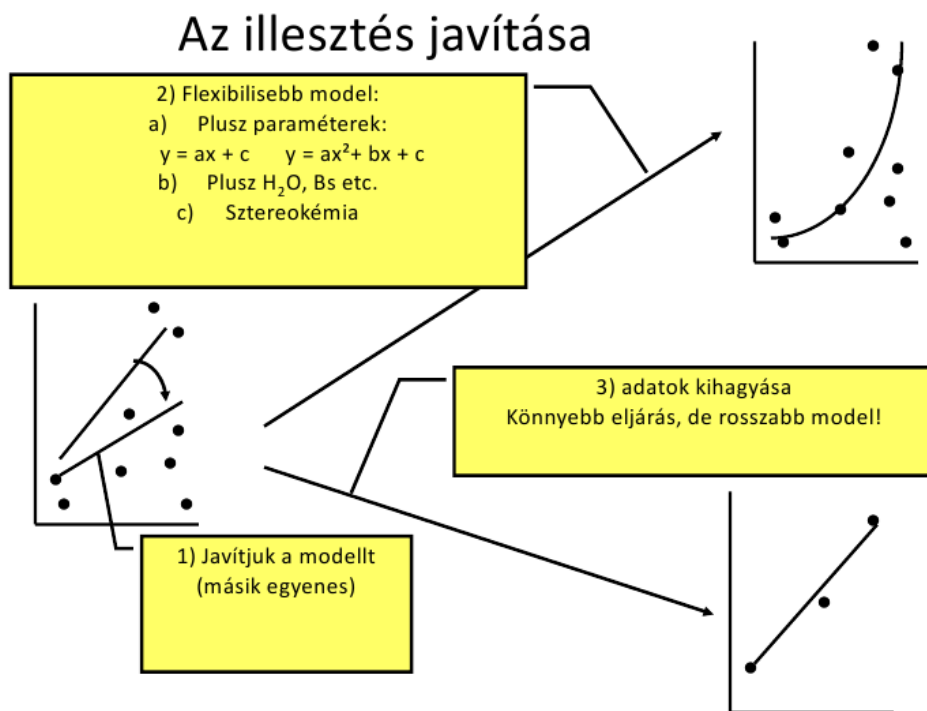
6.1.5.ábra A kristallográfiai jósági tényező (R-faktor;  $k$  skálafaktor)

A paraméterek finomításakor kis molekulák esetén előfeltétel az illesztési feladat 10-szeres túlhatározottsága, tehát egyenes illesztését végezzük el több ezer adatpontra a paraméterek több száz dimenziós terében. A fehérjekristallográfiában a feladat túlhatározottságát plusz információ bevitelével biztosítjuk, de folyamatosan ellenőrizzük ( $R_{free}$ ), hogy a bevitt adat ne legyen ellentétes a modellel. Erről részletesen a 13. és a 15.2 fejezetben lesz szó.

## 6.2. A diffrakciós adatok finomítása: illesztés több száz dimenzióban

A paraméterek száma több száz az adatoké pedig több ezer (kis molekulák esetén). A probléma nagy túlhatározottsága az az ok, ami miatt az atomi koordinátákat akár ezred Angström pontossággal meg tudjuk határozni.

Az illeszkedés javítására mutat ötleteket a 6.2.1. ábra. Az 1. esetben egymásik, jobban illeszkedő egyenest jelent a modell. Például, ha helyesen jelöljük az atomok minőségét (pl. C,N, O) egy új modellt kapunk, ami jobban megközelíti a valóságot. A 2. esetben két paraméter helyett (egyenes) három paramétert (parabola) illesztünk. Ha az atomok kristálybeli rezgését az egyensúlyi helyzet körül egy paraméterrel írjuk le izotróp, ha hat paraméterrel anizotróp finomításról beszélünk és ez utóbbi esetben azt várjuk, hogy az illeszkedés javuljon. Ellenkező tapasztalat arra utal, hogy a modell teljesen rossz. A 3. eset az adatok kihagyását jelenti. Ezt csak akkor alkalmazhatjuk, ha egyértelműen mérési hibára utaló jelek vannak. A követendő helyes gyakorlat az, hogy ismételten megmérjük a kérdéses reflexiókat. Az adatpontok számát úgy növelhetjük, hogy szerkezeti megkötéseket (restraint, laza kötöttségű finomítás; a finomítás célfüggvényében büntetőtagok vannak, amik büntetik bizonyos paraméterek eltérését az ideális értéktől – fehérjekristallográfiában, és gyengébb minőségű adatkészletek esetén kismolekulás kristallográfiában is alkalmazzák), kényszereket (constraint; merev kötöttségű finomítás; egyes paramétereket az ideális értékükhöz rögzítjük- fehérjekristallográfiában alkalmazzák alacsonyabb felbontás esetén) alkalmazunk. Azt, hogy meddig lehet az illeszkedés jóságát így javítani az  $R_{free}$  segítségével ellenőrizhetjük (erről további információ a 13.3.2. fejezetben).



6.2.1. ábra. Az illeszkedés jóságának javítására alkalmas módszerek. További magyarázat a fenti szövegben.

A modellszerkezet jóságát elterjedten a kristallográfiai R-faktorral jellemezzük: ez a legkisebb négyzetes célfüggvényben is megjelenő különbséggel méri a modellszerkezet eltérését a valóságos szerkezettől (6.1.5.ábra). ([http://en.wikipedia.org/wiki/R-factor\\_\(crystallography\)](http://en.wikipedia.org/wiki/R-factor_(crystallography))) Aszerint, hogy  $F$ -re vagy  $F^2$ -re finomítunk az eltérés definiáló egyenletét a 6.2.2. ábra mutatja.

$$R = \frac{\sum_{h,k,l} |F_o(h, k, l) - kF_c(h, k, l)|}{\sum_{h,k,l} F_o(h, k, l)} \quad \text{illetve} \quad R_w = \sqrt{\frac{\sum_{h,k,l} w_{hkl} [F_o(h, k, l) - kF_c(h, k, l)]^2}{\sum_{h,k,l} w_{hkl} [F_o(h, k, l)]^2}}$$

6.2.2. ábra. R-faktorok definiáló egyenlete ( $w$  súlyozó faktor,  $k$  skálafaktor)

### 6.3. Nem idealizált kristályok diffrakciós képe

A sikeres finomítás után a meghatározott szerkezet egyrészt a rács szerkezete az elemi cella paraméterek ( $a, b, c, \alpha, \beta, \gamma$ ) és a tércsoport megadásával, másrészt az atomi koordináták és atomi mozgástényezők. Ez utóbbiak segítségével értelmezzük, illetve írjuk le kémiaillag az elektronsűrűségi függvényt, ami a röntgensugárzással kölcsön hat, és a szórás függvényből közvetlenül kiszámítható. Az elektronsűrűségnek, és a szerkezetnek az értelmezésénél mindig szem előtt kell tartanunk, hogy ez az egész kristály összes elemi cellájának az egész mérési időre vett átlaga (egy szemléltetés a 6.3.1. ábrán).



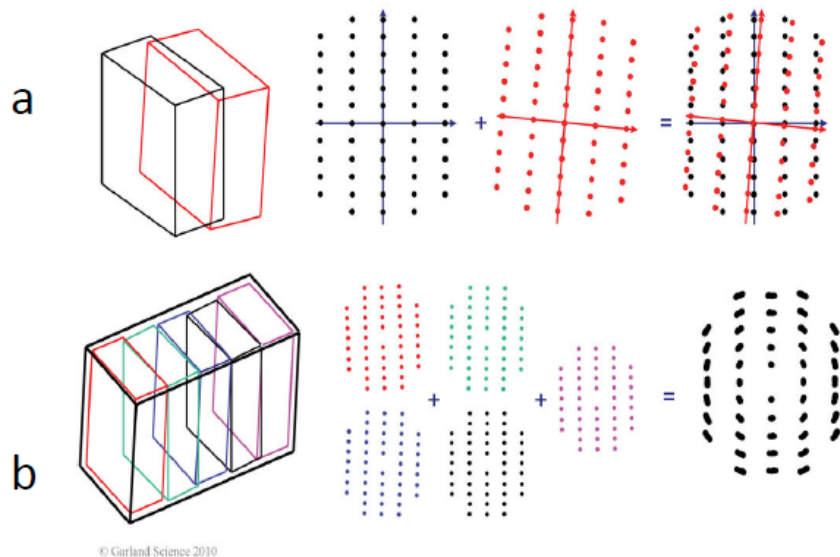
6.3.1. ábra. Kiátlagolódnak az elemi cellák képei, szemléltetés írásvetítő fóliával

A szerkezeti tényező vagyis a diffrakciós mintázat egyszerre tartalmazza a rácsra és az ismétlődő motívumra vonatkozó információt (5.2.2. ábra). Ebből következik, hogy ezek 'tökéletlensége' a szerkezeti tényezőben is megjelenik, de a teljes leírás az elvégzett konvolúciós illetve Fourier transzformációs lépések miatt nehézségekbe ütközik: egyrészt az előbbieken tárgyalt egyenletek végtelen és tökéletes kristályt feltételeznek, másrészt a különböző okokra visszavezethető hibák (torzulások, rendezetlenség) hatása az elektronsűrűségi térképen nem biztos, hogy megkülönböztethető. A problémát az egyes torzulások és rendezetlenségek felől is megközelíthetjük.

### 6.3.1. A rácsban fellépő makroszkopikus domének hatása

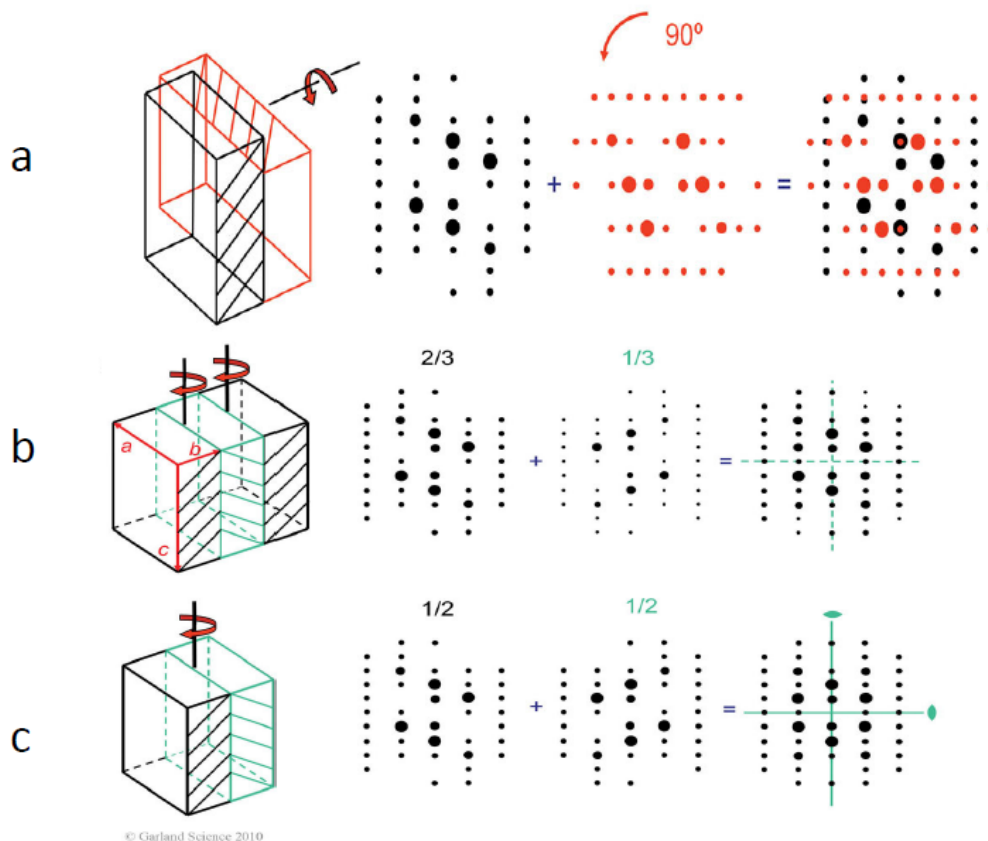
Amennyiben a kristály makroszkopikusan elkülönülő kristálykákból (iker kristályok) áll ezek reciprokrácsainak összegét, egymásra szuperponáltját fogjuk kapni a diffrakciós mintázatban (6.3.1.1. ábra). Mechanikai hatással polarizációs mikroszkóp alatt a nagyobb méretű iker kristályok szétválaszthatók (pattintás). Lehetséges (6.3.1.1. ábra a), hogy szennyezők vagy más külső hatás miatt a kristályok összenőttek (közös gócból kezdtek növekedni, vagy az egyik kristály kristályhibája szolgált a másik növekedéséhez kristálygócként) és a domének lapjai nem tökéletesen illeszkednek. Az ábra felső részén látható iker kristály diffrakciós képe is élesen különböző és terdetektoros készüléken felbontható alkotóira. Figyeljük meg, hogy a reciprokrácsban távolabb az origótól (nagyobb  $h, k, l$  indexek) a diffrakciós csúcsok jobban elkülönülnek. Két domén esetén a röntgendiffrakciós mérés valamint annak kiértékelése (a szerkezet megoldása és finomítása) elfogadható eredménnyel elvégezhető. A tapasztalatok alapján, ha reciprokrács vizsgálata arra utal, hogy 3 vagy több domént találtunk a mért kristályban, akkor a csúcsok átlapolása miatt az integrálás nehézségekbe ütközik, marad a kristály darabolása vagy új kristályosítás.

Ha sok kis méretű domén alkotja a kristályt, vagyis nagy a mozaikossága, akkor a diffrakciós foltok elmosódottak lesznek és célszerű újrakristályosítani a mintát (6.3.1.1. ábra b).



6.3.1.1. ábra. Ikerkristály és megjelenése a diffrakciós mintázatban. (Bernhard Rupp: Biomolecular Crystallography, Garland Science, a szerző engedélyével).

Abban az esetben, ha a kristály domének lapjai tökéletesen illeszkednek, de az egyik domén a másikhoz képest az elemi cella által meghatározott szöggel (pl.  $90^\circ$ ) el van forgatva (nem meroéderes iker), akkor két doméntől származó egymásra szuperponálódott diffrakciós kép kiértékelése nehezebb. Mivel a diffrakciós csúcsok átlapolnak, nem tudjuk felbontani a mért intenzitást az egyes domének járulékára és a tércsoport meghatározása is problémás lehet (6.3.1.2. ábra a).

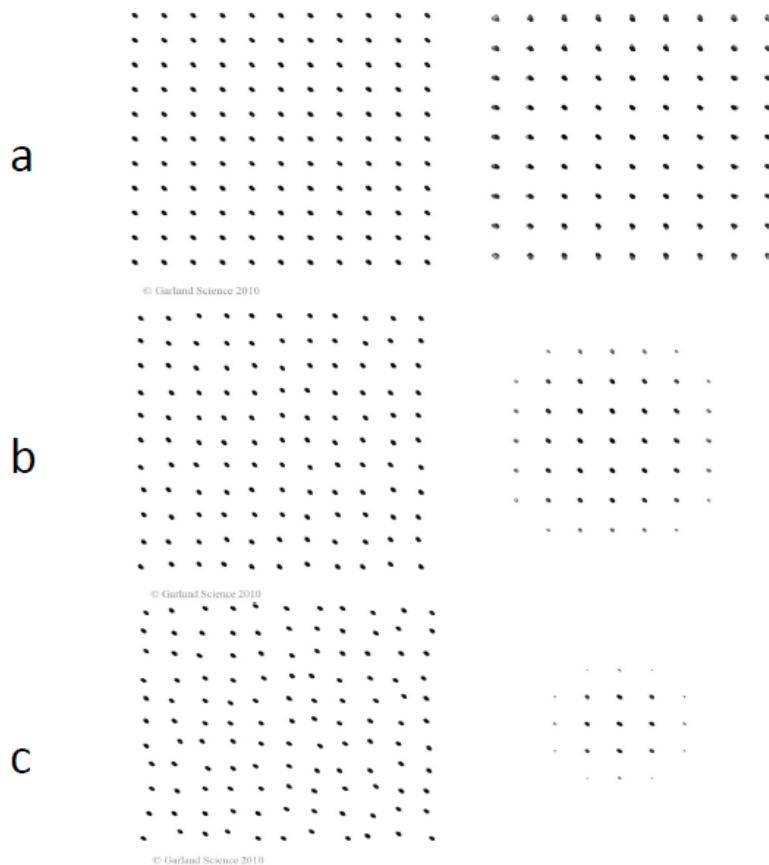


6.3.1.2. ábra. Nem meroéderes (a) és hemiéderes (b és c) iker kristályok valamint diffrakciós képük. (Bernhard Rupp: Biomolecular Crystallography, Garland Science, a szerző engedélyével).

Meroéderes iker kristály esetén a különböző domének diffrakciós képe teljesen átfed 3 dimenzióban. Ilyenkor általában csak kétféle orientációban vannak a domének, ekkor hemiéderes ikerről beszélünk. Ha hemiéderes iker kristályunk van és a domének mennyisége lényegesen eltér (6.3.1.2. ábra b) esélyünk van a diffrakciós kép felbontására. Ha azonban a domének egyforma mennyiségben vannak jelen (6.3.1.2. ábra c), akkor a diffrakciós mintázat magasabb szimmetriájúnak tűnik (pl. az ábrán monoklin helyett ortorombosnak). Ez is a tércsoport rossz megállapításához vezet.

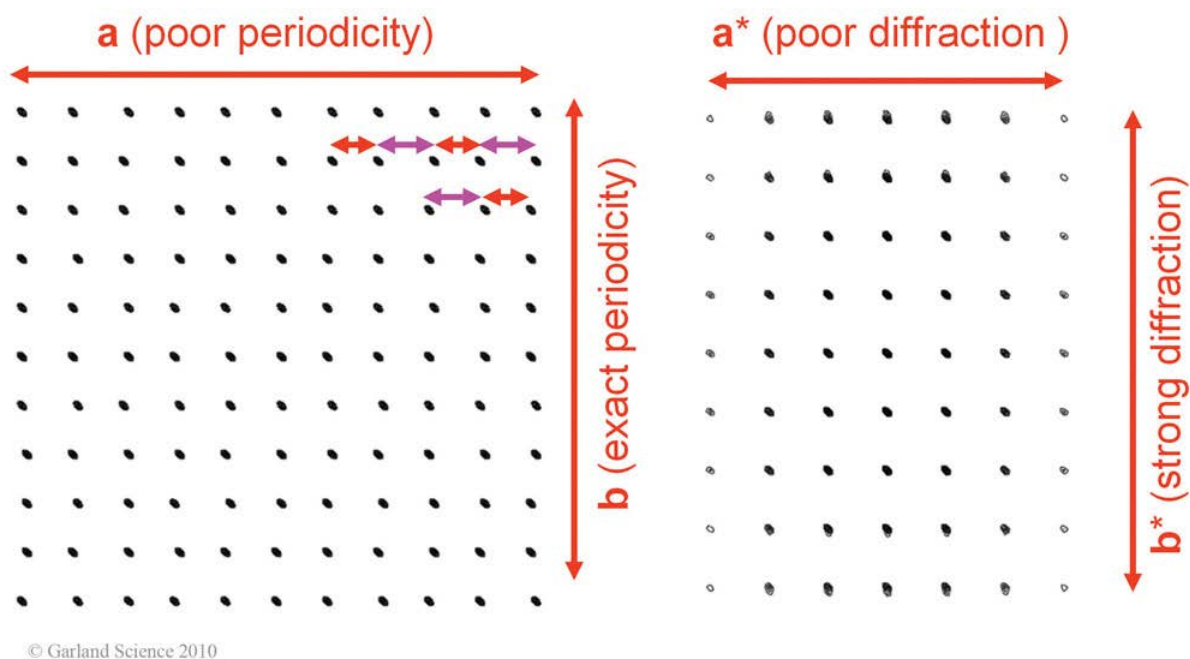
### 6.3.2. A rács torzulása

A rács feszültség és egyéb okok miatt hosszú távú korrelációval vagy korreláció nélkül torzulhat. Korreláció nélküli fokozódó véletlenszerű torzulást mutat a 6.3.2.1. ábra a-c. Figyeljük meg, hogy a diffrakciós foltok nagysága nem változik, nem szélesednek. A mérhető intenzitások csökkennek, a diffrakciós mintázat egyre nagyobb része csökken zajszint alá, romlik a felbontás.



6.3.2.1. ábra. A rács véletlenszerű torzulása (Bernhard Rupp: Biomolecular Crystallography, Garland Science, a szerző engedélyével).

Ha a torzulás korrelált és anizotropikus a 6.3.2.2. ábrának megfelelő mintázatot kapjuk. Az **a** tengely irányában a periodicitás torzul ennek hatására az  $\mathbf{a}^*$  tengely mentén a reciprok térben csökken az intenzitás, míg **b** irányban a periodicitás nem torzult, tehát  $\mathbf{b}^*$  irányban nincs csökkenés (ortorombos rendszer).



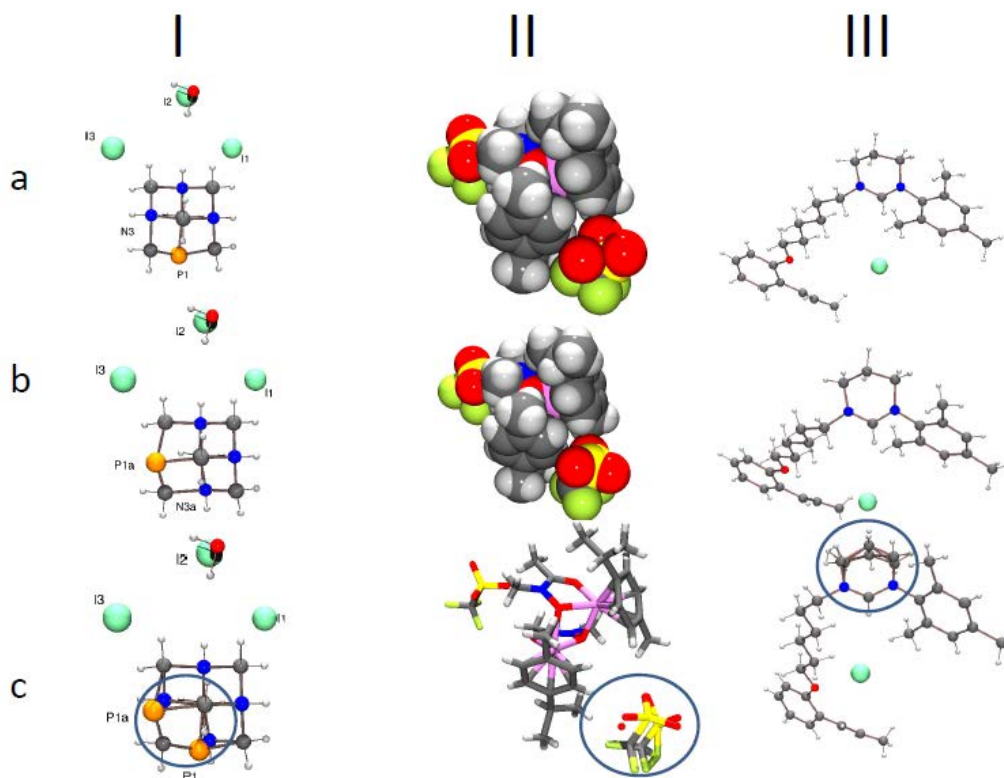
6.3.2.2. ábra. Anizotróp torzulás a rácsban. (Bernhard Rupp: Biomolecular Crystallography, Garland Science, a szerző engedélyével).

### 6.3.3. A molekulaszervezet torzulása

Az is előfordulhat, hogy az átlagos molekulaszervezet torzult. Ez a kristálybeli rendezetlenséggel magyarázható, ami lehet statikus vagy dinamikus rendezetlenség, de ezek a röntgendiffrakcióval nem megkülönböztethetők. Statikus rendezetlenség esetén ugyanaz a molekula ismerhető fel két helyen vagy csak a molekula egy részlete foglalhat el különböző konformációkat. Dinamikus rendezetlenség esetén a különböző konformációk vagy térbeli helyzetek egyensúlyban vannak, egymásba átalakulnak. Ha az aszimmetrikus egységekben ugyanannak a szerkezeti részletnek több helyzeti vagy konformációs változata van jelen, csak a domináns változatok azonosíthatók amiatt, hogy az atomok kiterjedtek (elektronsűrűségi térképen kell őket azonosítani). A 6.3.3.1. ábra I. oszlopában egy foszfin molekula a rácsban két orientációt foglal el (a és b). A szerkezet megoldása során az elektronsűrűségi maximumok nagysága arra utalt, hogy a molekula a foszfor atomot két, alternatív helyzetben tartalmazza (az aszimmetrikus egységekben az egy foszfor atomot tartalmazó molekula kétféle, egymással átfedő orientációban van jelen). A foszfor atomot sárga, a nitrogént kék, az oxigént piros, a jódot zöldeskék, a szenet sötét szürke míg a hidrogéneket világos szürke színnel jelöltük. A rendezetlenség modellezését mutatja a c ábra. A 6.3.3.1. ábra II. oszlopában egy ruténium komplexet (a ruténium atom lilával jelölve) két triflát anion (a kén atom sárga, a fluor zöld, az oxigén piros) semlegesít. Az egyik anion rendezett, de a jobb oldalon alul lévő triflát ion számára rendelkezésre álló tér elegendően nagy és két konformációban is lehet a kristályban. Az II/a és II/b ábrákon térkitöltésű modell látható az atomok van der Waals sugarával, a helyesen modellezett aszimmetrikus egységet itt a II/c ábra mutatja. A III. oszlopban arra látunk példát, hogy a molekula egy részlete, a gyűrű CH<sub>2</sub> csoportja lehet két helyen. Láncvégi metil csoportok különböző orientációja gyakran nem okoz röntgendiffrakcióval mérhető eltérést, de ha trifluorometilcsoportunk van annak nyitott és fedő állású konformációja egyszerre látható. Ha a szerkezetben az ellenion BF<sub>4</sub><sup>-</sup> vagy PF<sub>6</sub><sup>-</sup>



ezek gyakran alternatív orientációkban vannak jelen a rendelkezésükre álló poláris üregben, különösen akkor, ha nincs erős hidrogén donor a molekulában, ami hidrogénkötésekkel rögzíthetné az elleniont. Ha a két hely betöltöttsége összemérhető, akkor a betöltöttség a többi paraméterrel együtt finomítható. Nem várhatunk tized%-os pontosságot, de azt meg lehet mondani, hogy a két hely aránya körülbelül 90:10, 60:40, 50:50, 40:60 vagy 10:90. A rendezetlenség modellezése a SHELXL program PART utasításának használatával történhet, de az is előfordulhat, hogy kis molekulák esetén is modellezzetlenül kell hagynunk az elektronsűrűséget. Ez utóbbira gyakori példa a kristály üregeiben lévő rendezetlen oldószer molekula.



6.3.3.1. ábra Rendezetlen szerkezetek, a két hely betöltöttsége minden esetben közel azonos. Magyarázat a szövegben.

## 6.4. Kiralitás és tércsoportok

A kiralitás a modern kémia és biológia egyik központi kérdése, és így a szerkezeti kémiában is nagy a jelentősége. Itt a kiralitást a röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat és az abszolút konfiguráció egyértelmű meghatározhatóságának szempontjából tárgyaljuk. Spektroszkópiailag egy anyag királis, ha elforgatja a poláris fény síkját, pontosabban, ha CD spektrumán Cotton effektust tapasztalunk. A kiralitás oka, hogy az anyag részecskéi forgatással és eltolással egymással fedésbe NEM hozható tükörképi párok (enantiomerek) formájában léteznek, és az egyik nagyobb számban van jelen a másikkal a mintában. Ezzel a definícióval nemcsak a kiralitáscentrummal rendelkező molekulákat, hanem a molekula alakja miatt királis rendszereket (axiális pl. allének, planáris pl. ferrocének és helikális kiralitás pl. helicén) és a tükörkép formájában létező tércsoportokat is besoroltuk. A kvarc egy kitűnő példa arra, hogy nem királis

egységekből álló kristály is lehet királis. Az ásványtanban ezeknek kiterjedt irodalma van, az enantiomorf jelleg a kristály morfológiájában is tükröződik. David Avnir és munkatársai kutatásai mutatják, hogy ez a jelenség nem olyan ritka, mint korábban gondolták.

Az abszolút konfiguráció asszignálása spektroszkópiai módszerekkel összehasonlításon alapul (vegyületsorokat kell vizsgálni pl. NMR shift reagensekkel). Egy újabb módszer az abszolút konfiguráció meghatározására a polarizált fényvel az infravörös tartományban felvett spektrum (vibrációs cirkuláris dikroizmus spektrum, VCD, [http://btools.com/wp-content/uploads/2012/05/VCD\\_App\\_Notes\\_2012.pdf](http://btools.com/wp-content/uploads/2012/05/VCD_App_Notes_2012.pdf)) és kvantumkémiai számítások kombinálásán alapul. A konformerek geometriáját optimalizálják és kiszámolják a relatív energiákat (gázfázisra) valamint az egyes konformerek CD görbéit. A konformerek eloszlását az energiák alapján becslik és a Boltzman súlyozott eredő spektrumot generálják, amit a kísérletileg mért spektrummal hasonlítanak össze. Így a mért spektrumot kvantumkémiai számítások eredményével kiegészítve az abszolút konfiguráció meghatározható. A konformerek gáz fázisban és oldatban mért populációja általában hasonló. Szilárd fázisban a fellépő másodlagos kölcsönhatások jelentősen befolyásolják, hogy melyik konformer kristályosodott ki. Ha van jó minőségű egykristályunk, akkor önmagában a röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálatból meghatározható az abszolút konfiguráció. Nagyon flexibilis molekula konformációs viszonyainak felderítéséhez az energia optimalizálást is célszerű egykristály röntgendiffrakciós technikával meghatározott koordináta adatokkal indítani.

#### **6.4.1. Tiszta királis anyagok számára lehetséges és enantiomorf tércsoportok összefoglaló neve: királis tércsoport**

Azok az anyagok, amelyek csak az egyik enantiomert tartalmazzák, olyan tércsoportban kristályosodhatnak, amiben nincs olyan szimmetriaelem, amely a motívum tükörképi párját is előállítja, például inverzió, tükörsík vagy csúszósík; összesen 65 tércsoport. Van 11 pár olyan tércsoport is, amelyek egymás tükörképi párjai. Ezeket enantiomorf tércsoportnak nevezik, a 65 tércsoportra szokták a királis jelzőt használni. Természetesen fehérjék csak a 65 tércsoport valamelyikében kristályosodhatnak. Ha egy királis anyag a 11 tükörképi pár formájában létező tércsoport valamelyikében kristályosodik, akkor az enantiomer párja nem biztos, hogy a tükörképi tércsoportban kristályosodik. Felléphet a polimorfia jelensége, pl. más hidrogénkötés mintázat alakul ki. Természetesen ennek az anyagnak is a 65 engedélyezett tércsoport valamelyikében kell kristályosodnia. Mivel az enantiomer párok előállítása lényegesen különbözhet (pl. az egyik természetes eredetű, a másik szintetikus és/vagy rezolválás eredménye) a szennyező profiljuk is eltérő és ez elegendő lehet orientációs vagy konformációs polimorfizmus indukálására. Ugyanis nyomnyi szennyezők drasztikusan befolyásolhatják a kristályosodást. Ha az anyag kristályosodási hajlamának a feltérképezése a cél (a polimorf módosulatok keresését is beleértve) eredményre vezethet, ha az akirális (pl. ionos) hatóanyagot királis ellenion mindkét enantiomerjével kristályosítjuk (só- vagy kokristály képzés).

#### **6.4.2. Enantiomerek 1:1 molarányú elegye: racemátok**

A racemátok az enantiomerek 1:1 molarányú elegyei, ezért nem forgatják a poláris fény síkját, nem adnak Cotton effektust. A leggyakrabban ezek olyan tércsoportban kristályosodnak, amelyekben a tércsoport

szimmetriája miatt az elemi cellában a tükörképi pár mindkét tagja jelen van, pl középpontos szimmetriát mutató tércsoportok. Mint a 3.2. pontban tárgyaltuk, előfordul, hogy a racemát a 65 királis tércsoport valamelyikében kristályosodik, vagyis a két enantiomer nem pontosan egymás tükörképi párjai, a konformáció (kötésszög és kötéstávolság adatok) kismértékben eltérhet, nem csak a megfelelő torziós szögek előjelében van különbség. Nagyon érdekes az az eset, ha  $Z'=1$ , mert ekkor a kristálytömeg a két enantiomorf kristály keveréke, racém konglomerátuma. Pasteur a borkősav (racém sav) ilyen kristályait válogatta szét mikroszkóp segítségével! Ha egyetlen ilyen kristályt vizsgálunk az már csak az egyik enantiomert tartalmazza, tehát Cotton effektust ad.

### 6.4.3. Enantiomerek tetszőleges elegye, ikerkristályok

Előfordul, hogy enantiomer elegy úgy kristályosodik, hogy a tiszta enantiomerek kristályai egymással összenőve képződnek, és ezek a mikrodomének makroszkopikusan ikerkristályt alkotnak (chiral twinning, a meroéderes ikerkristály speciális esete; [http://ocw.mit.edu/courses/chemistry/5-067-crystal-structure-refinement-fall-2009/lecture-notes/MIT5\\_067F09 lec5 twinning.pdf](http://ocw.mit.edu/courses/chemistry/5-067-crystal-structure-refinement-fall-2009/lecture-notes/MIT5_067F09 lec5 twinning.pdf)). Ez, ha az enantiomerek elegye nem sztöchiometrikus, vagyis 1:1 molarányú, akkor a diffrakciós képben is észlelhető és a két komponens aránya a finomítási lépésben pontosan meghatározható. Ezzel az egykristály röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározás az enantiomer tisztaság ellenőrzésének a spektroszkópai módszerektől teljesen független módszere lehet. Persze ez csak akkor igaz, ha minden kristályban ugyanannyi az enantiomerek aránya és nem történik a korábban is említett spontán rezolválódás vagyis hogy a szilárd anyag a két enantiomorf kristály konglomerátuma lenne. A fázisdiagram mutatja az anyag kristályosodási hajlamát termodinamikai szempontból, vagyis hogy adott körülmények között a racém konglomerátum, az ikerkristály vagy az elegykristály a stabil.

### 6.4.4. Az abszolút konfiguráció meghatározásának független és elvileg mindig alkalmazható módszere az egykristály röntgendiffrakció

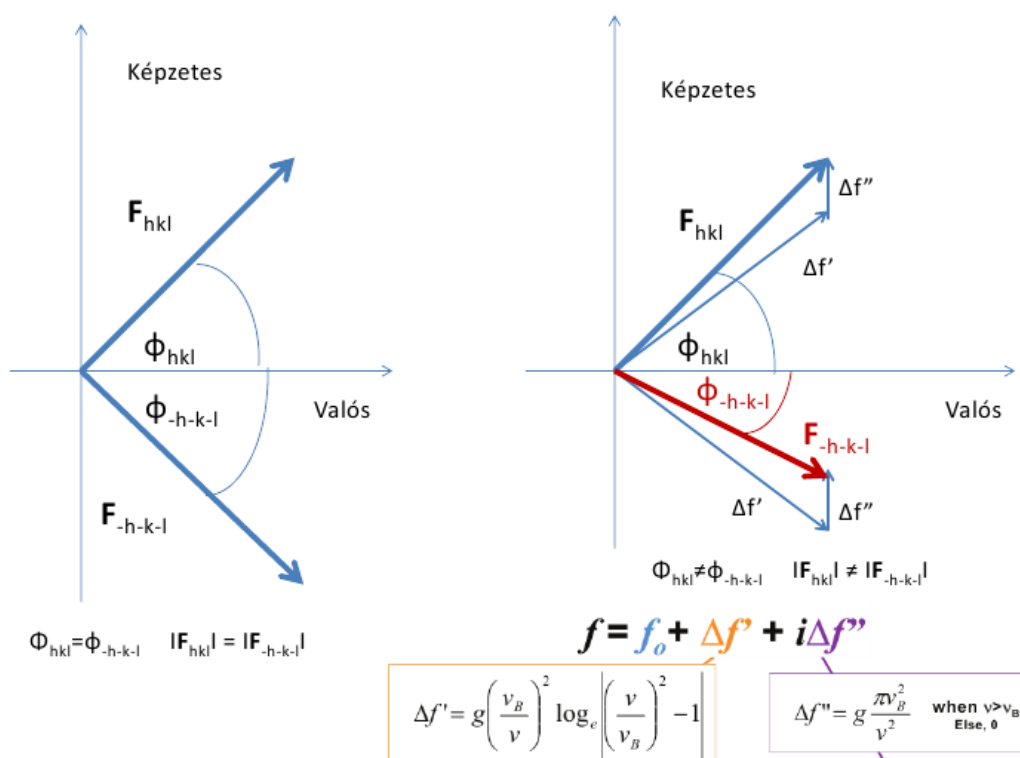
Az abszolút konfiguráció meghatározásának kémiai módszere a cukorkémia fejlődésével került előtérbe. Emil H. Fischer 1888-ban szerencsésen a jó konfigurációt asszignálta a D-gliceraldehidhez – 50% esélye volt eltalálni. Később röntgendiffrakciós mérésekkel igazolták a választását (1951, J.M. Bijvoet és munkatársai

[http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/en/ch/12/oc/vlu\\_organik/stereochemie/chiralitaet.vlu/Pa ge/vsc/en/ch/12/oc/stereochemie/absolute\\_configuration/absolute\\_configuration.vscml.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/en/ch/12/oc/vlu_organik/stereochemie/chiralitaet.vlu/Pa ge/vsc/en/ch/12/oc/stereochemie/absolute_configuration/absolute_configuration.vscml.html)).

Az egykristály röntgendiffrakció lehetővé teszi, hogy az asszignálást teljes bizonyossággal általános esetben is elvégezzük.

Ehhez a Friedel-pár reflexiók pontos mérése segít minket. Az eddigiek szerint és az 5. fejezetben részletesen bemutatott diffrakciós elméletből az következik, hogy a  $(h,k,l)$  és a  $(-h,-k,-l)$  reflexiók - amiket Friedel-pároknak is nevezünk - intenzitásának első rendben azonosnak kell lenni. A mérések szerint ez néhány %-os eltéréssel teljesül, és ha nagyon pontosan megmérjük ezeket a kicsiny különbségeket meghatározhatjuk hogy a helyes vagy a tükörképi konfigurációt mutatja a modellünk. Az egyik legelfogadottabb a Flack paraméter finomítása, ami tulajdonképpen azt mutatja meg, hogy mennyi a

másik enantiomer móltörtje a kristályban. Ha a Flack paraméter értéke 0 a szórás 3-szorosán belül, akkor a helyes konfigurációt mutatja a modell, ha 1, akkor invertálni kell. Nagy előny, hogy ez a Flack paraméter a finomítás során – ha rendelkezésünkre állnak pontosan megmért Friedel- pár reflexiók – a többi paraméterhez hozzávéve finomítható, tehát a szórását is ki tudjuk számolni. Ha a Flack paraméter szórása nagy (>0,1), vagyis rossz a kristály minősége és/vagy nem mértünk elegendő számú Friedel-párt akkor az abszolút konfiguráció asszignálása a mért kristályra nem megbízható. Bayes statisztika alkalmazásával pontosíthatjuk az asszignálás konfidenciáját a PLATON program használatával. A Friedel-párok eltérése az anomális diszperzió jelenségével magyarázható, amit vektorábrán (Argand diagram) a 6.4.4.1. ábra mutat. Elvben a Friedel-párok, vagyis a  $(h,k,l)$  és  $(-h,-k,-l)$  reflexiószerkezeti tényezői ( $F$  vektorok) egymásnak a valós tengely szerinti tükörképei, mint a bal oldali ábra mutatja. Valójában az atomi szórási tényezők nem valós, hanem komplex számmal írhatóak le. Ez anomális diszperziót okoz és az  $f''$  képzetes rész miatt az  $F_{hkl}$  és  $F_{-h-k-l}$  vektorok nem pontosan tükörképi párijai egymásnak. A szórási tényező valós és képzetes része is függ a hullámhossztól és ezt a jelenséget a 12.4. fejezetben bemutatottak szerint fehérjekrisztallográfiában a fázisprobléma megoldására nagyon hatékonyan alkalmazhatjuk (MAD módszer).



6.4.4.1. ábra. A Friedel-párok eltéréseinek magyarázata

A technológia jelenlegi szintjén, ha nincs foszfor vagy annál nehezebb atom a rácsban a Friedel-pár reflexiók intenzitásában tapasztalt különbséget nem tudjuk detektálni molibdén anódot használó készülékkel mért adatokra támaszkodva. A jó hír, hogy réz anóddal vagy szinkrotron sugárzással a probléma ekkor is megoldható, mivel az anomális diszperzió függ a hullámhossztól és az atomtípustól is. Akár házon belüli adatgyűjtéssel, réz anódot használva (térdetektoros készülékkel) sikerülhet olyan molekula abszolút konfigurációját meghatározni, ami csak könnyűatomokat, pl. egyetlen oxigén mellett

kb. 20 szénatomot és csak hidrogéneket tartalmaz. Szinkrotron sugárzást használva oxigén atomra sincs szükség.

Az abszolút konfigurációt egy kiralitáscentrum ismert konfigurációjára is megadhatjuk. Ez a módszer akkor is alkalmazható, ha a kristály gyenge minőségű és/vagy nem tudunk szinkrotronnál vagy réz anóddal diffrakciós adatgyűjtést végezni. Ha a molekulában vagy a rácsban egy vagy több királis centrum konfigurációját ismerjük és a szerkezet-meghatározás során a modellben az ellentétes konfigurációt kaptuk, akkor egyszerűen invertáljuk a koordinátákat. Ekkor *minden* kiralitáscentrum invertálódik, az ismert konfigurációk a vártak megfelelőek lesznek és az ismeretlen királis centrum(ok) konfigurációja megadható, ugyancsak teljes bizonyossággal. Az ismert aszimmetria centrum lehet a vizsgált molekulában kémiai átalakítás után, de akár lehet a molekulánk sója vagy kokristálya ismert konfigurációjú királis savval vagy bázissal (diasztereomer só képzése ismert abszolút konfigurációjú vegülettel). Gyakran használják a borkősavat vagy annak dibenzil származékát.

[Teszt](#)

## 7. Krisztallográfiai eredmények validálása és közlésük, a CIF fájl (Bényei Attila)

### Irodalom

A krisztallográfiai adatokról szóló alpmű

- International Tables for Crystallography Vol. G, Definition and exchange of crystallographic data, Ed. by. Sydney Hall and Brian MacMahon, 1st Edition, Springer, 2005

- 

A legfrissebb CIF szótár

- [http://www.iucr.org/resources/cif/dictionaries/cif\\_core](http://www.iucr.org/resources/cif/dictionaries/cif_core)

Powder CIF

- [http://www.iucr.org/resources/cif/dictionaries/cif\\_pd](http://www.iucr.org/resources/cif/dictionaries/cif_pd)

Ton Spek előadása a diffrakciós szerkezetek validálásáról

- [www.cryst.chem.uu.nl/spek/ppp/Freiburg-2009.ppt](http://www.cryst.chem.uu.nl/spek/ppp/Freiburg-2009.ppt)

Egy hasznos ingyenes CIF szerkesztő, az ENCIFER

- [http://www.ccdc.cam.ac.uk/free\\_services/encifer/downloads/](http://www.ccdc.cam.ac.uk/free_services/encifer/downloads/)

CIF FAQ és példák

- <http://www.mic.ucla.edu/X-ray/FAQ.htm>
- <http://chemcrys.ethz.ch/depixrd/cif.html>

## 7.1. A szerkezet-meghatározás eredménye: rács- és molekulaszervezet

Az egykristály röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározás egyrészt meghatározzuk a rács szerkezetét, ami az elemi cellát és a tércsoportot jelenti. Másrészt pedig az aszimmetrikus egységben lévő atomok koordinátáit és atomi mozgástényező paramétereit (ha vannak alternatív konformációk, akkor ezek betöltöttségét). A röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározás választ ad a molekula összetételére, az atomok konnektivitására, abszolút konfigurációjára, kristálybeli konformációjára, geometriájának torzulásaira (pl. térbeli zsúfoltság, konjugáció), másodlagos kölcsönhatásokra stb. vonatkozó kérdésekre. Mindezek kiszámolhatók az elemi cella adataiból és az atomi koordinátákból. Mint az 1.7. fejezetben kifejtettük, az egykristály röntgendiffrakció 4C módszer (composition, constitution, conformation, configuration).

## 7.2. Az adatok uniformizálása és platformok közötti átvihetősége kiemelt jelentőségű

Nagyon fontos, hogy adatainkat tévesztés nélkül át tudjuk vinni különböző számítógépes platformok között. A hetvenes évektől egyre erősödő igény volt erre, és számos javaslat született. Végül 1991-re kidolgozták a Crystallographic Information Fájel szabványt és szótárt. Néhány egyszerű szabály és szintaktika (ASCII karakterek, maximált sorhossz, különleges karakterek kódolása) lehetővé teszi, hogy teljes tudományos publikációt készítsünk CIF formátumban, amiből megfelelő programok (IUCR printcif vagy önálló programok pl. pubCIF) formázott cikket hoz létre. A közléssel és a kémiával kapcsolatos információkat a *data\_global* részben, az egyes meghatározott szerkezetekre vonatkozó információt a *data\_xxxx* részben szerepeltetjük, ahol xxxx a szerkezet jelölése.

A 7.2.1. ábra egy ilyen, egyébként bármilyen szövegszerkesztővel megnyitható CIF fájl részletet mutat. A sor elején \_ jellel kezdve látható a változó könnyen érthető megnevezése, utána pedig a szöveges vagy szám érték, esetleg a hibát is feltüntetve. A CIF fájlban a szerzőkre vonatkozó információt kötött formátumban, a kísérleti részt, diszkussziót, összefoglalást pedig szabad szöveggként megadhatjuk. Szükség esetén az adatokat ciklusba szervezve (loop) adjuk meg. A sor elején a # jel megjegyzést jelent, az adatokat feldolgozó programok nem értelmezik. A CIF fájl általában tartalmaz kötésszög és kötéstávolság adatokat táblázatos megjelenítéshez, de ezek az atomi koordináták ismeretében redundáns adatok. A

CSD adatbázis használja a CIF egy verzióját, a CMF-et is, amiben az atomok konnektivitása is szerepel (7.2.2. ábra). Ugyanazon szerkezet pdb és CIF fájlját a 7.2.3. illetve a 7.2.4. ábra mutatja.

```

data_1321b
_audit_creation_method      'WinGX routine-INITIALISE'
_audit_creation_date        2013-04-08T10:39:23-00:00
loop_
  _atom_type_symbol
  _atom_type_number_in_cell
C 80
H 176
Ag 16
N 24
O 24
P 8
_cell_length_a              8.726(2)
_cell_length_b              14.537(5)
_cell_length_c              23.773(5)
_cell_angle_alpha           90.000(5)
_cell_angle_beta            96.424(9)
_cell_angle_gamma           90.000(5)
_cell_formula_units_Z       8
_cell_measurement_temperature 293
_cell_measurement_wavelength 0.71073
_cell_measurement_reflns_used 25
_cell_measurement_theta_max 15.5
_cell_measurement_theta_min 6.5
_diffrn_ambient_temperature 293
_diffrn_radiation_probe     x-ray
_exptl_crystal_description  prism
_exptl_crystal_colour       colourless
_exptl_crystal_size_max     0.25
_exptl_crystal_size_mid     0.22
_exptl_crystal_size_min     0.2
_exptl_crystal_density_method 'not measured'
_chemical_formula_moiety     'C10 H22 Ag2 N3 O3 P1'
_chemical_formula_sum        'C10 H22 Ag2 N3 O3 P1'
_chemical_compound_source    'synthesis as described'
_symmetry_cell_setting       monoclinic
_symmetry_space_group_name_H-M 'P 21/n'
_symmetry_space_group_name_Hall '-P 2yn'
_symmetry_Int_Tables_number  14

```

7.2.1. ábra.CIF fájl részlete

data_CSD_CIF/MIF_DMGLUT10	23 O4 O 0.16550 -0.33480 0.39330 1_555 23
_audit_creation_date 1975-01-07	loop_
_audit_creation_method CSD-QUEST3D-V5	_atom_id
_database_code_CSD DMGLUT10	_atom_type
_chemical_formula_sum 'C7 H12 O4'	_atom_attach_nh
_symmetry_cell_setting monoclinic	_atom_attach_h
_symmetry_space_group_name_H-M 'P 21/c'	_atom_charge
_ccdc_symmetry_space_group_name P21/c	1 C 3 0 0
_symmetry_Int_Tables_number 14	2 C 4 2 0
loop_	3 C 4 0 0
_symmetry_equiv_pos_site_id	4 C 4 2 0
_symmetry_equiv_pos_as_xyz	5 C 3 0 0
1 x,y,z	6 C 4 3 0
2 -x,1/2+y,1/2-z	7 C 4 3 0
3 -x,-y,-z	8 H 1 0 0
4 x,-1/2-y,-1/2+z	9 H 1 0 0
_cell_length_a 5.650(1)	10 H 1 0 0
_cell_length_b 11.530(2)	11 H 1 0 0
_cell_length_c 12.849(3)	12 H 1 0 0
_cell_angle_alpha 90	13 H 1 0 0
_cell_angle_beta 91.9	14 H 1 0 0
_cell_angle_gamma 90	15 H 1 0 0
_cell_formula_units_Z 4	16 H 1 0 0
_ccdc_flag_disorder no	17 H 1 0 0
_ccdc_flag_error no	18 H 1 0 0
_ccdc_flag_match full	19 H 1 0 0
_ccdc_flag_sigma(C-C) 1	20 O 1 0 0
_ccdc_R_factor 5.70	21 O 2 1 0
loop_	22 O 2 1 0
_atom_type_symbol	23 O 1 0 0
_atom_type_radius_bond	loop_
C 0.68	_bond_id_1
H 0.20	_bond_id_2
O 0.68	_bond_type_ccdc
loop_	_bond_environment
_ccdc_atom_site_atom_id_number	1 2 S chain
_atom_site_label	2 3 S chain
_atom_site_type_symbol	3 4 S chain
_atom_site_fract_x	4 5 S chain
_atom_site_fract_y	5 22 S chain
_atom_site_fract_z	6 3 S chain
_ccdc_atom_site_symmetry	7 3 S chain
_ccdc_atom_site_base	8 21 S chain
1 C1 C 0.17710 -0.34310 0.10160 1_555 1	9 7 S chain
2 C2 C 0.09610 -0.43300 0.17650 1_555 2	10 7 S chain
3 C3 C 0.28420 -0.50890 0.23180 1_555 3	11 7 S chain
4 C4 C 0.46020 -0.44220 0.30250 1_555 4	12 22 S chain
5 C5 C 0.36500 -0.37350 0.39080 1_555 5	13 2 S chain
6 C6 C 0.43110 -0.57120 0.15030 1_555 6	14 2 S chain
7 C7 C 0.15220 -0.59870 0.29570 1_555 7	15 4 S chain
8 H1 H 0.08600 -0.26860 -0.01360 1_555 8	16 4 S chain
9 H2 H 0.04050 -0.63940 0.24890 1_555 9	17 6 S chain
10 H3 H 0.06230 -0.56120 0.34230 1_555 10	18 6 S chain
11 H4 H 0.27580 -0.65210 0.33500 1_555 11	19 6 S chain
12 H5 H 0.44920 -0.30880 0.52040 1_555 12	20 1 D chain
13 H6 H 0.00650 -0.38460 0.22680 1_555 13	21 1 S chain
14 H7 H -0.01360 -0.48440 0.13880 1_555 14	23 5 D chain
15 H8 H 0.57440 -0.50030 0.33280 1_555 15	

7.2.2. ábra CMF fájl részlete (DMGLUT10)



```

HEADER      CSD ENTRY DMGLUT10
COMPND      UNNAMED
AUTHOR      GENERATED BY CONQUEST
CRYST1      5.650   11.530   12.849   90.00   91.90   90.00 P 21/c      4
ATOM        1  C1  UNK  0   1      0.957  -3.956   1.305   1.00   0.00
ATOM        2  C2  UNK  0   1      0.468  -4.992   2.267   1.00   0.00
ATOM        3  C3  UNK  0   1      1.507  -5.868   2.977   1.00   0.00
ATOM        4  C4  UNK  0   1      2.471  -5.099   3.885   1.00   0.00
ATOM        5  C5  UNK  0   1      1.896  -4.306   5.019   1.00   0.00
ATOM        6  C6  UNK  0   1      2.372  -6.586   1.930   1.00   0.00
ATOM        7  C7  UNK  0   1      0.734  -6.903   3.797   1.00   0.00
ATOM        8  H1  UNK  0   1      0.492  -3.097  -0.175   1.00   0.00
ATOM        9  H2  UNK  0   1      0.123  -7.372   3.196   1.00   0.00
ATOM       10  H3  UNK  0   1      0.206  -6.471   4.396   1.00   0.00
ATOM       11  H4  UNK  0   1      1.416  -7.519   4.302   1.00   0.00
ATOM       12  H5  UNK  0   1      2.316  -3.560   6.683   1.00   0.00
ATOM       13  H6  UNK  0   1     -0.060  -4.434   2.913   1.00   0.00
ATOM       14  H7  UNK  0   1     -0.136  -5.585   1.782   1.00   0.00
ATOM       15  H8  UNK  0   1      3.104  -5.768   4.274   1.00   0.00
ATOM       16  H9  UNK  0   1      2.992  -4.404   3.367   1.00   0.00
ATOM       17  H10 UNK  0   1      3.039  -7.192   2.445   1.00   0.00
ATOM       18  H11 UNK  0   1      2.941  -5.854   1.423   1.00   0.00
ATOM       19  H12 UNK  0   1      1.746  -7.154   1.348   1.00   0.00
ATOM       20  O1  UNK  0   1      2.007  -3.346   1.414   1.00   0.00
ATOM       21  O2  UNK  0   1      0.123  -3.718   0.342   1.00   0.00
ATOM       22  O3  UNK  0   1      2.761  -4.076   5.969   1.00   0.00
ATOM       23  O4  UNK  0   1      0.768  -3.860   5.051   1.00   0.00
CONNECT     1   2   20   21
CONNECT     2   1   3   13   14
CONNECT     3   2   4   6   7
CONNECT     4   3   5   15  16
CONNECT     5   4   22  23
CONNECT     6   3   17  18   19
CONNECT     7   3   9   10   11
CONNECT     8   21
CONNECT     9   7
CONNECT    10   7
CONNECT    11   7
CONNECT    12  22
CONNECT    13   2
CONNECT    14   2
CONNECT    15   4
CONNECT    16   4
CONNECT    17   6
CONNECT    18   6
CONNECT    19   6
CONNECT    20   1
CONNECT    21   1   B
CONNECT    22   5   12
CONNECT    23   5
MASTER      0   0   0   0   0   0   0   0   0   23   0   23   0
END

```

7.2.3. ábra. A pdb fájl (DMGLUT10) (A PDB formátumról bővebben a 14.2.fejezetben lesz szó.)

```

data_CSD_CIF_DMGLUT10
_audit_creation_date 1975-01-07
_audit_creation_method CSD-ConQuest-V1
_database_code_CSD DMGLUT10
_chemical_formula_sum 'C7 H12 O4'
_chemical_formula_moiety
;
C7 H12 O4
;
_journal_codен_Cambridge 11
_journal_volume 103
_journal_year 1973
_journal_page_first 525
_journal_name_full 'Gazz.Chim.Ital.'
loop_
_publ_author_name
"E.Benedetti"
"R.Claverini"
"C.Pedone"
_chemical_name_systematic
;
3,3-Dimethylglutaric acid
;
_cell_volume 836.581
_exptl_crystal_density_diffn 1.27
_diffn_ambient_temperature ?
_diffn_special_details
;
The study was carried out at room temperature,in the
range 283-303K
;
#These two values have been output from a single
CSD field.
_refine_ls_R_factor_gt 0.057
_refine_ls_wR_factor_gt 0.057
_symmetry_cell_setting monoclinic
_symmetry_space_group_name_H-M 'P 21/c'
_symmetry_Int_Tables_number 14
loop_
_symmetry_equiv_pos_site_id
_symmetry_equiv_pos_as_xyz
1 x,y,z
2 -x,1/2+y,1/2-z
3 -x,-y,-z
4 x,-1/2-y,-1/2+z
_cell_length_a 5.650(1)
_cell_length_b 11.530(2)
_cell_length_c 12.849(3)
_cell_angle_alpha 90
_cell_angle_beta 91.9
_cell_angle_gamma 90
_cell_formula_units_Z 4
loop_
_atom_type_symbol
_atom_type_radius_bond
C 0.68
H 0.20
O 0.68
loop_
_atom_site_label
_atom_site_type_symbol
_atom_site_fract_x
_atom_site_fract_y
_atom_site_fract_z
C1 C 0.17710 -0.34310 0.10160
C2 C 0.09610 -0.43300 0.17650
C3 C 0.28420 -0.50890 0.23180
C4 C 0.46020 -0.44220 0.30250
C5 C 0.36500 -0.37350 0.39080
C6 C 0.43110 -0.57120 0.15030
C7 C 0.15220 -0.59870 0.29570
H1 H 0.08600 -0.26860 -0.01360
H2 H 0.04050 -0.63940 0.24890
H3 H 0.06230 -0.56120 0.34230
H4 H 0.27580 -0.65210 0.33500
H5 H 0.44920 -0.30880 0.52040
H6 H 0.00650 -0.38460 0.22680
H7 H -0.01360 -0.48440 0.13880
H8 H 0.57440 -0.50030 0.33280
H9 H 0.54940 -0.38200 0.26220
H10 H 0.55230 -0.62380 0.19040
H11 H 0.52890 -0.50770 0.11080
H12 H 0.31690 -0.62050 0.10500
O1 O 0.36350 -0.29020 0.11010
O2 O 0.02380 -0.32250 0.02660
O3 O 0.52370 -0.35350 0.46480
O4 O 0.16550 -0.33480 0.39330
#

```

7.2.4. ábra. A CIF fájl (DMGLUT10)

### 7.3. A CIF szótár példa lehet más területeken is (Powder CIF, mmCIF, sasCIF)

A CIF fájl formátum az eredmények krisztallográfiai programokban való használatokor, az eredmények publikálásakor és az adatbázisok lekérdezésénél különösen előnyös. A krisztallográfiai programok számára a CIF-ből egyértelmű a szimmetria jelölése akármilyen cella beállításnál. A CIF-ben az atomi koordináták

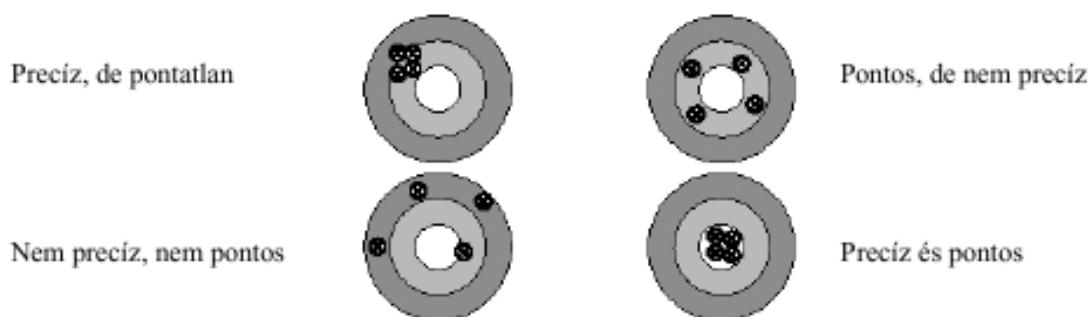
értéke az elemi cellához rögzített frakcionális koordinátákként vannak megadva. Kvantumkémiai számításoknál szükséges lehet az atomok koordinátáit Descartes koordinátákra átszámolni. A CIF segítségével kötésszög és kötéstávolság táblázatokat, szép ábrákat és mozikat készíthetünk néhány kattintással. A CIF formátum használata nagyon egyszerűvé teszi a szerkezet-meghatározás egyes lépéseiben elért részeredmények összegezését, az adatok betakarítását is. Az egyes lépéseket végző programok CIF formátumban mentik az eredményeket, amiket a másik program beolvas, illetve közléskor összeszedünk (harvesting) minden eredményt. Publikáláskor (7.5. fejezet) az elkészített CIF fájl egyértelmű és könnyen kezelhető. A Nemzetközi Krisztallográfiai Unió (International Union of Crystallography) folyóiratai teljesen CIF alapú publikálást is lehetővé tesznek, és várható, hogy más területeken is terjedni fog a kötött, szótárra épülő publikálás. Megemlítjük, hogy a számítógépes tárolási lehetőség rohamos fejlődése lehetővé tette, hogy az első krisztallográfiai közlésekhez hasonlóan visszakereshetően rögzítsük a mért és számított szerkezeti tényezőket. Ezzel lehetővé válik, hogy később ugyanazon az adatkészleten mások is végezzenek számításokat. A kismolekulákra kidolgozott CIF formátum sikere inspirálta, hogy más területekre is alkalmas CIF szótárat készítsenek. Ma már egységesítési törekvések vannak a kisszögű röntgen szórás (small angle scattering, SAS), [http://www.embl-hamburg.de/biosaxs/reprints/sascif\\_2000.pdf](http://www.embl-hamburg.de/biosaxs/reprints/sascif_2000.pdf) és a pordiffrakciós adatok közlésére is <http://pd.chem.ucl.ac.uk/pdnn/pubs/cif1.htm>. A fehérjeszerkezetekre vonatkozó információt a pdb formátum (14. fejezet) rögzíti amit az új lehetőségek és követelmények alapján ugyancsak fokozatosan fejlesztenek. A CIF formátum makromolekulákra adaptált változatát az mmCIF-et is kidolgozták (<http://www.sdsc.edu/pb/cif/papers/methenz.html>), és jelenleg a két rendszert párhuzamosan alkalmazzák. A fejlesztések eredménye lehet, hogy egy közös szabvány lesz.

#### 7.4. A krisztallográfiai eredmények validálása

Mint minden természettudományos eredményt, az egykristály röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározást is érvényesíteni, validálni kell. Ma a minőségbiztosítás a modern életünk egyik sokszor kárhoztatott, de elengedhetetlen kelléke. A krisztallográfiai adatok közlésekor jellemezzük a modell jószágát: mennyire pontos és precíz (7.4.1. ábra). Korábban említettük (4.4. és 6.1. fejezet), hogy a diffrakciós szerkezet-meghatározás kismolekuláknál erősen túlhatározott probléma. Ez lehetővé teszi az illesztendő paraméterek egyedi hibájának számítását is és objektív mérőszámok megadását a szerkezetvizsgálat jószágáról.

A modell és a valóság viszonya filozófiailag is fontos kérdés. A röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározás során a kristályról kapott mérési adatok (valóság) kiértékelésekor kapjuk a modellt, ami a felbontás, kívánatos mért adat/paraméter arány, kristály minősége stb. adottságoktól függően különböző szinten írhatja le a valóságot (pl. az atomi elmozdulások leírása izotróp vagy anizotróp módon, kristálybeli rendezetlenség kezelése különválasztott konformációkként vagy anizotróp atomi mozgástényezőkként, geometriai kényszerfeltételek, az extinkció kezelése, stb.). A modell validálása azért nagyon fontos, mert nem közvetlenül kapjuk meg a mért adatokból a szerkezetet, hanem, ahogy az az előző mondatban felsoroltakból is látszik, több felhasználói döntés is közrejátszik a végső modell kialakításában (modellépítés). Lehet, hogy más paraméterekkel a mérésekre jobban illeszkedő modellt tudunk felállítani. A fehérjekrisztallográfiában, ahol a kisebb felbontás miatt az elektronsűrűségi térképek kevésbé részletgazdagok, más forrásból származó információkat is felhasználunk a modellben (pl. ideális

kötésszögek, kötéshosszak), tehát a kismolekulák szerkezetével ellentétben ezek a szerkezetek nem adnak választ arra a kérdésre, hogy a molekula egy funkciócsoportja milyen geometriai torzulásokat szenved el másodlagos kölcsönhatások, konjugáció, stb. hatására. Más kérdésekre viszont válasz adnak ezek a szerkezetek: pl. milyen funkciócsoportok lépnek egymással kölcsönhatásba, milyen kémiai –másodlagos kölcsönhatásokkal magyarázható a fehérje funkciója. Célunk szerint a modell mindig az adott adatkészletet lehetőleg jobban leíró paraméterek összessége, tehát a vizsgált kristály szerkezetét írja le. Más kristályformákban más konformáció, kölcsönhatások, stb. lehetnek jelen, oldatbeli vizsgálatok (szerkezetvizsgálat NMR módszerekkel) során kapott szerkezet viszont a konformáció dinamikus változása, egyensúlya jelentősen befolyásolja a molekuláról kapott képet. A szerkezet fogalmát, a köznapi gondolkodásban, mint elérendő, független célt, a molekula képét (ideáját) használjuk, de tudatában kell lenni, hogy a meghatározott szerkezet mindig egy modell, és adott kísérlet mérési adatait írja le. Tehát a 7.4.1 ábrán jelzett precíz (a paraméterek értékeit minél kisebb hibával tartalmazó – mérőszáma lehet a geometriai paraméterek hibája) és pontos (a mért diffrakciós mintázatot lehetőleg jobban visszaadó szerkezet – mérőszáma pl. az R-faktor) validálási eredmény a célunk.



7.4.1. ábra. Validálási eredmények

A krisztallográfiában is a validálásnak az alábbi kérdésekre kell válaszolni:

- 1 – A közölt információ teljes (mennyire teljes az adatkészlet; mennyire teljes a modell, pl. nem értelmezhető rész az elektronsűrűségi térképen)?
- 2 – Milyen a szerkezet-meghatározás minősége (illeszkedés a mért adatokhoz)?
- 3 – A szerkezet jó (megfelelés fizikai, kémiai ismereteinknek)?

A kérdésekre válaszolni nem mindig egyszerű. Az, hogy a szerkezetre vonatkozó információ teljes-e, kis molekulák esetén viszonylag könnyen automatikusan ellenőrizhető: mért és független reflexiók száma, felbontás, a mérés belső konzisztenciája vagyis ugyanazon reflexiókat többször megmérve az intenzitás adatok szórása, bomlás, abszorpciós korrekció stb. A CIF fájlt helyben a PLATON programmal ellenőrizve vagy a checkcif serverekre elküldve évtizedes krisztallográfiai tapasztalatokat összegyűjtő hibaüzeneteket kapunk. A hibák (ALERT) jelölése A-tól G-ig terjed, az A jelű hibák nagyon lényegiek és akár a teljes modellt megkérdőjelezhetik, a B hibák enyhébbek stb. A hibák léte nem zárja ki a publikálást, ha kémiai és egyéb információk segítségével kielégítő magyarázatot tudunk adni a kérdésekre.

A szerkezet-meghatározás minőségére a különböző hibafaktorok (R-faktorok) és maradékok válaszolnak. Kis molekuláknál ma már követelmény, hogy az R-faktor 10 % míg  $R(F^2)$  25% alatt legyen (6.2. fejezet). Fehérjekrisztallográfiában az alulhatározott probléma miatt nagyobb értékek is megengedettek, ilyenkor az  $R_{free}$  érték is hasznos információt ad, lásd 13.3.2. fejezet. Az, hogy a szerkezet jó a geometriai jellemzők, másodlagos kölcsönhatások, stb. CSD illetve a PDB adatbázissal való összevetéséből látható. Kismolekulák esetén, ha a kötésszög és kötéstávolság adatok jól egyeznek a korábban vizsgált hasonló szerkezetű anyagokra tapasztaltakkal és az eltérésekre izgalmas új magyarázatot tudunk találni szupramolekuláris alapon is elemeztük a szerkezetet. A fehérjék szerkezetének validálásáról a 14.1 fejezetben lesz szó.

Mindezek a törekvések segítenek a tévedések, krisztallográfiai nem tudásból eredő hibák kivédésében. Sajnos, az elképesztő nyomás, amit a publikálás kényszere jelent szerte a világon szándékos hibához és így csaláshoz vezethet. Ezzel nem tudunk itt foglalkozni, de megemlíjtük, hogy számos szerkezetet kellett a CSD illetve a PDB adatbázisból visszavonni, mert később kiderült, hogy a szerzők szándékos hamisítást végeztek. Az Acta Crystallographica Section E szerkesztőségi cikke tudósított mintegy 70 bizonyítottan hamis szerkezetről (<http://journals.iucr.org/e/issues/2010/01/00/me0406/me0406bdy.html>), az eset a szélesebb tudományos közösség előtt is ismert (<http://www.nature.com/news/2010/100112/full/463142a.html>). Fehérjekrisztallográfiai példák között publikáció visszavonása vagy megkérdőjelezése történt szándékosan hamisított szerkezeteken kívül például hibás szerkezetmegoldás miatt, vagy az elektronsűrűségi térképen nem látható részletek modellbe való beépítése vagy a modell jelentős részének hiány miatt (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1110/ps.072888607/full>), <http://www.cell.com/structure/retrieve/pii/S096921260800186X>, <http://www.nature.com/nature/journal/v448/n7154/full/nature06102.html>, <http://main.uab.edu/Sites/reporter/articles/71570/>).

## 7.5. Krisztallográfiai eredmények közlése – kis molekulák esete

A röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározás eredménye nagyon fontos részét képezi a közleményeknek. A folyóiratok nagy része ma már nem tárolja a szerkezet-meghatározási információkat és nem alkalmaz krisztallográfust. Általában a szerzőket arra kérik, hogy az adatokat CIF fájlban összegezzék, ezt ellenőriztessék az IUCR checkcif serverén (<http://checkcif.iucr.org/>), és a kérdésesnek jelölt adatok magyarázatát rögzítsék a közleményben. Kérik, hogy a CIF fájl közlés előtt juttassák el a CSD adatbázist gondozó CCDC (Cambridge Crystallographic Data Centre, <http://www.ccdc.cam.ac.uk/pages/Home.aspx>) szakembereihez, akik egy regisztrációs számot adnak és ezt elegendő a cikkben szerepeltetni. A közleményekben a röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározás főbb paramétereit és eredményeit összegző táblázat, rajz illetve a mondandó szempontjából legfontosabb kötéshossz adatok, szögek és távolságok kerülnek be. A nevesebb folyóiratok (American Chemical Society, Royal Society of Chemistry folyóiratai) fenntartják a jogot, hogy krisztallográfusuk vagy a cikk bírálói közvetlenül a CIF fájl megkapják, <http://www.rsc.org/Publishing/Journals/guidelines/AuthorGuidelines/AuthoringTools/CIFDataImporter/CIFFormatForCifDataImporter.asp>. Több folyóirat kéri a közleménnyel és a kiegészítő információkkal együtt a krisztallográfiai ellenőrzés eredményeként kapott checkcif fájl feltöltését is a cikk bírálói számára.

[Teszt](#)

## 8. A röntgen és neutron pordiffrakció mint ujjlenyomat módszer (Bényei Attila)

### Irodalom

A pordiffrakciós módszer fémötvözetek vizsgálatában, az IUCR oktatási segédlete

- <http://www.iucr.org/education/pamphlets/16>

A pordiffrakciós adatokból történő szerkezet-megoldás alapkönyve

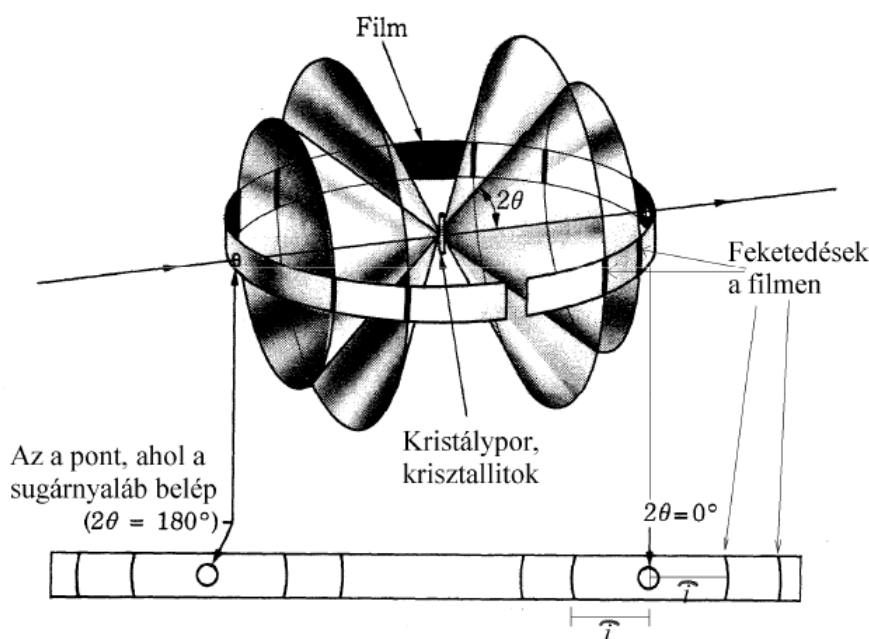
- Structure Determination from Powder Diffraction Data, Ed. by W.I.F. David, K. Shankland, L.B. McCusker and Ch. Baerlocher, Oxford University Press, 2003

Jó összefoglaló mű a pordiffrakcióról

- Principles and Applications of Powder Diffraction, Ed. by A. Clearfield, J. Reibenspies and N. Bhuvanesh, Wiley, 2008

### 8.1. A pordiffrakciós felvétel a rács ujjlenyomata

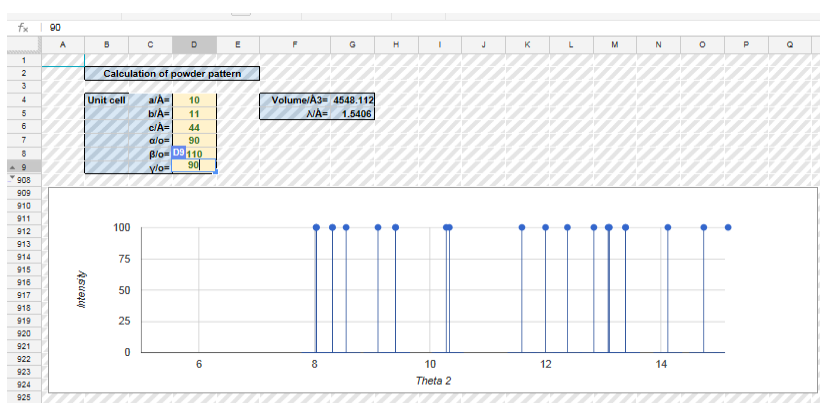
A pordiffrakciós felvétel apró kristályos, azaz mikrokristályos mintáról készül. Ha nagy számú véletlenszerű elrendeződésű kristallitunk van, a sok kristályka ugyanazon reflexiója egy kúppalást mentén jelenik meg. A 8.1.1. ábra szerinti kísérleti elrendezésben, ahol a kúppalástok metszik a henger alakban meghajlított filmet, előhívás után egy egydimenziós diffraktogramot kapunk: csúcsok (sávok) sorozata a szórási szög függvényében.



8.1.1. ábra. Pordiffrakciós felvétel keletkezésének elve

A magyarázathoz elegendő a Bragg-egyenletet segítségül hívni. Az  $n\lambda = 2d\sin\theta$  összefüggésnek megfelelő  $2\theta$  szögeknél kapunk csúcsokat. Mivel a  $d$  távolság csak a rács paramétereiktől függ, ezért, ha megadjuk a rács paramétereit, megkapjuk, hogy hol lehetnek csúcsok. Ezt a 8.1.1. interaktív táblázat kiszámolja nekünk, ahogy a 8.1.2. ábrán látható. A csúcsoknak csak a helyét jelöljük, az intenzitásokat, amik az atomok elemi cellabeli elrendeződésétől (szerkezetétől) függenek, most egységnyinek tekintjük. A pordiffraktogram számítása a cellaparamétereiből például akkor hasznos, ha gyógyszerhatóanyag szerkezetvizsgálatát akarjuk elvégezni: Az egykristály röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározáshoz a polikristályos formában kapott gyógyszerhatóanyagot fel kell oldani, egykristályt kell növelni, de ekkor már esetenként nem ugyanazt az anyagot kapjuk vissza, mint ami az eredeti mintában volt: például másik kristályforma kristályosodott ki, szolvát képződött stb. Az egykristály diffrakciós mérés első lépése az elemi cella paramétereinek meghatározása és ezen adatok ismeretében ellenőrizhetjük, hogy az egykristály az eredeti mintával azonos fázis. Ha az eredeti mintáról felvett röntgen pordiffrakciós felvételen több csúcs van, mint az interaktív táblázat által jósoltak, akkor vagy szennyeződésünk van az eredeti mintában vagy átalakulás történt, szolvát képződött stb. Kevesebb mért pordiffrakciós csúcs lehet a szisztematikus hiányok miatt, ami a tércsoporttól függ.

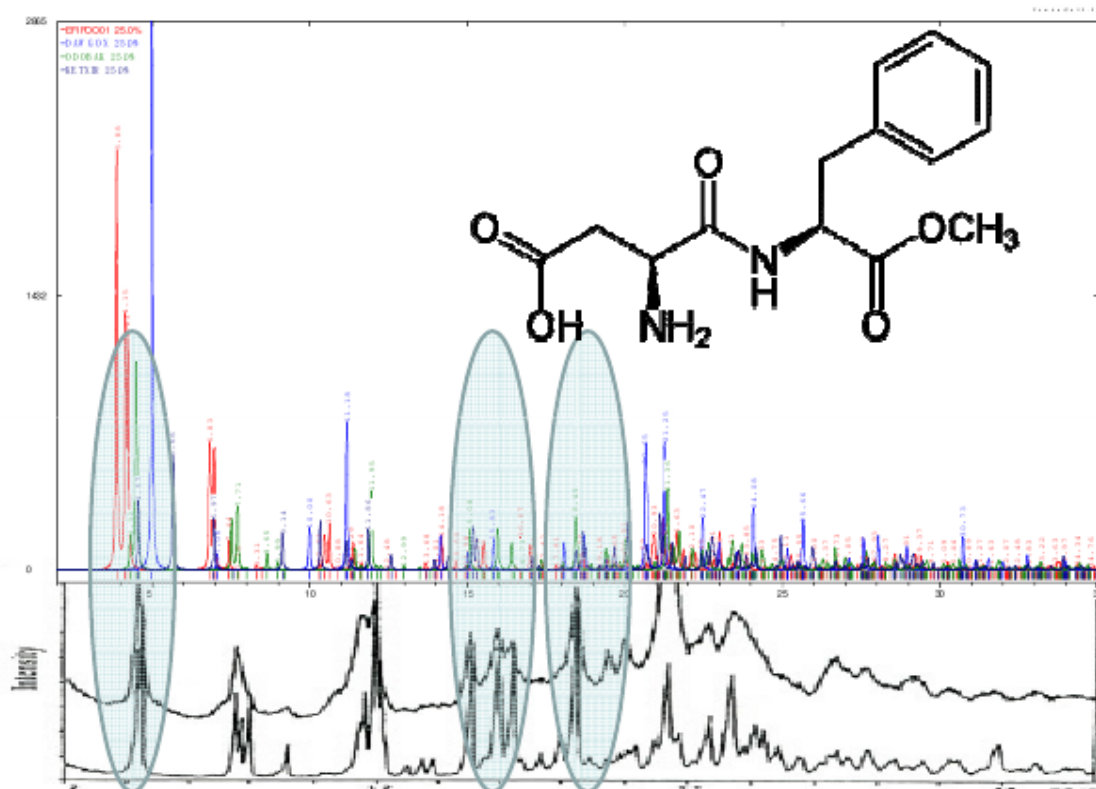
### 8.1.1. [Interaktív táblázat](#)



8.1.2. ábra. Pordiffrakciós vonalak számítása

A molekulászerkezet pordiffrakció esetén is a csúcsintenzitásokból határozható meg. Sajnos a pordiffrakciós felvétel indexelése és a csúcsok intenzitásának pontos meghatározása (integrálása) nehéz feladat a csúcsok átlapolása miatt. Az egykristály szerkezet ismeretében a várható pordiffrakciós felvétel kiszámítása egy kattintás, például a MERCURY program (9. fejezet) vagy más program ezt elvégzi és a 8.1.3. ábrához hasonló felvételt kapunk. Az aszpartám mért és adatbázisban található módosulatok szerkezetéből számított pordiffrakciós felvételek összehasonlítása mutatja azokat a tartományokat, ahol eléggé elkülönülő csúcsok vannak. A nagyobb szögeknél a csúcsok egymásra futnak és integrálásuk, indexelésük ezért nehéz. A mért pordiffrakciós felvételeken különböző lehet a jelek szélessége és a maximumok nagysága (beütés szám) is a készülék geometriájától, a beeső sugár tulajdonságaitól (pl.

fókuszálás, jelszélesedés), a minta kezelésétől és tulajdonságaitól (pl. szemcseméret, homogenitás, a szemcsék orientálódása) eredő korlátok miatt, ezeket szinkrotron forrásnál végzett mérésekkel és más független információval (neutrodiffrakciós felvétel) csökkenthetjük. A pordiffrakciós felvételből történő *ab initio* szerkezet-meghatározásra főleg a gyógyszeripar ilyen irányú igényei miatt nagyon intenzív kutatások folynak.



8.1.3. ábra. Az aszpartám egykristálydiffrakcióval kapott szerkezetéből számított (három kristályforma pirossal, kézzel és zölddel ábrázolva) és mért (két kristályforma, fekete görbék) pordiffrakciós felvételei. A mért pordiffraktogramokon a kiszélesedett csúcsok átlapolnak, de a bejelölt részekben mérésrel is jól elkülöníthető eltérések vannak az egyes módosulatok között.

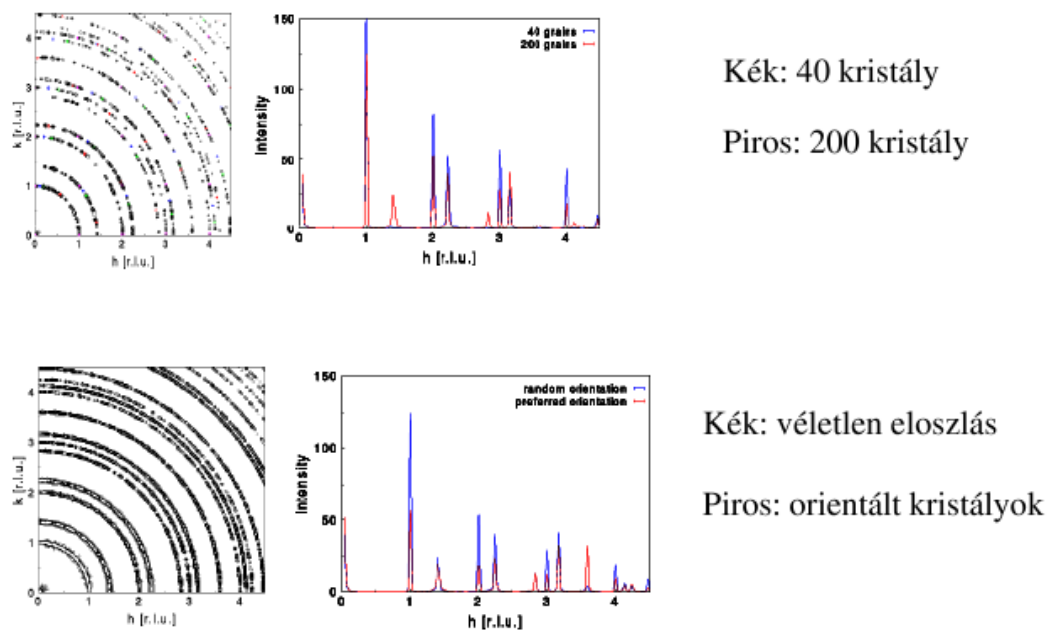
A csúcsok szélessége a kristallitok méretétől függ, amit a Scherrer képlet ad meg (8.1.4. ábra). Az egyenletben  $\tau$  a kristallitok mérete. Ezt a pordiffrakciós felvételből meghatározott méret. A részecskeméretre számos definíciót és módszert megadhatunk (pl. szitálás, lézeres diffrakcióval meghatározott részecskeméret). A röntgensugárzás hullámhossza  $\lambda$ , a csúcshoz tartozó diffrakciós szög  $\Theta$ ,  $K$  konstans, aminek az értéke 0,9 és  $\beta$  a radiánban megadott csúcs félértékszélesség (FWHM, full width at half maximum). A képlet 1000 Å alatti részecskékre igaz, a csúcsszélesedést más tényezők is befolyásolják (pl. készülék paraméterek, mennyire egykristályokból áll a minta, rácshibák és feszültségek a kristályokban), esetleg az amorf tartalom miatt az alapvonalban vannak széles csúcsok. A számítást több jól elkülönülő csúcsra is elvégezhetjük, a kristallitok méretére számolt  $\tau$  értékek pontossága 20-30%. Amorf anyagok pordiffraktogramja nem tartalmaz éles csúcsokat, hanem néhány széles maximumot tartalmaz, ezért a kristályos minták pordiffraktogramjától jól megkülönböztethető.



$$\tau = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$$

8.1.4. ábra Scherrer-egyenlet

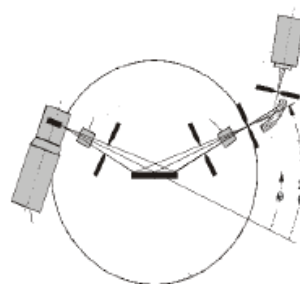
Szimulált adatokkal illusztráljuk azt, hogy a kristallitok számának és orientációjának is jelentős hatása van a pordiffrakciós felvételre, 8.1.5. ábra.



8.1.5. ábra. A kristályok számának és orientációjának hatása pordiffrakciós felvételre.

A következő ábrákon látható a napjainkban alkalmazott két leggyakoribb pordiffrakciós technikát, a Bragg-Brentano geometriát (8.1.6. ábra) és a Debye-Scherrer (8.1.7. ábra) geometriát előnyeikkel és hátrányaikkal együtt.

### Bragg-Brentano (sík felület)



#### Előnyök

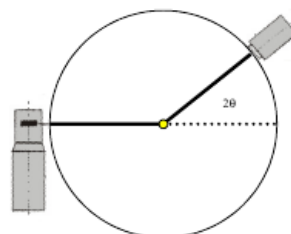
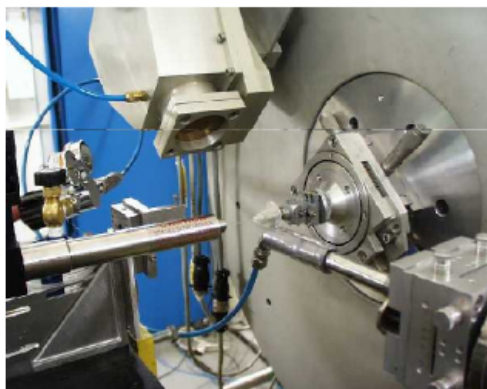
- Nagy beütésszámok
- Jól definiált minta geometria

#### Hátrányok

- Szisztematikus hibák a csúcsok intenzitásában (preferred orientation) és a csúcsok helyében (sample transparency)

8.1.6. ábra. Bragg-Brentano geometria

### Debye-Scherrer (kapilláris geometria)



#### Előnyök

- Kisebb szisztematikus hibák az intenzitásban (preferred orientation) és a csúcsok helyében

#### Hátrányok

- Kisebb beütésszámok
- Aszimmetrikus csúcsok

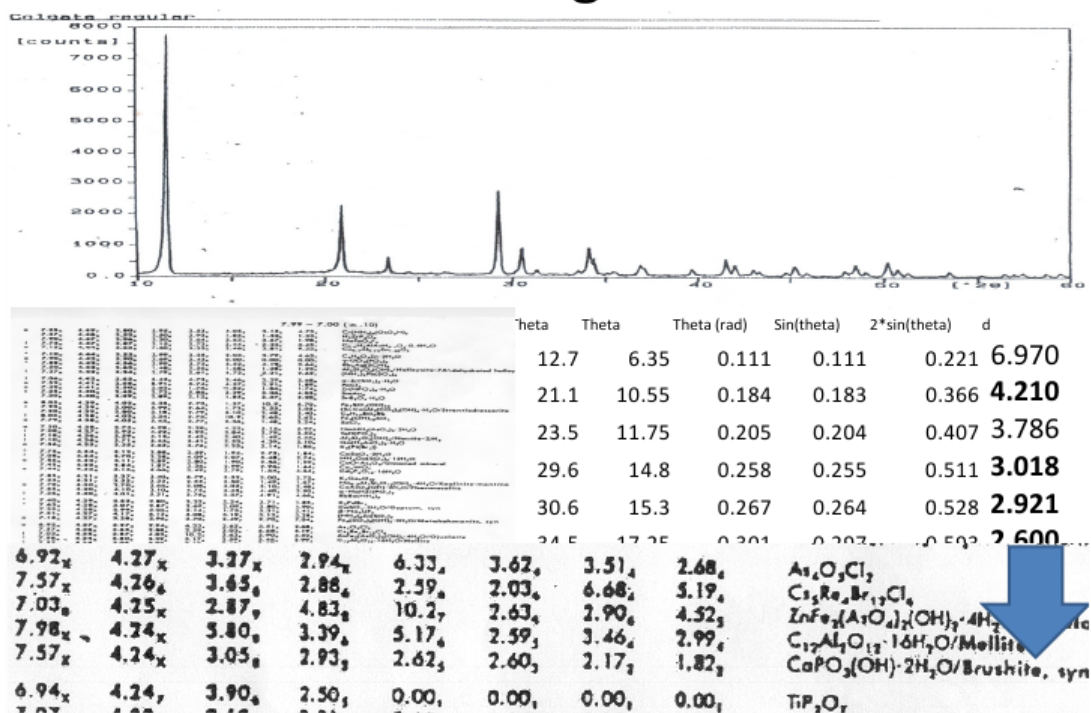
DS geometria a pontos pordiffrakciós mérésekhez

8.1.7. ábra. A Debye-Scherrer geometria

Végül egy példa: Ha a feladat annak meghatározása, hogy mi van a fogkrémekben egy pordiffrakciós felvételen könnyen eldönthetjük. A felvételen leolvasható  $2\theta$  szögekből a  $d$  rácstávolságok

kiszámolhatók a hullámhossz ( $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$ , réz anód) ismeretében. Összevetve a PDF (Powder Diffraction File) adatbázissal (amit az ICDD, International Centre for Diffraction Data gondoz) látjuk, hogy a szintetikus brusit (kalcium-foszfát) vonalaival egész jó az egyezés (8.1.8. ábra)

## Mi van a Colgate-ben?



8.1.8. ábra. A Colgate alapanyaga a brusit

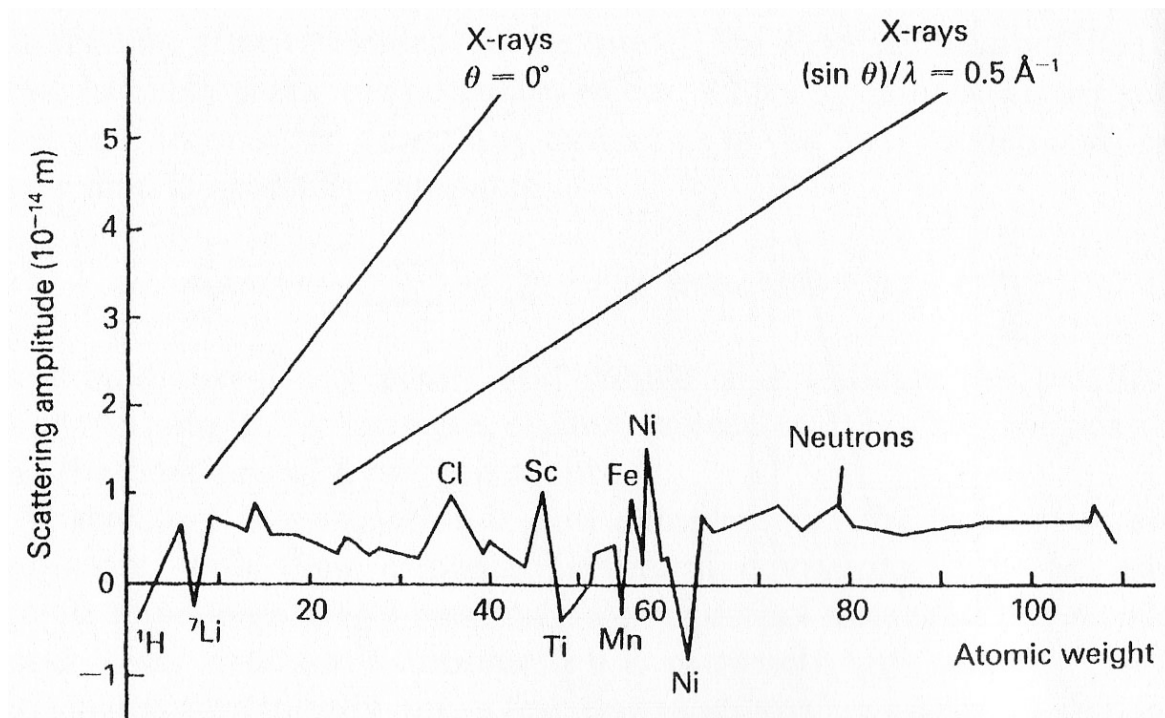
## 8.2. A polimorfia jelensége

Polimorfia az a jelenség, amikor egy anyag a körülményektől függően különböző szilárd fázisú szerkezetet mutat. Az allotróp módosulatokat, pl. a grafitot és a gyémántot is polimorfoknak szokták tekinteni (<http://hu.wikipedia.org/wiki/Allotr%C3%B3pia>). Még nagyobb jelentősége van a szerves molekulák és így a gyógyszer hatóanyagok polimorfijának. A polimorfia mindazokat a tulajdonságokat befolyásolja, amik a szilárd fázissal kapcsolatosak, így oldódási sebesség, oldhatóság, szín, íz, stb. Az új szilárd fázisú módosulat szabadalmaztatható illetve egy új módosulattal a szabadalmi oltalom időtartama kitolható. A polimorfia több milliárd dolláros üzletet jelent, és mind a generikus, mind az innovatív gyógyszergyárak intenzív kutatásokat folytatnak ezen a területen. A mindennapi életben is gyakran tapasztaljuk a polimorfia jelenségét például a nem megfelelően tárolt csokoládé kifehéredése esetén vagy a festékek színe is sok esetben függ a módosulattól. A cél mindig a kívánt polimorf előállítás és a termodinamika által kifejtett stabil polimorf irányába történő átalakulás gátlása. Ezt adalékanyagokkal érhetjük el például a csokoládé esetén ilyen a mogyoróolaj. A polimorfia fontossága miatt hazánkban is minden nagyobb gyógyszergyárban röntgen pordiffrakciós méréssel jellemezik a bejövő és kimenő hatóanyagot és terméket. A polimorfia gyógyszeripari vonatkozásai iránt érdeklődőknek Német Zoltán PhD dolgozatát ajánljuk

([http://www.omikk.bme.hu/collections/phd/Vegyeszmernoki\\_es\\_Biomernoki\\_Kar/2009/Nemeth\\_Zoltan/tezis\\_hun.pdf](http://www.omikk.bme.hu/collections/phd/Vegyeszmernoki_es_Biomernoki_Kar/2009/Nemeth_Zoltan/tezis_hun.pdf)). A Debreceni Egyetemen a polimorfia szabadalmi, szerkezeti, analitikai, gyógyszeripari engedélyezési vonatkozásairól 2008-tól magyar és angol nyelvű kurzust tartunk gyógyszerész hallgatóknak (kurzus kód GYGPO0108 illetve GYGPO0208, <http://www.structbiol.unideb.hu/polimorfia>).

### 8.3. A neutron diffrakcióról

A kurzusnak nem célja e módszer részletes ismertetése. Az elektron- és neutron diffrakció alapegyenletei hasonlóak a röntgendiffrakció egyenleteihez. A szóródó részecske (neutron vagy elektron) hullámtermészetét és a szóró közeget (atommagok illetve elektron felhő) is figyelembe vevő diffrakciós elmélet is analóg. Nagyon lényeges különbség, hogy a röntgensugárzásban az atomi szórási tényezők az elektronok számával, azaz az atom rendszámával azonosak  $\theta=0^\circ$ -nál, ( $\sin\theta/\lambda$  függvényében erősen csökkennek). Tehát a hidrogén szórási tényezőjénél 92-szer nagyobb az urániumé, vagyis a nehéz atomok meghatározzák a szórási képet. Ezt ki tudjuk használni a fázisprobléma megoldására a Patterson térkép értelmezésénél. A neutronokra vonatkozó atomi szórási tényezők a rendszámtól függően viszont a 8.3.1. ábrán bemutatott módon függenek. Egyrészt gyakorlatilag nem függenek, tehát a szórási képben nem dominálnak a nehéz atomok. Másrészt egymást követő rendszámú elemek (vagy eltérő tömegszámú izotópok!) szórási tényezője lényegesen eltér és így a szórási képből megkülönböztethetőek. Különösen érdekes a hidrogén és a deutérium összevetése, amelyekre a szórási tényező előjelet is vált! A neutrondiffrakciós vizsgálatok egyik fő alkalmazási területe: előállított egykristályon végzett méréssel a röntgendiffrakcióban nehezen látható hidrogén atomokról kaphatunk lényeges információt. A vizsgálati lehetőségeket jelentősen korlátozza, hogy a neutrondiffrakciós mérésre csak néhány helyen van lehetőség (hazánkban a Wigner Kutatóközpontban), és ha egykristály neutron diffrakciót akarunk tanulmányozni nagy méretű, több mm-es kristályokra van szükség a detektorok kis érzékenysége miatt. Pordiffrakciós mérés neutronokkal is végezhető. Mivel a neutron mágneses részecske a neutrondiffrakciós kísérlet különösen informatív mágneses anyagok vizsgálatánál így például a magas hőmérsékleten is szupravezetést mutató különleges anyagoknál. A neutron- és a röntgendiffrakciós mérések összehasonlítására számos példát találunk (lásd pl. [http://www.fhi-berlin.mpg.de/acnew/groups/nanostructures/pages/teaching/pages/teaching\\_malte\\_behrens\\_x-ray\\_and\\_neutron\\_diffraction.pdf](http://www.fhi-berlin.mpg.de/acnew/groups/nanostructures/pages/teaching/pages/teaching_malte_behrens_x-ray_and_neutron_diffraction.pdf) vagy [www.mdpi.com/2073-4441/2/3/333/pd](http://www.mdpi.com/2073-4441/2/3/333/pd)), ezek a módszerek jól kiegészítik egymást.



8.3.1. ábra. A röntgensugárzásra és neutronra vonatkozó szórási tényezők különböző atomtömegekre.

### Teszt

## 9. Számítógépes programok, WINGX, PLATON, ORTEP, MERCURY, SHELX (Bényei Attila)

### Irodalom

Az egyes programcsomagok honlapja

WINGX

- <http://www.chem.gla.ac.uk/~louis/software/wingx/>

Manual Fernandes rövid használati utasítása a WINGX-hez

- <http://www.gh.wits.ac.za/manuel/solving-xtals/crystal-structures-15-3-06.pdf>

PLATON eredeti és Windows verzió, ingyenes

- <http://www.cryst.chem.uu.nl/platon/>
- <http://www.chem.gla.ac.uk/~louis/software/platon/index.html>

ORTEP, Windows alatt, oktatási és kutatási céllal ingyenes

- <http://www.chem.gla.ac.uk/~louis/software/ortep3/index.html>

MERCURY, a CSD-hez ajánlott megjelenítő, ingyenesen is elérhető

- [http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/csd\\_system/mercury\\_csd/](http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/csd_system/mercury_csd/)

SHELX honlap

- <http://shelx.uni-ac.gwdg.de/SHELX/>

A jegyzetnek nem célja számítógépes programok részletes ismertetése. A programok változnak, az egyes hasonló profilú szerkezetvizsgáló laborok is különböző programcsomagokat használnak és a terjedelmi keretek sem teszik lehetővé a programok utasításainak részletes ismertetését. A 15.1. és a 15.2. fejezetben egy példán bemutatjuk a szerkezetmeghatározás szoftveres lépéseit is, főleg szemléletesként.

## 9.1. All in one ingyen, a WINGX programcsomag

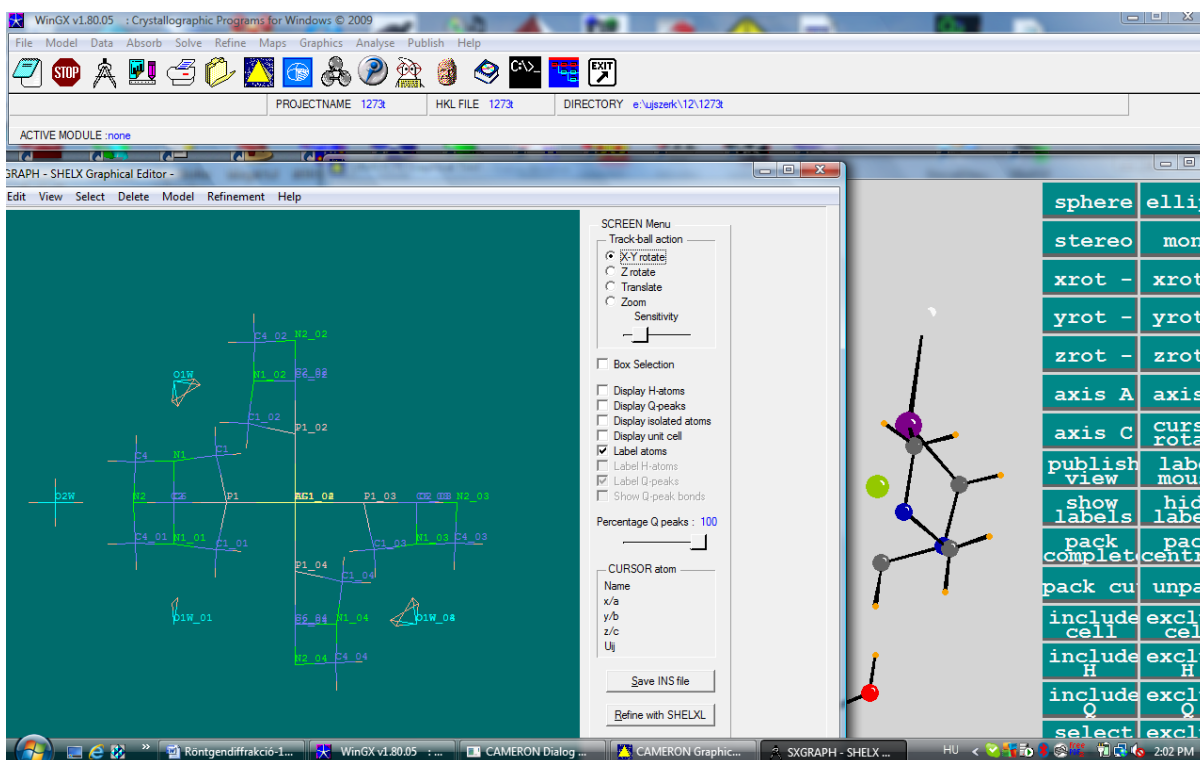
A diffrakciós szerkezet-meghatározás jórészt számítógépes munkát jelent. A korábban is bemutatott első lépésekre, az adatgyűjtésre, az adatok feldolgozására a diffraktométer gyártójától kapott program szolgál. A fázisprobléma megoldására, a szerkezet finomítására és az egyéb feladatokra a legkülönbözőbb forrásból rendelkezésünkre állnak programok vagy programcsomagok. Feladat lehet ezeknek az esetenként különböző platformokon futó programoknak az összehangolása is, hogy az egyik program kimenetéből a másik program indítható legyen manuálisan vagy automatikusan.

Sajnos, ma nagyon kevesen vannak, akik ezeket a programokat teljes egészében értik, vagyis a matematika, a krisztallográfia és az informatika teljes szükséges eszköztárával rendelkeznek. A felhasználók nagy része fekete dobozként használja a programokat és ennek jelentős a veszélye. Ezen nem tudunk változtatni, ezért kiemelten fontos, hogy a felhasználók legalább nagy vonalakban ismerjék a programok működési elvét, és különösen a megadható paraméterkészlet értelmes tartományát.

Ugyanarra a feladatra, például a fázisprobléma megoldására számos program elérhető, amelyek hasonló, vagy különböző elven működnek (pl. direkt módszer vagy nehézatom módszer). A tapasztalat az, hogy a könnyű feladat, jó minőségű adatkészlet, helyesen meghatározott tércsoport esetén szinte bármilyen módszerrel és programmal eredményesen próbálkozhatunk és ez szerencsére az esetek 60-70%-át jelenti. Sajnos, ha nem sikerül a rutinbeállításokkal a fázisprobléma megoldása, akkor nagy tudás, intuíció és persze gyakorlat kell, hogy a rendelkezésünkre álló tucatnyi programból és azok ezernyi beállításából a megoldást elérjük. A másik irányba a művelet már egyértelmű (egy modellből diffrakciós mintázat számítása), azaz könnyen el tudjuk dönteni, hogy a kapott megoldás megfelelő-e (a mért és számított diffrakciós mintázat megegyezésének mértéke, pl. R-faktorok).

Az egyes programok összehangolását keretprogram segíti, amely zökkenőmentessé teszi a paraméter átadást illetve az eredmény feldolgozást az egyes lépések között. A 9.1.1. ábra mutat egy lépést a WINGX használatából. A WINGX-hez hasonló számos keretprogram elérhető ingyenes és fizetős változatban is, ilyenek a JANA (<http://jana.fzu.cz/>), CRYSTALS (<http://www.xtl.ox.ac.uk/crystals.html>), OLEX2 (<http://www.olex2.org/>) és a PLATON programra épülő SYSTEM-S (<http://www.cryst.chem.uu.nl/spek/platon/pl070000.html>).

Természetesen profitorientált cégek is bekapcsolódnak a versenybe és a diffrakciós készülékek gyártóinak érdekük is a teljes szerkezet-meghatározást elvégezni tudó programcsomagok árusítása. A kismolekulák szerkezet-meghatározásánál automatikus szerkezetmegoldó programok is vannak: A kristály felhelyezése után a diffraktométer elvégzi a mérést, az adatok feldolgozását és a szerkezet megoldását majd finomítását. Az esetek 20-50%-ában ezek az automatikus programok jól működnek (saját becslés, BA), de sajnos még számos esetben vakvágányra jutnak. A kristály minősége, szokatlan tércsoport, ikerkristály, hibásan megadott összetétel és sok egyéb esetben nem kapunk értékelhető eredményt. A fejlődés jelentős az utóbbi időben ezen a területen is, de a problémás esetek megoldására szükség van a szakértelemre.



9.1.1. ábra. A WINGX használatának egy lépése. A 15.1. fejezetben egy példán keresztül mutatjuk be a program használatát.

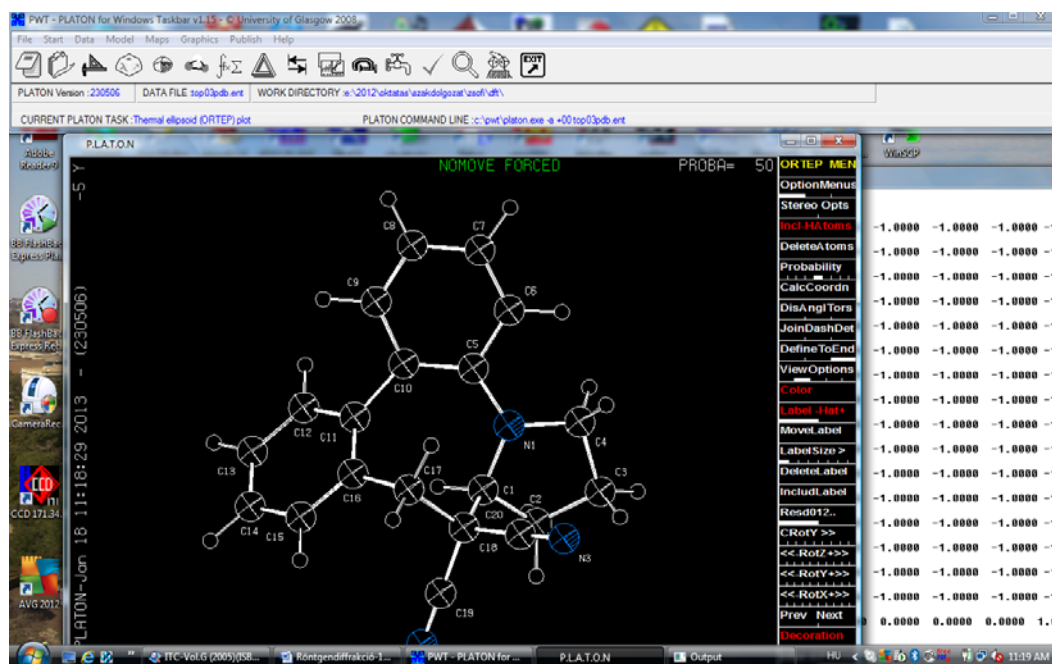
Jó minőségű adatkészlet esetén a WINGX segítségével a szerkezet-meghatározás részlépéseit kismolekula esetén néhány óra alatt elvégezhetjük. Ezek:

- Adatok feldolgozása és tércsoport meghatározás
- Szerkezet megoldása direkt módszerek és nehézatom módszer segítségével
- A szerkezet finomítása

- A számítások során készült CIF fájlok összevonása és ellenőrzése a CHECKCIF serverrel, a hibaüzenetek értelmezése

## 9.2. Kimerítő kristallográfiai számítások a PLATON programmal

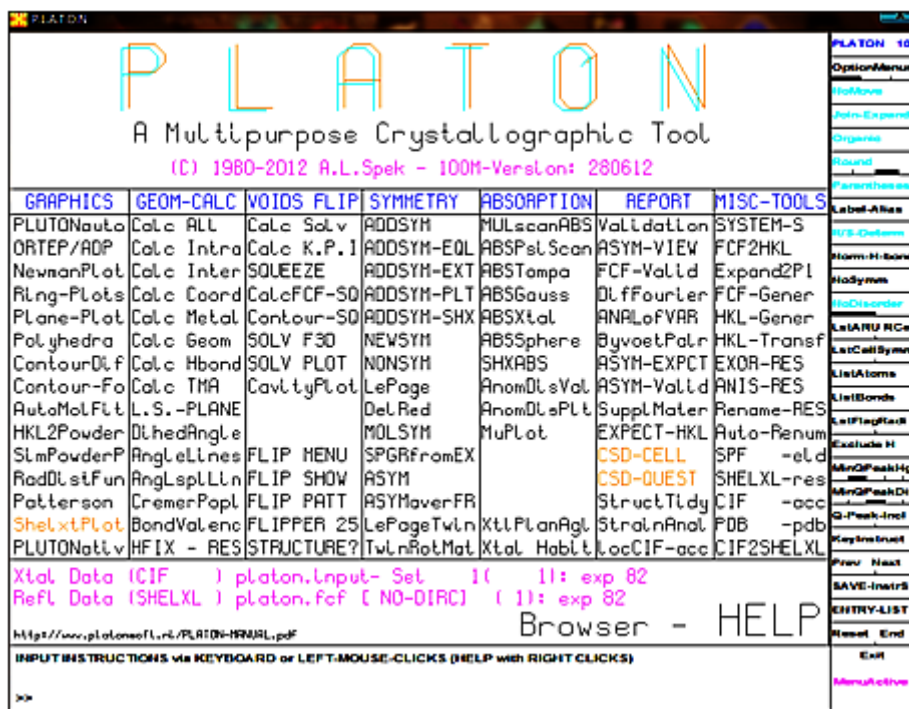
A kismolekulák körében talán a PLATON programmal (<http://www.cryst.chem.uu.nl/spek/platon/>) lehet a legtöbb kristallográfiai számítást elvégezni. Ezt Ton Spek Utrechtben fejlesztte, Louis Farrugia írt hozzá egy Windowsos GUI-t (PWT), ami a 9.2.1. ábrán látható.



9.2.1. ábra. A PLATON használata Windows alatt

A PLATON program önálló használatán kívül (pwt) hívható a WINGX-ből és a PLATON-nak is van grafikus menüje ami linux és egyéb rendszerek alatt is fut. A 9.2.2. ábra mutatja ennek a kristallográfiai szerszámszládának a lehetőségeit. Használhatjuk a szerkezetek validálására és a szükséges kémiai szerkezeti információk kinyerésére is.



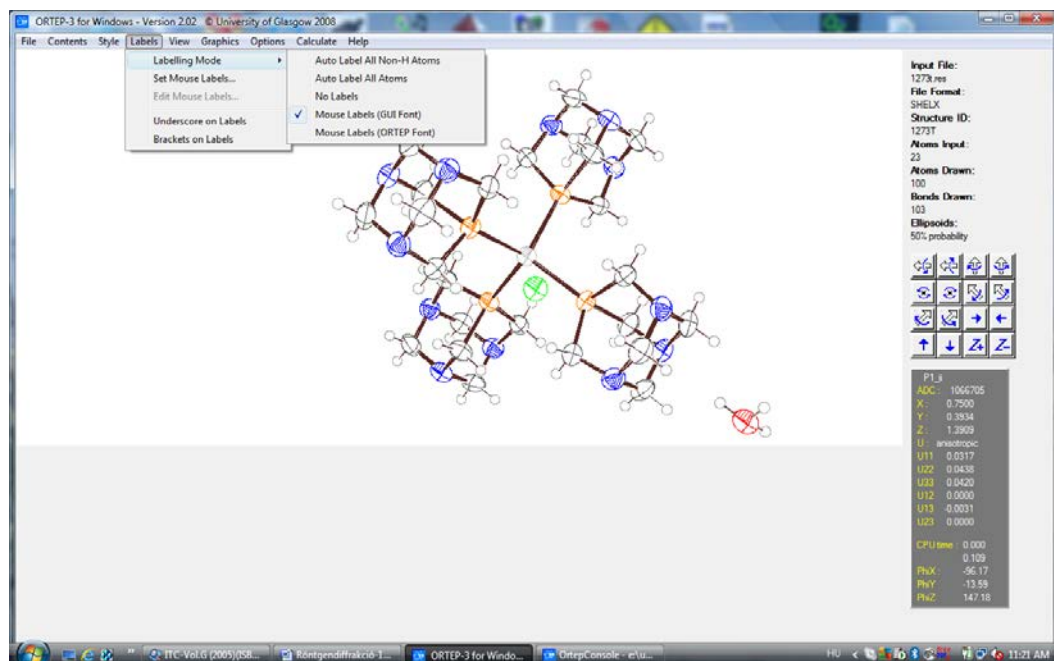


9.2.2. ábra. A PLATON saját grafikus menüje

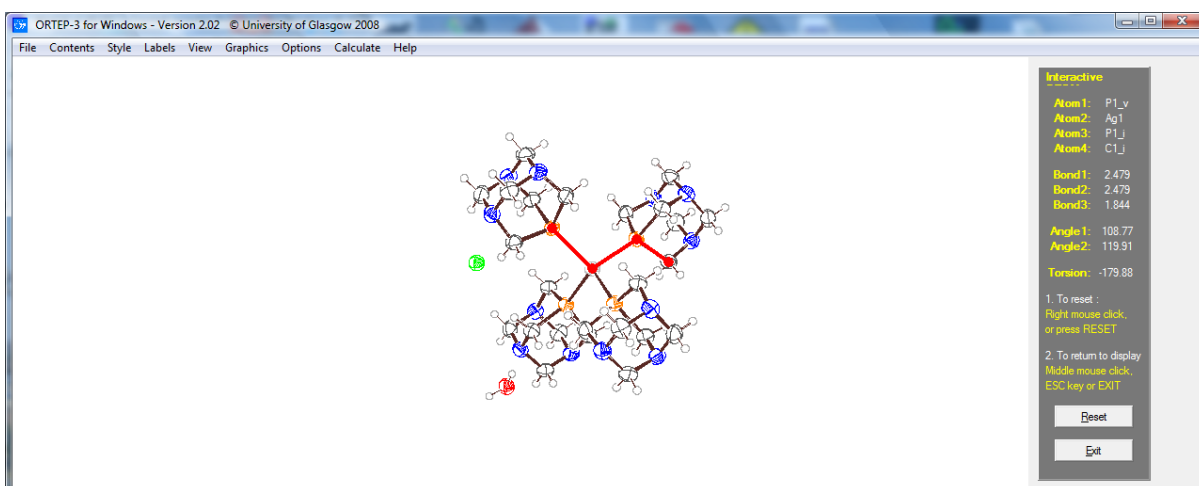
### 9.3. A megjelenítés elsődleges fontossága, az ORTEP és a MERCURY

Az adatok vizualizálása különösen fontos a krisztallográfiában. Az ORTEP programot az atomok egyensúlyi helyzet körüli elhelyezkedésének bemutatására dolgozta ki az Oak Ridge National Laboratory kutatóintézetben eredetileg Fortran nyelvre Michael N. Burnett és Carroll K. Johnson (<http://www.ornl.gov/sci/ortep/ckj.html>). Ma már elfogadott standard, és a cikkekben található 50%-os valószínűségnél kontúrozott ORTEP rajzok alapján ránézéssel el tudjuk dönteni a szerkezet jóságát, (9.3.1. ábra; az atomokat megjelenítő ellipszoidok belsejében 50%-os valószínűséggel fordul elő az atom középpontja – az ellipszoid mérete és alakja jelzi az atom rendezetlenségét/mozgékonyosságát). Ha közel gömbszerű ellipszoidokat látunk, akkor a szerkezetünk jó, ha valamelyik ellipszoid nagyon aszimmetrikus ott szerkezeti vagy meghatározási problémák lehetnek. A 9.3.2. ábrán arra láthatunk példát, hogy az ORTEP programmal egyszerűen végezhetünk el méréseket a szerkezeten. A négy atom kiválasztásakor lemért torziós szög az első három (nem egy egyenesbe eső) atomra illesztett síkhoz a negyedik atom szögét mutatja. Az ORTEP program nem veszi figyelembe az atomi koordináták hibáját, ezért a lemért szög értékek mindig  $\pm 0,1-0,5$  fok pontossággal értendők, figyelembe véve, hogy a távolságok hibája általában néhány ezred Å.

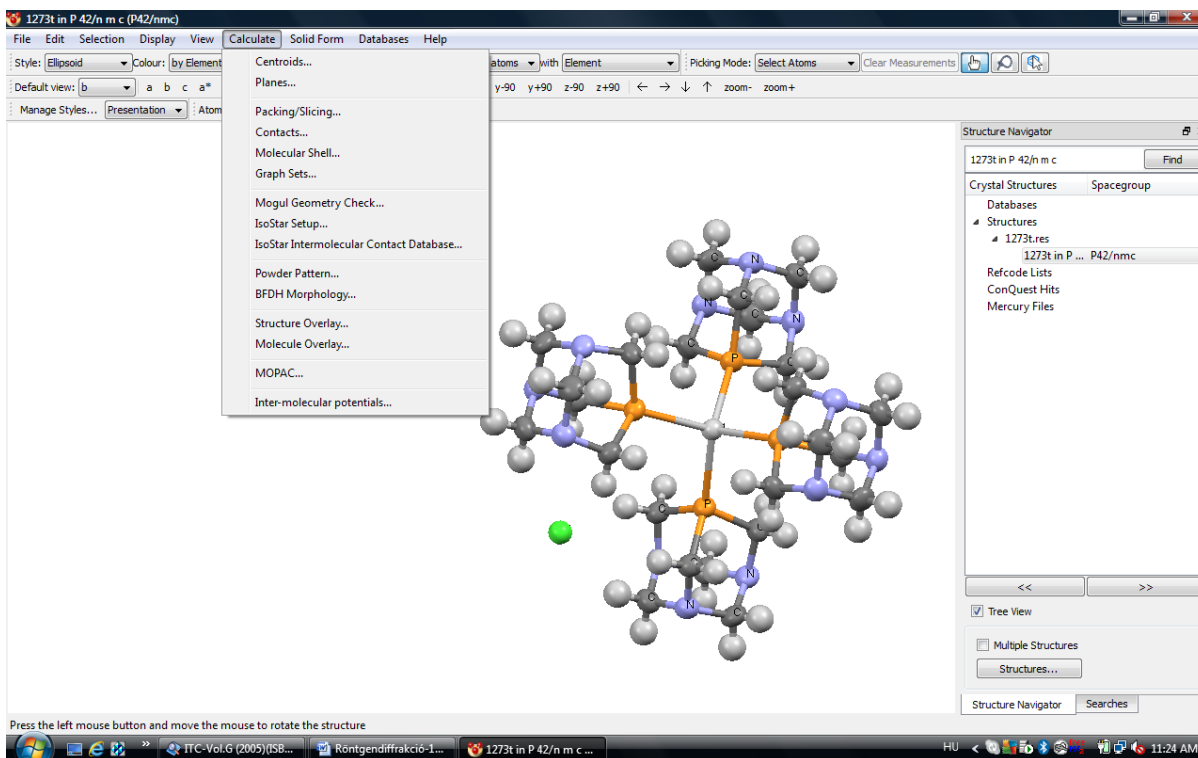
Egy másik, hasonlóan nagy teljesítőképességű megjelenítő program a MERCURY, amit a CSD adatbázis előfizetéséhez mellékelnek, de ingyenesen is letölthető egy korlátozott funkcionalitású verziója a CSD honlapjáról. A 9.3.3. ábra ugyanazon molekula megjelenítését MERCURY-val mutatja.



9.3.1. ábra. ORTEP rajz 50%-os valószínűségeen és néhány menüpont a rajz feliratozásához.



9.3.2. ábra. Interaktív geometriával meghatározott kötésszög, kötéstávolság és torziós szög mérése ORTEP programmal.



9.3.3. ábra. A MERCURY programmal megjelenített szerkezet (golyós-pálcikás ábrázolás).

A kristallográfiai grafikus programok ma már előállítják a rajz kiszínezett, renderelt változatához szükséges indító fájlt például a POVRAY (Persistence of Vision Rasytracer, <http://www.povray.org/>) programnak és a képeket videóvá is összefűzhetjük, ahogy a 9.3.1. és 9.3.2. video mutatja.

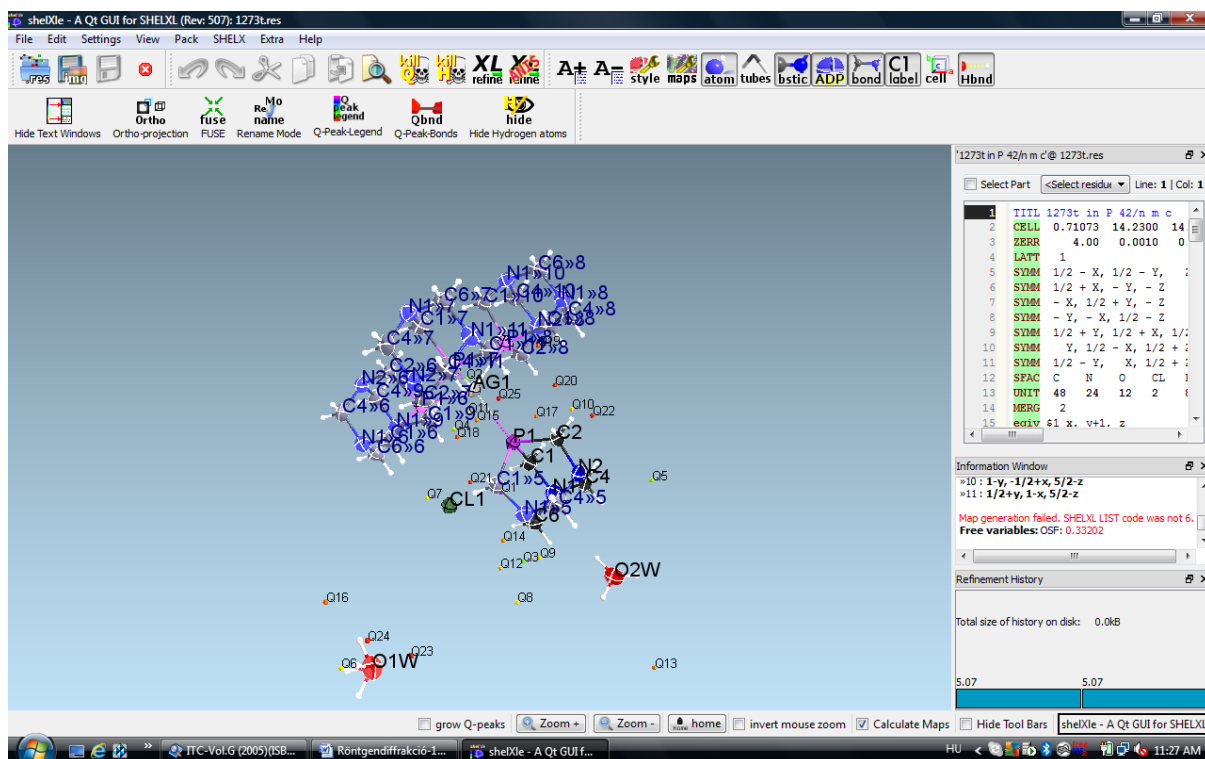
9.3.1. [Video a körbeforduló molekuláról.](#)

9.3.2. video. [A teljes elemi cella forog.](#)

## 9.4. A SHELX, az egyik legtöbbet hivatkozott program

Ha röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározást is tartalmaz egy közlemény majdnem biztos, hogy hivatkozik George Sheldrick programjára a SHELX-re. Egy grafikus felületet (GUI) mutat a 9.4.1. ábra, de a SHELX programcsomag fázisprobléma megoldására vagy finomításra csaknem minden kristallográfiai programcsomagból elérhető kis molekulák, fehérjék vagy pordiffrakció s felvételből való szerkezet-meghatározáshoz. A fejlesztését a '70-es években kezdte George M. Sheldrick (<http://journals.iucr.org/a/issues/2008/01/00/sc5010/index.html>), először a kismolekulás kristallográfiában terjedt el használata köszönhetően az egyszerűen kezelhető és hatékony direkt módszeres fázisprobléma-megoldó algoritmusának és legkisebb négyzetes finomítást végző programnak. A későbbi fejlesztések lehetővé tették akár 1-2 ezer atomos szerkezetek fázisprobléma megoldását direkt módszerrel, fehérjék fázisprobléma-megoldását a nehéz/anomálishan szóró atomok jelenlétének

kihhasználásával (direkt módszer vagy Patterson-függvény használata; 12. fejezet). A finomító program ma a leginkább elterjedt szerkezetfinomításra alkalmazott program kismolekulák és atomi felbontású fehérjeszerkezetek esetén egyaránt (legkisebb négyzetek módszerét vagy konjugált gradiens módszert alkalmazó iterációs algoritmusok).



9.4.1. ábra. GUI a SHELX-hez

[Teszt](#)

## 10. Cambridge Structural Database (CSD) használata (Bényei Attila)

### Irodalom

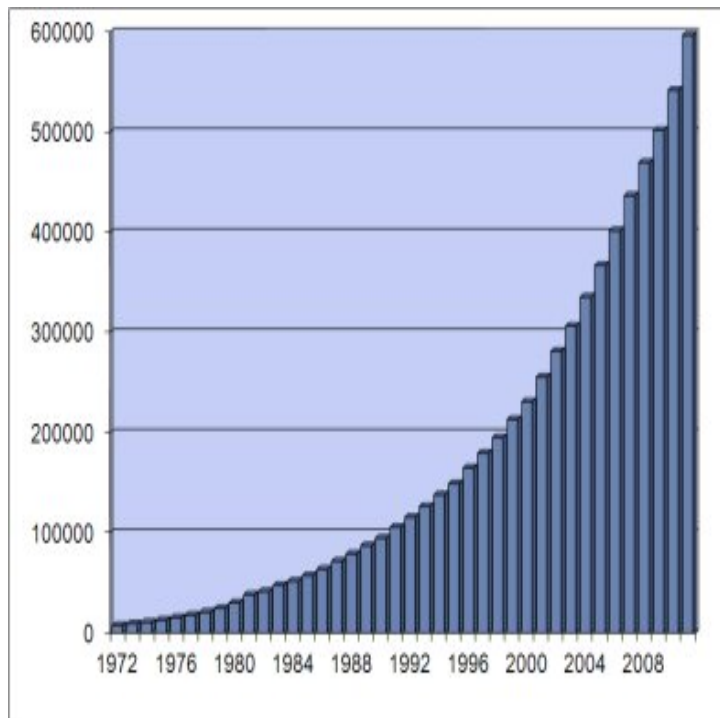
A kiindulópont a CSD webhely

- <http://beta-www.ccdc.cam.ac.uk/pages/Home.aspx>
- <http://researchguides.library.wisc.edu/content.php?pid=100555&sid=755197>
- [http://en.wikipedia.org/wiki/Cambridge\\_Structural\\_Database](http://en.wikipedia.org/wiki/Cambridge_Structural_Database)
- <http://cds.dl.ac.uk/cds/datasets/crys/csd/csd.html>

## 10.1. A CSD történetéről

Amint az egykristály röntgendiffrakciós módszer elkezdte térhódítását, több kiadó is elkezdte a tudományos cikkekben megjelent szerkezetek összegyűjtött publikálását. Kialakult a specializáció: szervetlen és szerves molekulák adatbázisa, de hamar kiderült, hogy ez nem a legeredményesebb, mivel a szükséges kötetek száma rohamosan növekedett. John Bernal ír krisztallográfus javaslatára elkezdtek egy számítógépen rögzített adatbázis kialakítását. Olga Kennard és munkatársai 1970-ben létrehozták azt a rendszert, amiben az akkor ismert mintegy 3000 szerves molekula kristályszerkezetét rögzíteni tudták és kellő lehetőséget biztosított a bővítésre. Akkor még nem álltak rendelkezésre grafikus felületek és az adatbázist alfanumerikus terminálról lehetett elérni. A molekulák konnektivitásának leírása betűkkel és számokkal egy új topológiai leíró rendszer megalkotását tette szükségessé és azt is gondosan meg kellett tervezni, hogy mely mezők legyenek kereshetők. A rendszer annyira sikeres lett, hogy, bár napjainkban a CSD-be letett szerkezetek száma már több mint 600000, az adatbázis felépítése gyakorlatilag ugyanolyan. Az adatbázisban található kristályszerkezetek döntő többségét egykristály röntgendiffrakcióval határozták meg. Néhány ezerre tehető a pordiffrakcióval és neutroindiffrakcióval meghatározott szerkezetek száma, ami tükrözi, hogy ezen módszereknél vagy a szerkezetmegoldás (pordiffrakció), vagy a mérési lehetőséghez való hozzáférés (neutroindiffrakció) ütközik nehézségekbe.

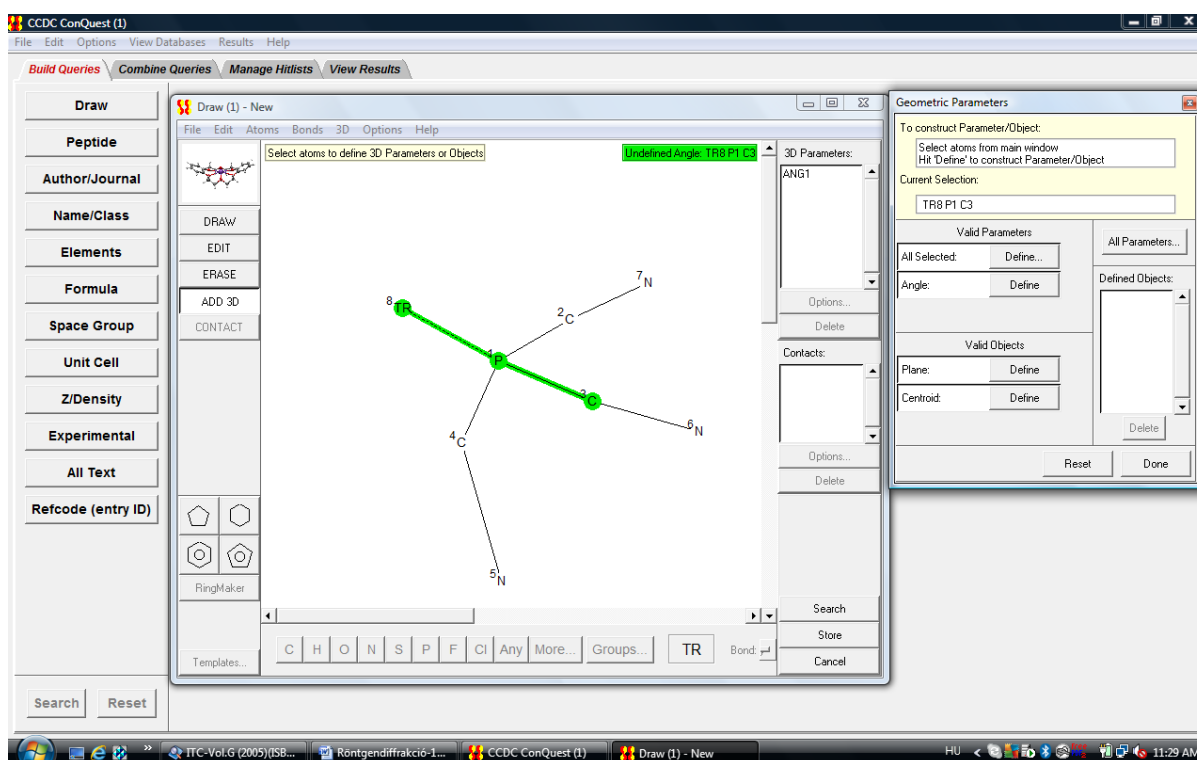
A 10.1. ábra mutatja az adatbázisban lévő szerkezetek számának impresszív növekedését. A növekedés exponenciális, 5-7 évente duplázódik a meghatározott szerkezetek száma. Ezt a folyamatos technológiai fejlődést a PDB fehérjekrisztallográfiai adatbázisban lévő szerkezetek száma is tükrözi. Ennek a növekedésnek még nem látszanak a korlátai, sőt, ha a CSD-be letett szerkezeteket tekintjük, nincsenek közöttük a gyógyszergyárakban meghatározott, de főleg szabadalmi okok miatt nem publikált szerkezetek, tehát a meghatározott szerkezetek száma az adatbázisban találhatóénál sokkal nagyobb. A tudomány egyéb területein is ilyen a fejlődés üteme, ehhez kell alkalmazkodnunk.



10.1. ábra. A CSD adatbázis növekedése

## 10.2. A CSD a szupramolekuláris kémia kincses ládája

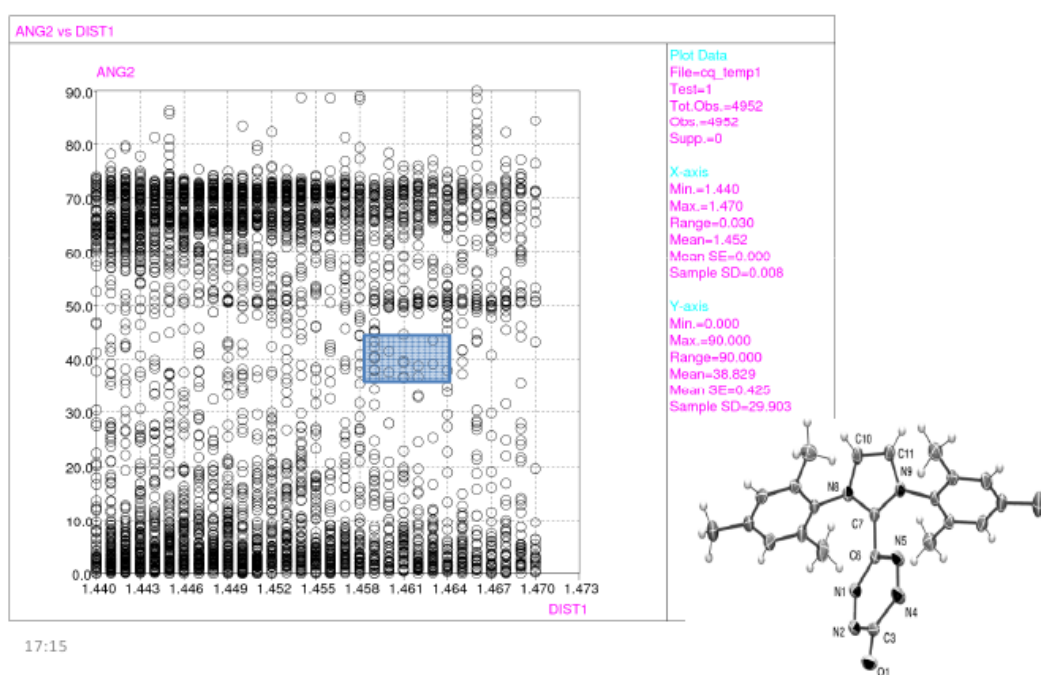
A Google világában nem kell bizonygatni, hogy a meglévő adatok új szempontú rendszerezése lényeges profitot vagy új tudományos eredményt hozhat. A szupramolekuláris kémia a kémián túli kémiát jelöli, amikor a rácsot felépítő gyenge másodlagos kötőerőket megpróbáljuk megérteni és befolyásolni. Az egész kristályt egyetlen szupermolekulának tekintve ez a kémiai szintézishez hasonló, kristálymérnökségnek is nevezett kutatási terület, aminek a célja a kívánt tulajdonságú szilárd fázisú szerkezetek előállításának. Még nagyon messze vagyunk attól, hogy ezt a célt elérjük, de a CSD adatbázis is segíti, hogy a kristályrácsokban előforduló szerkezeti motívumokat felismerjük, és ha lehet képződésük okait és energetikáját leírjuk.



10.2.1. ábra. CSD keresési mezők

A CSD-ben szöveges mezőkön kívül (pl. szerző neve, bibliográfia stb.) kereshetünk az atomok molekulán belüli és intramolekuláris konnektivitására és különböző geometriai paraméterekre (pl. atom-atom távolságok, szögek, planaritás, torziós szögek...). Az atomi koordinátákat tartalmazó CIF fájlból számítással további információt nyerhetünk illetve már a keresésnél megadhatunk távolság vagy szög adatra vonatkozó korlátozást, vagy kigyűjthetjük az adatbázisból a számunkra érdekes geometriai adatokat egy adott vegyületcsoportra. Az adatokat PDF-ben illetve az atomi koordinátákat kristallográfiai vagy számítási kémiai analízisre alkalmas formátumban (CIF, mol2, xyz stb.) is menthetjük. Ha a keresés azt mutatja, hogy az általunk talált szerkezet a hasonló szerkezetek adott paraméterek szerint nagyon kis populációjú régiójában van, mint ahogy a 10.2.2. ábra mutatja, gondolkozhatunk róla, hogy ennek mi az oka (pl. korrelációt állapíthatunk meg a vizsgált paraméter és más geometriai paraméterek értéke között). Az adatbázisban a koordináták finomított értéke található a hibájuk feltüntetésével, amiből a geometriai paraméterek hibája számítható (a hibák birtokában konfidencia szinteket is meghatározhatunk; jó

minőségű adatkészlet esetén ezred Å illetve század fok pontossággal megkapjuk az eredményt). A hibaszámítás különösen akkor fontos, ha távolság és szög különbségeket akarunk összevetni. Nem szabad elfeledkezni azonban arról, hogy az atomi pozíciók a röntgendiffrakcióval meghatározott szerkezeteknél az elektronsűrűségi maximumok, és nem az atommagok átlagos helyzetei a kristályban. A hidrogén atomok pozíciója pedig geometriai megfontolások figyelembevételével kerül meghatározásra a szerkezetmegoldás során, mert kis elektronsűrűségük miatt az elektronsűrűségi térképekben elhelyezésük bizonytalan volna – ebből az következik, hogy a hidrogéneket tartalmazó kötések és a hozzájuk tartozó kötésszög értékek nem a mérésből származnak, a vizsgált molekulára nem specifikusak. A gyakorlatban összehasonlításakor általában nem érdemes a távolság adatokat század Å illetve a szögeket egész fok pontosságon belül megkülönböztetni.



10.2.2. ábra. Az általunk talált szerkezet nagyon kilóg a hasonlóak közül, bár van rá néhány példa

### 10.3. A CSD felépítése

A CSD adatbázist a Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) gondozza. Az adatbázis létrehozásakor először meghatározták, hogy milyen adatmezőket célszerű rögzíteni az adatbázisban, hogy a lehető legtöbb információ legyen benne vagy belőle kiszámítható. Ezek egy része szöveges információ (kísérleti adatok, szerző, bibliográfia stb.) más része kristallográfiai adat (tércsoport jelölése, atomok neve, koordinátái, konnexitásuk stb). A közlésre beküldött szerkezetek egy hat betűből álló azonosítót (Refcode) kapnak. Ha ugyanazt a szerkezetet újra publikálják, ehhez egy kétjegyű számot illesztnek pl. ALUCAL04. Ha a szerző új adatkészletet küld be a szerkezethez, de nem másik cikkben jelenik meg, akkor az adatkészlet felülírja az előző információt. Sajnos, a CSD-ben lévő szerkezetek egy részénél nem találunk koordinátákat, csak esetleg elemi cella adatokat. Ennek magyarázata, hogy általában szabadalmi okok miatt a szerzők nem teszik publikussá a teljes szerkezet értelmezését lehetővé tevő atomi koordinátákat.

A CSD használatáról elérhető videók a YouTube-on: <http://www.youtube.com/user/CCDCCambridge>

A CSD <http://www.ccdc.cam.ac.uk/SupportandResources/Resources/pages/Resources.aspx?mc=-1&sc=-1&rt=5&p=-1&productname=CSD%20Teaching%20Database>

#### 10.4. A CSD adatbázis segítségével megoldandó feladat, számolási gyakorlat

A kurzus során mérőpárokban végzünk egy keresést a CSD adatbázisban (pl. egy adott aminosav szerkezete), elmentjük az adatokat és az ORTEP vagy a MERCURY program segítségével meghatározzuk a hidrogén kötések geometriai adatait. Érdekes következtetéseket vonhatunk le, ha a D, L vagy DL aminosav hidrogénkötési mintázatát összevetjük. A 10.3. videó az alanin hidrogénkötés mintázatát mutatja.

10.3. video [Alanin](#) hidrogénkötés hálózata.

[Teszt](#)

## 11. Fehérjék röntgendiffrakciós vizsgálata, fehérjék kristályosítása (Harmat Veronika)

### Irodalom

Klasszikus módszerek, történet, faktoriális kísérlettervezés, csíráztatás, adalékok szerepe, kristályosítás gélben:

- Ducruix and R.Giegé (eds.) „Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. a Prectical Approach” Oxford University Press, 1992
- A. McPherson, „Crystallization of biological macromolecules” (Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1999).

Automatizálás, alkalmazások RNS, fehérje/DNS komplexek és vírusok kristályosítására:

- Mark R. Sanderson and Jane V. Skelly „Macromolecular Crystallography”, Oxford University Press, 2007, 1-3. és 14-16. fejezetek

Terese Bergfors oktatási anyagai (kristályosítási receptek, gyakorlati tanácsok sok fotóval):

- [http://xray.bmc.uu.se/terese/Laboratory\\_Exercises.pdf](http://xray.bmc.uu.se/terese/Laboratory_Exercises.pdf) és  
<http://xray.bmc.uu.se/terese/tutorials.html>



A fázisdiagram felhasználása a kristályosítás optimalizálásában:

- Joseph R. Luft, Jennifer R. Wolfley, and Edward H. Snell: „What’s in a Drop? Correlating Observations and Outcomes to Guide Macromolecular Crystallization Experiments” *Crystal Growth & Design*, 11: 651-663, 2011 <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cg1013945>

Kristályok átvitele krio-oldatba (recept):

- Artem G. Evdokimov: "Cryoprotection of delicate crystals." NIH X-RAY Diffraction Interest Group Newsletter No. 195, 2009 [http://mcl1.ncifcrf.gov/nihxray/Tips-and-Tricks\\_CryottectionOfDelicateCrystals-ArtemEvdokimov.pdf](http://mcl1.ncifcrf.gov/nihxray/Tips-and-Tricks_CryottectionOfDelicateCrystals-ArtemEvdokimov.pdf)

Membránfehérjék kristályosítása:

- Roslyn M Bill, Peter J F Henderson, So Iwata, Edmund R S Kunji, Hartmut Michel, Richard Neutze, Simon Newstead, Bert Poolman, Christopher G Tate and Horst Vogel: „Overcoming barriers to membrane protein structure determination” *Nature Biotechnology* 29:335-340. 2011 <http://gbb.eldoc.ub.rug.nl/FILES/root/2011/NatBiotechnolBill/2011NatBiotechnolBill.pdf>
- CLP összefoglaló, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2746658/>

Előadások

- Claudia Massa: Protein Crystallisation, Blockkurs Biophysik und Strukturbiologie 2010 [http://www.biozentrum.unibas.ch/personal/schirmer/teaching/blockkurs/2010/Lectures\\_files/X-lecture\\_29\\_09\\_10.pdf](http://www.biozentrum.unibas.ch/personal/schirmer/teaching/blockkurs/2010/Lectures_files/X-lecture_29_09_10.pdf)
- Zygmunt Derewenda: Protein crystallization: an overview, CCP4 Study Weekend (2010) [http://www.ccp4.ac.uk/courses/stwk10/talk\\_files/Derewenda\\_CCP4\\_Jan2010.pdf](http://www.ccp4.ac.uk/courses/stwk10/talk_files/Derewenda_CCP4_Jan2010.pdf)

## 11.1 Fehérjék kristályosítása, történeti áttekintés: az első hemoglobin kristályoktól a vírus és riboszóma kristályokig

A fehérjék esetén a funkciót a konformáció hordozza, a globális konformáció által kerülnek meghatározott térbeli elrendeződésbe a szerkezet, molekuláris felismerés, enzimek esetén a katalízis stb. szempontjából fontos aminosavak, és az általuk hordozott funkciók csoportok. Az NMR spektroszkópia és a röntgendiffrakció a két, 3 dimenziós szerkezet kísérleti meghatározására alkalmas módszer, de mindkettőnek megvannak a maga korlátai. Míg NMR módszerekkel bizonyos méret fölötti molekulák már nem vizsgálhatók, a röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározáshoz rendezett fehérje egykristályok előállítására van szükség. A genomprojektekhez kapcsolódó szerkezetvizsgálati erőfeszítések (szerkezeti genomika) során bebizonyosodott, hogy a fehérjék szerkezet-meghatározása leggyakrabban három dolgon bukhat el: nem sikerül natív (oldható formában) előállítani, nem sikerül megtisztítani vagy nem sikerül kristályosítani: (pl. <http://kiemlicz.med.virginia.edu/nysgrc/statistics>, <http://kiemlicz.med.virginia.edu/mcsg/progresses>).

Az első fehérjekristályokat (hemoglobin) véletlenül állította elő Hünefeld földigilisza véréből 1840-ben. A következő években több különböző fajból származó hemoglobint sikerült kikristályosítani, de csak 1850-

ben Fünke közölt először általánosítható kristályosító módszert. A korai időszakban több növényi fehérje és tyúktojásból albumin kristályosítását közölték, amik általában „kisózás” módszerével történtek. 1925-ben Sumner kristályosította az első enzimet (ureáz), 1929-ben Northrop a pepszint, majd 1935-ban Stanley a dohány-mozaikvírust, és bebizonyította, hogy az a kristályosítás után is aktív maradt. Munkájukért Nobel-díjat kaptak (<http://www.nobelprize.org>). Bár az első fehérje kristályról készült röntgendiffrakciós felvételeket már 1934-ban felvették (pepszin, Bernal és Crowfoot), az első szerkezetet csak 24 évvel később publikálta Max Perutz (mioglobint), eddigre dolgozták ki az adatgyűjtés/szerkezetmegoldás elméleti, metodikai és technikai feltételeit. Perutz és Kendrew (hemoglobin szerkezete) 1962-ben Nobel díjat kaptak.

A fehérjekristályosítás kis oldattérfogatokat felhasználó módszereinek kidolgozása a '60-as évektől kezdődött. Felfedezték a manapság is használatos főbb módszereket, amelyek kis mennyiségű fehérjét használnak (gőzdiffúzió, dialízis). A membránfehérjék kristályosítása a detergens alkalmazásának köszönhetően indult el (első membránfehérje, a bakteriorodopszin szerkezetvizsgálatáért kémiai Nobel díjat kapott Johann Deisenhofer, Robert Huber, Hartmut Michel 1988-ban; [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1988/deisenhofer-michel-lecture.pdf](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1988/deisenhofer-michel-lecture.pdf)) - ez a terület ma is kihívásokat rejt, annak ellenére, hogy kidolgozták különböző, 3 dimenziós kristályok képződését elősegítő lipid fázisok alkalmazását (pl. köbös lipid fázis, CLP; <http://www.pnas.org/content/93/25/14532.long> ; a módszer áttekintése: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2746658/>). Felfedezték, hogy a fehérjeminta tisztasága mellett a minta forrása, és a vizsgált molekula jól megválasztott fragmentuma vagy komplexe is létfontosságú lehet - pl. a riboszóma kristályosításánál mezofil baktériumok helyett halofil vagy termofil (sókedvelő vagy hőkedvelő) baktériumokból származó minta kristályosítása, 2009-ben kémiai Nobel díjat kaptak Ramakrishnan, Steitz és Yonath, ekkor már több, mint 120 szerkezet volt elérhető a fehérje szerkezeti adatbázisban ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)).

A különböző, gyakorlati szempontból érdekes genomok felderítése kapcsán több genomprojekt is elindult. Ezekhez kapcsolódóan szerkezeti genomikai kutatások indultak meg, melyek célja minél több újonnan azonosított fehérje szerkezetének a meghatározása röntgendiffrakcióval vagy NMR-rel. Bár hamar kiderült, hogy a fejezet elején említett okok miatt (natív fehérje előállítása, kristályosítás) a kiválasztott célfehérjék csak 2-8%-a jut el a szerkezet-meghatározásig (napjainkban ez a szám kb. 12%), a szerkezeti genomikai projektek nagyban hozzájárultak a fehérjekristallográfia elmúlt 20 évben bekövetkezett robbanásszerű fejlődéséhez: a fehérje előállítás nagy áteresztőképességű új módszereinek, és a kristályosítás automatizálásának és miniatürizálásának következtében nagy mértékben nőtt a vizsgálható fehérjék száma. A robbanásszerű fejlődés másik fő oka a szinkrotronsugárzás alkalmazásának és alacsony hőmérsékletű méréseknek a rutinszerűvé válása, automatizálása, aminek köszönhetően gyengén diffraktáló, nagy elemi cellával rendelkező vagy mikrokristályok, is vizsgálhatók.

Bár még napjainkban sem jósolható meg, milyen körülmények közt fog kristályosodni egy új fehérje, a felhalmozódott tapasztalat és nagy áteresztőképességű módszerek segítségével felállítható kristályosítási stratégia, nem pusztán próba-szerencse módszeren alapul a kristályosítás.

## 11.2. Hogyan növeljük fehérjénk kristályosodási hajlamát? Tisztítás, komplexek, új konstrukciók

Fehérjekristályok képződésének esélyét úgy növelhetjük, ha a mintánk nagy tisztaságú és tömény oldatából indulunk ki. Ez pufferrel beállított pH-jú, vizes oldatot jelent, hiszen a fehérje természetes közegbeni szerkezetéről szeretnénk információt kapni. Az oldat annyira legyen tömény, hogy stabilan eltartható legyen (ne aggregálódjon spontán a fehérje), de a kristályosító szer hozzáadásával megindulhasson a kristályosodás – ez általában kb. 10 mg/ml koncentrációt jelent, de gyakran ennél egy nagyságrenddel nagyobb, vagy kisebb. Az oldat kis koncentrációban tartalmazzon puffert (pl. 10 mM) és sót (100 mM vagy kevesebb), hiszen a pH megváltoztatásával és különböző sók hozzáadásával, az ionerősség befolyásolásával akarjuk kristályosodásra bírni a fehérjét. Olyan oldat összetevők (pl. foszfát puffer), amelyek a kristályosító oldatokkal maguk is sókristályt képezhetnek, kerülendők.

A tisztaság nagyon fontos kritérium, gyakran ezen múlik, hogy csapadék vagy kristályok képződnek az oldatunkból. A fehérjetisztítás során nemcsak idegen fehérjéktől kell megszabadulni, de a vizsgált fehérje változataitól is, ezek sokfélék lehetnek, általánosságban a fehérje konformációs heterogenitását (a molekulaalak sokféleségét) vagy a molekulafelszín megváltozását okozzák. Az ilyen molekulaváltozatoknak a kristályba épülése megtöri a rendezettséget, szélsőséges esetben meggátolhatja a már a kristálygócok kialakulását is, ehelyett nem specifikus aggregáció történik. Tehát olyan fehérjék esetén várhatjuk, hogy kristályosíthatók, amelyek stabil harmadlagos-negyedleges szerkezettel rendelkeznek, ez az ún. globuláris fehérjékre igaz. A kisebb méretű 20-40 aminosavas fehérjék, fehérjedomének esetén az oldatbeli hajlékonyság, konformációs változatosság miatt kisebb az esély a kristályosodásra. A természetesen rendezetlen fehérjék esetén (IUP, intrinsically unstructured proteins) esetén, a konformációs szabadsági fokok nagy száma lehetetlenné teszi, hogy a fehérjét önmagában kristályosítsák, azonban komplexeik, ahol egy globuláris partnerrel kialakított kölcsönhatás stabilizálja szerkezetüket, vizsgálhatók. Szennyeződésnek számít, ha a fehérjénk tartalmaz:

- Aminosav-szekvenciájukban különböző módosulatokat. (Ha nem rekombináns technikával állítottuk elő a fehérjét.)
- Poszttranszálciós módosítás következtében létrejött változatokat. (Gyakori probléma például a glikoziláció, melynek során heterogén összetételű és hosszúságú szénhidrátláncok kapcsolódnak a fehérjéhez, amelyeket specifikus hidrolízissel a kristályosítás előtt el kell távolítani.)
- Probléma lehet a fehérjeminta egy részének hidrolízise. (A rendszerben jelenlevő szennyező proteáz enzimek elhasíthatják a fehérjét, általában hajlékony hurokrégiókban, ami, bár esetleg a fehérjénk funkcióját, aktivitását nem befolyásolja, konformációs heterogenitást okozhat. Proteázgátlók hozzáadásával gyakran kiküszöbölhető a probléma, de előfordulhat, hogy szükség van a hasításra érzékeny hely mutációjára.)
- Konformációs változatokat, hibásan feltekeredett fehérjemolekulákat. Ezek, és az esetleg diszulfid hídban részt nem vevő ciszteinek növelik a nemspecifikus aggregációra való hajlamot. Előbbire megoldás lehet kis mennyiségű detergens (pl.  $\beta$ -oktil-glükopiranozid), utóbbira pedig redukálószer (pl. ditio-treitol) hozzáadása a kristályosítás során.
- A fehérjemolekulából csak néhány darabot tartalmazó aggregátumokat. Leggyakrabban dinamikus fényszórással vizsgálják, hogy ezeknek milyen a méreteloszlása – ha polidiszperznek bizonyul, vagyis többféle tagszámú aggregátum van a fehérjeoldatban, valószínűleg a

kristályosodási hajlamot kedvezőtlenül befolyásolja, ezért más konstrukció termelésével, komplexképzéssel

- A minta tartalmazhat szennyezésként egyéb fehérjéket, a fehérjéhez kötött molekulákat (pl. szénhidrátok, DNS darabok) amelyek heterogenitást okoznak, és amelyeknek az eltávolítása nehéz lehet, ha erős a kötődés.

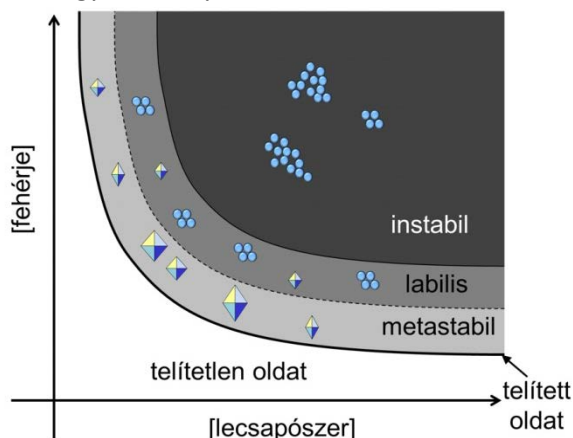
A fehérjék előállítására leggyakrabban rekombináns technikát alkalmaznak. Ennek előnyei, hogy gyakran nagy mennyiségű, fehérjét olcsóbban elő lehet állítani, vizsgálhatók a fehérje különböző fragmentumai, önálló doménjei, pontmutációk szerkezeti hatásai, és készíthetők szelena-metionin tartalmú kristályok, amelyek a fázisprobléma anomális szórás módszerével való megoldásához használhatók. További előny, hogy a fehérjelánc végére beépíthető His-tag (6 db. hisztidin) lehetővé teszi nikkkel oszlopon való affinitáskromatográfiás tisztítását. Az affinitáskromatográfiás lépést legtöbbször egyéb pl. ioncsere kromatográfiás lépések követik a fent említett heterogenitások kiküszöbölése céljából, a legutolsó kromatográfiás lépés gélszűrés. A rekombináns technika esetén azonban előfordulhat, hogy a fehérje nagy mennyiségben való termelése meghiúsul, mert pl. mérgező a sejtek számára, amelyekben termelődik, vagy nem sikerül a natív, helyesen feltekeredett formát előállítani (különösen nagy méretű fehérjék esetén).

### 11.3. A kristályosítási fázisdiagram fehérjéknél, kristályosítási módszerek és stratégiák

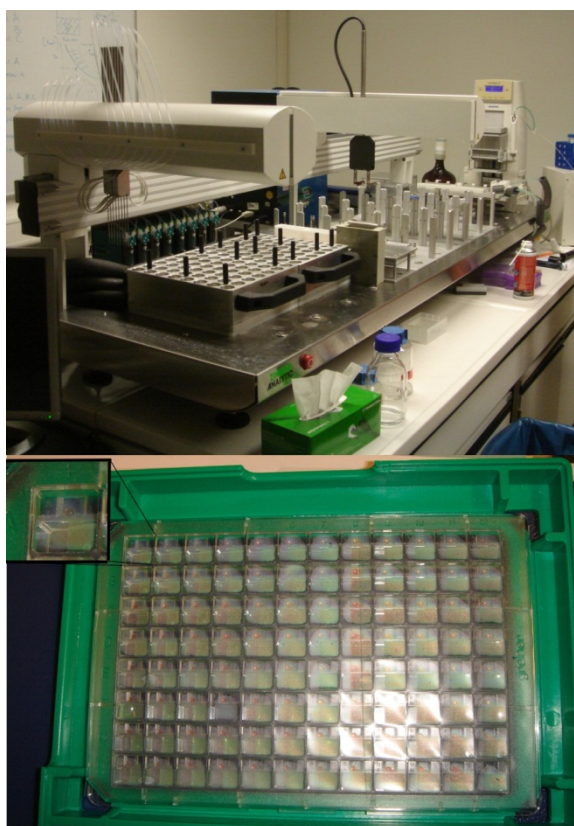
A fehérje kristályosodása sok tényező együttes hatásától függ: pH, hőmérséklet, a kristályosítószer vagy lecsapószer minősége és koncentrációja, az oldatban jelenlevő egyéb ionok vagy molekulák anyagi minősége és koncentrációja (puffer, adalékok, komplexképző ligandum, ionerősség), mikroszennyeződések. Ahhoz, hogy eredményes legyen a kristályosítás, a paramétereknek ebből a sokdimenziós teréből megfelelő módon mintát kell venni, azt fel kell térképezni (kristályosító oldatkészletek, „screen”-ek), majd az eredmények kiértékelése után (kristályosodási fázisdiagram) az ígéretes körülményeket optimalizálni kell.

A kristályosodási fázisdiagram (a 11.1. ábra egyszerűsített formáját mutatja be, ahol a paraméterek sokdimenziós teréből csak két dimenzió látható) termodinamikailag jól definiált régiókból áll. Ha a koncentrációk a telítetlen tartományban vannak, tiszta oldatot kapunk, illetve az oldatba juttatott kristályok oldódását tapasztalunk. A telített oldatot jelző görbének megfelelő körülmények között a kristályok egyensúlyban vannak az oldattal. A telítetlen tartományon belül a metastabil régióban a gócképződés nem indul meg kinetikai okok miatt, de a kristálygócok növekednek. A labilis tartományban gócképződés és kristálynövekedés is történik. Itt néhány molekulából álló aggregátumok jönnek létre, amelyek, ha rendezettek, a kristályképződés gócai lehetnek. A túlságosan gyors aggregálódás nagy mennyiségű, rendezetlen aggregátumot eredményez, ekkor a fehérje lecsapódását tapasztaljuk (instabil régió). Egyes esetekben nagy fehérjekoncentrációk esetén fázis szétválás tapasztalható: két folyadékfázis különül el, amelyek közül az egyikben dúsul a fehérje, a tapasztalat szerint itt is van esély a kristálykiválás megindulására. A kristályosítás során olyan körülmények kikísérletezésére törekszünk, ahol kevés góc képződik (így ugyanannyi fehérje nagyobb kristályokat eredményez), ezekből lassú folyamatban nőnek a kristályok (a növekedés kontrollálásával csökkenthető a kristályhibák mennyisége, befolyásolható a

kristályok morfológiája). Mivel sok körülmény kipróbálására van szükség, olyan módszerek terjedtek el, amelyek során kis mennyiségű fehérjeoldatra van szükség (1-4  $\mu$ l/körülmény). A fehérjeoldatot összekeverjük a kristályosító oldattal, általában 1:1 térfogatarányban (2-8  $\mu$ l-es csepp). Automatizáláskor (robottal végzett kristályosításnál) ennél kisebb térfogatokra: gőzdiffúziós és microbatch módszereknél minimum kb. 25 nl (pl. <http://www.ttplabtech.com/products/mosquito/> 11.2. ábra, 11.1.videó; <http://www.artrobbins.com/phoenix/>), szabad határfelületi diffúziós módszernél 10 nl ([http://www.fluidigm.com/home/fluidigm/docs/Datasheet\\_TOPAZ\\_System.pdf](http://www.fluidigm.com/home/fluidigm/docs/Datasheet_TOPAZ_System.pdf)). Az előbbi módszer korlátja a cseppek párologása a pipettázás közben, ami ilyen kis térfogatoknál jelentős lehet a csepp térfogatához képest, az utóbbié, hogy a kristályokat nem lehet kivenni a tartálykákból, ahol képződtek.



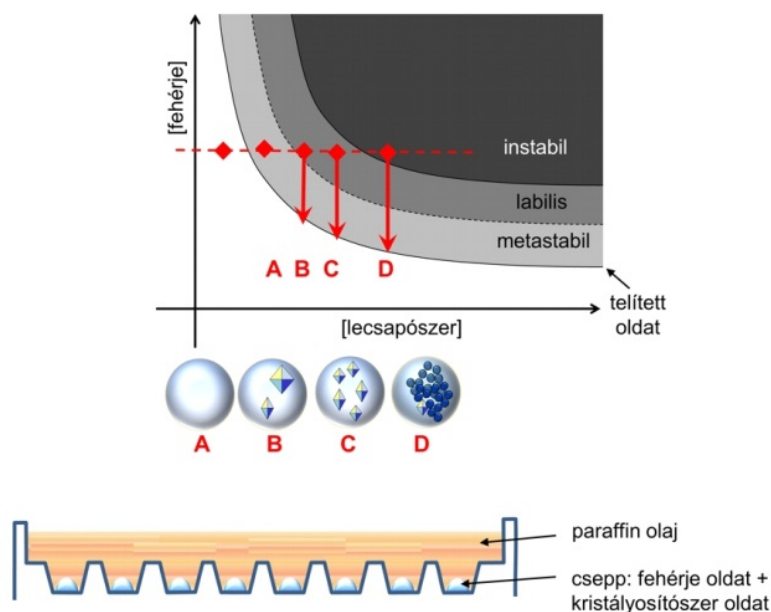
11.1. ábra. A kristályosodási fázisdiagram



11.2. ábra. Kristályosító robot ([www.embl-hamburg.de/facilities/htpx](http://www.embl-hamburg.de/facilities/htpx)), és 96 körülmény kipróbálására alkalmas kristályosító tálca (ülő csepp módszer)

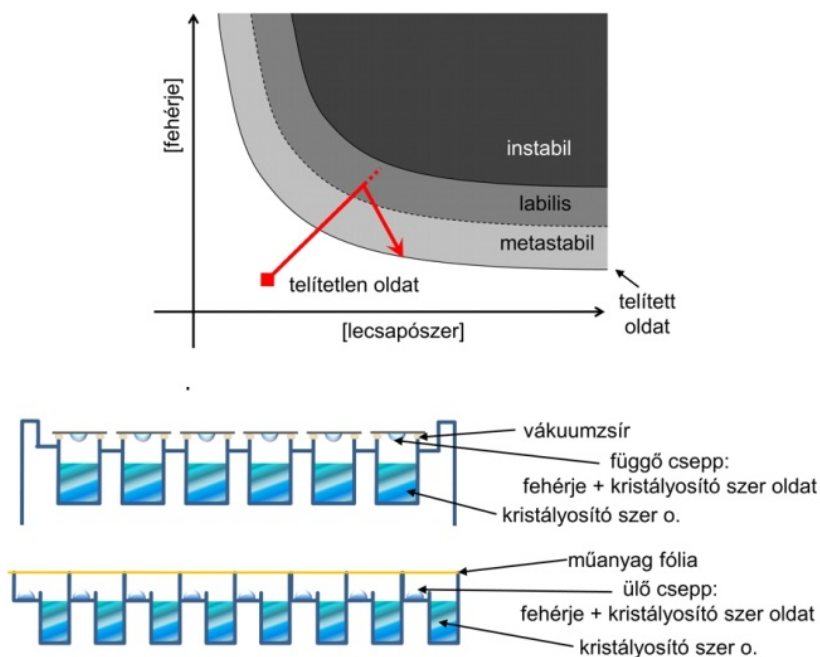
### 11.1. videó

Microbatch módszerek: a cseppet paraffinolaj réteg alatt állítjuk elő a kristályosító oldat, és a fehérjeoldat összekeverésével. A paraffin réteg meggátolja a csepp párolgását. Előnye, hogy egyszerűen összeállítható, automatizálható. Hátránya a többi módszerhez képest, hogy mivel az oldat nem fog töményedni a fehérjére vagy kristályosítószerre nézve, ha a fázisdiagram metastabil vagy telítetlen régiójában van, nem fognak kristályok képződni. Ennek kiküszöbölésére különböző fehérjekoncentrációkkal, vagy különböző fehérjeoldat/kristályosító oldat arányokkal párhuzamos kísérleteket célszerű végezni. (11.3. ábra)



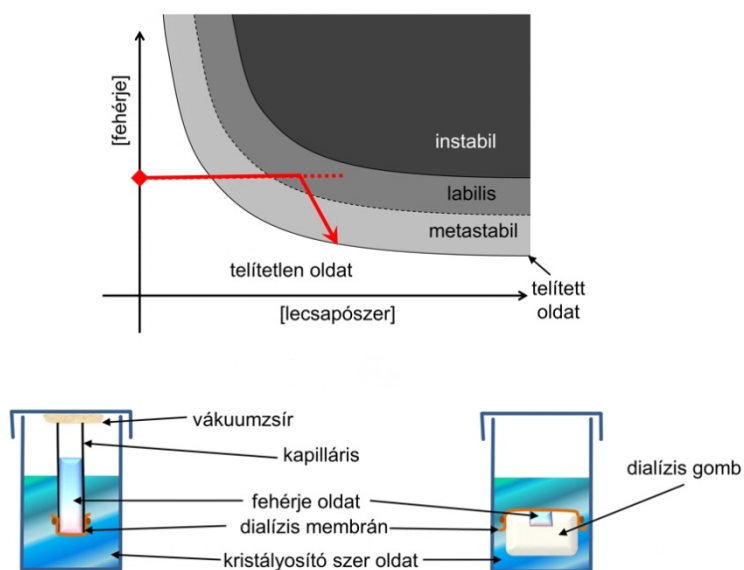
11.3. ábra Microbatch módszer

Gőzdiffúziós módszerek: a csepp itt is a fehérjeoldat és kristályosító oldat (pl. 1:1 térfogatarányú) elegye, ami egy lezárt edénykében a gőztérén keresztül kapcsolatban van a kristályosító oldattal (tároló oldat, reservoir), ami jelentősen nagyobb térfogatú (tehát a cseppben a kristályosítószer ekkor kb. feleakkora koncentrációjú, mint a tároló oldatban). A lezárt edénykében a két oldat fölötti gőznyomás kiegyenlítődik a gőztérén keresztül, ami általában az oldószernek a cseppből való távozását és a nagyobb térfogatú oldatba való jutását jelenti. A csepp lassan töményedik, így, ha eredetileg telítetlen volt, (vagy túltelített, de a fázisdiagram metastabil régiójában), eljuthat abba a tartományba, ahol megindul a homogén gócképződés, de csak kevés góc képződik. A függőcsepp módszernél a csepp az edényke tetejéről függ (előnye, hogy a kristályok lesüllyednek benne, ezért kevésbé tapadnak az üveglemezhez). Az ülő csepp módszernél a csepp egy emelvényen ül (előnye, hogy könnyebben automatizálható)- ez utóbbi alkalmazható, ha az oldat kis felületi feszültsége miatt szétfutna az üveglapon (pl. detergens, alkohol van benne). A körülményeket nem mindig sikerül átvinni egyik módszertől a másikba, mivel a gőznyomás a görbületi sugártól is függ. (11.4. ábra)



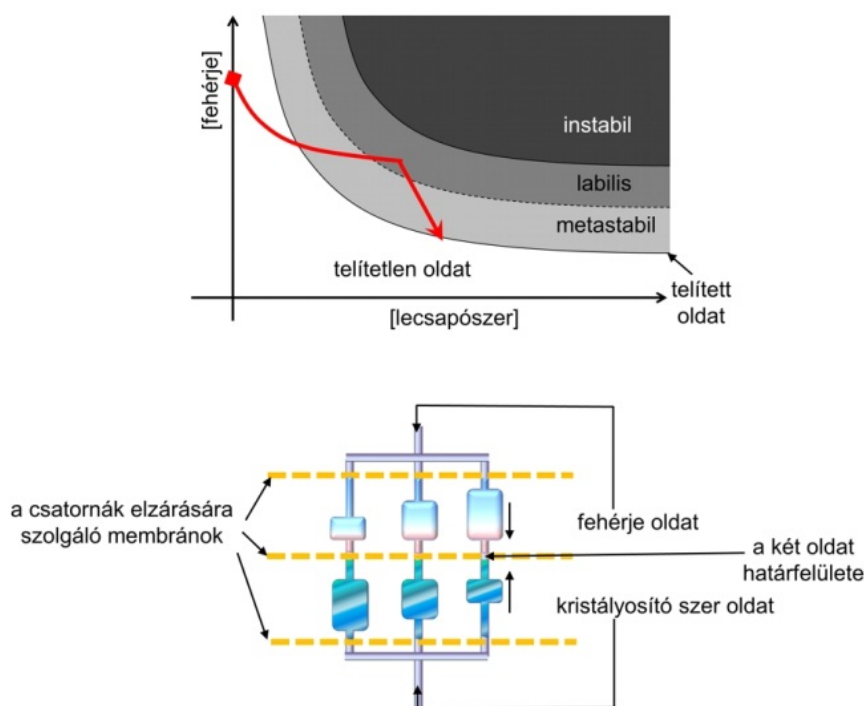
11.4. ábra Függő csepp és ülő csepp módszer

Kevésbé elterjedtek a dialízis módszerek, elsősorban a kísérlet bonyolultabb összeállítása miatt. A néhány  $\mu\text{l}$  fehérjeoldatot dialízis gombba vagy kapillárisba töltjük, majd nagyobb (ml) térfogatú kristályosító oldatba tesszük. A két oldat féligáteresztő hátyán keresztül érintkezik - ami fehérjemolekulák számára átjárhatatlan, de a kristályosítószer (pl. tömény sóoldat) bejut a fehérjeoldatba, és ott fokozatosan emelkedik a koncentrációja. A módszer kapillárisos változata hasznos, ha a kristályosítandó anyag veszélyes (pl. vírusok kristályosítása), mert a kapilláris lezárható, és a benne levő kristályokról lehetséges röntgendiffrakciós adatgyűjtés. (11.5. ábra).



11.5. ábra Dialízis módszerek

A szabad határfelületi diffúzió alapuló módszer a jelenleg elérhető módszerek közül a legkisebb oldattérfogatokat felhasználó automatizált módszer. A fehérjeoldatot és a kristályosító oldatokat a robot egy „chip”-be tölti, ahol ezek vékony kapillárisban érintkeznek, és a kísérlet elindítása után egymásba diffundálnak. A körülményeket párhuzamosan többféle fehérjeoldat/kristályosító oldat térfogataránnyal végzik, amit a kapillárisokhoz csatlakozó különböző méretű tartálykák biztosítanak. Az oldatok elosztását a chip csatornarendszerében keresztirányban futó vágatokban felfújható membrán biztosítja. A módszer a kis térfogatok miatt (csak kis kristályok nőhetnek), és amiatt, hogy a kristályok nem szedhetők ki a chipből (diffrakciós kép ugyan készíthető, de a chip fala árnyékol, és alacsony hőmérsékletű mérés nem kivitelezhető), a körülmények gazdaságos előzetes szűrésére alkalmas ez a módszer. (11.6. ábra)



11.6. ábra Szabad határfelületi diffúziós módszer

#### 11.4. Előzetes szűrés: minél több lehetőség kipróbálása gazdaságosan

Az, hogy a fehérjénk milyen körülmények között fog kristályosodni jelenleg nem jósolható, még annak ismeretében sem, hogy más homológ fehérjék esetén más ismertek a kristályosodás körülményei. Egy új fehérje kristályosításakor első cél a kristályosodást befolyásoló nagyszámú paraméter hatásának minél jobb feltérképezése minél kevesebb fehérjeoldat felhasználásával. Az ún. ritka mátrix, vagy hiányos mátrix módszer (sparse matrix) segítségével ebből a sokdimenziós térből veszünk mintát: olyan kristályosító oldatokat használunk, amelyek egymástól különböznek pH, ionerősség, a kristályosítószer minősége és koncentrációja, és a fehérje oldatbeli stabilizálását szolgáló só tekintetében. A kereskedelmi forgalomban többféle oldatkészlet (crystallization screen, általában 50, a robottal való kristályosításhoz való nagy áteresztőképességű, high throughput screen 96 oldatból áll) kapható, amelyek összeállításakor a fentiek



figyelembevételével olyan körülményeket válogattak össze, amelyek már beváltak fehérjék kristályosításakor, tehát nem véletlenszerűek a paraméterek. Az oldatok jellemzői:

- Széles pH tartományt fognak át (pl. 4,5-9,5). A viszonylag magas puffer-koncentráció (0.1 M) biztosítja, hogy a fehérjeoldattal összekeverve a kristályosító oldat határozza meg a pH-t.
- Lehetnek nagy ionerősségű oldatok („kisózás”), egy só tömény oldatai (pl. ammónium-szulfát).
- Vagy lehetnek alacsony ionerősségű oldatok, amikben a fehérje oldatbeli stabilizálását viszonylag kis koncentrációjú só szolgálja („besózás”), emellett nagy koncentrációban van jelen valamilyen, a fehérjemolekulák hidratáltságát csökkentő szer (ezek lehetnek pl. különböző méretű polietilén-glikolok, többértékű alkoholok).

Az előbb említett általános oldatkészleteken kívül lehet kapni olyan válogatásokat is, amik pl. speciálisan a membránfehérjékre (detergens válogatások), fehérje-fehérje komplexekre (nincsenek nagyon nagy ionerősségű oldatok, amik a komplex stabilitását csökkentenék), lecsapódásra hajlamosabb fehérjékhez (alacsonyabb koncentrációjú oldatok) lettek kifejlesztve vagy krio-körülményeket tartalmazó oldatkészlete (alacsony hőmérsékletű mérésre kész kristályokat kapunk ld. következő fejezet).

A kísérlet során, ha elég sok fehérjeoldat rendelkezésre áll, általában 2-3 oldatkészletet ki szoktak próbálni (kb. 2-300 csepp), akár többféle fehérjekoncentrációval, vagy fehérje oldat /kristályosító oldat aránnyal. A kísérletek előtt fontos meggyőződni róla, hogy a fehérjekoncentráció megfelelő-e: ha túl tömény, túl sok cseppből ki fog csapódni, ha pedig túl híg, esetleg minden cseppünk telítetlen lesz. Ehhez egy-egy cseppet állítunk össze tömény sóoldatot tartalmazó körülményekkel 2-3 pH-n (pl. 1,5M ammónium-szulfát), és tömény polietilén-glikol oldattal 2-3 pH-n (pl. 30 v/w% PEG 8000). A kiválasztott pH-k közül az egyik a fehérje izoelektromos pontja legyen, mert ezen a pH-n legkisebb az oldhatóság, mivel fehérjerészecskék semleges töltésűek. Jól megválasztott fehérjekoncentráció esetén a cseppekben néhány perc alatt még éppen nem képződik csapadék.

A ritka mátrix (vagy hiányos mátrix) oldatkészletek előnye, hogy jól bevált körülményeket tartalmaznak, hátrányuk viszont, hogy ezek a kristályosodási fázisdiagramon túlságosan elszórva helyezkednek el, nem minden esetben lehet az eredményekből általános következtéseket levonni a paraméterek kristályosodásra vonatkozó hatásáról. Egy lehetséges másik kiindulási stratégia során a paraméterek sokdimenziós terének egy kisebb részletét, de alaposabban térképezzük fel a legtöbb esetben bevált polietilén-glikol/só/puffer összetételű körülményeket: Néhányféle polietilén-glikolt és néhányféle sót tartalmazó oldatkészletekkel, amelyek ezeket pl. 3-5 különféle koncentráción tartalmazzák („peg-ion screen”). Ez utóbbi kísérlet kiértékelésekor jó eséllyel megbecsülhető a fázisdiagramon a metastabil és instabil kristályosodási zónák helyzete.

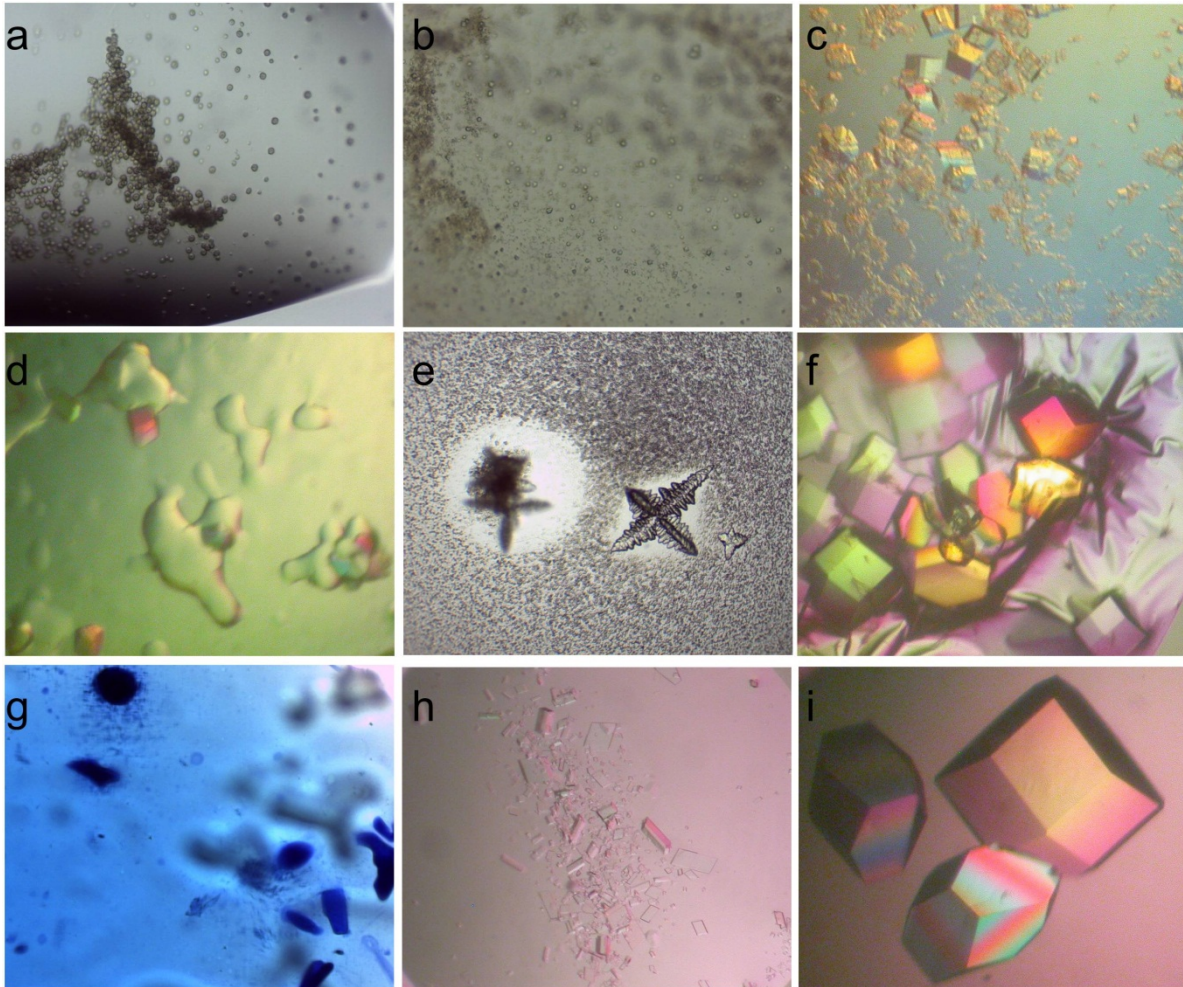
Elsősorban az előzetes szűrés során van egyre növekvő jelentősége a kristályosító robotok alkalmazásának, mivel ezekkel az egy körülmény kipróbálásához felhasznált fehérje oldat mennyiségét a  $\mu$ l mérettartományból a nl (vagy 10 nl) mérettartományba csökkenti. Ezzel a módszerrel tehát a sokkal takarékosabban tudunk nagyon sok körülményt kipróbálni, emellett a nagyszámú kristályosodási kísérlet folyamata automatizált és programozott módon nyomonkövethető. Lehetséges az ígéretes körülmények optimalizálása is robotokkal, de általában ekkor már célszerű nagyobb oldattérfogatokkal dolgozni, hogy nagyobb, mérésre alkalmas méretű kristályokat kapjunk. Kristályosító robotokkal a dialízis módszeren kívül mindegyik bemutatott kristályosító elrendezés megvalósítható (néhány kristályosító robot: <http://rigakuautomation.com/> ; <http://www.ttplabtech.com/products/mosquito/applications-hts.html> ; <http://www.fluidigm.com/topaz-system.html>). A robotok fő egységei (pl. az ülőcsepp módszer példáján):

1. kristályosítási körülmény összeállítása és a kristályosító tálcába pipettázása; 2. cseppek összeállítása; 3. a kristályosító tálcák termosztálása, és a kristályosodás programozott nyomonkövetése (fotók készítése a cseppekről, adatbázisban való tárolása és a kiértékelés segítése számítógépes programmal). A nagy fehérjekristallográfiai infrastruktúráknál található robotok külső kutatók által is igénybe vehetők.

## 11.5. Mi van a cseppben? A kísérletek értékelése

A kísérlet kiértékelésekor a cseppeket bizonyos időközönként vizsgáljuk (pl. a közvetlenül a kísérlet összeállításakor, utána pár napig naponta, majd 2-3 naponta, végül hetente). Előfordulhat, hogy a kinövő kristályok később tönkremennek vagy visszaoldódnak (pl. a pH változása miatt). Ha csak több hét után nőnek ki a kristályok, az arra utalhat, hogy nem a kiindulási fehérjemolekula kristályosodott ki, hanem valamilyen kémiai reakció eredménye (pl. hidrolízis terméke). A kísérleteket táblázatosan értékeljük, gyakran pontozzuk.

Néhány jellegzetes eredmény a 11.7. ábrán látható. Tiszta csepp: az oldat telítetlen, vagy metastabil túltelített. Fázis szeparáció (cseppecskék az oldatban vagy felszínén), vagy gélképződés (amorf formájú áttetsző fázis): nagy fehérje-koncentrációknál, túltelített oldatból alakul ki, lehetséges, hogy a fehérje kristályosodik valamelyik folyadékfázisból. Amorf csapadék: labilis tartomány (gyakran barna színű, ami arra utal, hogy a fehérje egy része denaturálódott is). Szintén denaturálódott fehérjét tartalmaz a csepp felszínén megjelenő bőr. Mikrokristályos csapadék (kettőstörést mutat) vagy atipikus csapadék (nem egyenletes eloszlás, csomósodások): van esély rá, hogy a fehérje vagy kristályosítószer koncentrációjának csökkentésével a fázisdiagram instabil régiójába jutunk. Szfeluritok, „tengeri sünn”: egy gócból kiinduló sok kristály, a fehérje oldhatóságának növelésével hasonló körülményekből egykristályokat kaphatunk. Kristályok: tű, lap vagy mindhárom dimenzióban nagyobb kiterjedésű – mivel a szórt intenzitás arányos a kristálytérfogattal, ez a morfológia a legkedvezőbb. A tiszta oldat, „bőr” és amorf csapadék kivételével a cseppeket meg lehet próbálni csíráztatásra felhasználni. Gyakori jelenség az Ostwald-érés (Ostwald ripening), ennek során a kisebb kristályok (vagy mikrokristályos csapadék) idővel oldódik, és a nagyobb kristályok még jobban megnőnek (11.7. ábra).



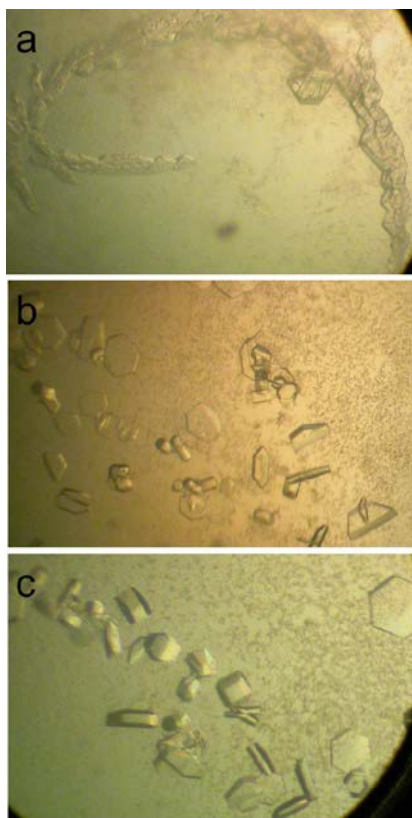
11.7. ábra. A kristályosítási kísérletek néhány jellegzetes eredménye. a: Szfelluritok, b: Mikrokrisztályok és atipikus csapadék, c: Krisztályok, mikrokrisztályos csapadék, d: Fázis szeparáció, egykrisztályok, e: Ostwald-érés (ikres krisztályok, csapadék), f: Bőr, krisztályok, g: Metilénkéssel megfestett krisztályok és csapadék, h: „Streak seeding”, krisztályok a beoltás vonala mentén, i: Vastag krisztályok képe polarizációs szűrőkkel felszerelt mikroszkópban (kettőtörés, c,d,f és h képek is így készültek)

Annak az eldöntésére, hogy a cseppben lévő objektum fehérjekristály, sókristály vagy pl. üvegszilánk-e, többféle módszer létezik, amelyek közül csak a diffrakciós kép készítése a biztos, ezt azonban nagyon kis mikrokrisztályoknál nem tudjuk alkalmazni. Általában több módszert együttesen alkalmaznak: A krisztályok éllel és sarkokkal rendelkeznek, míg az üvegszilánk íves. Legtöbb krisztály optikailag anizotróp (kivéve pl. a köbös krisztályrendszerben krisztályosodó anyagok), ez szintén felhasználható krisztályok azonosítására akár sűrű csapadékos oldatban is (vékony lapocskák esetén nem biztos, hogy észrevehető az effektus). Ha a krisztályt megpróbáljuk egy tűvel eltörni, és nehezen sikerül, a krisztály kemény, akkor sókristályról van szó, ha könnye törik, puha, kis mechanikai hatásra szétmorzsolódik, akkor fehérjekristály. Ha a mikroszkóp UV lámpával felszerelt, használható a fehérjében található triptofán 280nm-en észlelhető fluoreszcenciája. A fehérjekristályok megfesthetők különféle festékekkel (pl. metilénkék), azonban, ha a krisztály túl vékony, vagy a fehérjemolekulák szoros illeszkedése miatt nem tud az oldószer-csatornába bediffundálni a festék nem látunk megfestődést. Figyelembe kell venni, hogy az oldatból a festék is kikristályosodhat. Kevésbé megbízható módszer a krisztályok mosás utáni feloldása, majd gélelektroforézissel való azonosítása –itt az anyalúggal (a fehérjeoldattal) való kis szennyeződés pozitív eredményt adhat.

Ha az első kristályosító szűrés során találtunk ígéretes körülményeket (kristályok, mikrokristályos csapadék, de lehet próbálkozni fázis szeparáció vagy nem tipikus csapadék esetén is), ezek optimalizációja, körbejárása következik. Ha a kezdeti szűrés nem járt sikerrel, lehet más hőmérsékleten próbálkozni, kevés detergenssel a nonspecifikus aggregátumok képződését gátolni, de el kell gondolkozni a tisztítás javításán, esetleg új fehérjekonstrukciók előállításán: hajlékony régiók levágása, a fehérjefelszín módosítása (kristálykontaktusok kiépítése, fehérjefelületi entrópia csökkentése), kristályosítást elősegítő fehérjével fúzióban vagy komplexben (pl. specifikus antitest), poszttranszlációs módosítások kiküszöbölése.

## 11.6. A kristályosítási körülmények optimalizálása

Az ígéretes körülmények optimalizálása során cél lehet a kristályok méretének növelése (kevesebb kristálygócból nagyobbra nőnek), ikres kristályok helyett egykristályok növesztése, a kristálymódosulat vagy morfológia megváltoztatása. A paramétereket (koncentrációk, pH, hőmérséklet) változtatva a fázisdiagram feltérképezése a vizsgált körülmény körül, melyek a gócképződést/növekedést leginkább befolyásoló tényezők. Az eredmények figyelembevételével sokszor sikerül olyan körülmény beállítása, ahol az instabil régióban csak kevés góc képződik, amelyek aztán nagyobbra nőnek. Más esetekben ez nem érhető el, de csíráztatásos módszerekkel, a gócképződés és gócnövekedés különválasztásával már igen. (11.8. ábra)



11.8. ábra. A kristályosítás optimalizálása. A kiindulási körülmények (a) csapadékos oldatban kis, ikres kristályok tömegét eredményezték, ami túl sok góc képződésére és túl gyors növekedésükre utal. A körülmények optimalizálásával (b, kristályosítószer koncentráció csökkentés, pH és fehérje/kristályosítószer térfogatarány növelése) különálló, de vékony egykristályokat kaptunk. A beoltott vastagabb kristályok képződtek (c, streak seeding).

A legelterjedtebb csíráztatásos módszerek a következők: „Streak seeding” (vonallal mentén való csíráztatás): A rossz minőségű vagy túl kicsi kristályok felszínéről túvel (vagy macskabajusszal) néhány kristálygócot leválasztunk, majd a túvel végigsimítjuk egy olyan csepp felszínét, amely a tároló oldattal már koncentrációs egyensúlyba jutott, de még nem képződtek benne göcök (metastabil koncentrációtartomány). Így a vonal mentén bejuttatott kristálycsírák fognak növekedni. Célszerű egy sorozatban több cseppet beoltani. Mikrocsíráztatás (microseeding): Hasonló az előző módszerhez, de mivel sokkal kevesebb kristálycsírárt viszünk át az új cseppbe, nagyobb kristályok nyerhetők. A rossz minőségű kristályokat összetörjük, és egy olyan nagyobb térfogatú (pl. 50 µl) oldatban felvesszük, amiben nem oldódnak (ez a lépés kritikus). Ezután kis fordulatszámra lecentrifugáljuk, hogy a folyadék felső rétegében csak néhány molekulából álló „darabkák”, kristálycsírák maradjanak, majd ebből a felső rétegből végezzük az új cseppek beoltását a túvel. Makrocsíráztatás (macroseeding): Ha kis méretű egykristályaink vannak, ezek felszínének óvatos visszaoldása után átvihetők egy új, metastabil koncentrációtartományban lévő, a tároló oldattal már egyensúlyba jutott cseppbe. A visszaoldásra azért van szükség, mert kiépült kristálylapok esetén új molekularéteg beépülése nagy aktiválási energiát igényel. Gyakran előfordul, hogy a cseppbe véletlenül belekerülő idegen anyagból (porszem, szál) indul meg a kristálynövekedés. A kereskedelmi forgalomban is kapható idegen göcként használható anyag (megfelelő pórusméretű szilikát).

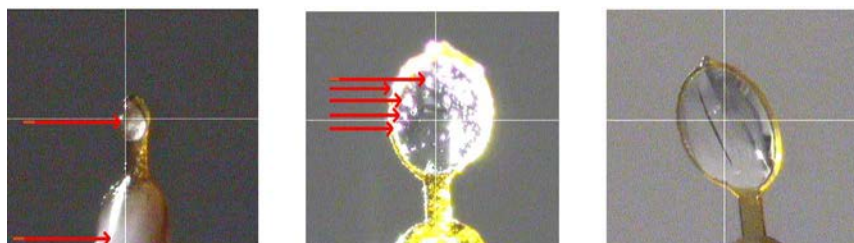
Különböző, kis mennyiségben adott adalékokkal befolyásolhatjuk a kristály morfológiáját (a különböző irányokba való növekedés relatív sebességét) és stabilizálhatunk egy kristályformát a másikkal képest, befolyásolhatjuk a fehérje oldhatóságát. Ezek lehetnek ligandumok, kofaktorok amelyek befolyásolhatják a fehérje konformációját (pl. ATP); oldhatóságot befolyásoló anyagok (detergensek, egy vagy többértékű alkohokok, kaotrópok stb.); redukálószer (a diszulfidhidak szétbontása), különböző sók (az ionok beépülnek a kristályba, és részt vesznek a molekulák közötti kapcsolatokban – attól függően, hogy az adott pH-n a fehérje milyen töltésű, a kation vagy az anion lecserélésére érdemes próbát tenni).

Membránfehérjék esetén gyakran nehézségbe ütközik a 3 dimenzióban kiterjedt kristályok előállítás. A membránból kilógó rész módosításán, potenciális kristálykontaktusok kiépítésén kívül a kristályosító közeg megfelelő megválasztása, a lipidfázist alkotó molekulák arányának beállítása is áttörést hozhat. Bár a fehérjét micellákba ágyazva adják a kristályosítási körülményhez, a kristályosító oldat tartalmazhat 3 dimenziós lipidfázist is, amelybe aztán beágyazódnak a fehérjemolekulák (pl. lipid habfázis, köbös lipidfázis), így segítve elő a 3 dimenziós kristályok képződését.

Ha az oldat töményedését lassítani tudjuk (gőzdiffúziós módszer) kevesebb göc képződhet, és nagyobb kristályokat kaphatunk. Ez elérhető a tároló oldatra olajkeverék rétegezésével (a paraffinolaj a vízgőz számára nem átjárható, a szilikonolaj: átjárható, a kettő keverési aránnyal befolyásolni tudjuk a vízgőz-csere sebességét). A kristálynövekedés lassítható a csepp viszkozitásának növelésével (pl. glicerin), vagy a cseppben gél létrehozásával (agaróz, az oldatbeli kondukciót megakadályozza, nem engedi lesülyedni a kristályokat), így nagyobb, tökéletesebb kristályokat kaphatunk.

Mivel napjainkban a röntgendiffrakciós adatgyűjtés legtöbbször alacsony hőmérsékleten történik, a kristályokat olyan oldatból kell a méréshez felvenni, amiben a mérés hőmérsékletére (100 K) való gyors lehűtés közben nem képződnek jégkristályok (krio védőoldat, krio oldat). Ha a kristályosító szer nem ilyen tulajdonságú, fagyálló adalékok adagolásával (többértékű alkohokok vagy kis molekulatömegű polietilén glikol) tudunk krio oldatot előállítani, majd mérés előtt ebbe áztatjuk a kristályt. Azt, hogy mennyi adalék

szükséges, próbálgatással lehet meghatározni (11.9. ábra). Minél jobban hasonlít a krio oldat az anyalúgra, annál nagyobb az esély, hogy a kristály nem károsodik áztatáskor a hirtelen koncentrációváltozáskor bekövetkező „ozmotikus sokk” miatt (a kristályban a fehérjemolekulák közötti oldószer-csatornáknak az oldat gyors áramlása). Az ozmotikus sokk csökkenthető a krio adalék koncentrációjának fokozatos növelésével (pl. áztatás oldatsorozatba), esetleg a fehérjemolekulák között kovalens kötések kiépítésével (glutáraldehid segítségével).



11.9. ábra Krio oldat tesztelése hideg nitrogén gázáramban. A baloldali oldat nem megfelelő, benne (mikrokristályos) jég képződött, ami fehér, nem átlátszó. A középső ábrán a cseppecske felszínén répződtek jégkristályok. (A kristályos jégfázist piros nyilak jelölik.) A jobboldali krio oldat megfelelő, a 100K nitrogénáramban amorf szilárd vízfázis keletkezett (átlátszó; a közepén a fehérjekristály).

## Teszt

## 12. A fázisprobléma megoldása fehérjék esetén, MIR, MR, MAD alapjai (Harmat Veronika)

### Irodalom

Jan Drenth, Jeroen Mesters: Principles of Protein X-Ray Crystallography, Springer

Patterson-függvény, Patterson módszerek:

- [reference.iucr.org/dictionary/Patterson\\_methods](http://reference.iucr.org/dictionary/Patterson_methods)
- [www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte\\_07\\_3-en.html](http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte_07_3-en.html)
- [bstr521.biostr.washington.edu/PDF/2011%2009%20BSTR521%20Pattersons%20v01.pdf](http://bstr521.biostr.washington.edu/PDF/2011%2009%20BSTR521%20Pattersons%20v01.pdf)

Izomorf helyettesítés:

- [www.ccp4.ac.uk/dist/share/ccp4i/help/modules/appendices/ir-bathtutorial/irbath98.html](http://www.ccp4.ac.uk/dist/share/ccp4i/help/modules/appendices/ir-bathtutorial/irbath98.html)
- [www.bioc.rice.edu/~bios482/Xtal\\_PPT/lecture8.pdf](http://www.bioc.rice.edu/~bios482/Xtal_PPT/lecture8.pdf)
- [esilrch1.esi.umontreal.ca/~syguschj/cours/BCM6200/BCM6200\\_Pawelek\\_Lecture1\\_2012.pdf](http://esilrch1.esi.umontreal.ca/~syguschj/cours/BCM6200/BCM6200_Pawelek_Lecture1_2012.pdf)

Anomális szórás módszere:

- [skuld.bmsc.washington.edu/scatter/AS\\_index.html](http://skuld.bmsc.washington.edu/scatter/AS_index.html)
- <http://www.gwyndafevans.co.uk/thesis-html/Thesis.html>

Molekuláris helyettesítés:

- [xray0.princeton.edu/~phil/Facility/Guides/MolecularReplacement.html](http://xray0.princeton.edu/~phil/Facility/Guides/MolecularReplacement.html)
- [www.ysbl.york.ac.uk/refmac/ACA\\_workshop/Ronan.ppt](http://www.ysbl.york.ac.uk/refmac/ACA_workshop/Ronan.ppt)
- A kristály oldószertartalma, és a Matthews koefficiens:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2323984/>,  
[http://www.ccp4.ac.uk/html/matthews\\_coef.html](http://www.ccp4.ac.uk/html/matthews_coef.html)

Sűrűségmódosító módszerek:

- [www-structmed.cimr.cam.ac.uk/Course/DenMod/index.htm](http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/Course/DenMod/index.htm)

## 12.1 Fázisprobléma megoldás – a fehérjeszerkezetből és méretből következő sajátságok

A fehérjék esetén általában a direkt módszerek önmagukban nem alkalmazhatók a fázisprobléma megoldására, a felbontás legtöbbször gyengébb, mint atomi felbontás, de az atomok számának növekedésével a direkt módszerek hatékonysága rohamosan csökken (alkalmazhatók viszont részszerkezet: a molekulához kötött nehézatomok vagy anomálishan kötött atomok összességének meghatározására a 12.2 és 12.3. fejezetben tárgyalt módszereknél). A globuláris fehérjék fontos tulajdonsága viszont a stabil térszerkezet, ami egyrészt lehetővé teszi a kristályosíthatóságot (11. fejezet), másrészt kihasználható a fázisprobléma megoldása során: általában a fehérje konformációja, eltekintve a felszíni aminosav oldalláncoktól, nem változik különböző kristályformák között, sőt hasonló aminosav szekvenciájú fehérjék konformációja - térszerkezete - is hasonló: ezt használja ki a molekuláris helyettesítés (12.5. fejezet). A globuláris „gömbszerű” molekulák közötti résekben ligandumokat tudunk a molekulákhoz juttatni a kristályban, ahol azok megkötődnek, így ún. származék kristályok állíthatók elő az izomorf helyettesítés módszeréhez (12.3 és 12.4. fejezet). Bár itt részletesen nem tárgyaljuk, a vírusrészecskék kristályainak szerkezetmegoldásánál is azt használják ki, hogy a burkoló fehérjék sok, gyakorlatilag egyforma konformációjú nemkrisztallográfiai szimmetriamásolata alkotja a vírus külső burkát (kapszid).

## 12.2. A Patterson-függvény

A Patterson-függvény segítségével információt nyerhetünk az atom-atom vektorokról a fázisok ismerete nélkül. Az Arthur Lindo Patterson által 1934-ben felfedezett függvény és módszer tette lehetővé bonyolultabb molekulászerkezetek megoldását a direkt módszerek felfedezése előtt.

A Patterson-függvény fázisok nélkül, szerkezeti tényező amplitúdó négyzetekkel végrehajtott Fourier összegzés (12.2.1. ábra):

$$P(\mathbf{u}) = 1/V \sum_{\mathbf{h}} F^2(\mathbf{h}) \cos(2\pi\mathbf{h}\mathbf{u})$$

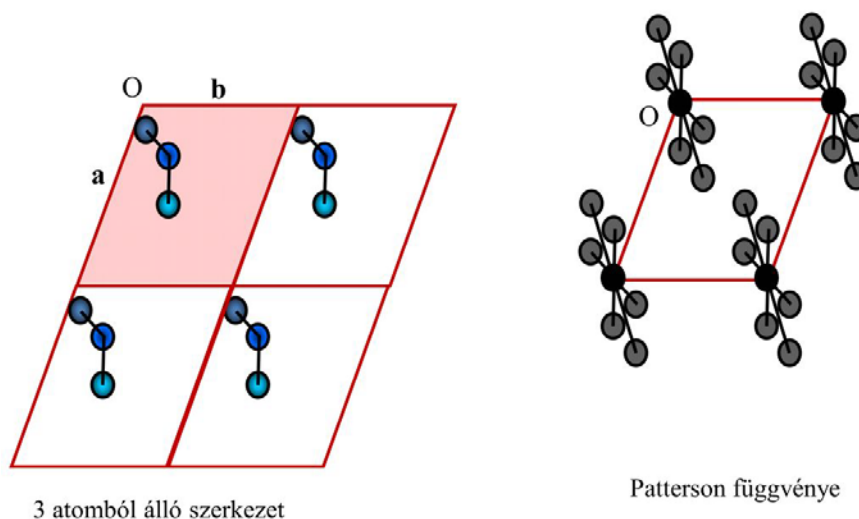
12.2.1. ábra. Patterson-függvény kifejezése a szerkezeti tényezőkkel

Átalakítható az alábbi formává (12.2.2. ábra):

$$P(\mathbf{u}) = \int_{\mathbf{x}} \rho(\mathbf{x})\rho(\mathbf{x} + \mathbf{u}) d\mathbf{r}$$

12.2.2. ábra. Patterson-függvény kifejezése az elektronsűrűségi függvénnyel

Tehát a Patterson-függvénynek egy  $\mathbf{u}$  helyen maximuma van, ha az  $\mathbf{u}$  vektor megfelel a szerkezetben valamely atom-atom vektornak. Ha  $\mathbf{u}$  nem felel meg atom-atom vektornak a szerkezetben, akkor az  $\mathbf{u}$  helyen gyakorlatilag 0 a Patterson-függvény értéke (12.2.3. ábra).



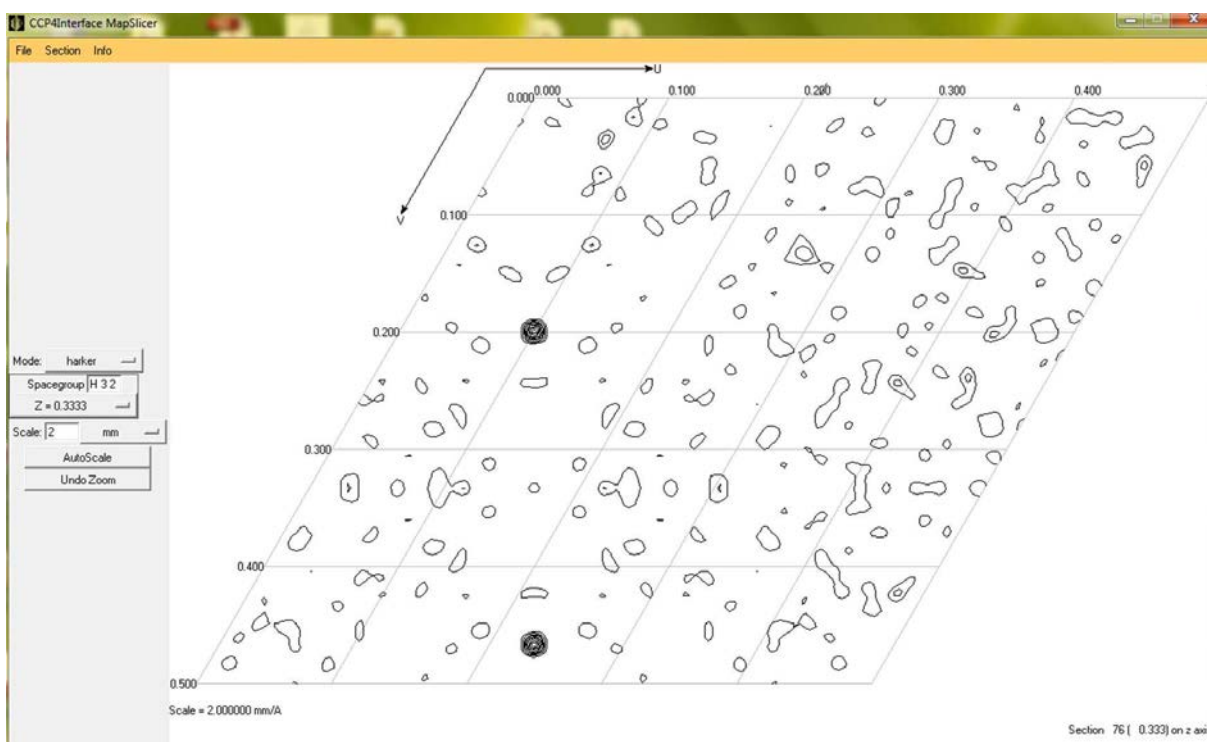
12.2.3. ábra. Három atomos szerkezet (egy elemi cella rózsaszínnel kiemelve) és Patterson-függvénye (szintén periodikus)

A Patterson-függvény tulajdonságai:

- Centroszimmetrikus (A atomból B atomba és B-ből A-ba mutató vektorok is megfelelnek 1-1 maximum). Királis szerkezet esetén elvesz az az információ, hogy melyik enantiomert tartalmazta a kristály.
- $N$  atomot tartalmazó szerkezet esetén a Patterson csúcsok száma  $N^2-N+1$  (minden atomból minden atomba mutat vektor, ezek közül  $N$  db. Patterson-vektor hossza 0: az atomokból önmagukba mutató vektorok). Következmény: közvetlenül csak nagyon egyszerű, kevés atomból álló szerkezet megoldására alkalmas.



- Az maximumok nagysága (integrálja) arányos a két atom elektronsűrűségének szorzatával. A csak néhány nehéz atomot tartalmazó szerkezetekben a nehézatom-nehézatom vektoroknak megfelelő így csúcsok kiemelkednek a többi Patterson maximum erdejéből (pl.: Hg-Hg atom-atom vektor esetén a Patterson-függvény megfelelő maximumának magassága  $80 \cdot 80 = 6400$ , C-C vektor esetén  $6 \cdot 6 = 36$ ). Ezt használja fel a Patterson módszer és az izomorf helyettesítés módszere a nehézatomok helyzetének meghatározására.
- Ha a kristályban forgás- vagy csavartengelyek vannak, akkor a Patterson-függvényben forgástengelyek vannak; ha pedig tükör- vagy csúszósíkok akkor a Patterson-függvényben tükörsíkok.
- A Patterson-függvény csúcsai a Harker szekciókban koncentrálnak (David Harker, 1935). Kristálybeli csavar- vagy forgástengely esetén Harker síkokban (12.2.4. ábra), kristálybeli tükör- vagy csúszósík esetén Harker vonalakban.



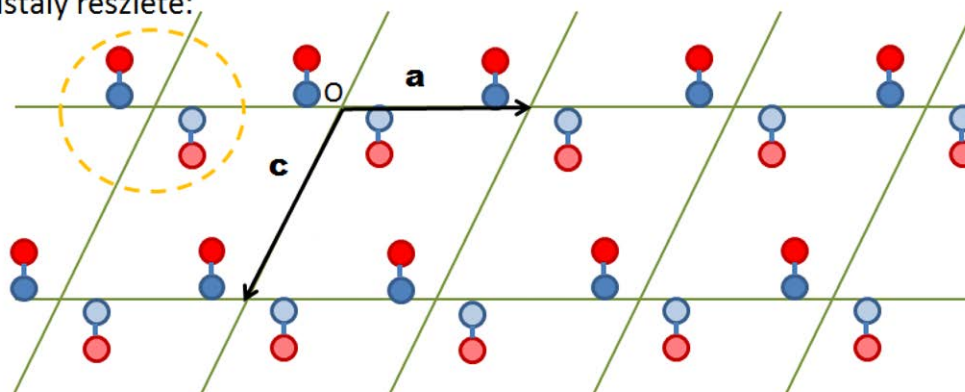
12.2.4. ábra Harker sík a  $z=1/3$  pozícióban. Az aszimmetrikus egység egy uranil iont tartalmaz, a Harker csúcsok (frakcionális) koordinátái  $(0,100, 0,200, 1/3)$  és  $(0,233, 0,468, 1/3)$ . Ebben a tércsoportban (H 3 2) Harker csúcsok vannak a  $(x+y+2/3, 2y-x+1/3, 1/3)$  és  $(2x-y+2/3, x+y+1/3, 1/3)$  pontokban. Felhasznált programcsomag: [CCP4](#).

A következő példa szemlélteti a Harker szekciók jelentőségét: az itt található csúcsok szimmetria ekvivalens atomok közti Patterson-vektoroknak felelnek meg, a szimmetria operátor ismeretében a nehézatom koordináták kiszámíthatók:

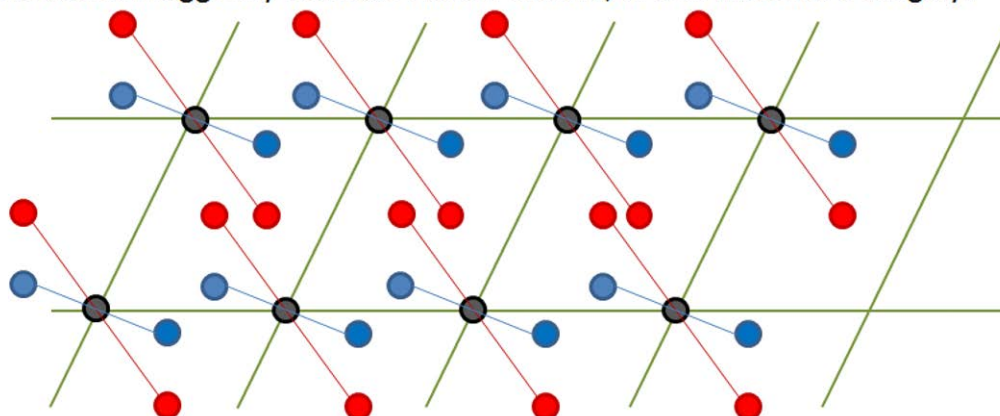
- $P2_1$  tércsoport, az origón átmenő kétfogású csavartengely,  $\mathbf{b}$ -vel párhuzamos. Szimmetria ekvivalens atomi pozíciók: Atom1:  $(x,y,z)$  és Atom2:  $(-x,y+1/2,-z)$ . Patterson-vektorok:  $(x,y,z)-(-x,y+1/2,-z)=(2x,1/2,2z)$  és  $(-x,y+1/2,-z)-(x,y,z)=(-2x,1/2,-2z)$ . A Harker sík  $+1/2$ -ben metszi a  $b$  tengelyt, és az eredeti atom két koordinátája ( $x$  és  $z$ ) meghatározható a Patterson-vektor

koordinátáinak felezésével. (Azonban lehet, hogy invertált szerkezetet kapunk:  $x$  és  $z$  helyett  $-x$  és  $-z$ ). (12.2.5. ábra)

A kristály részlete:



A Patterson függvény részlete: Harker szekció,  $\frac{1}{2}$ -ben metszi a b tengelyt



12.2.5. ábra Harker szekció bemutatása egyszerű szerkezetre: tércsoport  $P2_1$ , a  $b$  tengely, és a vele párhuzamos csavartengelyek az ábra síkjára merőlegesek. A kristály részletének ábráján a világosabb színnel jelölt molekulák  $b$  irányban  $\frac{1}{2}$  cellaéllal el vannak tolva (másik réteget képeznek), mint a sötétebb színű szimmetria ekvivalens atomjaik. A szaggatott vonallal körülvett részlet atompárjainak megfelelő Patterson-csúcsokat piros és kék segédvonalak kötik össze a Patterson térképen (Harker szekció: a  $b$  tengelyre merőleges, azt  $\frac{1}{2}$ -ben metsző sík). A Patterson-függvényben csak az origóban megjelenő csúcsot (szürke) és a Harker csúcsokat (piros atomok: piros; kék atomok: kék) jelöltem.

### 12.3. Izomorf helyettesítés

Ha a vizsgált molekulához hasonló szerkezet, amit a molekula kiindulási modelljeként tudnánk használni (ha nem ismert olyan szerkezet, amelynek aminosav sorrendje a vizsgált fehérjemolekulával legalább 25-30%-ban megegyezik, ld. 12.5. fejezet: fázisprobléma megoldása molekuláris helyettesítéssel), még nem ismert az izomorf helyettesítést alkalmazzák a fázisprobléma megoldására.

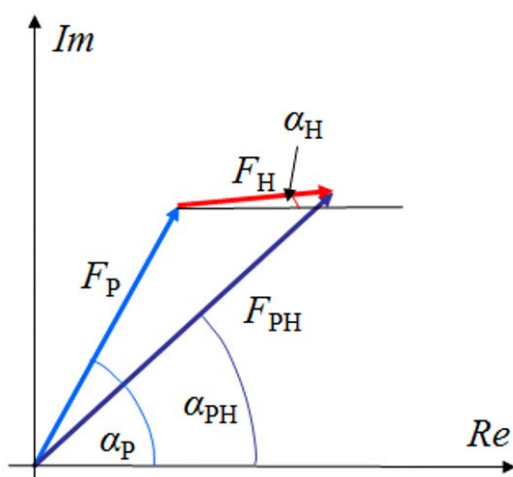
Szükséges:

- Általában egy vagy több nehézatommal (vagy anomálishan szóró atommal)-képzett származék kristály a fehérjekristályon („natív” kristályon) kívül.

- A származék kristályoknak és a natív kristálynak izostrukturálisnak (régii névvel izomorfoknak) kell lenniük: a fehérjemolekula konformációja, helyzete az elemi cellában, a kristályszimmetria és a cellaparaméterek ne változzanak a nehézatom megkötésének hatására.
- A nehézatomok a kristályban néhány jól definiált helyen, magas betöltöttséggel kötődjenek. Ezeknek az atomoknak a szórási hozzájárulása hatására a szerkezeti tényezőben okozott változást használják ki a natív kristály fázisainak meghatározására.

A módszer tulajdonképpen több rokon módszer összessége, elnevezésükben szerepel pl., hogy egy vagy több származékot használtak fel a fázisprobléma megoldásához, és a kristályba bevitt atomok „nehéz”-ségét (a módszer szempontjából az a fontos, hogy nagy elektronszámát) vagy anomális szórását (ld. 12.4. fejezet) használták fel. MIR (multiple isomorphous replacement): többszörös izomorf helyettesítés, SIR (single isomorphous replacement): egyszeres izomorf helyettesítés, MAD (multi-wavelength anomalous diffraction): több hullámhosszon mért anomális diszperzió, SAD (single-wavelength anomalous diffraction): egy hullámhosszon mért anomális diszperzió, MIRAS (multiple isomorphous replacement with anomalous signal): többszörös izomorf helyettesítés anomális szórás felhasználásával, SIRAS (single isomorphous replacement with anomalous signal): egyszeres izomorf helyettesítés anomális szórás felhasználásával, RIP (radiation induced phasing): a röntgensugár-okozta kristálybomlás felhasználása. Ez utóbbi esetben a kristályban adatgyűjtés közben bekövetkező, gyakran jól definiált helyeken bekövetkező változások (pl. savas oldalláncok dekarboxileződése, kén atomok oxidációja) hatására keletkezik az új, izostrukturális kristály.

Az izomorf helyettesítés módszerének elvét a 12.3.1. ábra szemlélteti. A származék kristály  $F_{PH}(\mathbf{h})$  szerkezeti tényezői a fehérje  $F_P(\mathbf{h})$  és a nehéz atomok  $F_H(\mathbf{h})$  szórási hozzájárulásának vektori összegei. Mivel a natív és származék kristály izostrukturális,  $F_P(\mathbf{h})$  megegyezik a natív kristály szerkezeti tényezőivel. Feladat az  $F_P(\mathbf{h})-F_{PH}(\mathbf{h})-F_H(\mathbf{h})$  vektorháromszög megszerkesztése, ha ismerjük az  $F_P(\mathbf{h})$  és  $F_{PH}(\mathbf{h})$  amplitúdókat (adatgyűjtés a két kristályról) és  $F_H(\mathbf{h})$  vektorokat (pl. a Patterson-függvény segítségével meghatározhatók a nehézatom pozíciók, és segítségével számítható). A megszerkesztett vektorháromszögből megkapjuk az  $\alpha_P(\mathbf{h})$  fázisokat.



12.3.1. ábra. Az izomorf helyettesítés elve, az  $F_P(\mathbf{h})-F_{PH}(\mathbf{h})-F_H(\mathbf{h})$  vektorháromszög az Argand diagramon

Lépései:

- Származék kristály készítése
- A különböző hullámhosszokon mért és/vagy különböző kristályokról készült adatkészletek közös skálára hozása (Wilson)
- A nehézatomok helyzetének meghatározása: A nehézatomok szórási hozzájárulás-amplitúdóinak  $[F_H(\mathbf{h})]$  közelítő meghatározása (pl. a natív kristály szerkezeti tényezői a származék képzés hatására megváltoznak).  $F_H(\mathbf{h})$  értékek alapján a nehézatomok helyzetének meghatározása az elemi cellában – pl. Patterson-függvény segítségével, vagy direkt módszerrel. A nehézatom pozíciók felhasználásával az  $F_H(\mathbf{h})$  vektorok számítása. Végül a nehézatom paraméterek finomítása ( $x, y, z, B$ , betöltöttség)
- A natív kristály fázisainak számítása: vektorháromszög szerkesztése, legjobb fázis meghatározása, nehézatom paraméterek finomítása, a fehérjefázisok iteratív javítása
- A fehérje elektronsűrűségi térkép számítása, a térkép javítása sűrűségmódosító módszerekkel, főlánc, majd oldalláncok hozzárendelése a térképhez.

### 12.3.1. A többszörös izomorf helyettesítés lépései

A származék kristályok készítése során követelmények a minél tökéletesebb izostrukturalitás a natív kristállyal és a nehéz atomok jól definiált helyeken való megkötődése a fehérjemolekulához (lehetőleg nagy betöltöttséggel, azaz a fehérjemolekulák nagy hányadán bizonyos funkciók csoportjához legyenek koordinálva). Az előbbi feltétel miatt a származék kristályokat nem a fehérje és a nehézatomot tartalmazó vegyület együttkristályosításával állítják elő (ilyenkor fennáll a veszélye, hogy más kristályforma képződik), hanem a kristályokat a nehézatomot/iont tartalmazó oldatba áztatják, ahonnan az a kristály fehérjemolekulái közötti csatornarendszerben diffúzióval eljut a fehérjemolekuláig. A második feltétel teljesüléséhez felhasználják a különböző ionok (pl. átmeneti fém ionok) koordinációs tulajdonságait: különböző kísérletekben olyan ionokat választanak, amik különböző funkciók csoportjához koordinálódnak a fehérjében (pl. Hg, Pt, Au kén atomokhoz és imidazol csoportokhoz koordinálódik, Pb oxigénhez). A kísérlet sikere függ az anyalúg pH-jától, összetételétől (oldhatóság, hidrolízis, a komplex ion ligandumainak lecserélődése), a kristályszerkezettől és nehézatom koncentrációtól (a nehézatomok szétverhetik a kristálykontaktusokat, túl szűk oldószer-csatornák esetén nem tudnak a kristályba bediffundálni) és az áztatás idejétől (betöltöttség). Halogenid-oldatba való áztatásnál kisebb a veszély, hogy károsodik a kristály, és több kötőhely található a fehérjén (felszíni, pozitív töltésű mélyedések). A nehézatom tartalmú ligandumok, kofaktorok alkalmazása és a Se-Met származék előállításának a jól definiált, nagy betöltöttségű és ismert számú kötőhelyek miatt előnyös.

Származék kristály előállítási módszerek:

- A fehérje nehézatom tartalmú (pl. Fe, Co)
- A natív kristály áztatása (1-10 mM, több órán át, vagy akár napokig). Hg-, Pt-, Au-, Os-, Cd-, Sm-Eu... sók; szerves Hg- származékok (pl. PheHgOAc, a fehérje hidrofób magjába képesek bediffundálni);  $UO_2^{2+}$ ; klaszterek pl.  $Ta_6Br_{12}^{2+}$
- Gyors áztatás halogenid ion oldatába ( $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ) (0,1-1M; pár perc)
- A natív szerkezetben kofaktorként található  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  helyettesítése ritkaföldfémekkel

- Nehézatomot (pl. I) tartalmazó ligandum: inhibitor, szubsztrát analóg, stb. megkötése
- Szelénes táptalajon növesztett baktériumok által termelt fehérjében S atom helyett Se lesz a metionin (Se-Met) (és cisztein) aminosavakban. Bár a fehérjetermelés így drágább, és nagyobb körülményt igényel, a jól definiált Se helyek miatt ez elterjedt módszer a származék képzésre (anomális szórás felhasználása)
- Nemesgázok megkötése nagy nyomású kamrában: Xe, Kr 25-40 bar, 1-2 perc (12.1.videó)

### [12.1. videó: Nemesgázok megkötése nagy nyomású kamrában](#)

Mivel a fázisprobléma megoldás során a szerkezeti tényező nehézatomok szórási hozzájárulása miatti változását használják fel, a fehérje méretétől és a nehézatom rendszámától függően akár több megkötött nehézatomra is szükség van fehérjemolekulánként, hogy a származék kristály adatkészlete felhasználható legyen. Az átlagos várható intenzitásváltozást az alábbi egyenlettel becsülhető (12.3.2. ábra,  $N_H$  és  $N_P$  a nehézatomok és fehérjeatomok száma,  $Z_H$  a nehézatomok rendszáma,  $Z_P^{eff}$  pedig a fehérjeatomok effektív, átlagos rendszáma: 6,7). Ennek az intenzitás változásnak kell jelentősnek lennie a mérési hibához képest (pl.  $R_{merge}$ ), ami a felbontással csökken.

$$\frac{\langle \Delta F \rangle}{\langle |F| \rangle} = \sqrt{\frac{2N_H}{N_P} \frac{Z_H}{Z_P^{eff}}}$$

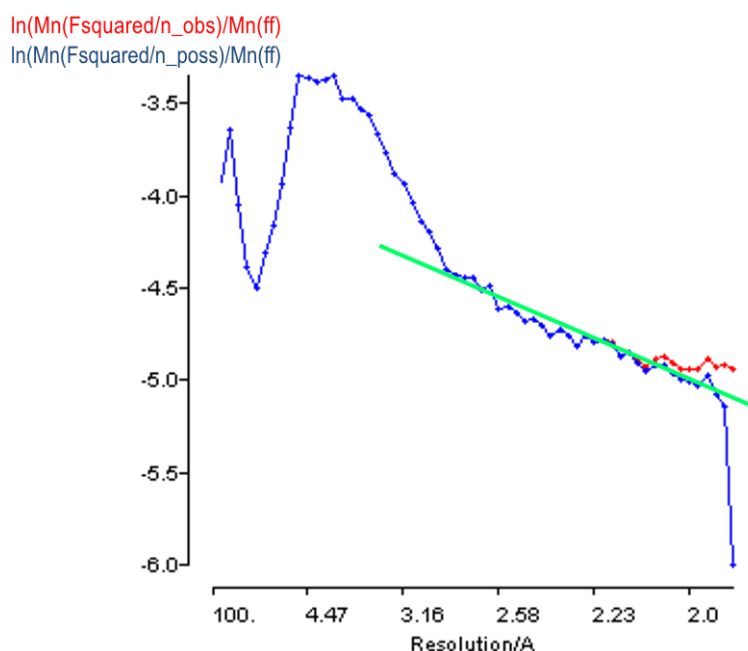
12.3.2. ábra Hány nehézatomot kell a fehérjéhez kötni, hogy észlelhető változást okozzanak a diffrakciós mintázatban?

A diffrakciós adatgyűjtés kezdetekor röntgenfluoreszcencia spektroszkópia segítségével megállapítható, hogy a nehézatom megkötődött-e a kristályban, amit közvetlenül az adatgyűjtés előtt el lehet végezni szinkrotron sugárforrásoknál (ehhez az áztatás végén a kristályt pillanatszerűen nehézatomot nem tartalmazó oldatba áztatják, hogy az oldószer csatornákból távozzanak a fehérjéhez nem koordinálódott nehézatomok).

A különböző kristályokról felvett adatkészletek összehasonlítása érdekében azonos skálára kell őket hozni. A kristályok mérete, rendezettsége (a kristály áztatása, származék képzés során bekövetkezett rendezettség szökkenés), és a különböző forrásoknál a sugár intenzitás is jelentős különbségeket mutathat. Wilson-görbe segítségével történik a különböző adatkészletek abszolút skálára hozása (12.3.3., 12.3.4. ábra). Kis felbontási héjakban ábrázoljuk az átlagos intenzitás és az atomi mozgástényező ( $f_i^0$ , nyugalomban lévő atom atomi mozgástényezője) négyzetösszegének hányadosát a felbontás ( $\sin^2\theta/\lambda^2$ ) függvényében. A meghatározható paraméterek: átlagos izotróp atomi mozgástényező  $B$  és  $C$  skálafaktor. Az egyenlet implicit módon tartalmazza azt a feltételezést, hogy az atomok véletlenszerűen helyezkednek el az elemi cellában (nem képeznek mintázatot). Fehérjék esetén ez nem igaz: másodlagos szerkezeti elemek ( $\alpha$ -hélix,  $\beta$ -redő) vannak jelen, ezért kb. 3 Å-nál alacsonyabb felbontású régióban nem lesz egyenes.

$$\ln \frac{\langle I(S) \rangle}{\sum_i (f_i^0)^2} = \ln C - 2B \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2}$$

12.3.3 ábra Wilson skálázás



12.3.4. ábra Fehéjerkristály Wilson-görbéje (Felhasznált programcsomag: [CCP4.](#))

Az izostrukturalitás mértékét az izomorf R-faktor jellemzi (12.3.5. ábra), ha túl kicsi, az arra utalhat, hogy nem kötődött meg a nehézatom, ha túl nagy, az pedig arra, hogy nem teljesül az izostrukturalitás.

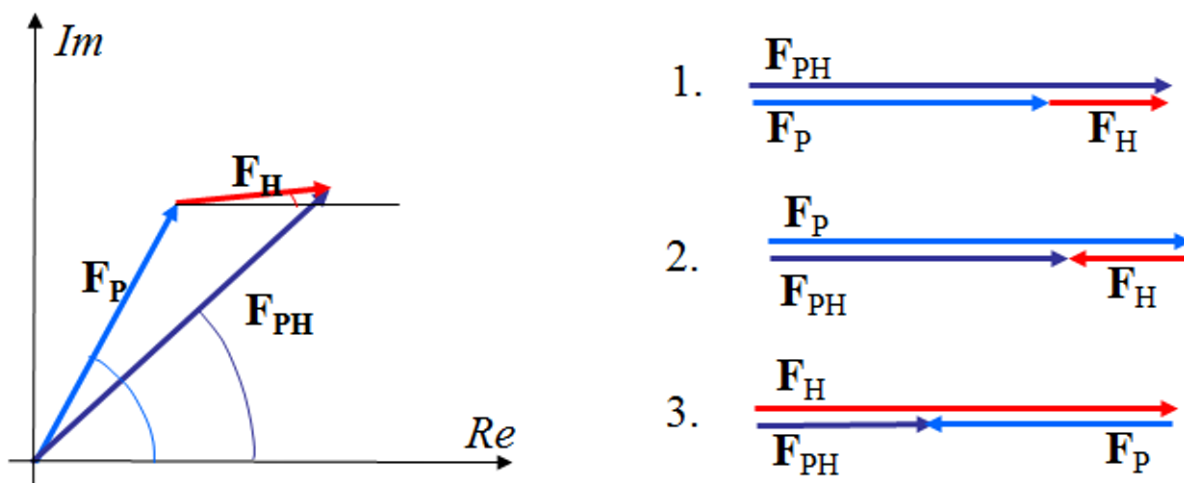
$$R_{iso} = \frac{\sum_{\mathbf{h}} |F_P(\mathbf{h}) - F_{PH}(\mathbf{h})|}{\sum_{\mathbf{h}} F_P(\mathbf{h})}$$

12.3.5. ábra Izomorf R-faktor

Az azonos skálára hozott adatkészletek segítségével megtörténhet a vektorháromszögek (12.3.1. ábra) megszerkesztése minden reflexióra. Ehhez szükség van az  $\mathbf{F}_H$  szerkezeti tényező hozzájárulásokra, amiket a nehézatom pozíciók ismeretében számíthatunk. A nehézatomok helyzetének meghatározása történhet Patterson-függvény felhasználásával (a nehézatomok nagy elektronszáma miatt a nehézatom-nehézatom csúcsok kiemelkednek a Patterson csúcsok erejéből) vagy direkt módszerrel is. Mivel azonban sok esetben a nehézatomok betöltöttsége alacsony (a nehézatom-nehézatom maximumok nem emelkednek ki eléggé a többi Patterson csúcs közül), a Patterson-függvényt nem közvetlenül az  $F_{PH}^2$  értékek felhasználásával számoljuk, hanem a közelítőleg meghatározható  $F_H^2$  hozzájárulásokkal.

Az az  $\mathbf{F}_P(\mathbf{h}) - \mathbf{F}_{PH}(\mathbf{h}) - \mathbf{F}_H(\mathbf{h})$  vektorháromszög a vektorok abszolút értékeinek különbségévé és összegévé egyszerűsödik azoknak a reflexióknak az esetében, amelyek az adott tércsoport centroszimmetrikus

vetületei. Ezekre jellemző, hogy a szimmetria ekvivalens reflexiók egyben Friedel-párok is. A fázisuk ekkor csak két, egymástól  $180^\circ$ -ban eltérő értéket vehet fel. A 12.3.6. ábra jobb oldalán látható módon ekkor három lehetséges eset van. Az első két esetben:  $F_{PH}=F_P+F_H$  és  $F_H=|F_{PH}-F_P|$ . Ritkán, ha  $F_{PH}$  és  $F_P$  is kicsi, előfordulhat, hogy  $F_H=F_{PH}+F_P$  (3. eset).



12.3.6. ábra. Az izomorf helyettesítés során felhasznált vektorháromszög általános esetben (balra), és a centroszimmetrikus vetülethez tartozó esetben (jobbra).

Az  $F_H$ -t az  $|F_{PH}-F_P|$  különbséggel közelítjük minden reflexióra (nem centroszimmetrikus esetben is) (12.3.7. ábra). Megmutatható, hogy a  $\Delta F_{iso}^2$  együtthatókkal számolt Patterson térkép a nehézatomok körülbelül félmagasságú Patterson térképét adja,

$$\Delta F_{iso}^2 = (F_{PH} - F_P)^2$$

12.3.7. ábra. Az izomorf különbség

A nehézatomok koordinátáinak meghatározása ezután történhet  $\Delta F_{iso}^2$  együtthatókkal számolt Patterson térkép segítségével (12.3.8. ábra). (Direkt módszer is felhasználható a nehézatomok helyzetének meghatározására, mivel a nehézatomok elszórtan (egymástól távol) helyezkednek el az elemi cellában, ezért a  $3-4\text{\AA}$  is atomi felbontást biztosít  $F_H$ -ra.)

$$P(\mathbf{u}) = (1/V) \sum_{\mathbf{h}} \Delta F_{iso}^2(\mathbf{h}) \cos(2\pi \mathbf{h} \cdot \mathbf{u})$$

12.3.8. ábra Patterson-függvény a nehézatom pozíciók meghatározására

A következő lépésben, a nehézatom paraméterek finomítása során a nehézatom pozíciójából számított ( $F_{H(calc)}$ ) és a mérésből kapott ( $\Delta F_{iso}$ ) nehézatom szerkezeti tényező eltéréseinek minimalizálása történik. A finomított paraméterek: a nehézatom koordinátái ( $\mathbf{r}_i$ ), atomi mozgástényezője ( $B_i$ ) és betöltöttsége ( $q_i$ ) (12.3.9. ábra). A nehézatom paraméterek megbízhatóságát az  $R_{cullis}$  jellemzi (12.3.10. ábra).

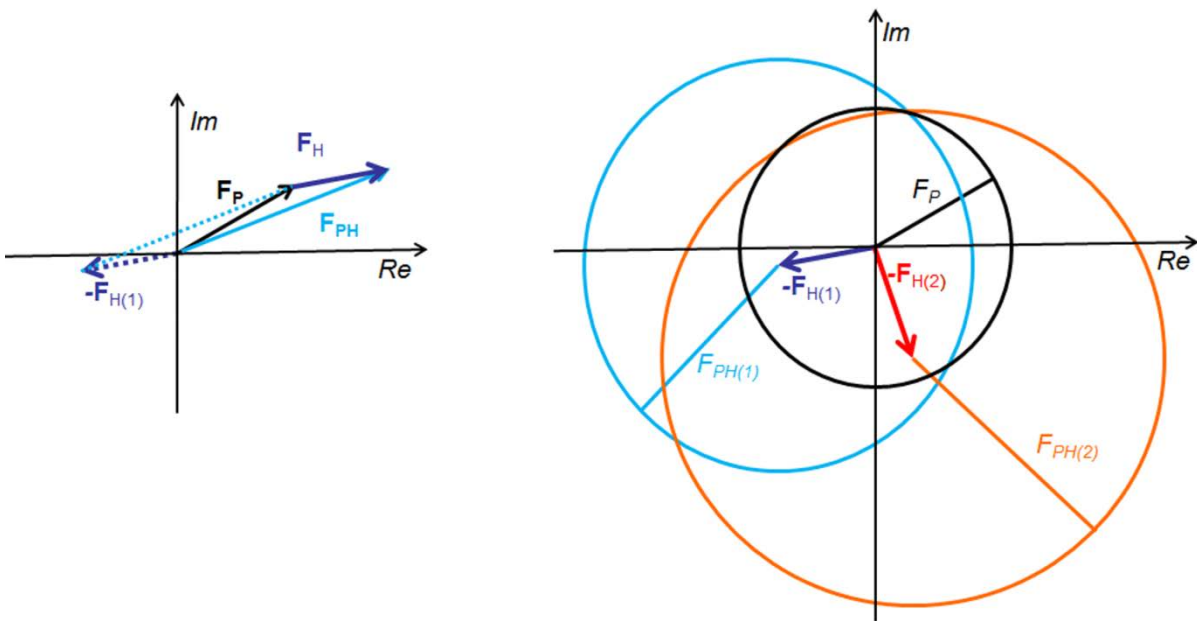
$$F_{H(\text{calc})}(\mathbf{h}) = \sum_i q_i f_i(h) \exp(2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{x}_i)$$

12.3.9. ábra. A nehézatom pozíciókból számolt szerkezeti tényező hozzájárulásuk

$$R_{\text{Cullis}} = \frac{\sum_{\mathbf{h}} ||F_{PH} \mp F_P| - F_{H(\text{calc})}|}{\sum_{\mathbf{h}} |F_{PH} \mp F_P|}$$

12.3.10. ábra. Az  $R_{\text{Cullis}}$

A natív kristály szerkezeti tényezői fázisainak meghatározása a Harker szerkesztéssel történik, ennek során egy, az eredeti vektorháromszöggel egybevágó háromszög lesz megszerkesztve, aminek az eredeti háromszöggel közös az  $F_P$  oldala. (12.3.11. ábra, balra). Ha csak egy származék kristály van (SIR), az origóból az  $F_P$  és a  $-F_{H(1)}$  vektor végpontjából az  $F_{PH(1)}$  amplitúdóval rajzolt köröknek általában két metszéspontja van (12.3.11. ábra, jobbra), tehát a reflexió fázisa nem határozható meg egyértelműen. Egy második származék kristály adatkészletének ( $F_{PH(2)}$ , és a megfelelő  $-F_{H(2)}$ ) felhasználásával elvileg már eldönthető az  $F_P$  szerkezeti tényező fázisa: az  $F_P$  vektor a három kör közös metszéspontjába mutat (az  $F_P$  a két vektorháromszög közös oldala).

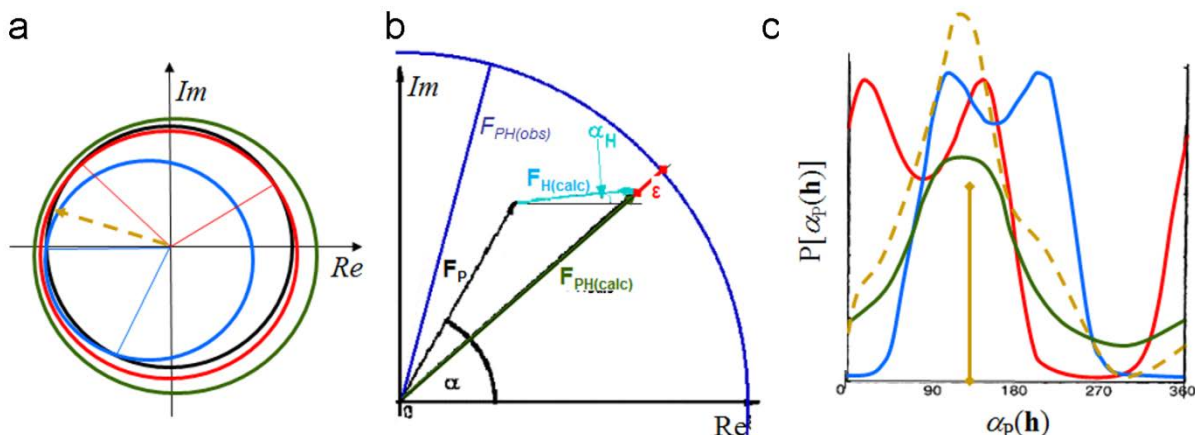


12.3.11. ábra Harker szerkesztés többszörös izomorf helyettesítés esetén. Balra: Az eredeti és a megszerkesztendő vektorháromszög. Jobbra: Harker szerkesztés két származékkristály esetén ((1) és (2)). A megszerkesztett körök sugarát a körnek megfelelő színű vonal jelzi.

A gyakorlatban a Harker szerkesztés általában nem eredményez egy közös metszéspontot a különböző származék kristályok és natív kristály szerkezeti tényező amplitúdóival rajzolt körökre (12.3.12.a. ábra), többféle ok miatt: mérési hiba, izostrukturalitás hibája, a meghatározott nehézatom paraméterek hibája. A Harker szerkesztés valószínűségi megfogalmazása során a hibákat valószínűségi függvények segítségével



vesszük figyelembe, és az összes nehézatom származék adatainak figyelembevételével számítjuk ki a fehérje fázisait.



12.3.12. ábra MIR fázisok meghatározása, a: A Harker szerkesztés során a körök metszéspontja nem jelöli k egyértelműen az  $\alpha_p$  fázist ( $F_p$  sugárral rajzolt kör fekete, a különböző származékok amplitúdójával, mint sugárral rajzolt körök színesek a metszéspontokat vékony vonalak jelzik). b: Az  $\epsilon$  záródási hibával jellemezzük az  $F_{PH}$  hibáját c: A fehérjefázis valószínűsége az a példában szereplő származék kristályok esetén (a körök általában két pontban metszik egymást, ami két maximumot eredményez az  $\alpha_p$  valószínűségi sűrűségfüggvényében). Az eredő függvényt sárga szaggatott vonal jelöli.

A módszer feltételezi, hogy minden hiba Gauss függvénnyel írható le (normál eloszlás), és hogy az izostrukturalitás hiánya és a nehézatom paraméterek hibája közös függvénnyel írható le. Így ezek együtt az  $F_{PH}$  hibájaként írhatók le, és a záródási hiba jellemzi őket (a vektorháromszög nem záródik, 12.3.12.b ábra):  $\epsilon = |F_{PH(obs)} - F_{PH(calc)}|$ . Az  $\alpha_p$  valószínűségi függvénye (12.3.13. ábra) felhasználásával keressük azt a fázist, amellyel számolt elektronsűrűségi térképnek a legkisebb az átlagos négyzetes hibája (12.3.14. ábra). Az egyenletben egyidejűleg figyelembe vehető az összes származékból származó fázis információ az egyedi valószínűségi függvények helyett együttes valószínűségi függvény (az egyedi  $P(\alpha_p)$  függvények szorzata) behelyettesítésével.

$$P(\alpha_p) = N \exp\{-\epsilon^2 / [2\sigma^2(\epsilon)]\}$$

12.3.13. ábra. A natív kristály fázisának valószínűsége a záródási hibával kifejezve ( $N$  normáló tényező)

$$\mathbf{F}_{P(\text{legjobb})}(\mathbf{h}) = F_P(\mathbf{h}) \int_0^{2\pi} \exp[i\alpha P(\alpha)] d\alpha = F_P(\mathbf{h}) m(\mathbf{h}) \exp[i\alpha_{\text{legjobb}}(\mathbf{h})]$$

12.3.14. ábra. A legjobb fázis meghatározása

Az eredmény nemcsak a legjobb fázis (a valószínűségi függvény centroidja, ld. 12.3.12.c ábra), hanem az  $m$  hitelességi tényező is. Ennek a szorzótényezőnek a hatására azok a reflexiók amelyeknek a fázisát nem lehet nagy biztonsággal meghatározni (széles valószínűségi eloszlás), kis súllyal számítanak az

elektronsűrűségi függvény kiszámításakor ( $m$  közel 0). Ha viszont éles maximummal rendelkezik a valószínűségi függvény, az adott reflexió nagyobb súllyal fog szerepelni ( $m$  közel 1).

Az  $\alpha_p$  kezdeti értékeinek ismeretében a záródási hiány iteratív eljárásban minimalizálható, amelyek során a nehézatomban paraméterek,  $\alpha_p$ ,  $F_{PH(\text{calc})}$ ,  $\varepsilon_j$ ,  $m_j$  értékek finomodnak.

### 12.3.2. Differencia elektronsűrűségi térképek

A differencia elektronsűrűségi térkép közelítőleg két (csak kis mértékben eltérő) elektronsűrűségi térkép különbsége. Széles körűen alkalmazzák a modellépítés során, de a többszörös izomorf helyettesítés során is fontos szerepe van, ezért itt tárgyaljuk.

Az elemi cella origója a szimmetria operátorok szempontjából egyféle, kitüntetett helyzetben van (ún. megengedett origó), azonban, ha a molekulákat is belehelyezzük az elemi cellába, a molekulákhoz viszonyítva a megengedett origók sok esetben különböznek. A többszörös izomorf helyettesítéskor a kezdetleges fázisok ismeretében differencia elektronsűrűségi térképek számíthatók további származékokra, az, hogy ezeken a térképeken történik a nehézatomban lokalizációja, garancia arra, hogy ugyanaz a megengedett origó lesz a különböző kristályok esetén kiválasztva. Emellett új, alacsony betöltöttségű nehézatomban-helyek is azonosíthatók.

Tekintsünk két szerkezetet: egyikben a makromolekula (M) található, a másik egy kis szerkezeti különbséget mutat (pl. a makromolekula egy ligandummal alkotott komplexét tartalmazza: ML). Ekkor a két elektronsűrűségi függvény: 12.3.15. ábra.

$$\rho_M = (1/V_{\text{cella}}) \sum_{\mathbf{h}} F_M \exp(-2\pi i \mathbf{h} \mathbf{x} + i \alpha_M) \quad \text{és}$$

$$\rho_{ML} = (1/V_{\text{cella}}) \sum_{\mathbf{h}} F_{ML} \exp(-2\pi i \mathbf{h} \mathbf{x} + i \alpha_{ML})$$

12.3.15. ábra. M és ML elektronsűrűségi függvénye

Ha csak az egyik adatkészlet fázisait ismerjük (pl. izomorf helyettesítés esetén már meghatároztunk a natív kristály, M adatkészletéhez kezdetleges fázisokat, de az újabb származék kristály, ML esetén a fázisokat még nem tudjuk). Feltéve, hogy  $F_L$  kicsi,  $\alpha_{ML} \approx \alpha_M$ , ezt  $\rho_{ML}$  függvénybe behelyettesítve a differencia elektronsűrűségi függvény: 12.3.16. ábra. A függvényt gyakran súlyozzák a fázisok megbízhatóságával (pl. izomorf helyettesítés esetén a hitelességi tényezővel).

$$\Delta \rho = \rho_{ML} - \rho_M \approx (1/V_{\text{cella}}) \sum_{\mathbf{h}} (F_{ML} - F_M) \exp(-2\pi i \mathbf{h} \mathbf{x} + i \alpha_M)$$

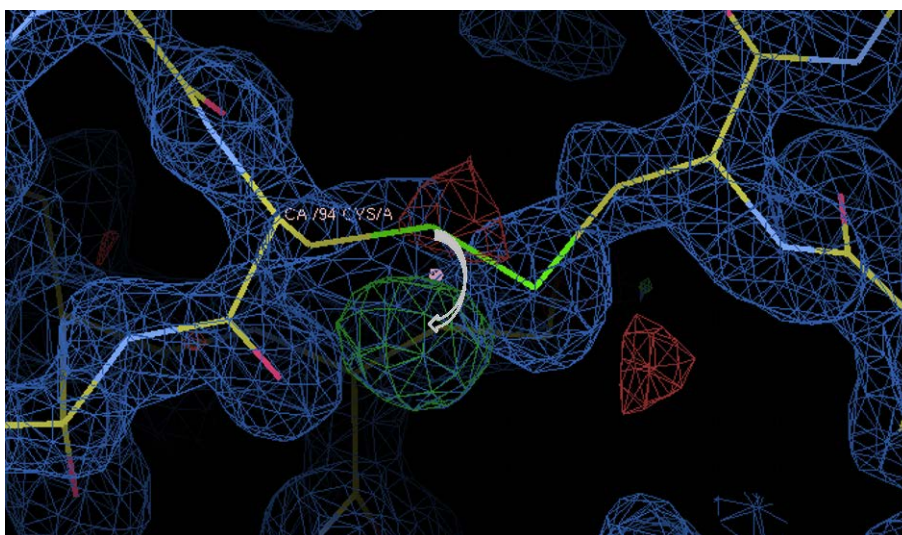
12.3.16. ábra Differencia elektronsűrűségi térkép általános alakja.

Tulajdonságai:  $\Delta \rho > 0$ , ahol ML tartalmaz atomot, de M nem, és fordítva:  $\Delta \rho < 0$ , ahol M tartalmaz atomot, de ML nem; magasabb zaj, mint  $\rho$  függvényben.

A modellépítés során ilyen típusú függvényeket alkalmazunk a modell hibásan megépített vagy éppen hiányzó részeinek azonosítására. Ekkor ML a vizsgált kristály (ismerjük az amplitúdóit az adatgyűjtésből,  $F_o(\mathbf{h})$ ), M pedig az aktuális modell, ismerjük az összes atomjának a helyzetét, tudunk amplitúdókat illetve fázisokat is számítani ( $F_c(\mathbf{h})$  és  $\alpha_c(\mathbf{h})$ ). A fenti differencia elektronsűrűségi térkép tehát ebben az esetben  $F_o-F_c$  típusú térkép lesz (ez a különbség kerül a szumma mögé). Ahol pozitív értéket vesz fel, ott a valóságos molekula tartalmaz atomot, a modell viszont nem (tehát be kell építeni atomokat), hasonlóképp ahol negatív, arról a helyről el kell távolítani modell-atomokat. (Az elektronsűrűségi térkép alapján "üresnek" látott régiókban rendezetlen atomok, legtöbbször víz található, a rendezetlenség miatt lesz az -egész kristály, és a mérés ideje alatti átlagos-elektronsűrűség közel 0). Az  $F_o-F_c$  térképen gyakran pozitív-negatív mintázat jelzi, ha egy atomcsoport a modellben eltolódott a vizsgált molekulához képest. A modellépítés során az  $F_o-F_c$  térképet  $2F_o-F_c$  típusú térképpel (12.3.17. ábra) együttesen vizsgáljuk (12.3.18. ábra). Ez utóbbi mindenhol „körülöleli” a molekulát, pozitív értéket vesz fel, ahol atomok vannak a vizsgált kristályban.

$$\Delta \rho_{2F_o-F_c} = 2\rho_o - \rho_c \approx (1/V_{cella}) \sum_{\mathbf{h}} (2F_o - F_c) \exp(-2\pi i \mathbf{h} \mathbf{x} + i \alpha_c)$$

12.3.17. ábra  $2F_o-F_c$  típusú differencia elektronsűrűségi térkép



12.3.18. ábra Diszulfidhíd javítandó konformációban (S atomok: zöld, szürke nyíl jelzi a javítás irányát).  $2F_o-F_c$  térkép: világoskék,  $0,576e/\text{Å}^3$  izo-elektronsűrűségi szinten ábrázolva;  $F_o-F_c$  térkép: zöld,  $0,420e/\text{Å}^3$  izo-elektronsűrűségi szinten ábrázolva és piros  $-0,420e/\text{Å}^3$  izo-elektronsűrűségi szinten ábrázolva.

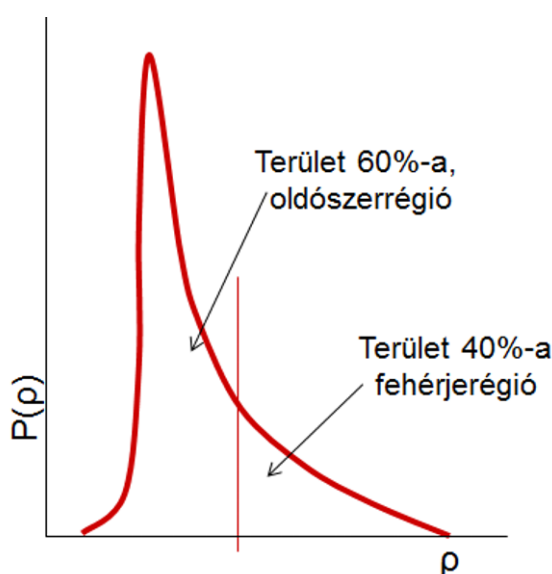
### 12.3.3. A kezdeti elektronsűrűségi térkép javítása: sűrűségmódosító módszerek

A sűrűség módosító módszerek (density modification methods, DM) célja az izomorf helyettesítéssel kapott, natív elektronsűrűségi térkép értelmezhetővé tétele - a képminőség javítása. Az elektronsűrűségi függvény jellegzetesen különbözik a fehérje és az oldószer által elfoglalt régiókban: a „fehérje-régióban” alacsony és magas értékeket is felvesz, mert a kristályban található sok, közel azonos konformációjú fehérjemolekula elektronsűrűségének átlaga. Az *oldószer* catornákat dinamikus, folyadék jellegű víz tölti

ki (a kristályosításhoz alkalmazott puffer, stb.), ennek megfelelően az elektronsűrűség (időátlaga, és az elemi cellákra vonatkozó átlaga) egyenletes, alacsony értékű. A sűrűségmódosítás lényege, hogy a fehérje régióban fehérjeszerűbbé, az oldószer régióban pedig oldószer-szerűbbé tesszük az elektronsűrűséget.

Az első lépés a molekuláris boríték definiálása, a fehérje által elfoglalt térrészek azonosítása. Lépései:

- Rács illesztése az elektronsűrűségi térképre
- Átlagolt, kissé kisimított térkép létrehozása: Minden rácsponthoz az  $R$  sugarú (pl. 8-10 Å) környezetben található elektronsűrűség súlyozott átlagát rendeljük.
- Hisztogram rajzolása az átlagolt elektronsűrűségi térkép értékeinek gyakoriságáról. (12.3.19. ábra)
- A kristály %-os oldószertartalmának megfelelő "oldószer-elektronsűrűségi szint" megválasztása a hisztogram alapján.



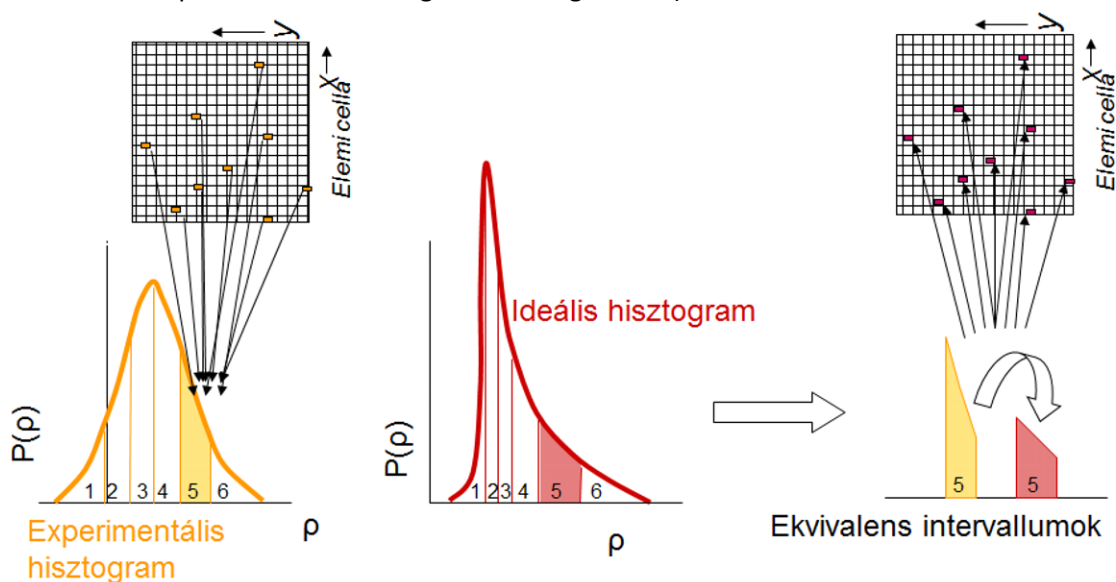
12.3.19. ábra. Molekuláris boríték meghatározása: az átlagolt elektronsűrűségi térkép hisztogramját a kristály térfogat százalékos oldószertartalmának megfelelően két részre osztjuk. Pl. 60%-os oldószertartalom esetén 60:40 területarányban vágjuk el.

Az oldószer által elfoglalt régióban oldószer simítást végzünk: Az oldószer-csatornáknak az elektronsűrűséget alacsony, az oldószerregióban állandó értékre állítjuk. A simított oldószerregióknak megfelelő szerkezeti tényező hozzájárulás lesz felhasználva a sűrűségmódosítás során.

Nemkristallográfiai szimmetria szerinti átlagolást érdemes alkalmazni, ha az aszimmetrikus egység egynél több molekulát tartalmaz. Bár ezek kristallográfiailag függetlenek, globális konformációjuk megegyezik (eltekintve a molekulafelszíni régióktól, ami különböző kristálykontaktusokban vesz részt). A molekulák határainak kijelölése után a molekulák elektronsűrűségeinek átlagolása történik.

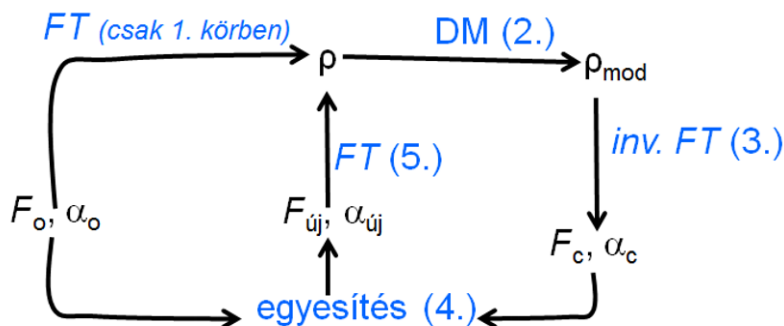
A hisztogram illesztés általánosan alkalmazható sűrűségmódosító módszer. A fehérjekristályok fehérjeregiónak elektronsűrűségi hisztogramja jellegzetes alakú, ami nem függ a fehérje típusától, csak a felbontástól. A térképünk fehérjeregiónak tehát fehérjeszerűbbé tehetjük, ha hisztogramját úgy módosítjuk, hogy az megfeleljen az adott felbontású térkép várt hisztogramjának. A módszer lépései (12.3.20. ábra):

- Az elektronsűrűségi térképet kiszámoljuk megfelelően sűrű rácspontokban.
- Az elektronsűrűség sűrűségi histogramjának kiszámítása (az elektronsűrűség értékek gyakorisága a térképre helyezett rácspontjaiban).
- Az elektronsűrűségi térkép ( $\rho$ ) histogramját és a várt sűrűségi ( $\rho'$ ) histogrammot  $n$  darab (pl. 250) egyenlő területű részre osztjuk.
- Az eredeti histogram összes így módon készült darabját a várt histogram megfelelő darabjára skálázzuk, majd az így kapott új elektronsűrűségi értékeket a rácspontjaihoz rendeljük (ezáltal minden rácspont elektronsűrűségi értéke megváltozik).

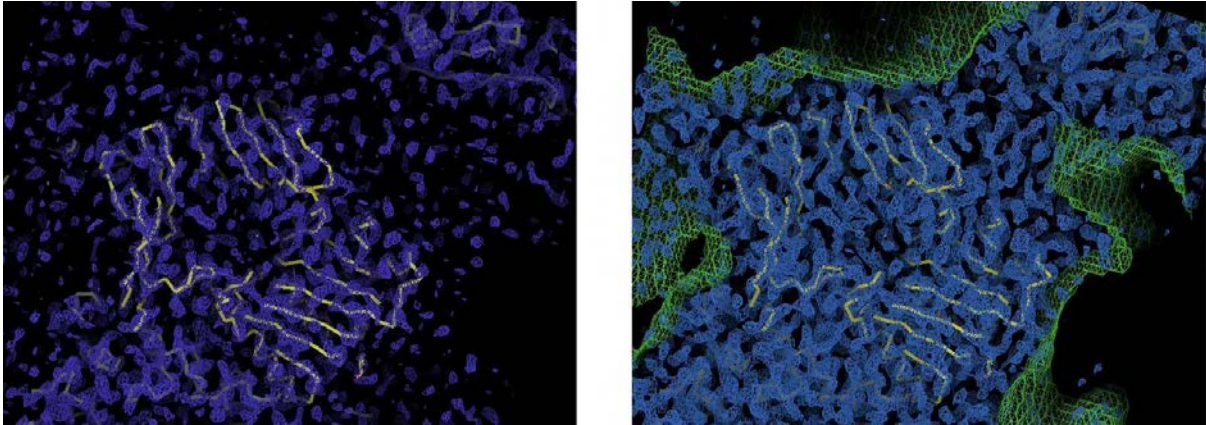


12.3.20. ábra. Histogram illesztés

A sűrűségmódosítás iteratív eljárás (12.3.21. ábra). Az első elektronsűrűségi térkép ( $F_p$  és izomorf helyettesítéssel vagy anomális szórás módszerével kapott  $\alpha_p$ ) kiszámolása után megtörténik a sűrűségmódosítás, majd a módosított elektronsűrűségi térképből inverz Fourier transzformációval új amplitúdókat és fázisokat kapunk, amelyeket minden körben kombinálunk az  $F_p$  és  $\alpha_p$  értékekkel, majd új térképet számolunk. A kapott jobb minőségű térkép alapján pontosabban ki lehet jelölni a molekula határait, és újra elvégezni a sűrűségmódosító lépést. Több iterációs ciklus után végül olyan elektronsűrűségi térképet kapunk, amiben felismerhető(bb)ek a másodlagos szerkezeti elemek, a fehérjelánc lefutása (12.3.22. ábra).



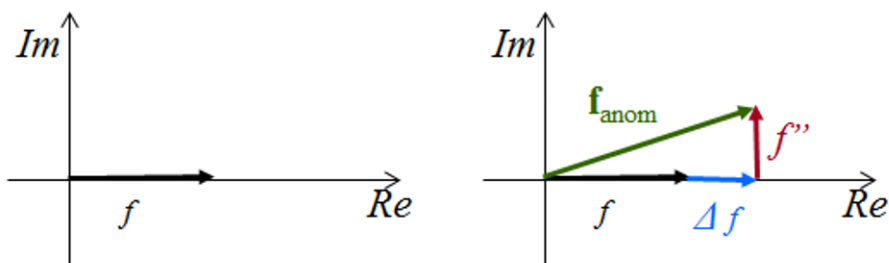
12.3.21. ábra. A sűrűségmódosító módszerek folyamatábrája



12.3.22. ábra. A fázisprobléma megoldáskor kapott fázisokkal számolt (izomorf helyettesítés; balra) és sűrűségmódosítás után kapott (jobbra) elektronsűrűségi térkép. Kék: elektronsűrűségi térkép, zöld: molekuláris boríték, referenciaként megjelenítettem a később felépített modell  $C_\alpha$  vázát (sárga és szürke).

## 12.4. Anomális szórás módszere

Az anomális szórás akkor lép fel, amikor a mérő röntgensugár hullámhossza közel esik valamely, a kristályban található atom abszorpciós hullámhosszához. A röntgenfoton nem „szabad atomról” szóródik. Ha nincs anomális szórás, az atomi szórástényezőnek önmagában nincs fázis-hozzájárulása, anomális szórás esetén az atomi szórástényezőnek imaginárius komponense is van, és a valós komponens nagysága is változik (mindkettő a hullámhossz függvényében) (12.4.1. és 12.4.2. ábra)



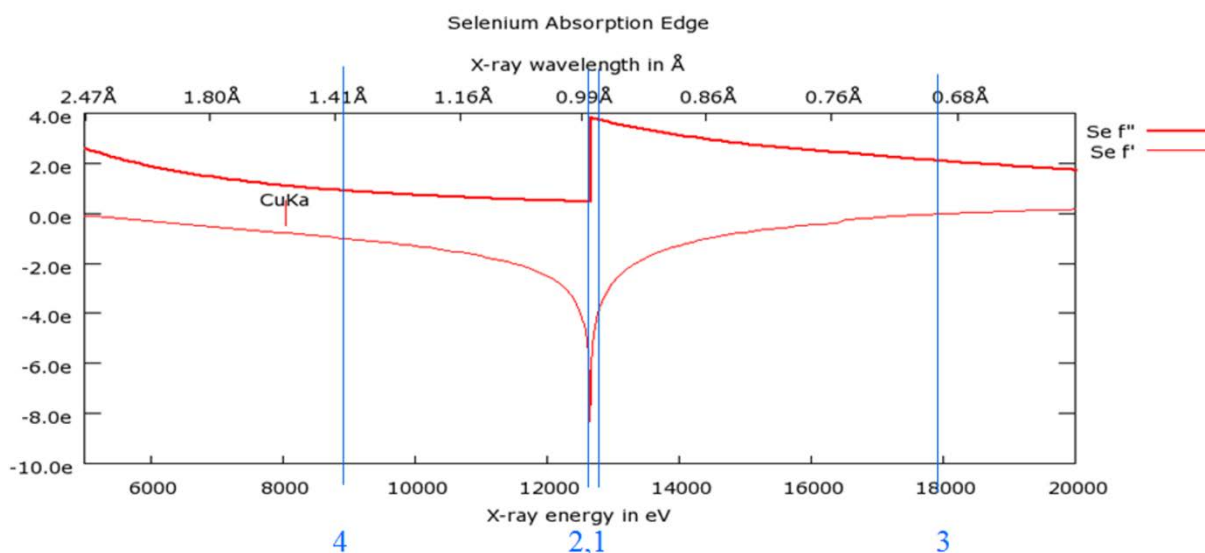
12.4.1. ábra. Az atomi szórástényező megváltozása ha anomális szórás jelensége fennáll (jobb oldali ábra)  
Ha nincs anomális szórás, az origóban lévő atom fázis-hozzájárulása 0; bal oldali ábra).

$$\mathbf{f}_{\text{anom}} = f + \Delta f + if'' = f' + if''$$

12.4.2. ábra. Anomálisan szóró atom atomi szórástényezője  $\mathbf{f}_{\text{anom}}$ . (ha nincs anomális szórás, az atomi szórástényező  $f$ ,  $\Delta f$  negatív, az eredő valós komponens a diszperziós, az imaginárius pedig az anomális komponens).

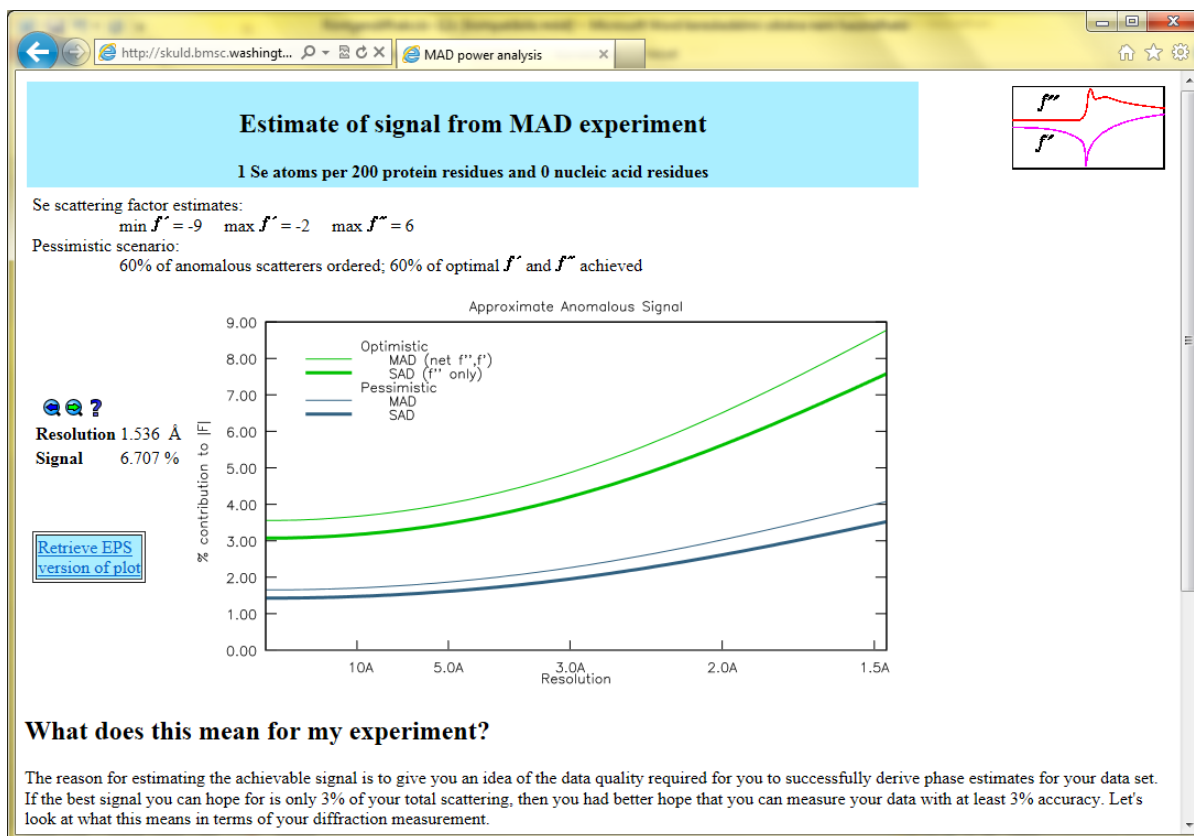
Anomálisan szóró atomot tartalmazó nem-centroszimmetrikus esetben a Friedel-törvény sérül, azaz  $F(\mathbf{h}) \neq F(-\mathbf{h})$  és  $\alpha(\mathbf{h}) \neq -\alpha(-\mathbf{h})$ . Az  $F(\mathbf{h})$  és  $F(-\mathbf{h})$  közötti eltérés felhasználható az abszolút konfiguráció

meghatározására kismolekuláknál (6.4. fejezet), és a fázisprobléma megoldására a fehérjekristallográfiában. A fázisprobléma megoldása az izomorf helyettesítés lépéseivel analóg módon történik, de itt egy származék kristályról több adatkészletet gyűjthetünk különböző hullámhosszokon (MAD). Az anomális jel a kicsi az egész fehérjemolekula szórásához viszonyítva, ezért célszerű nagy redundanciájú adatkészletet felvenni. A kristály sugárzás általi károsodása az abszorpciós maximum (abszorpciós él) közelében különösen gyors lehet, a mérési stratégia kiválasztása nagy körültekintést igényel. Az  $f'$  és  $f''$  változását figyelembe véve 4 féle hullámhosszon történhet mérés (12.4.3. ábra): 1:  $f''$  maximuma (peak), 2:  $f'$  minimuma,  $f''$  inflexiós pontja (inflexion) – ezeknél a legjelentősebb a különbség a gyűjthető adatkészletek között, de a kristály károsodása miatt nem biztos, hogy sikerül teljes adatkészletet gyűjteni. 3: mérés nagy energiájú távoli hullámhosszon (high energy remote) - itt is jelentős az anomális jel, de a kristály károsodása kisebb mértékű. 4: mérés kis energiájú távoli hullámhosszon, ez kisebb jelentőségű. A szinkrotron sugárforrás technikai lehetőségeitől is függ az optimális stratégia. Ha van rá lehetőség, célszerű a Friedel-pár reflexiókat időben egymáshoz közel mérni, esetleg a hullámhossz változtatásával a célul kitűzött adatkészleteket (pl. 1,2,3) egymással párhuzamosan mérni.



12.4.3. ábra. Az atomi szórástényező anomális és diszperziós komponensének függése a röntgensugár energiájától ill. hullámhosszától. ([http://skuld.bmsc.washington.edu/scatter/AS\\_form.html](http://skuld.bmsc.washington.edu/scatter/AS_form.html) felhasználásával)

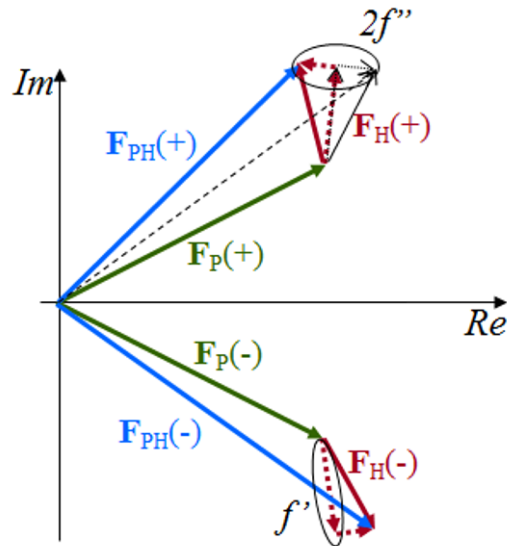
A nehézatom helyettesítéses módszerhez analóg módon itt is vizsgálandó, hogy az anomális jel a mérési hibához képest jelentős-e (12.4.4. ábra).



12.4.4. ábra. Az anomális jel nagyságának jóslása MAD kísérlet előtt  
[http://skuld.bmsc.washington.edu/cgi-bin/MAD\\_power.pl](http://skuld.bmsc.washington.edu/cgi-bin/MAD_power.pl)

Az anomális szórás módszerének lépései analógok az izomorf helyettesítésnél leírtakkal, sőt, a két módszer kombinálható, ha anomálishan szóró, nagy rendszámú atomot vittünk be a kristályba (SIRAS, MIRAS). itt is vektorháromszöget szerkesztünk meg. Ehhez előbb meghatározzuk az anomálishan szóró atomok amplitúdó hozzájárulását, majd helyét, végül szerkezeti tényező hozzájárulásukat. Alapvető különbség van a vektorháromszögben: itt már egy származék kristály egy hullámhosszon mért adatkészletével két háromszöghöz jutunk (12.4.5. ábra), ami elvileg lehetővé teszi a fázisok egyértelmű meghatározását (megtörténhet a Friedel-párok véletlen felcserélése, ami az egész szerkezet invertálását okozza, ez az első elektronsűrűségi térkép vizsgálatával kideríthető (hélixek), és a modell invertálásával kiküszöbölhető).





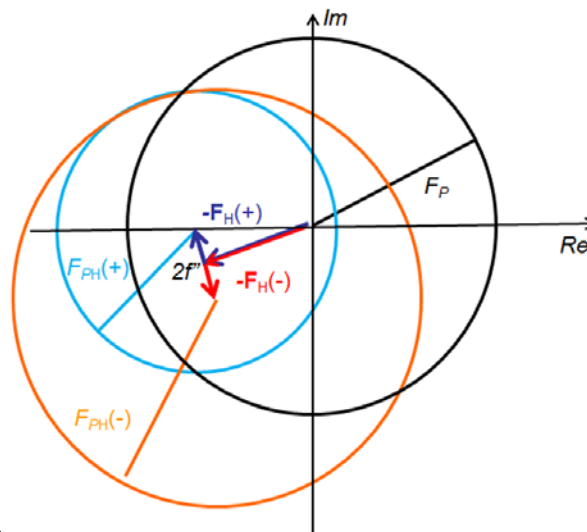
12.4.5. ábra Vektorháromszög SAD módszernél. A (+) és (-) jelzések Friedel-párra utalnak. A két vektorháromszög  $F_P-F_H(+)-F_{PH}(+)$  és  $F_P-F_H(-)-F_{PH}(-)$  összehasonlítása könnyebb, ha az alsó háromszöget tükrözzük a valós tengelyre (vékony és szaggatott fekete nyilak). A két háromszög eltérését az  $f'$  anomális komponens okozza.

Az anomálisan szóró atomok amplitúdó hozzájárulásának kifejezése (12.4.6. ábra) a  $\Delta F_{iso}^2$ -gel analóg közelítő függvény, ami felhasználható Patterson-függvény együtthatójaként az anomálisan szóró atomok helyzetének meghatározásához. Az anomális és izotróp különbség összegét ( $\Delta F_{ano}^2(\mathbf{h}) + \Delta F_{iso}^2(\mathbf{h})$ ) együtthatóként alkalmazva a Patterson-függvény zajszint csökkenthető.

$$\Delta F_{ano}^2 = [F_{PH}(+) - F_{PH}(-)]^2 f' / (2f'')$$

12.4.6. ábra. Az anomális különbség

A Harker szerkesztés során minden származék minden, különböző hullámhosszon mért adatkészletére két-két háromszöget szerkeszthetünk (amelyeknek az eredeti vektorháromszöggel közös az  $F_P$  oldaluk). A szerkesztéskor rajzolt körök itt is egy pontban metszik egymást.(12.4.7. ábra)



12.4.7. ábra Harker szerkesztés (SAD)

## 12.5. Molekuláris helyettesítés

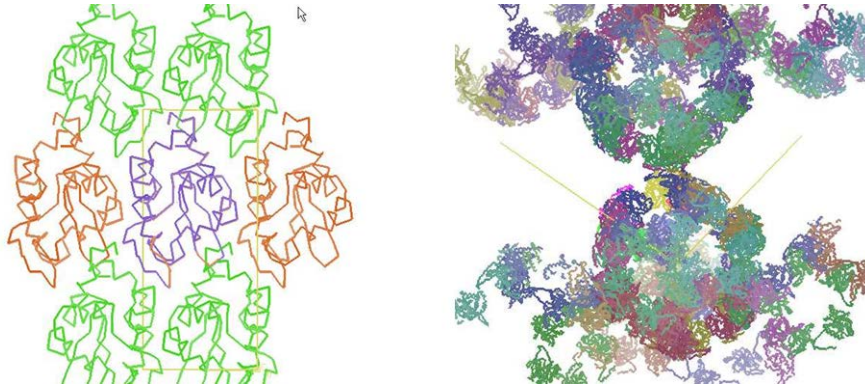
Ha ismert egy, a vizsgált molekulával legalább 20-30% szekvencia-azonosságot mutató fehérje térszerkezete, az ismert szerkezetű fehérje a vizsgált molekula modelljeként alkalmazható. Ugyanis az elsődleges szerkezet (aminosav szekvencia) ilyen mértékű hasonlósága a térszerkezet nagyfokú hasonlóságát vonja maga után. Kismolekulák esetén viszont a molekuláris helyettesítés, mint fázisprobléma megoldó módszer nem alkalmazható, mert a molekulák hasonló konstitúciója nem garantálja, hogy a kristálybeli konformációjuk hasonló lesz.

A modell kiválasztásánál a PDB adatbázisban a vizsgált molekulához aminosav szekvenciájában leginkább hasonló, emellett a lehető legnagyobb felbontású szerkezetet érdemes választani. (Tapasztalat szerint alkalmasabb egy kristályszerkezet, mint a segítségével készített homológiamodell.) NMR szerkezetek alkalmazásakor a gyakorlat azt mutatja, hogy érdemes ilyenkor a konformációt együttesen jellemző több szerkezetet („sokaságot”) együttesen használni. Lehetséges alacsony felbontású elektronsűrűségi térképet (pl. elektronmikroszkópiából) is modellként használni. Modellként a szerkezet azon részeit használjuk, amik valószínűleg megegyeznek a két molekulában (tehát a PDB fájlban található vízmolekulák és egyéb ligandumok, amiknek az elhelyezkedése a kristályosítási körülményektől és kristálykontaktusoktól függenek, kihagyandók, hasonlóan azokhoz az aminosav oldalláncokhoz, amik a szekvencia illesztés szerint különböznek). A keresés szempontjából nem lesz hasonló a két szerkezet, ha nagyobb szerkezeti egységek (domének) relatív orientációja eltér bennük (a domének csukló vagy zsanér régiókon elmozdulhatnak), ezért a keresést érdemes úgy is elvégezni, hogy a doméneket (és fehérje-fehérje komplexek esetén az individuális fehérjemolekulákat) önálló keresőmodellként használjuk. Tekintetbe kell azonban venni, hogy a keresést az aszimmetrikus egységben található atomok minél kisebb részével végezzük, annál kevésbé fog a jó eredmény elkülönülni (ld. lent).

Előfordul, hogy a molekula több példányát tartalmazza az aszimmetrikus egység (nemkristallográfiai szimmetria). A fehérje által elfoglalt térfogati hányad az elemi cellában számítható a molekulatömegének ismeretében (Matthews koefficiens segítségével is kifejezhető, 12.5.1. ábra). A számítás eredményeként kiderül, hogy hány fehérjemolekula fér el az aszimmetrikus egységben, és ha több, mekkora a kristály oldószertartalma (leggyakrabban 40-60%, de akár 20 vagy 80% körül is lehet, 12.5.2. ábra).

$$v_P = \frac{1}{N_{av} D_P V_m} \quad \text{ahol } V_m = \frac{V_{cella}}{M_P X Z}$$

12.5.1. ábra. A fehérje által elfoglalt térfogati hányad ( $v_P$ ), és a Matthews koefficiens ( $V_m$ , mértékegysége  $\text{\AA}^3/\text{Da}$ ).  $N_{av}$ : Avogadro szám,  $D_P$ : fehérjesűrűség,  $M_P$ : a fehérje moláris tömege,  $Z$ : az aszimmetrikus egységek száma az elemi cellában,  $X$ : molekulák száma az aszimmetrikus egységben

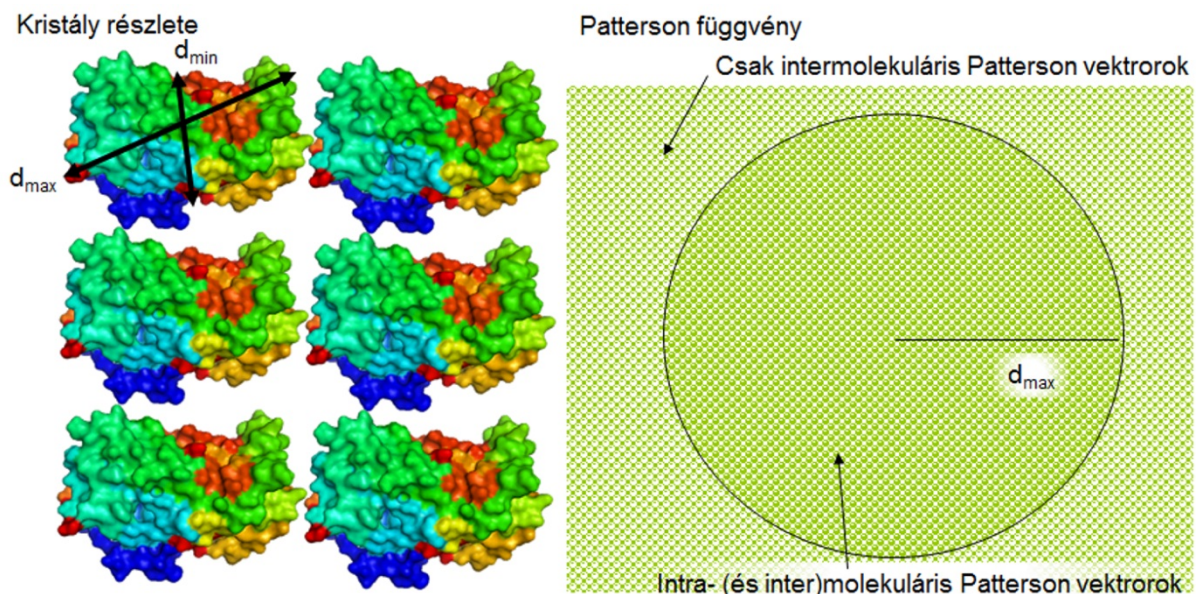


12.5.2. ábra Lizozim kristály alacsony vízgőztartalmú közegben növesztve (balra, PDB kód: 1XEJ, 17,6% víztartalom,  $V_M=1,5$ ) és dihidrolipoil transzacetiláz szerkezete (jobbra, biológiai egység: dodekamer, PDB kód: 1B5S 86% víztartalom,  $V_M=8,5$ )

A molekuláris helyettesítés során a cél a modellmolekula elhelyezése a vizsgált molekula elemi cellájában. Mivel a Patterson-függvény kiszámítható a fázisok ismerete nélkül is, kiszámolható a vizsgált, és a modellmolekulára is. Alkalmazásakor azt használjuk ki, hogy a hasonló molekulák Patterson-függvénye is hasonló. A Patterson-függvény felhasználásával a molekuláris keresés 6 dimenziós problémája két 3 dimenziós keresésre bontható, ami jóval kisebb számítógép-kapacitást igényel:

- Rotációs keresés: a modell helyes orientációjának megtalálása (3 szög érték)
- Transzlációs keresés: A modell helyzetének meghatározása (eltolási vektor)

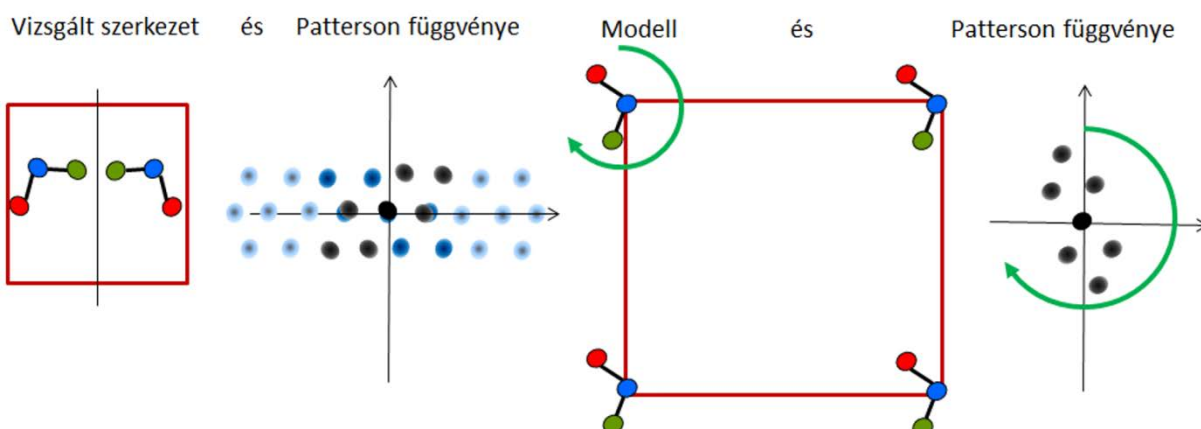
A Patterson-függvény vektorai lehetnek molekulán belüli atom-atom vektoroknak megfelelők (intramolekuláris vektorok), és két szomszédos, vagy távolabbi molekula atomjai közöttiek is (intermolekuláris vektorok). Míg az intermolekuláris vektorok lehetnek egészen rövidek (pl. két szomszédos molekula közötti kristálykontaktus), és hosszúak is, az intermolekuláris vektorok a molekula átmérőjénél nem hosszabbak (12.5.3. ábra).



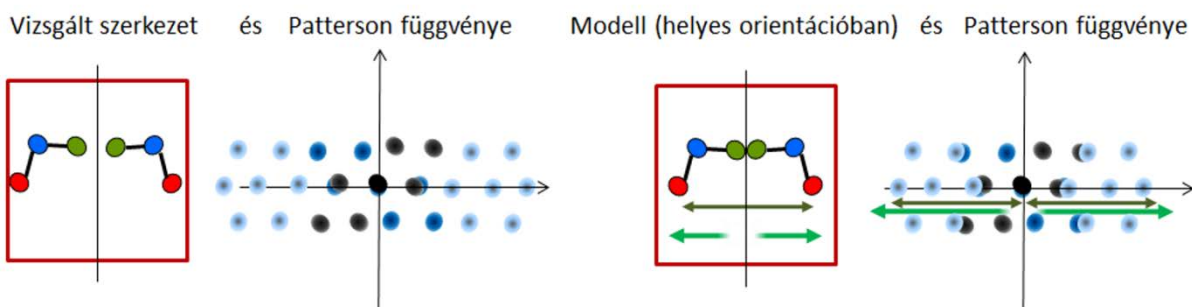
12.5.3. A Patterson-függvényben az intra és intermolekuláris vektorok bizonyos mértékben elkülönülnek: az intramolekuláris vektorok a  $d_{max}$  sugarú gömbön belül helyezkednek el.

Az intramolekuláris Patterson-vektorok csak a molekula orientációjától függenek, az elemi cellán belüli helyzetétől nem, ezért alkalmasak a Rotációs keresésre: a modellmolekula elforgatása során akkor lesz intramolekuláris Patterson csúcsainak mintázata a leginkább hasonló a vizsgált molekuláéra, amikor az orientációjuk megegyező (12.5.4. ábra, fent). A translációs keresés során a helyes orientációba forgatott modellmolekulát tologatjuk az elemi cellában, így a szimmetria operátoroktól függően közeledik vagy távolodik szomszédjaitól (a szimmetria ekvivalens molekuláktól)(12.5.4. ábra lent)). A translációs keresés során tehát az intermolekuláris vektorok mintázata használható fel: keressük a molekulának azt a pozícióját, amikor az intermolekuláris Patterson-vektorainak összessége leginkább hasonlít a vizsgált molekula Patterson-függvényére. Mindkét keresés szisztematikus keresés, azaz a molekulaorientációt ill. - helyzetet kis lépésekben változtatjuk, egy célfüggvény kiszámítjuk, és végül kiválasztjuk a legjobb megoldást (célfüggvény maximuma). (Létezik más elven működő, 6 dimenziós keresést és genetikus algoritmust alkalmazó keresési módszer is, de a gyakorlatban nem lett népszerű a használata.) Az alább leírt célfüggvényekhez képest a modern programok figyelembe veszik a modell teljességét és hasonlóságát vizsgált molekulához valószínűségi megközelítést alkalmazva, így határozva meg mi számít szignifikáns megoldásnak.

### Rotációs keresés



### Transzlációs keresés



12.5.4. ábra. A Patterson-függvény felhasználása a rotációs (fent) és translációs (lent) keresés során. A rotációs keresés során a modell (jobb oldal) intramolekuláris Patterson csúcsainak összességét használjuk (sötét foltok), a translációs keresés során az intermolekuláris Patterson csúcsokat (világoskék foltok). Az elemi cellában egy kétfogású forgástengely fekete vonalként van ábrázolva.

A rotációs keresés során a keresztrotációs függvény maximumát keressük (12.5.5. ábra). Ez a mért adatokból számolt ( $P(\mathbf{u})$ ) és az elforgatott modellből számolt ( $P_r(\mathbf{u}_r)$ ) Patterson-függvények átfedési integrálja. Mivel az intramolekuláris Patterson csúcsok mintázatát akarjuk „egymásra forgatni”, az intermolekuláris csúcsok zavarnak. Ezért az integrálást csak a molekula-átmérővel egyező, vagy (ha elnyújtott formájú a molekula) valamivel kisebb sugarú gömbön belül végezzük (ld.12.5.3. ábra jobb oldala). A vizsgált molekula Patterson-függvényében lesznek a gömbön belül intermolekuláris vektorok is, de a modellt beletehetjük egy olyan nagy elemi cellába, ahol messze vannak a szomszédos molekulák, így intermolekuláris Patterson-vektorok nem lesznek az integrálási gömbön belül (12.5.4. ábra). A Patterson-függvény számításakor kihagyják a nagyon alacsony felbontású reflexiókat (érzéketlenek a rotációra) és magas felbontású reflexiókat (3-3,5Å felbontásnál magasabb - a modell és a vizsgált molekula különbségei már jelentős különbséget okoznak) – emiatt mindkét Patterson-függvényt a 12.2.1. egyenlet alapján számítják. A forgatási kereséskor a molekulát Euler szögek szerint forgatják ([http://en.wikipedia.org/wiki/Euler\\_angles](http://en.wikipedia.org/wiki/Euler_angles)).

$$R(\alpha, \beta, \gamma) = \int_U P(\mathbf{u})P_r(\mathbf{u}_r) d\mathbf{u}$$

12.5.5. ábra Rotációs függvény (az integrálási régió,  $U$  általában a molekula-átmérővel körülbelül egyező sugarú gömb)

Ha a rotációs függvényben mindkét Patterson-függvényt a mért reflexió-amplitúdónégyzettel számítják, az az önrotációs függvény. Segítségével a nemkristallográfiai szimmetriaoperátor rotációs eleme meghatározható (az önrotációs függvény legnagyobb maximuma az origóban van).

A translációs keresés során a célfüggvény többféle lehet. A mért és modellből számolt amplitúdók korrelációja, vagy a Patterson-függvények átfedését mérő Transzlációs függvény a modell és a vizsgált molekula közötti kis homológia esetén is alkalmas a jó megoldás kiszűrésére, míg az R-faktor nem eléggé érzékeny mérőszám. A csomagolási vagy pakolódási függvényt (Packing function), ami az elemi cellában lévő molekulák ösztérfogatát méri, a translációs keresés eredményeinek szűrésére használják: ha az ösztérfogat kisebb, mint maximális, az azt jelenti, hogy a molekula átlapol szomszédjaival, tehát az adott megoldás nem jó.

A translációs függvény alakja hasonló a rotációs függvényéhez: a mért adatokból, és a már helyes orientációban levő modellből számolt Patterson-függvények átfedési integráljának a maximumát keressük a modell elemi cellán belüli helyének függvényében (12.5.6. ábra). Itt a modell intermolekuláris Patterson csúcsai a fontosak (az intramolekulárisak nem változnak a molekula eltolásakor), ezért csak ezeket számoljuk ki (kereszt-Patterson-függvény,  $P_{1,2}$ ).

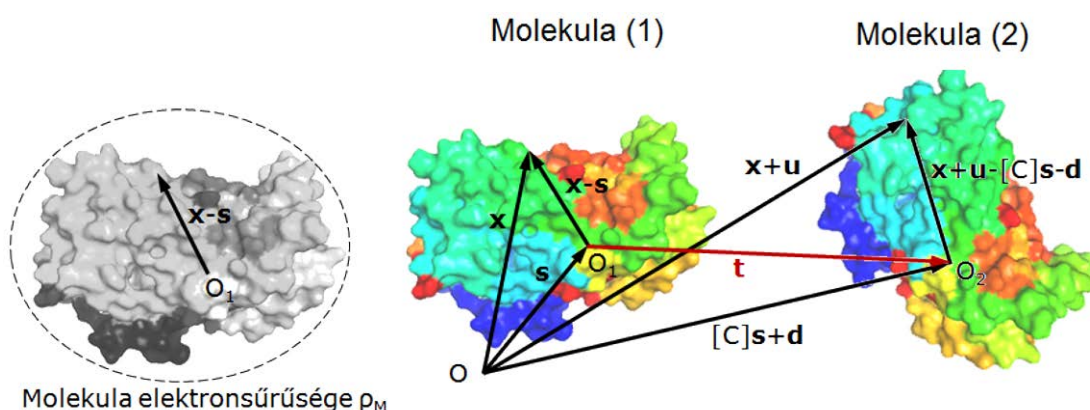
$$T(\mathbf{t}) = \int_V P(\mathbf{u})P_{1,2}(\mathbf{u}, \mathbf{t}) d\mathbf{u}$$

12.5.6. ábra. A translációs függvény

A  $P_{1,2}$  függvény számításakor (12.5.7. ábra) felhasználjuk, hogy az intermolekuláris Patterson-vektor két végpontján levő atomok egyforma, csak a kristallográfiai szimmetriaoperátorok ( $[C]$  forgatási mátrix és  $\mathbf{d}$  vektor) által elforgatott és eltoló molekulában vannak (12.5.8. ábra). Mindkét molekula elektronsűrűségi függvénye ennek a molekuláris elektronsűrűségi függvénynek ( $\rho_M$ ) a transzformáltja. Tehát  $\rho_1(\mathbf{x}) = \rho_M(\mathbf{x}-\mathbf{s})$  és  $\rho_2(\mathbf{x}+\mathbf{u}) = \rho_M(\mathbf{x}+\mathbf{u}-[C]\mathbf{s}-\mathbf{d})$ . Behelyettesítés és átalakítás utána translációs függvény a két molekula lokális origója közötti  $\mathbf{t}$  vektortól függő alakra  $T(\mathbf{t})$  hozható.

$$P_{1,2}(\mathbf{u}) = \int_V \rho_1(\mathbf{x})\rho_2(\mathbf{x} + \mathbf{u})d\mathbf{x}$$

12.5.7. ábra Kereszt Patterson-függvény



12.5.8. ábra. A molekula transzformációja kristallográfiai szimmetria operátorral (kereszt Patterson-függvény kifejezéséhez)

A rotációs és translációs keresés során a már említett valószínűségi módszerek felhasználásán kívül különböző forrásokból nyert információk felhasználhatók, pl. izomorf helyettesítésből származó kezdetleges fázisok, amelyek önmagukban nem elég jól értelmezhető elektronsűrűségi térkép számításához, vagy a nemkristallográfiai szimmetria forgatási elemének felhasználásával (amit az önrotációs függvénnyel határozunk meg) duális vektor keresés alkalmazása a translációs kereséskor. Utolsó lépésben a molekula merev test finomítása történik, aminek során a molekula orientációját és helyzetét leíró 6 paramétert finomítjuk konjugált gradiens módszerrel. Az alkalmazott célfüggvény a fehérjeszerkezet finomításakor alkalmazott célfüggvény (ld. következő fejezet).

[Teszt](#)

## 13. Fehérjék szerkezeti elemei, NMR, SAXS módszerek (Harmat Veronika)

### Irodalom

#### Bio-NMR

- [www.biomachina.org/courses/structures/download/sattler\\_nmr\\_handout\\_02.pdf](http://www.biomachina.org/courses/structures/download/sattler_nmr_handout_02.pdf)
- [www.biomachina.org/courses/structures/061.pdf](http://www.biomachina.org/courses/structures/061.pdf)
- [www.bioc.aecom.yu.edu/labs/girvlab/nmr/course/COURSE\\_2012/ConstrCalcEval.pdf](http://www.bioc.aecom.yu.edu/labs/girvlab/nmr/course/COURSE_2012/ConstrCalcEval.pdf)
- G.C.K.Roberts (ed.): NMR of Macromolecules, A Practical Approach, Oxford University Press, 1993.
- K.Wüthrich: NMR of Proteins and Nucleic Acids, Wiley, 1986.

#### SAXS

- [oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/fizkem/Biomimetikus-anyagok/kisszogu-jegyzet-2010.pdf](http://oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/fizkem/Biomimetikus-anyagok/kisszogu-jegyzet-2010.pdf)
- [www.chem.missouri.edu/Tannerjj/bchem/SAXS/SAXSreviewTainer07.pdf](http://www.chem.missouri.edu/Tannerjj/bchem/SAXS/SAXSreviewTainer07.pdf)
- [www.embl-hamburg.de/biosaxs/courses/embo2012ccmb/](http://www.embl-hamburg.de/biosaxs/courses/embo2012ccmb/)
- [dasher.wustl.edu/bio5357-07/lectures/lecture-23.pdf](http://dasher.wustl.edu/bio5357-07/lectures/lecture-23.pdf)

#### Fehérjekrisztallográfia

##### Könyv:

- G. Rhodes: Crystallography Made Crystal Clear, A guide for Users of Macromolecular Models, Academic Press, 2006.
- M.V.Sanderson, J.V.Skelly: Macromolecular Crystallography conventional and high throughput methods, Oxford University Press, 2007

##### Modellépítés, finomítás:

- [shelx.uni-ac.gwdg.de/~tg/teaching/molbio/2005/day3\\_4on1.pdf](http://shelx.uni-ac.gwdg.de/~tg/teaching/molbio/2005/day3_4on1.pdf)
- [bstr521.biostr.washington.edu/PDF/bstr521-lec27-09.pdf](http://bstr521.biostr.washington.edu/PDF/bstr521-lec27-09.pdf)
- [people.mbi.ucla.edu/sawaya/m230d/Refinement/refinement.html](http://people.mbi.ucla.edu/sawaya/m230d/Refinement/refinement.html)

##### Modellépítés:

- [www.ysbl.york.ac.uk/~cowtan/fourier/fourier.html](http://www.ysbl.york.ac.uk/~cowtan/fourier/fourier.html)
- [www-structmed.cimr.cam.ac.uk/Course/Fitting/fittingtalk.html](http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/Course/Fitting/fittingtalk.html)
- [d-nb.info/1026332877/34](http://d-nb.info/1026332877/34)
- [people.mbi.ucla.edu/sawaya/m230d/Modelbuilding/modelbuilding.html](http://people.mbi.ucla.edu/sawaya/m230d/Modelbuilding/modelbuilding.html)

##### Finomítás:

- [atbweb.stanford.edu/scripts/papers.php?sendfile=315](http://atbweb.stanford.edu/scripts/papers.php?sendfile=315)

A maximum likelihood alfejezet alapjául szolgáló összefoglaló:

- [www-structmed.cimr.cam.ac.uk/Course/Statistics/statistics.html](http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/Course/Statistics/statistics.html)
- [www-structmed.cimr.cam.ac.uk/Course/Likelihood/likelihood.html](http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/Course/Likelihood/likelihood.html)

### 13.1 Fehérjék felépítése, a szerkezet szerveződési szintjei

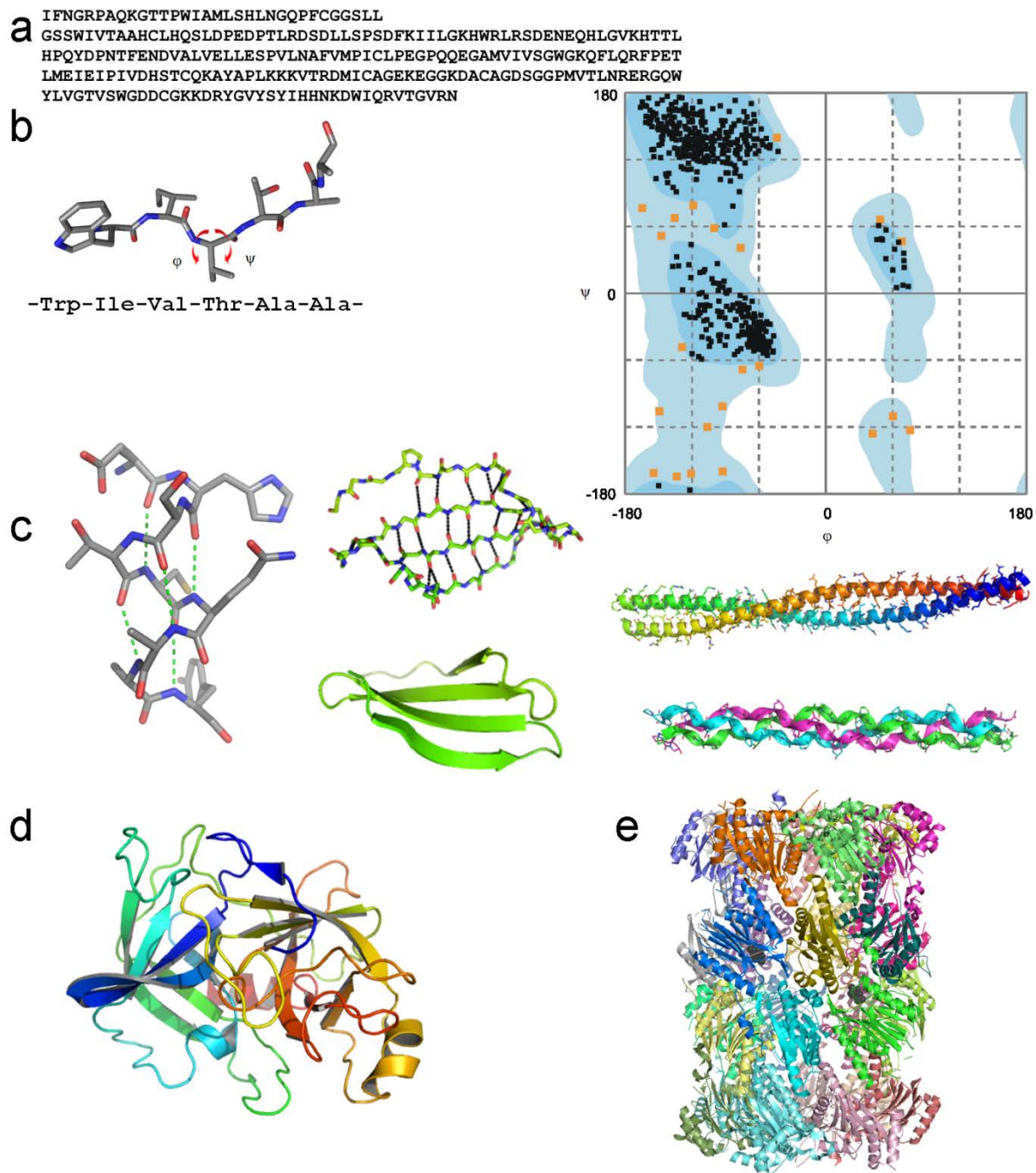
A fehérjéket 20-féle aminosav építi fel. Kapcsolódási sorrendjük, az aminosav sorrend a fehérje elsődleges szerkezete. A szekvencia hordozza a térszerkezetre vonatkozó információt és ezen keresztül a funkciót, de sok esetben a fehérje képződésekor még nem funkcionális, ahhoz más fehérjékkel kialakított kölcsönhatásokra van szükség (pl. a feltekeredés, harmadlagos szerkezet kialakulása dajkafehérjék, chaperonok segítségével, kémiai (poszt-transzlációs) módosítások, a fehérje szállítása a rendeltetési helyére speciális, irányító szekvencia részletének felismerése után, kofaktorok (pl. fémionok) kötése, hetero-multimer fehérjék kialakulása). A szekvencia vizsgálatából, a szekvencia adatbázissal való összevetéséből kiderül az adott fehérje rokonsági köre, funkciója, térszerkezeti típusa (fold, feltekeredés), különböző kölcsönhatások meglétére utaló szekvencia motívumai. (A fehérjeszerkezet szerveződési szintjeire példák a 13.1.1. ábrán láthatók.)

A következő szerveződési szint a másodlagos szerkezet, ami a fehérje főlánc konformációját jelenti, aminosavanként két torziós szög jellemzi ( $\varphi, \psi$ ), valamint a peptidkötés térállása (transz, néhány esetben, néha glicin és főleg prolin esetén cisz). A Ramachandran térképen ábrázolt  $\varphi, \psi$  értékek kirajzolják a fehérjelánc energetikailag kedvező konformációs lehetőségeit, amelyek a másodlagos szerkezet gyakori elemeinek felelnek meg:  $\beta$ -szál, hélix (3<sub>10</sub>-  $\alpha$ - és  $\pi$ -hélix, poliprolin hélixek), különböző kanyarok). A szupermásodlagos szerkezeti elemek átmenetet képeznek a harmadlagos szerkezet felé, több másodlagos szerkezeti elemből állnak, amelyek vagy önmagukban is léteznek (pl. két egymásra tekeredett  $\alpha$ -hélix szuperhélice a colied coil), vagy nem (pl. kollagén három szálból álló szuperhélix).

A harmadlagos szerkezet az egész fehérje térszerkezete, a másodlagos szerkezeti elemek összessége, térbeli, topológiai kapcsolatai (pl. egy  $\beta$ -redőben milyen sorrendben, és paralel vagy antiparalel módon következnek a szomszédos  $\beta$ -szálak). A harmadlagos szerkezetet egyrészt a másodlagos szerkezeti elemeken belül és közöttük létrejövő főlánc-atomok által létesített hidrogénkötés hálózat (pl. a  $\beta$ -szálak között a  $\beta$ -redőben vagy az  $\alpha$ -hélixen belül), másrészt az oldalláncok közti kölcsönhatások (ionos kölcsönhatások, hidrogénhidak, dipólus-dipólus kölcsönhatások, kisebb mértékben diszperziós erők és a hidrofób effektus – entrópia jellegű hatás, ami az apoláris csoportok vízből való kizárását, és így a fehérje hidrofób magjának kialakulását okozza) stabilizálják. A másodlagos szerkezeti elemek térbeli elrendeződése a feltekeredés (fold), ami lehet az egész fehérjére jellemző, de sok esetben a fehérje több, egymástól többé-kevésbé független szerkezeti egységet, domént vagy modult tartalmaz, amik önállóan is feltekerednek. A másodlagos-harmadlagos szerkezettel rendelkező globuláris és fibrilláris fehérjék mellett léteznek rendezetlen fehérjék is (intrinsically unstructured proteins, IUP), amelyek jellemzője, hogy igen mozgékony a szerkezetük, legfeljebb kis szakaszaik rendelkeznek másodlagos szerkezettel, sok közülük csomóponti fehérje: sokféle kötőpartner fehérjéhez képes kötődni, és így működésüket együttesen szabályozni – ezekben a komplexekben a kötőszakasz rendeződik.



Negyedleges szerkezettel a több (egyforma, vagy különböző) fehérjemolekulából álló komplexek rendelkeznek. Ezek a szerkezetek funkcionális egységek, a multimer képződését meggátoló mutációk akár a fehérje alegységek aggregációját is okozhatják. Vannak olyan alegységek, amik többféle, különböző funkciójú komplexben is szerepelhetnek, vagy csak tranzienst képeznek.



13.1.1. ábra. A fehérjék elsődleges, másodlagos harmadlagos és negyedleges szerkezete, példák. a: fehérjedomén szekvenciája egybetűs kóddal, b: fehérjelánc részlete főlánc torziós szögek jelölésével és Ramachandran térkép c:  $\alpha$ -hélix,  $\beta$ -redő, colided-coil, kollagén hármas hélix; d: kimotripszin szalagmodellje (fold: két, egymásra merőleges elhelyezkedésű  $\beta$ -hordó), e: proteaszóma negyedleges szerkezete (28 fehérjelánc, különböző színekkel jelölve) (PDB kódok: 3q8t, 1cgd, 2f91, 3dy3)

A következő alfejezetekben rövid kitekintést nyújtunk két, a fehérjekristallográfia melletti szerkezet-meghatározó módszerről. Ezeknek a módszereknek a részletes tárgyalása meghaladná e jegyzet kereteit, ezért itt csak a szerkezetről kapott információ főbb jellegzetességeit emeljük ki.

## 13.2. A fehérjeszerkezet vizsgálata SAXS módszerekkel

A kisszögű röntgenszórás (SAXS) és kisszögű neutronszórás (SANS) módszerek nanorészecskék méretének és alakjának vizsgálatára alkalmas módszerek, mindkét módszer a sugárzásnak a vizsgált mintán való rugalmas szóródását használja ki (a szórás leírása matematikailag hasonló, a Függelékben tárgyalt formalizmussal levezethető). A SANS kevésbé hozzáférhető módszer, mivel neutronforrás szükséges hozzá, viszont érzékenyebb a könnyűatomokra (az atomi szórástényező nem függ a rendszámától), és a szórócentrumok dinamikájáról is információt kapunk.

A biológiai makromolekulák oldatbeli vizsgálatával értékes információt kaphatunk a feltekeredésről-letekeredésről (pl. intermedierek), nyújtott konformációjú állapotokról (pl. szerkezet nélküli fehérjék), többdoménes, hajlékony könyökrégiókkal rendelkező molekulák konformációs állapotairól (csuklórégiók jellemző állása; kristályban rendezetlen fehérjeszakaszok alakja), aggregációról, általánosságban az oldatbeli molekulaalakról és oligomerek tagszámáról. Ha a fehérje túlságosan flexibilis, ezért nem kristályosítható (vagy csak önálló doménjei kristályosíthatók), és nagy mérete miatt NMR-rel sem vizsgálható. A módszer hátránya viszont, hogy csak 10-50Å felbontás érhető el (de nm-µm mérettartomány vizsgálható).

Mivel a részecskék véletlenszerű orientációban vannak az oldatban, három dimenziós információ helyett csak egy dimenziós lesz kapható a szórási képből: két dimenziós detektorral felvett szórási képen elmosódott gyűrű vagy gyűrűk láthatók, az intenzitást a szórási vektorhosszának ( $S$ ) függvényében ábrázolva (vagy gyakran  $q=2\pi S$  függvényében ábrázolva) kapjuk a szórási görbét. A szórási göréből közvetlenül meghatározható a részecskét jellemző általános paraméterek homogén ( $R$  sugarú), gömb alakú részecskére a 13.2.1. és 13.2.2. ábrán láthatóak. A levezetés során (ld. [oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/fizkem/Biomimetikus-anyagok/kisszogu-jegyzet-2010.pdf](http://oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/fizkem/Biomimetikus-anyagok/kisszogu-jegyzet-2010.pdf))

közelítések tehetők a kis szórási szög miatt. Az intenzitás a részecske és a körülvevő közeg elektronsűrűségének különbségétől függ, fehérjeoldatok esetén ez a fehérje ( $0,44e/\text{Å}^3$ ) és a pufferoldat ( $0,33e/\text{Å}^3$ ) elektronsűrűsége közti kis, koncentrációtól és oldat összetételétől is függő különbség (kontraszt).

$$I(S) = V_{gömb}^2 (\rho_1 - \rho_2)^2 \exp\left(\left(-\frac{4\pi^2 R^2}{5}\right) S^2\right) = V_{gömb}^2 (\rho_1 - \rho_2)^2 \exp\left(\left(-\frac{R_G^2}{3}\right) q^2\right)$$

$$\text{ahol } R_G = \sqrt{3/5}R$$

13.2.1. ábra Guinier összefüggés. A homogén gömb alakú részecskék szórásának közelítése nagyon kis szórási szögek esetén (a szórási görbe ún. Guinier tartománya). A meghatározható paraméter  $R_G$ , a Guinier rádiusz, ami a részecske tehetetlenségi rádiusza (girációs rádiusz).

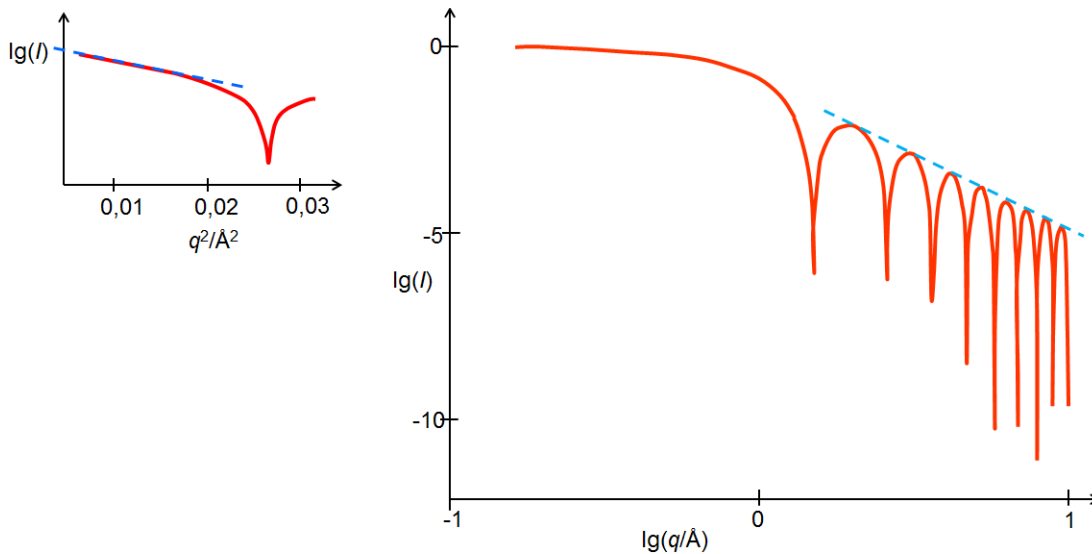
$$I(S) = \frac{1}{8\pi^3} \left( \frac{4\pi R^2}{S^4} (1 + \cos 4\pi RS) + \frac{4R \sin 4\pi RS}{S^5} + \frac{1}{\pi S^6} (1 - \cos 4\pi RS) \right), \quad \text{az illesztett egyenes:}$$

$$I(S) = \frac{(N4\pi R^2)}{4\pi^3} \frac{1}{S^4}$$

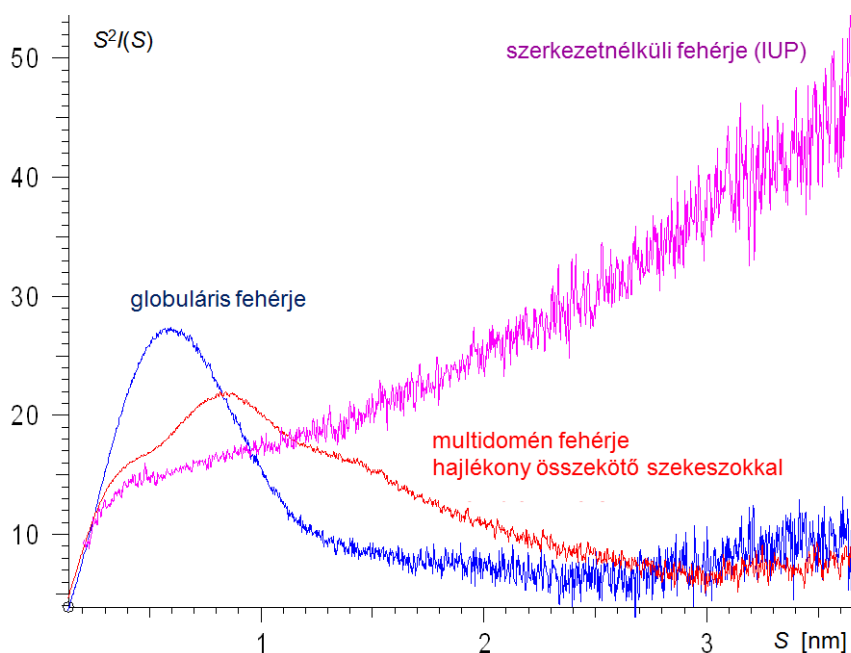
13.2.2. ábra. A homogén gömb alakú részecskék szórásának közelítése a Porrod tartományban. Az intenzitás kifejezéséből az  $S^{-5}$ -től és  $S^{-6}$ -ól függő tagok elhanyagolásával egy  $S^{-4}$ -hatványával lecsengő függvényt kapunk, ami a  $\cos 4\pi RS$  tag miatt periodicitást mutat. A maximumokra illeszthető egyenes egyenlete a második sorban található, ebből a részecskék felülete  $N4\pi R^2$  számítható.

A Guinier összefüggésből következik, hogy  $S=0$ -ra extrapolálva a szórási görbe intenzitásértékét, a részecsketérfogot négyzete kapható meg. A Guinier plot segítségével a 13.2.1. egyenlet logaritmusát használjuk fel: az  $\ln(I)$ -t ábrázolva a  $q^2$  függvényében, egyenes illeszthető a Guinier tartományban, és a meredekségből meghatározható  $R_G$ . Ha a Guinier plot nem egyenes, az különböző méretű részecskékre utal (pl. aggregáció, vagy elnyújtott alak).

A Guinier tartománynál nagyobb szórási szög értékeknél található a Porrod tartomány, ahol a görbe lecsengéséből a részecskék alakjára is következtethetünk: gömbszerű részecskék:  $I(q) \sim q^{-4}$ ; lemezek  $I(q) \sim q^{-2}$ ; vékony pálcikák:  $I(q) \sim q^{-1}$ . A Guinier és Porrod illesztésre példa gömbszerű részecskék esetén a 13.2.3. ábrán látható. A függvény éles minimumainak „kisimulása” polidiszperz rendszerre utal. A Kratky görbe a fehérje feltekeredtségéről szolgáltat kvalitatív információt (13.2.4. ábra).

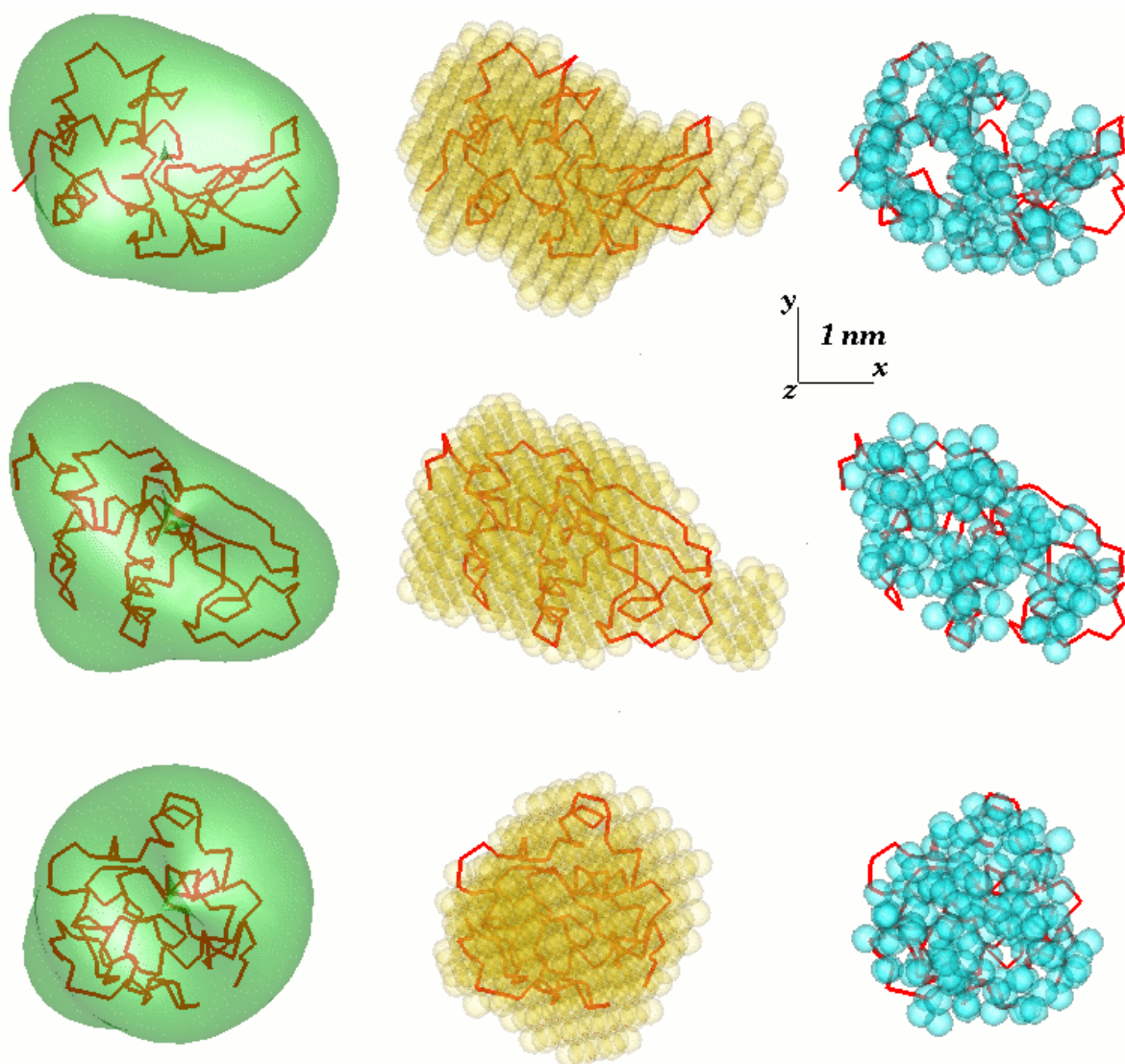


13.2.3. ábra 30Å sugarú homogén gömb Guinier (balra) és Porrod (jobbra) plotja ([www.helsinki.fi/~serimaa/soft-luento/soft-2-scattering.html](http://www.helsinki.fi/~serimaa/soft-luento/soft-2-scattering.html) nyomán).



13.2.4. ábra Kratky görbék

A szórás görbe Fourier transzformációjával kapják a páreloszlás függvényt, ami a Patterson-függvény megfelelője SAXS vizsgálat esetén, de ez csak egydimenziós függvény, nincs az origójában maximuma, és nincsenek intermolekuláris vektoroknak megfelelő maximumai. A szórás görbéből nem határozható meg egyértelműen a molekulaalak, és a mérési hiba korlátozza a modell elérhető pontosságát és helyességét. Kiindulási modellként felhasználják a PDB-ben található homológ szerkezeteket, szerkezeti doméneket, amit az adatokhoz illesztnek. Komplexek oligomerek és megváltozott domén-elrendeződésű fehérjék esetén lehetséges az építőegységekkel (doménekkal) merev test finomítást végezni. Az illesztés szempontjából (is) komplikált, polidiszperz rendszerek az egyensúlyi keverékek (hajlékony molekulák konformációs egyensúlya, oligomerképződés, komplexképződés, feltekeredés-letekeredés): minden entitásnak különböző szórás görbéje van, amelyeket együtt kell illeszteni. Az ab initio alakmeghatározáskor az eredeti atomos modellt leegyszerűsítik (13.2.5. ábra). Lehetséges a fehérje burkolófelszínét, molekuláris borítékját definiálni harmonikus gömbfüggvények segítségével, majd ezek paramétereit illeszteni (SASHA program). A szabad gyöngyökből Monte Carlo módszerrel alkotott modell illesztése során egy, a molekula legnagyobb kiterjedésének megfelelő átmérőjű gömbben lesznek az azt szorosan kitöltő gyöngyök oldószer vagy fehérjerégióhoz sorolva. A harmadik módszernél a kiindulási fehérjeszerkezetet „gyöngysorra” alakítják (minden aminosavnak egy gyöngy felel meg), majd láncszerűségét megőrizve szimulált hőkezeléssel (ld. 13.4.fejezet) illesztik a mért adatokhoz. Gyakran alkalmazzák a SAXS módszert más módszerekkel kombinációban (pl. NMR, de novo fehérjemodellezés), a segítségével kapott alakra vonatkozó adatokat kényszerfeltételként alkalmazva.



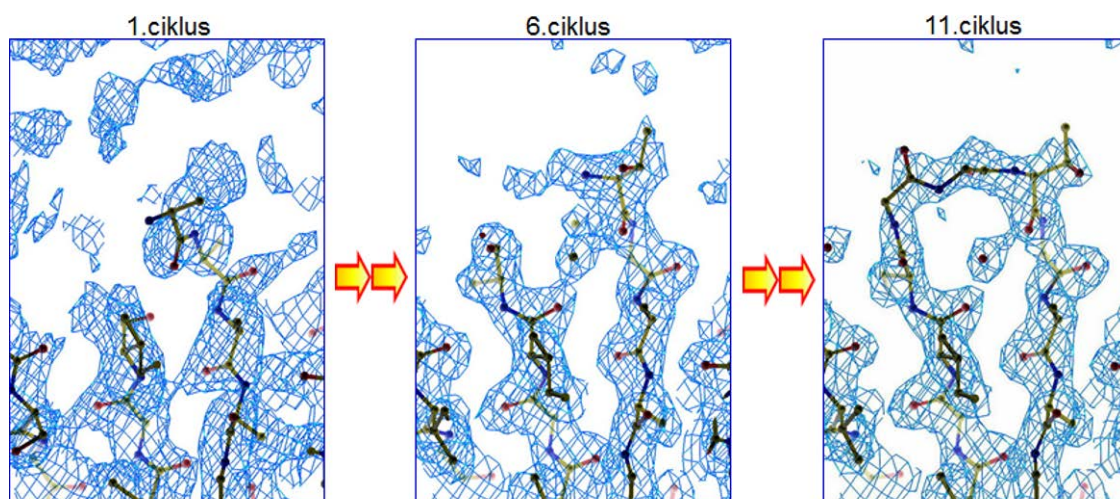
13.2.5. ábra. Lizozim kristályszerkezete alapján különböző programokkal készített modellje: molekuláris boríték függvény, gyöngyökből alkotott modell és „dummy residue” modell (az aminosavlánc az egyes aminosavakat reprezentáló gömbök láncolata) (forrás: [en.wikipedia.org/wiki/Biological\\_small-angle\\_X-ray\\_scattering](http://en.wikipedia.org/wiki/Biological_small-angle_X-ray_scattering))

### 13.3. Fehérjekristallográfia: az első elektronsűrűségi térképtől a szerkezetig

A kristallográfiai szerkezetmegoldás során a molekula (az elemi cella aszimmetrikus egységének tartalma) térszerkezetét, az atomi koordináták és atomi mozgástényezők összességét a fázisprobléma megoldása után számítható elektronsűrűségi térképek értelmezése során kapjuk. A szerkezetfinomítás során ezeket illesztjük a mért adatokhoz. Az elektronsűrűségi térkép az összes elemi cellának a mérés egész idejére vett átlagos elektronsűrűségi térképe, ezért a kristályban rendezetlen vagy mozgékony szerkezeti részletek (statikus és dinamikus rendezetlenség) elektronsűrűsége sokszor nehezen értelmezhető. Jó felbontás esetén, ha csak két fő konformerje van jelen egy adott csoportnak a kristályban, ezek még elkülöníthetők. Gyengébb felbontás esetén azonban gyakran csak elmosódott elektronűrűséget látunk a két konformer közötti térrészben (ami megnehezíti a két konformer felismerését), vagy az atomcsoport átlagos

elektronsűrűsége a térkép zajszintjébe esik, nem értelmezhető. A makromolekulás kristályszerkezetekre emiatt általában jellemző, hogy a molekula összes atomját nem tartalmazzák (hiányoznak a hajlékony régiók: egyes felszíni oldalláncok, a fehérjelánc vége, esetleg hajlékony hurokrégiók). A modellépítés és finomítás iteratív eljárás: a modell mozgékonyabb régióit a kiindulási, viszonylag nagy hibával rendelkező fázisokkal számolt elektronsűrűségi térképek alapján nem tudjuk megépíteni, de más régiók kijavítása és a modell finomítása során kapunk egy jobb (a vizsgált molekulára jobban hasonlító) modellt. Ennek az atomi pozíciói és B-faktorai segítségével aztán új fázisokat számolunk, amelyek jobbak lesznek, a velük számolt elektronsűrűségi térképpel pedig tovább tudjuk javítani a modellt (13.3.1. ábra)

Modellépítés-finomítás:

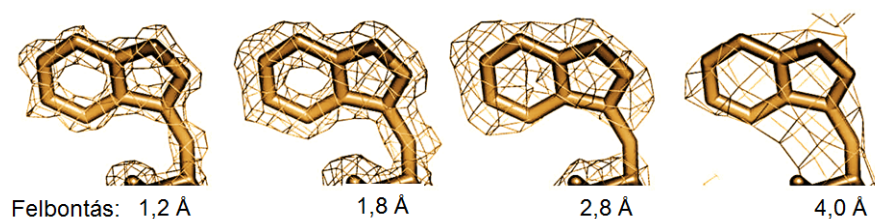


13.3.1. ábra. Makromolekula modellépítése és finomítása iteratív eljárás. Balra: a molekuláris helyettesítés után kapott  $2F_o - F_c$  típusú térkép, és a kiindulási modell részlete (a középen látható, két  $\beta$ -szálat összekötő hurokrégió a modellben rövidebb, mint a vizsgált molekulában; az összekötő szakasz a térképen nem látszik). Középen: a modellépítés-finomítás közti fázisában. Jobbra: a szerkezetmegoldás végén. (felbontás:  $2,7\text{\AA}$ )

### 13.3.1. Modellépítés

Modellépítés során a 12.3.2. fejezetben bemutatott elektronsűrűségi térképeket használjuk. Az elektronsűrűségi térképek értelmezhetősége nemcsak a fázisok jóságától (finomítottság mértékétől) függ, hanem a felbontástól is (13.3.2. ábra). A fehérje adatkészletek általában atomi felbontásúnál gyengébb felbontásúak, tehát nem különíthetők el a térképeken az egyes atomokhoz tartozó elektronsűrűségi maximumok. Az, hogy mégis felépíthető a szerkezet ezeknek a térképeknek a segítségével, amiatt lehetséges, hogy a biológiai makromolekulák viszonylag kevés féle építőköből (aminosavak, nukleotidbázisok, cukor-egységek) állnak, amik méret és alak szerint jól megkülönböztethetők. Atomi felbontásnál rosszabb felbontás esetén a fehérjék szerkezetére vonatkozó *a priori* adatokat is felhasználjuk (ideális kötésszögek, kötéshosszak, főlánc konformáció: Ramachandran térkép, oldallánc konformáció: *rotamerek*), ezeket a modellépítésre használt programok automatikusan felhasználják. A térképek értelmezhetőségét a felbontáson kívül nagyban befolyásolja az adatkészlet teljessége is: ha hiányoznak a nagy intenzitású reflexiók (méréskor túlcsordultak), egy bizonyos felbontási héj (a kristály jegesedése, „jéggyűrűk”) vagy egy cikk a reciproktérből (a mérést túl korán abba hagytuk, mert nagyobb szimmetriát

feltételeztünk, mint a valóságos), az mind az elektronsűrűségi térképek „fodrozódását” okozza ([www.yesbl.york.ac.uk/~cowtan/fourier/fourier.html](http://www.yesbl.york.ac.uk/~cowtan/fourier/fourier.html), duck tales).



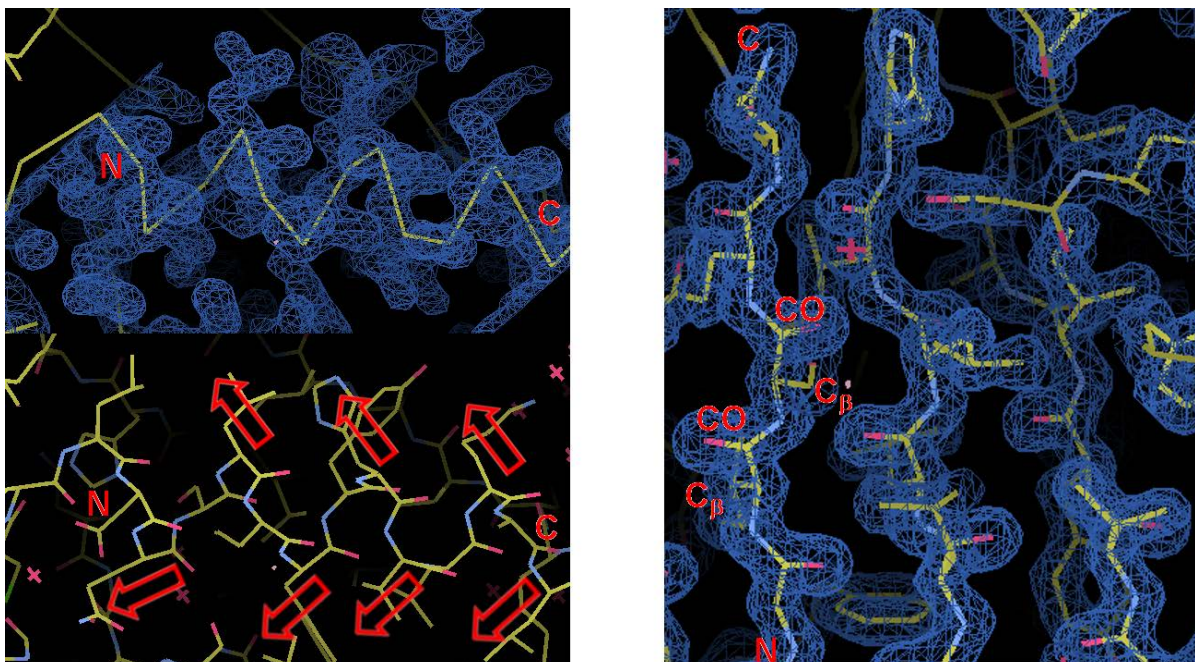
13.3.2. ábra. Az elektronsűrűségi térkép részletgazdagságának függése a felbontástól ( $2F_o - F_c$  típusú térkép; triptofán oldallánc). Legalább atomi felbontás esetén rendelhető csak elektronsűrűségi maximum minden nemhidrogén atomhoz. Közepes felbontás esetén más forrásokból származó geometriai ismereteket kell felhasználnunk (ideális kötésszögek, kötéshosszak, esetleg torziós szögek is). Gyengébb, pl. 4 Å felbontás esetén gyakran a konformer sem azonosítható a térkép alapján.

Ha izomorf helyettesítéssel oldottuk meg a szerkezetet, nincs kiindulási modellünk, a sűrűségmódosítással kapott térképben fel kell ismerni és fel kell építeni a fehérjeláncot. Elérhetőek automatikus modellépítő programok, amelyek sikere a kiindulási térkép minőségétől is függ, de elsősorban a felbontástól. Általánosságban elmondható, hogy jó, 2,0-2,3 Å felbontás esetén a program képes a modell nagy részét felépíteni, azonban ebben az esetben is szükséges felhasználói hozzájárulás, a nehezebben értelmezhető térképű, mozgékonyabb régiók felépítésénél. A folyamat lépései:

- Egy váz (skeleton) definiálása (az elektronsűrűségi felhő közepén végigfutó vonal).
- A váz korrigálása során a váz konnektivitását úgy változtatja a program, hogy kevesebb elágazás, és hosszabb nyújtott illetve helikális szakaszok (a modell leendő  $\beta$ -szálai és  $\alpha$ -hélicei) legyenek benne.
- A váz mentén egy  $\alpha$ -szénatom lánc beépítése, melynek során a vázból való kiágazások, az oldalláncok helye nyújt segítséget a  $C_\alpha$ -atomok elhelyezésénél, valamint a másodlagos szerkezeti elemekben ismert  $C_\alpha - C_\alpha$  távolság felhasználása. Az eredmény: hosszabb-rövidebb, különálló láncok.
- A következő lépés a  $C_\alpha$ -lánc polialanin láncná való alakítása, amelynek során a láncok lefutását meg kell állapítani. Ez  $\alpha$ -hélixek esetén könnyebb, mert a hélix tengelyéhez képest egyik irányba mutatnak az oldalláncok.  $\beta$ -szálak esetén csak jó felbontás esetén dönthető el nagy biztonsággal, az elektronsűrűségi térképen a karbonil csoport és az oldallánc helyzetének megfelelő maximum, „dudor” egymáshoz viszonyított helyzetének vizsgálatával (13.3.3. ábra).
- A kezdeti modell felépítésének utolsó lépésében történik a szekvencia ráillesztése a polialanin láncra, ez kiterjedt oldalláncú aminosavak térképen való azonosításával (Trp, Tyr, Phe) és a szekvenciában való kikeresésével történik, de nem biztos, hogy a modell összes polialanin láncocskája azonosítható és átkonvertálható a szekvencia szerint, tehát a láncocskák topológiai sorrendjében lehetnek hibák.

A programok automatikus modellépítő algoritmusai a kezdeti modellt iteráltatja. A modelltől kapott új fázisok segítségével új térképet számol, amiben újra felépíti a modellt: szabad atomokra bontja, a szabad atommodell módosítja (atomok eltörlése, új atomok hozzáadása az elektronsűrűségi térképnek

megfelelően), a szabad atom modellben újra azonosítja a fehérjelánc(ka)t, rövid oldalláncokkal felépíti a láncokat, az oldalláncokat automatikusan kiegészíti, majd a fehérjeszekvenciát ráilleszti, újra finomítja, és a következő ciklusban az egészet újrazekedi.



13.3.3. ábra. A fehérjelánc irányának meghatározása  $\alpha$ -hélix (balra) és  $\beta$ -szálak (jobbra) esetén. (Az ábrákon  $2F_o - F_c$  típusú térkép látható.)

A fázisprobléma molekuláris helyettesítéssel való megoldás után van kezdeti modellünk, és csak ezt kell a vizsgált molekulának megfelelően módosítanunk. Ebben az esetben azonban a modelltorzítás gondot okozhat (model bias, szemléltetését ld. és 5.3. fejezet ábrái, [www.ysbl.york.ac.uk/~cowtan/fourier/coeff.html](http://www.ysbl.york.ac.uk/~cowtan/fourier/coeff.html)): a fázisok, amik a modellből származnak, jobban befolyásolják az elektronsűrűségi függvényt, mint az amplitúdók (mért adatok). Tehát a modelltorzítás akadályozza, hogy felismerjük a modell javítandó részleteit. A modelltorzítás kihagyásos térképekkel (omit map) csökkenthető: a modell kritikus részletét eltöröljük, majd újrafinomítjuk, és a kritikus részt az új térkép alapján újra beépítjük. Az ilyen egyszerű kihagyásos térképek még nem elég hatékonyak a modell torzítás kiküszöbölésébe, mert a maradék szerkezet „emlékszik” a kihagyott részre (az előző finomítási ciklusokban a modell többi része egy kicsi torzult, hogy a kritikus szerkezeti rész hibáját kompenzálja). A maradék modell torzítás kiküszöbölhető szimulált hőkezeléssel (ld. 13.3.2.fejezet), vagy az atomok kis mértékű véletlenszerű elmozdításával. A kihagyásos térképeket az egész szerkezetre ki lehet számolni: minden aminosavra külön-külön elvégezhető a kihagyás, a számolt térképet ekkor csak az adott aminosav környezetében veszi figyelembe a program, végül a kiskihagyásos térkép darabkákból állítja össze az egész molekula kihagyásos térképét.

A modellépítési ciklusok általános stratégiája, hogy először a jól definiált, stabil konformációjú, ezért nagyobb átlagos elektronsűrűségű részletek felépítése történik, majd, ahogy javul a modell, javulnak a fázisok, és csökken az elektronsűrűségi térképek zajszintje, egyre mozgékonyabb, esetleg nem is 100%-osan jelen levő szerkezeti elemeket is beépítünk (ez is elvégezhető részben automatizáltan, programok segítségével). Szokásos lépések általános sorrendje:



- Fehérje főlánc felépítése, stabil konformációjú oldalláncok (pl. fehérje hidrofób magja) beépítése.
- Hajlékonyabb hurokrégiók beépítése, további oldalláncok beépítése.
- Alternatív konformációjú oldalláncok (esetleg hosszabb peptidszakaszok) beépítése, lehetséges alternatív konformerek figyelembevételével (ezek az adatépítő programok adatbázisaiban megtalálhatók, onnan automatikusan behívhatók). A modell korrigálása a másodlagos kölcsönhatások felülvizsgálatával (pl. His, Asn, Gln oldalláncok irányának meghatározása a hidrogénkötés mintázat alapján).
- Nem kovalensen kötött molekulák: ligandumok, vízmolekulák, az anyalúgból származó ionok, molekulák beépítése a lehetséges konformerek és másodlagos kölcsönhatások figyelembevételével.

### 13.3.2. Szerkezetfinomítás

A kémiai kristallográfiában a legkisebb négyzetes finomítást alkalmazzák a szerkezetfinomításra. Ennek a minimalizálandó célfüggvénye (13.3.4. ábra) implicit módon tartalmazza azt a feltételezést, hogy a fázisok helyesek (a modell nagyon hasonlít a vizsgált molekulához), ebben az esetben egyezik meg ugyanis a cél (vagyis, hogy a mért  $F_o(\mathbf{h})$  vektorokat minél jobban megközelítsük a számolt  $F_c(\mathbf{h})$  vektorokkal), azzal, hogy az amplitúdókat közelítjük.

$$Q = \sum_{\mathbf{h}} w(\mathbf{h})(F_o(\mathbf{h}) - F_c(\mathbf{h}))^2$$

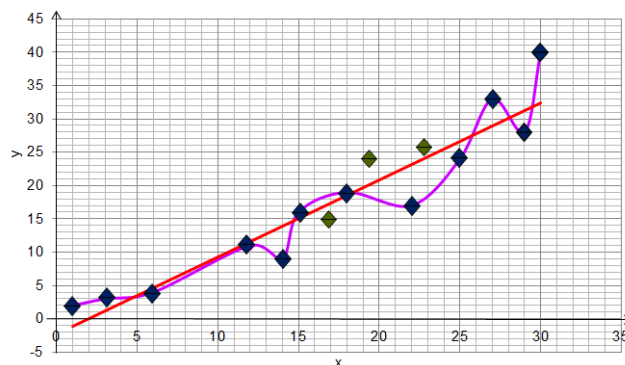
13.3.4. ábra. A legkisebb négyzetes finomítás célfüggvénye.

A makromolekulás szerkezetfinomításban ez a módszer nem elég hatékony, a következő okok miatt:

- Túlillesztés veszélye (különösen közepes vagy gyenge felbontás esetén a megmért reflexiók számát megközelíti a változók száma). *Megoldás: a priori* megfigyelések bevezetése (geometriai megkötések, kényszerek). Konvergencia követésére  $R$  és  $R_{free}$  együttes alkalmazása.
- A minimalizálandó célfüggvénynek túl sok lokális minimuma van. (Sok a meghatározandó paraméter (atomonként három koordináta, és B-faktor). Ezért kicsi az esély, hogy megtaláljuk a globális minimumot.) *Megoldás: hatékonyabb minimalizáló algoritmus (molekuladinamikai szimuláció) alkalmazása és csak a lényeges paraméterek illesztése (torziós szög dinamika).*
- A modell nem lehet teljes a gyakorlatban (hiányoznak atomok), ezért a valóságnak megfelelő atomi koordináták és B-faktorok esetén ennek a hiányos modellnek elvileg sem lehetnek a szerkezeti tényező amplitúdói a mértekkel egyenlők. *Megoldás: maximum valószínűségi (maximum likelihood) célfüggvény.*

Míg a kémiai kristallográfiában teljesül, hogy a mért reflexiók száma legalább tízszerese a finomítandó paramétereknek, a fehérjekristallográfiában az alacsonyabb felbontás miatt ez az arány háromnál is kisebb lehet, ezért fennáll annak a veszélye, hogy finomításkor túlillesztjük a modellt (13.3.5. ábra). Ekkor az illeszkedés mérőszáma a kristallográfiái jósági tényező ( $R$ -faktor, 13.3.6. ábra) alacsony értéket vesz fel, jelezve a precíz illesztést, de a modell helyességéről nem nyújt információt. A probléma feloldására

bevezették a szabad R-faktort: a modellt általában csak a mért reflexiók 95%-ához illesztjük (az ezekkel számolt R-faktor az  $R_{work}$ ), és a kimaradt 5%-nyi reflexióval számolják a szabad R-faktort. Ha ez is csökken a finomítás során az valószínűleg azt jelzi, hogy a modell valóban javul. Az  $R_{free}$ -t elsősorban a különböző finomítási stratégiák (súlyozás, adat/paraméter arány) közötti döntésre használják. Ha értéke kb. 0,05-nél jobban különbözik az R-faktortól, az túlillesztésre utal (nagyobb felbontás esetén kisebb különbség is utalhat túlillesztésre, alacsony felbontás esetén pedig nagyobb különbség is megengedhető.).



13.3.5. ábra. Túlillesztés. A kék mérési pontjainkat sok paraméteres polinommal precízen tudjuk illeszteni (lila), azonban ez nem jelenti azt, hogy a modellfüggvény helyes (lehet pl. egyenes az adatokat leíró függvény). Ha további, az illesztés szempontjából független reflexió mérésekhez (zöld) való illeszkedést is megvizsgálunk, információt kaphatunk az illeszkedés jóságáról.

$$R = \frac{\sum_{\mathbf{h}} |F_{obs}(\mathbf{h}) - F_{calc}(\mathbf{h})|}{\sum_{\mathbf{h}} F_{obs}(\mathbf{h})}$$

13.3.6. ábra. Az R-faktor (és szabad R-faktor) alakja

A túlillesztést az adat/paraméter arány javításával kerülhetjük el. A fehérje geometriai jellemzői közül a funkció szempontjából a torziós szögek a legfontosabbak, a globális konformáció teszi lehetővé, hogy a szekvenciában távoli aminosavak térben közel kerüljenek. A kötőszögek-kötéshosszak viszont nem határozhatók meg olyan pontossággal, hogy lehetővé tegyék a kismértékű torzulásuk észlelését (nem atomi felbontású szerkezetek esetén nincs minden atom helyén különálló maximum az elektronsűrűségi térképen), ezeket más forrásból (kismolekulás kristallográfiai eredményekből) vesszük át. Vagy megkötéseként alkalmazzuk őket (constraint, a geometriai paramétereket az ideális értékükön tartjuk), ekkor a változók száma csökkent; vagy kényszerként alkalmazzuk (restraint, az ideális értéktől való eltérést büntetjük a célfüggvényben; 13.3.7. ábra), ezzel a mért reflexiók számát növeltük. A nemkristallográfiai szimmetria is hasonlóan kétféleképpen alkalmazható az adat/paraméter arány javítására. Az adat/paraméter arány nemcsak a felbontástól, hanem a kristály oldószertartalmától is függ, de általánosságban elmondható, hogy kb. 4,5Å felbontás esetén csak a főlánc torziós szögek finomíthatók függetlenül, kb. 3,5Å felbontás esetén az oldallánc torziós szögek is, 3,0Å felbontás esetén már aminosavanként két átlagos B-faktor is, 2,5Å felbontás esetén individuális atomi B-faktorok is, 1,75Å felbontás esetén ezen felül a kötőszögek és kötőhosszak is, 1,3Å felbontás körül pedig az anizotróp atomi mozgástényezők is. Tapasztalat szerint a fehérjekristályokban az anizotrópia döntő hányada nagyobb régiók, domének vagy fehérjemolekulák együttes anizotróp mozgásával leírható, így az

anizotrópia viszonylag kevés paraméter bevezetésével jól modellezhető, ez a TLS finomítás (a merev testek anizotróp mozgása nem egy, hanem három tenzorral írható le: transláció, billegő és csavarodó mozgás; bővebben: [ccp4wiki.org/~ccp4wiki/wiki/images/f/fa/Winn-Oulu08-tls.pdf](http://ccp4wiki.org/~ccp4wiki/wiki/images/f/fa/Winn-Oulu08-tls.pdf)).

$$E_{bond} = \sum_{bonds} k_b (r - r_0)^2 \quad , \quad E_{angl} = \sum_{angles} (k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + k_{\theta ub} (r_{1,3} - r_{ub})^2)$$

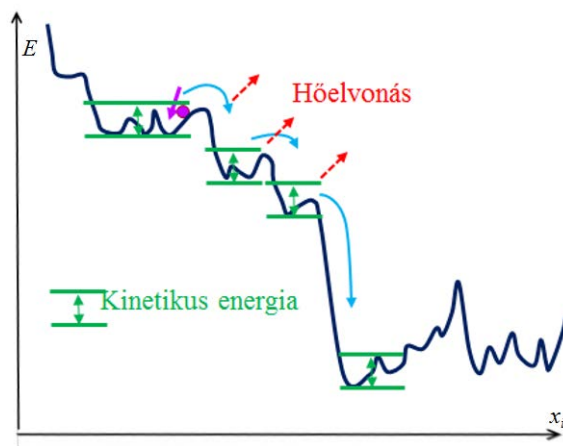
13.3.7. ábra. Harmonikus alakú geometriai megkötések (kötéshossz és kötésszög): az adott paraméter ideális értékével és egy kényszerítő erőállandóval jellemezhetők (Hooke törvény).

A következő problémakör a globális minimum megtalálása. A kémiai krisztallográfiában alkalmazott legkisebb négyzetes célfüggvény teljes mátrix módszerrel való megoldása, és az ebből származtatható hiányos mátrix, diagonális mátrix és legmeredekebb leereszkedés módszereinél az iteráció során csak a legközelebbi minimumát közelítjük meg a célfüggvénynek, a célfüggvényen „felfele lépkedni”, nyeregponthoz, maximumokhoz átlépni nem tudnak ezek a módszerek. Ez nem lehetséges a fehérjekrisztallográfiában gyakran alkalmazott, ezeknél gyorsabb konvergenciát biztosító konjugált gradiens módszerekkel sem (itt nem az adott pontban számított gradiens irányába lép a rendszer egy iterációs lépéskor, hanem az előző lépésbeli gradienst is figyelembe veszi a módszer, így kevesebb iterációs lépés szükséges). Ezeknél a módszereknél a modellépítés során lehet egy másik lokális minimum környezetébe „vinni” a rendszert.

A molekuladinamikai szimulációt alkalmazó módszerek viszont lehetővé teszik a lokális minimum környezetéből való kijutást, és egy mélyebb minimumba való jutást (13.3.8. ábra). Ezeket érdemes alacsony felbontás esetén, vagy a finomítás kezdetén alkalmazni nagyobb konvergencia sugaruk miatt. A molekuladinamikai szimuláció az erőteret molekulamodellező módszerek közé tartozik, segítségével időben szimulálhatjuk atomi szinten valamilyen rendszer időbeni viselkedését és származtathatjuk termodinamikai paramétereit. A molekulában a Born-Oppenheimer közelítés szerint az elektronok hatását kiátlagolódnak tekintjük, és megfelelően parametrizált atom-atom potenciálokként írjuk le (a kötésnyújtás, szöghajlítás, akár a 13.3.7 ábrához hasonló harmonikus potenciálokkal lehet megjelenítve, míg a torziósszögek periodikus függvényekkel). Van továbbá a királis és sík alkatú csoportok torzulását büntető tag, és a másodlagos kölcsönhatásokat figyelembe vevő tagok is a potenciális energia kifejezésében). A rendszer atomjai kinetikus energiával rendelkeznek. A szimuláció során Newton-féle mozgásegyenleteiket oldjuk meg (kis időlépésenként integráljuk, pl. Verlet algoritmus [www.fisica.uniud.it/~ercolessi/md/md/node21.html](http://www.fisica.uniud.it/~ercolessi/md/md/node21.html) alkalmazásával). A szimuláció elején atomi sebességeket pl. a Maxwell-Boltzmann eloszlás szerint generálnak, és a rendszert hőfürdőhöz csatolják. A rendszer tehát a hőmérsékletétől függő magasságú energiagátakon képes átjutni. Ellentétben a molekulamodelléskor alkalmazott molekuladinamikai szimulációval, a krisztallográfiai finomítás szempontjából csak ez utóbbi tulajdonsága a fontos a módszernek, ezért a rendszert leíró potenciálfüggvény olcsóbb energiagátokból áll össze (pl. a kötésnyújtás és szöghajlítás potenciálok harmonikus formájúak, a másodlagos kölcsönhatások közül az elektrosztatikai potenciál sincs definiálva sík alkatú), viszont potenciális energiagátoként van figyelembe véve a modell mért adatoktól való eltérését büntető függvény ( $E_{TOTAL} = E_{KRISZT} + E_{EMPIRIKUS}$ ). A kétféle energiagátot egymáshoz kell skálázni.

A szimulált hőkezelés a molekuladinamikai szimuláció egy fajtája: ha a rendszert magas hőmérsékletre fokozatosan lehűtjük, és minden állapotban hagyjuk egyensúlyba jutni, elvileg a globális energiaminimumba jut (ez a valóságban nem történik meg, mert túl rövid ideig tart a szimuláció ahhoz,

hogyan az egyes hőmérsékleteken egyensúlyba jusson a rendszer). A gyakorlatban több felfűtés eredményeként kapott különböző modellek fázisaival kapott térképek átlagolása szolgáltat a modellépítés következő ciklusa számára legjobb minőségű térképet. Még nagyobb konvergencia sugárral rendelkezik a torziós szög dinamika. Ennek során a kötőszögek, kötőhosszak nem változhatnak, a molekula mozgásai a torziósszögek változásaként vannak leírva.



13.3.8. ábra. A krisztallográfiai célfüggvény potenciális energiaként való értelmezése. A legkisebb négyzetes finomítással vagy konjugált gradiens módszerekkel a rendszer (lila pont) a célfüggvény sokdimenziós felszínén (sötétkék) csak a legközelebbi lokális minimumba juthat. A molekuladinamikai szimuláció során a rendszer hőmérsékletétől függően távolabbi minimumokba is el tud jutni (zöld). Szimulált hőkezeléskor a rendszer nagyon mély minimumba jut (piros, világoskék).

A szerkezetből hiányzó atomok szórásai hozzájárulásának figyelembevétele előtt ki kell térni a fehérjemolekulák közötti oldószerregiókban elhelyezkedő rendezetlen vízmolekulákra. Ezeknek a szórásai hozzájárulása az alacsony felbontású régiókban jelentős, és a molekula alaktól (az üregek alakjától) függ. A Babinet bulk oldószer modellezés a fehérjemolekula-felület meghatározásán alapul (egy próbagömböt görget végig a program az atomokon), majd az így meghatározott üregek szórásai hozzájárulását a program hozzáadja a modell szórásához.

A célfüggvény valószínűségi értelmezésével vesszük figyelembe, hogy a modellünk hiányos, és paraméterei bizonyos hibával terheltek (maximum valószínűségi célfüggvény; maximum likelihood, ML). Ennek alkalmazása során feltételezzük, hogy teljesül a centrális határeloszlás tétel (a hibák sok, független forrásból származnak), ezért az alábbi változók normáeloszlást mutatnak. A finomítás során cél a mért adatokkal legjobban egyező modell megtalálása. Ez az „egyezés” a valószínűség számításban a likelihood függvény ( $L$ ), feltételes valószínűség leírása.  $L$  értéke nő, ha a modellt úgy módosítjuk, hogy a mért adatokat nagyobb valószínűséggel hozza létre és a valószínűségi maximum élesebb lesz, ha a modell hibáját csökkentjük. Az alábbi függvényben a reflexió intenzitás mérések (adatok vagy obszervációk; a továbbiakban: adatok)  $(x_1, \dots, x_N)$  együttes valószínűsége adott. Ha az adatok függetlenek, felírható az egyes adatok független valószínűségi függvényeinek szorzataként (13.3.9. ábra). A legkisebb négyzetes célfüggvényhez hasonló alakja van a likelihood függvény logaritmusának a mínusz egyszerese ( $-LL$ ). Megmutatható, hogy a legkisebb négyzetes célfüggvény a  $-LL$  speciális esete, amikor az egyes  $x_j$  adatok Gauss eloszlással rendelkeznek (normális eloszlással), és hibájuk (standard deviációjuk) konstans. Azonban

egyik feltétel sem igaz. Nem a mért amplitúdók, hanem a szerkezeti tényező vektorok rendelkeznek Gauss eloszlással (2 dimenziós Gauss függvény, a komplex síkon).

$$L = p(x_1, x_2, \dots, x_N) = \prod_{j=1}^N p(x_j) \quad , \quad LL = \ln L = \sum_{j=1}^N \ln p(x_j)$$

13.3.9. ábra. Az adatok feltételes valószínűsége adott modell esetén (likelihood), és logaritmus

A maximum likelihood Bayes-i értelmezése. Az  $L$  függvény az adatok feltételes valószínűsége adott modell esetén  $p(\text{adatok}; \text{modell})$ . A szerkezetfinomításkor azonban adott adatokhoz keressük az azokat legjobban leíró modellt, vagyis a modellünk feltételes valószínűségének kifejezésére van szükségünk adott adatkészlet (a mért szerkezeti tényező adatok összessége) esetén:  $p(\text{modell}; \text{adatok})$ . Bayes tétele szerint a két valószínűség közötti összefüggés a következő (13.3.10. ábra):

$$p(\text{modell}; \text{adatok}) = \frac{p(\text{modell}) p(\text{adatok}; \text{modell})}{p(\text{adatok})}$$

13.3.10. ábra. A modell feltételes valószínűsége adott adatok esetén. Ahol  $p(\text{modell})$  és  $p(\text{adatok})$  a modell és adatok független valószínűségei.

A nevező elhagyható, mivel az adatkészletet már megmértük, nem érdekes a valószínűsége. A  $p(\text{modell})$  a modell a priori, adatoktól független valószínűségét leíró függvény, tartalmazhat a fehérje geometriájára, atomjai közötti másodlagos kölcsönhatásokra vonatkozó információkat, hasonló formában, mint a geometriai megkötéseknél láttuk. Ha viszont nem részesítjük egyik modellt sem előnyben a többihez képest, visszajutottunk az eredeti  $L$  függvényhez.

A szerkezeti tényező valószínűségi függvényét abban az esetben, ha nem ismerjük az atomok helyét (tehát nem ismerjük a fázis-hozzájárulásukat), a Wilson eloszlás írja le (tekintsük most a P1 tércsoportot, ahol függetlenek az atomok). Ez egy olyan Gauss függvény, aminek a maximuma az origóban van (13.3.11. ábra; bővebb magyarázat: [www-structmed.cimr.cam.ac.uk/Course/Statistics/statistics.html](http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/Course/Statistics/statistics.html)):

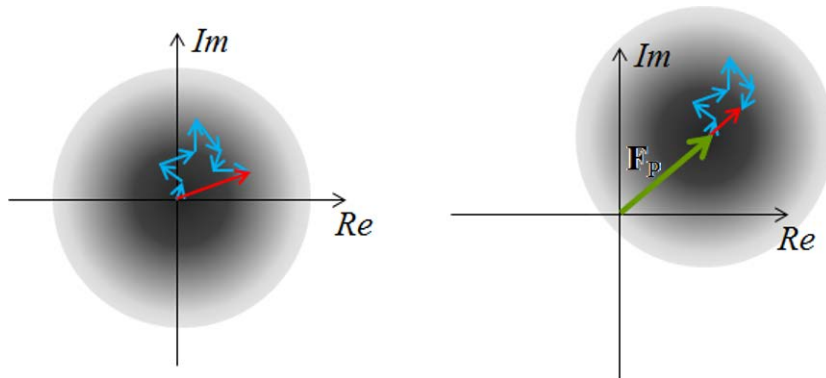
$$p(\mathbf{F}) = \frac{1}{\pi \Sigma_N} \exp \frac{-F^2}{\Sigma_N} \quad , \quad \text{ahol} \quad \Sigma_N = \sum_{j=1}^N f_j^2$$

13.3.11. ábra Wilson eloszlás: minden atom helyzete ismeretlen.  $\Sigma_N$  az ismeretlen helyzetű atomok atomi szórástényezőinek négyzetösszege.

Ha ismerjük az atomok egy részének helyzetét (1, 2, ... P, összesen P darab atom), a szerkezeti tényező valószínűségi függvénye a Wilson eloszláshoz hasonló alakú feltételes valószínűség lesz a Sim eloszlás (13.3.12. ábra, 13.3.13. ábra). A nevezőben itt is az ismeretlen helyzetű atomok (P+1, ...N, összesen Q darab) atomi szórástényezőinek négyzetösszege szerepel.

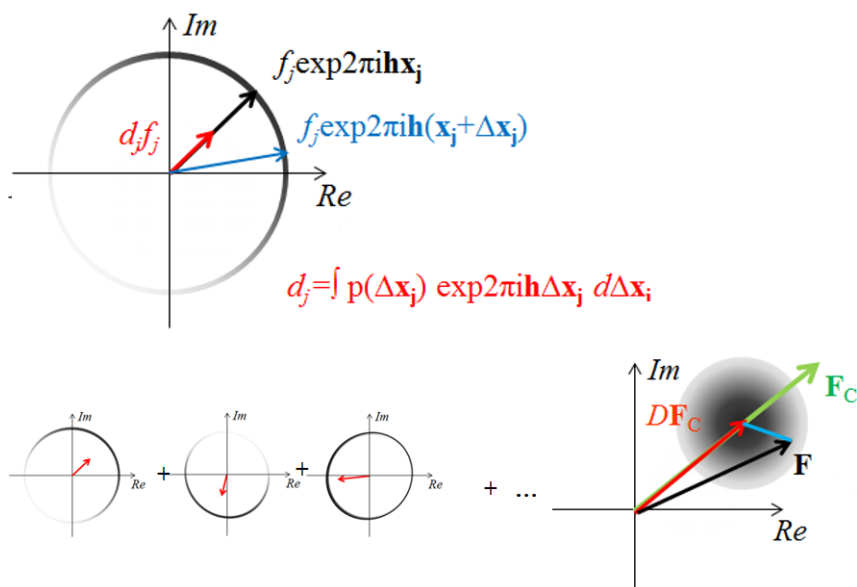
$$p(\mathbf{F}; \mathbf{F}_P) = \frac{1}{\pi \Sigma_Q} \exp \frac{-|\mathbf{F} - \mathbf{F}_P|^2}{\Sigma_Q} \quad , \quad \text{ahol} \quad \Sigma_Q = \sum_{j=P+1}^N f_j^2$$

13.3.12. ábra Sim eloszlás: A szerkezet egy része ( $P$ ) ismert.



13.3.13. ábra. A Wilson és a Sim eloszlás (Az ismertetlen helyzetű atomok hozzájárulása ismeretlen: világoskék nyilak; az ismert helyzetű atomok hozzájárulása: zöld.)

Ha az atomi koordináták hibával terheltek, az atomi hozzájárulás a fázis függvényében fog normáloszlást mutatni, az atomi hozzájárulást, a valószínűségi függvénnyel megszorozott hozzájárulás integrálja fogja megadni (átlagolás az összes lehetőség szerint), iránya megegyezik az eredeti iránnyal, de hossza rövidebb lesz. A szerkezeti tényező kifejezésében minden atom hozzájárulása rövidülést fog szenvedni (13.3.14. ábra, 13.3.15. ábra).



13.3.14. ábra. A koordinátahiba hatása a szerkezeti tényezőre.

$$p(\mathbf{F}; \mathbf{F}_C) = \frac{1}{\pi \varepsilon \sigma_{\Delta}^2} \exp \frac{-|\mathbf{F} - D\mathbf{F}_C|^2}{\varepsilon \sigma_{\Delta}^2}, \text{ ahol } \sigma_{\Delta}^2 = \Sigma_N - D^2 \Sigma_P$$

13.3.15. ábra Valószínűségi függvény teljes, de az atomi koordinátákban hibát tartalmazó modell esetén ( $\varepsilon$  szimmetriafüggetlen szorzótényező, a kifejezésnek ez az általános alakja nemcsak P1 tércsoportban igaz).

A különböző hibaforrásokat leíró valószínűségi függvények hasonló alakúak, egyesíthetők (Srinivasan eloszlás). A valószínűségi összefüggések felhasználhatók az experimentális fázisok finomításba való bevonásába, az általános koordinátahiba becslésére, és az elektronsűrűségi térképe koeficienseinek súlyozására. A 13.-15. fejezetekben előforduló differencia elektronsűrűségi térképek mind ún.  $\sigma_A$ -skalázott elektronsűrűségi térképek, amelyek kiszámításakor az  $F_C$  amplitúdók a modell hibája szerint vannak súlyozva ( $\sigma_A$  a Srinivasan eloszlás paramétere,  $\sigma_A = D(\Sigma_P / \Sigma_N)^{1/2}$ ).

## 13.4. Fehérje-NMR alkalmazások

A fehérjekristallográfia és fehérje NMR egymást kiegészítő módszerek. A fehérje szerkezeti adatbázisban levő szerkezetek döntő többségét (PDB, [www.rcsb.org/pdb/statistics/holdings.do](http://www.rcsb.org/pdb/statistics/holdings.do)) együttesen e két módszerrel határozták meg (kb. 90%-ban diffrakció és 10%-ban NMR segítségével). A fehérjekristallográfia globuláris fehérjék vizsgálatára alkalmas, előnye, hogy mérettől függetlenül használható nagy fehérjék és fehérjekomplexek vizsgálatára, hátránya, hogy a vizsgálandó molekulának kristályosíthatónak kell lennie, és hogy a mozgékonyaságról csak közvetett információval szolgál. Az NMR-spektroszkópiai vizsgálatok oldatfázisban zajlanak, bár van már szilárd NMR-rel is meghatározott fehérjeszerkezet is. Az oldatfázis előnye, hogy a szerkezeti információn kívül a molekula dinamikájára mozgására vonatkozó információt is kapunk. A módszer hátránya a vizsgálható molekulák méretkorlátja (szerkezet-meghatározás méretkorlátja kb. 50kDa, de kölcsönhatások felderítése céljából már 100kDa-os molekulák is vizsgálhatók, köszönhetően a módszerbeli fejlődésnek: relaxációs folyamatok lassítása  $^2\text{H}$  jelölés, TROSY technika). A módszer nem 0 magspinnel rendelkező atommagok mágneses térben való gerjesztésén alapul. A fehérjék egydimenziós spektruma túlságosan gazdag jelekben (13.4.1a. ábra), az átlapolások feloldására többdimenziós spektrumok segítségével van lehetőség. A módszer időskálája ps-s tartomány, ami lehetővé teszi feltekeredés-letekeredés vizsgálatát (13.4.1b. ábra), a konformációs mozgások jellemzését, konformációs és oldószerrel létrejött kicserélődési folyamatok vizsgálatát, fehérje/fehérje és fehérje/ligandum kölcsönhatások feltérképezését.

Mérhető paraméterek és információtartalmuk:

- Kémiai eltolódás ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$  magok), a rezonanciajel frekvenciájának kismértékű, a spin lokális kémiai környezetétől függő megváltozása, a kémiai környezet árnyékoló hatása miatt. Felhasználás: asszignáció (jel hozzárendelés) és másodlagos szerkezet jóslása.
- J csatolás (kovalens kötések keresztül; jelfelhasadás a közeli magok hatására;  $^3\text{J}(\text{H}_\text{N}, \text{H}_\alpha)$   $^3\text{J}(\text{H}_\alpha, \text{H}_\beta)$  ...). Felhasználás: korrelációs vizsgálatok kötések keresztül, torziós szögek, Karplus-görbék megállapítása, pontosabb szerkezet megadása.

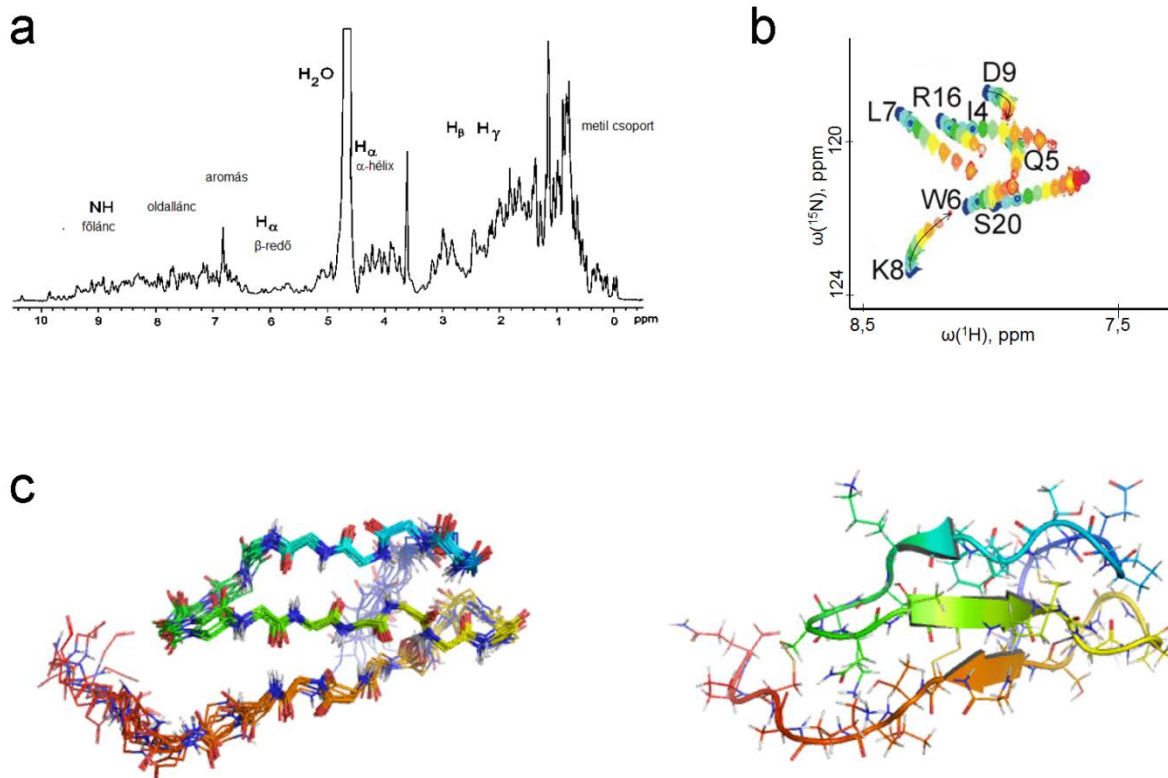
- Nukleáris Overhauser effektus (NOE), dipoláris csatolt spinek keresztrelaxációja, téren át ható spin-spin kölcsönhatások eredménye (a magnetizáció átadása spinek között a téren át,  $\sim 1/r^6$ ). Felhasználás: atom-atom távolságok ( $< 5 \text{ \AA}$ ), szerkezet számolás.
- Két konformáció közötti kicserélődés. Felhasználás: konformációs változások, ligandum kötődés.
- Oldószer kicserélődés ( $H_N$  atomok kicserélődése  $D_2O$ -ban). Felhasználás: hidrogénkötések vizsgálata.
- Relaxáció, jelszélesség ( $^1H$ ,  $^{13}C$ ,  $^{15}N$ ; az egyensúlyi állapot helyreállása a mágneses gerjesztő pulzus után; spin-spin és spin-rács relaxáció). Felhasználás: dinamika, mozgékonyág, konformációs vagy kémiai kicserélődés.
- Maradék dipoláris csatolás ( $^1H$ - $^{15}N$ ,  $^1H$ - $^{13}C$ ,  $^{13}C$ - $^{13}C$ , ... ; kismértékű rendeződés oldatban). Felhasználás: orientációs megkötések, távolható kölcsönhatások (pl. két fehérjedomén relatív orientációja).

Állandó konformációval nem rendelkező fehérjék (IUP) esetén fontosak a dinamikai vizsgálatok. Emellett a másodlagos kémiai eltolódások segítségével felderíthetők a fehérje mozgása során egyes szakaszainak másodlagos szerkezeti preferenciái is.

A kölcsönhatások vizsgálata leggyakrabban a kémiai eltolódás feltérképezésén alapul: növekvő koncentrációban adagolva (titrálva) a kötőpartnert, nyomon követik, hogy mely aminosavak jele változik/tolódik el. Ez a változás jelzi az adott aminosav környezetének megváltozását a kölcsönhatás következtében. A vizsgálat eredménye a kötésben részt vevő aminosavak meghatározása.

A szerkezet-meghatározáshoz kb. 25kDa-nál nagyobb molekuláknál már többszörös izotópjelölésre ( $^{13}C$ ,  $^{15}N$ ) van szükség. Ez lehetővé teszi a multinukleáris, többdimenziós spektrumok felvételét, amelyekkel elvégezhető a jelhozzárendelés, az aminosav-szekvencia H, C, N kémiai eltolódásai ismertté válnak. A szerkezetszámoláshoz geometriai megkötések nyerhetők a NOESY spektrumból (H-H távolságok NOE felhasználásával), kémiai eltolódásokból (másodlagos szerkezet), csatolásokból (további szerkezeti információ, pl. relatív orientáció), oldószer-kicserélődés vizsgálatokból (H-kötések). A szerkezeti modell előállítására, amelyre minden geometriai feltétel teljesül, molekuladinamikai szimulációval, szimulált hőkezeléssel történik (ld. 13.3.2. fejezet). Ez modell szerkezetek sokaságát jelenti (pl. 10 vagy 20 szerkezet), amelyek együttesen jellemzik a molekula által bejárt konformációs teret (13.4.1.c. ábra).





13.4.1. ábra Fehérje NMR alkalmazások. a: Fehérje 1 dimenziós  $^1\text{H}$  NMR spektruma, a jelek nagymértékű átfedése miatt, az asszignációhoz többdimenziós mérések szükségesek (forrás [bionmr-c1.unl.edu/991/Lectures/NMR-struct.ppt](http://bionmr-c1.unl.edu/991/Lectures/NMR-struct.ppt)) b:  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrum változása fehérje feltekeredés-letekeredés vizsgálat során (részlet; a hőmérséklet  $4^\circ\text{C}$  (kék) -  $54^\circ\text{C}$  (bíbor) között változott; (Rovó P. et al. Chem. Eur. J. 2013.)). A jelsorozatok görbülése arra utal, hogy a feltekeredett és letekeredett állapoton kívül egy harmadik, intermedier állapot is van. c: Fehérje NMR-szerkezete, balra: főlánc atomok konformációja 10 reprezentatív szerkezettel bemutatva, jobbra: egy kiválasztott szerkezet oldalláncokkal és másodlagos szerkezeti elemekkel (PDB kód: 1kgm)

[Teszt](#)

## 14. A PDB adatbázis. Grafikus programok használata (Harmat Veronika)

### Irodalom

Adatbázisok:

- PDB szerkezeti adatbázis, [www.pdb.org](http://www.pdb.org)
- Szekvencia adatbázis, [www.expasy.org](http://www.expasy.org)

Fájl formátumok:

- MMCIF, <http://mmcif.rcsb.org/>
- PDB, [http://deposit.rcsb.org/adit/docs/pdb\\_atom\\_format.html](http://deposit.rcsb.org/adit/docs/pdb_atom_format.html)

Validálás, megjelenítés (programok):

- CCP4, <http://www.ccp4.ac.uk/dist/share/ccp4i/help/modules/valdep.html>
- molprobity server, <http://molprobity.biochem.duke.edu/>
- PDB, <http://deposit.rcsb.org/validate/docs/tutorial.html>
- pymol (ingyenes verzió:): <http://pymol.en.uptodown.com/>
- Coot, <http://www.biop.ox.ac.uk/coot/>
- Swiss-PdbViewer, <http://spdbv.vital-it.ch/>
- Jmol (applet), <http://jmol.sourceforge.net/>

Molekulafelszínek, kölcsönhatási felszínek, kölcsönhatások elemzése

- CCP4
- Pisa server, [http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/pistart.html](http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html)
- Naccess, <http://www.bioinf.manchester.ac.uk/naccess/>
- Hollow, <http://hollow.sourceforge.net/>
- MOLE, <http://webchem.ncbr.muni.cz/Platform/App/Mole>
- Ligplot, <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>

Validálás, előadások, összefoglaló és gyakorlat:

- [http://www.phenix-online.org/presentations/latest/pavel\\_validation.pdf](http://www.phenix-online.org/presentations/latest/pavel_validation.pdf)
- <http://www.bioinfo.rpi.edu/bystrc/courses/bcbp4870/lecture12.pdf>
- [http://www.msg.ucsf.edu/BI204/docs/crystallography\\_review.pdf](http://www.msg.ucsf.edu/BI204/docs/crystallography_review.pdf)
- Gyakorlat (Gerard Kleywegt): <http://xray.bmc.uu.se/embo2001/modval/>

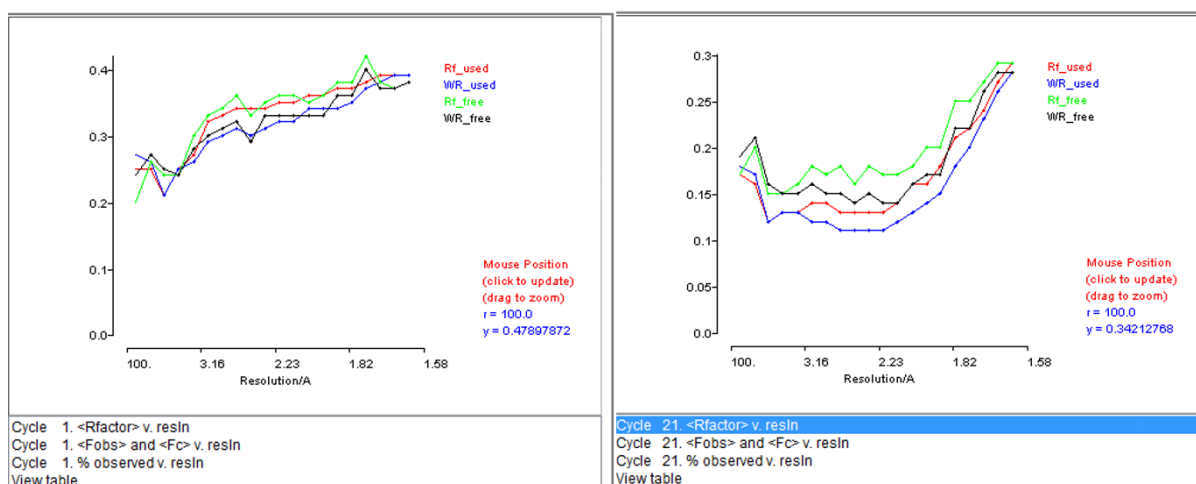
## 14.1. A fehérjeszerkezet validálása

A nagyműszeres fehérje-szerkezetmeghatározó módszerek (NMR, krisztallográfia) alkalmazása során nem közvetlenül kapjuk meg a mért adatokból a térszerkezetet, hanem van egy értelmezési lépés („emberi tényező”) ezért nem kerülhető ki a modell validálása. Krisztallográfiában ez a lépés az elektronsűrűségi térképek értelmezése (modellépítés): függhet a felhasználó tapasztaltságától, automatikus modellépítés esetén az algoritmustól is. Alacsony felbontású adatkészlet, vagy más módon hiányos adatkészlet esetén többféle modell is megfelelhet a térképeknek. A szerkezetfinomítás során megválasztott stratégia szintén értékelendő.

A validálás során vizsgáljuk a modell illeszkedését a mért adatokhoz, megfelelését a fehérjemolekulákra vonatkozó fizikai és kémiai ismereteinknek (geometriai paraméterek, másodlagos kölcsönhatások), és az adott fehérjére vonatkozó biológiai tudásunknak (magyarázhatók-e a szerkezettel, összhangban vannak-e vele a fehérje funkcionális vizsgálatainak eredményei, a ismert mutációk hatására vonatkozó ismeretek, specificitás stb.). Ez utóbbi azért fontos, mert, bár a globuláris fehérjék sajátsága a vizes közegben nagy

számú, másodlagos kölcsönhatás által stabilizált, stabil térszerkezet, előfordulhat, hogy ha hajlékony hurokrégiók, domének (nagyobb szerkezeti egységek) közötti csuklóregiók vannak a szerkezetben, a kristálybeli intermolekuláris kölcsönhatások egy olyan konformációt stabilizálnak, ami a fehérje funkciója szempontjából nem releváns.

A mért adatokhoz való illeszkedést az R-faktor és szabad R-faktor segítségével jellemezzük. Túlillesztésre utalhat, ha kb. 5%-nál nagyobb az eltérésük (felbontásfüggő). Az, hogy mekkora  $R$  és  $R_{free}$  jelzi, hogy a szerkezet jól van finomítva, szintén felbontástól (mért adat/paraméter aránytól, tehát az elemi cella oldószertartalmától is) függ – hasonló felbontású szerkezetekhez viszonyítva értelmezendő a validálás során. ( $R$  értéke körülbelül 59%: véletlenszerű atomok esetén, a fázisprobléma megoldása után 30-50%, 25-30% finomított szerkezet, kisebb hibák, vagy felbontás 2,7Å körüli, vagy rosszabb, 15-20% között jól finomított modell; atomi felbontásnál még kisebb lehet). Míg  $R$  és  $R_{free}$  közötti nagy különbség rossz finomítási stratégiára utal, a köztük levő túl kicsi különbség lehet nemkristallográfiai szimmetria vagy nem korrigált ikresség következménye. Az R-faktorok felbontás függvényében való ábrázolása árulkodik a felbontásról, a modell finomítotttsági állapotáról (nagy felbontású régió) és az oldószertartalom szórásának modellezéséről (alacsony felbontás), valamint a kristály jegesedéséről (a "jéggyűrűk" helyén R-faktor maximumok vagy hiányzó reflexiók) (14.1.1. ábra).



14.1.1. ábra R-faktor ábrázolása a felbontás függvényében (CCP4 programcsomag, Refmac program). Balra: R-faktorok a finomítás elején, a tömbfázisú oldószertartalom itt nem volt modellezve. Jobbra: a finomítás végén (a felbontás alacsonyabb, mint 1,58 Å).

Míg az R-faktorok globális jellemzők, vannak lokális jellemzők is, amik segítenek megtalálni a modell rosszul beépített régióit. Ilyen a valós térbeli R-faktor és az elektron sűrűség korreláció. Ezek a mért amplitúdókkal és modellkoordinátákból számolt elektronsűrűségi függvény ( $\rho_{obs}$ ), és az atomi pozíciók és B-faktorok felhasználásával kapott modell szerkezeti tényezőkből számolt elektronsűrűségi függvény ( $\rho_{calc}$ ) eltérését ill. egyezését mérik (14.1.2. ábra). Az elemi cellába helyezett rács pontjaiban számítja a program, így minden aminosavhoz rendelhető egy jellemző érték a szerkezetben.

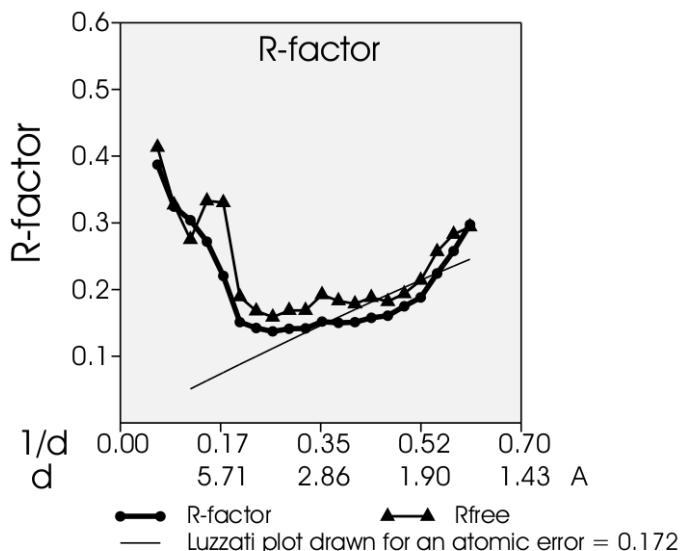
$$R = \frac{\sum_h |F_{obs} - F_{calc}|}{\sum_h F_{obs}} \quad R_{valós\ tér} = \frac{\sum_{rács} |\rho_{obs} - \rho_{calc}|}{\sum_{rács} |\rho_{obs} + \rho_{calc}|}$$

$$CC_{valós\ tér} = \frac{\sum_{rács} |\rho_{obs} - \langle \rho_{obs} \rangle| \sum_{rács} |\rho_{calc} - \langle \rho_{calc} \rangle|}{(\sum_{rács} |\rho_{obs} - \langle \rho_{obs} \rangle|^2 \sum_{rács} |\rho_{calc} - \langle \rho_{calc} \rangle|^2)^{1/2}}$$

14.1.2. ábra. A kristallográfiai R-faktor, valós térbeli R-faktor és elektronsűrűségi korreláció.

Hasznosak a rosszul beépített szerkezeti részletek azonosításában az aminosavankénti átlagos B-faktorok ábrázolása a szekvencia mentén (a nagy B-faktor nagy mozgékonyagra és alacsony számértékű, rosszul értelmezhető elektronsűrűsége utal).

Az atomi koordináták (és B-faktorok) hibája a kémiai kristallográfiában a legkisebb négyzetes finomítás során származtatható, a makromolekulák esetén azonban csak atomi felbontás esetén használják ezt a módszert a finomításra. Gyengébb felbontású szerkezetek esetén az egész szerkezetre jellemző átlagos koordinátahibát számolják ki elméleti görbére való illesztéssel ( $\sigma_A$  plot, Luzzati plot; 14.1.3. ábra) a kapott koordinátahiba összehasonlításra jó, relatív érték, általában 0,1-0,3 Å között van.



14.1.3. ábra. Luzzati plot (CCP4 programcsomag, Sfcheck program). Az R-faktor ábrázolása a felbontás függvényében, majd összehasonlítása egy különböző koordinátahibákkal rajzolt elméleti görbesorozattal

Az előbbi lokális jellemzőkkel együttesen vizsgálva a szerkezet geometriai torzulásait, és nemkötő kölcsönhatásait még egyértelműbben kiderül, melyek a szerkezetnek a rosszul felépített részei. Ilyen hibák lehetnek aminosav oldalláncok, rossz konformerének beépítése, rendezetlen oldallánc rossz modellezése (pl. alternatív konformációk helyett vízmolekulák vagy átlagos helyzet), a főlánc peptidkötéseinek átbillenése, regiszterhiba (a szekvencia eltolódása a főlánc mentén) vagy a másodlagos szerkezeti elemek rossz topológiai sorrendben történő felfűzése (az összekötő hurokrégiók mozgékonyabbak, az elektronsűrűségi térképen rosszul azonosíthatók lehetnek), az elektronsűrűségi térkép zajának modellezése vízmolekulákkal („fodrozódást” okoz az elektronsűrűségi térképen, pl. ha hiányoznak reflexiók egy szögtartományban, vagy a nagy intenzitású reflexiók; a fodrozódás különösen nagy lehet a kristallográfiai szimmetriaoperátorok közvetlen környezetében).

A geometria és nemkötő kölcsönhatások jelenleg legátfogóbb együttes vizsgálatát és grafikus megjelenítését végző program a Molprobity. A torzulások száma hasonló felbontású szerkezetekkel összevetve általános minőségi jellemző, az egyes aminosavak jellemzői pedig a problémás régiókat segítenek azonosítani (14.1.4. ábra). A Ramachandran térkép (főlánc) és a  $\chi/\chi'$  térképek (oldallánc) a szomszédos  $\sigma$ -kötések torziós szögeinek megjelenítésére szolgálnak. Ezeknek az értékeknek az energetikailag kedvező régiókban kell lenniük (a Ramachandran térképen jól azonosíthatók a másodlagos szerkezeti elemek, mint kedvező régiók; 14.1.5. ábra), de előfordulhat szerkezeti vagy funkcionális okokból, hogy egy-egy aminosav a tiltott régióban van (pl. szerin proteázok katalitikus szerinje tiltott régióban van, ez is hozzájárul nukleofilicitásának növeléséhez). A kötesszögek, kötэшosszak ideális értéktől való eltérése, síkalkatú csoportok és kiralitáscentrumok körüli térállás torzulása a finomítás során megkötések vagy kényszerek segítségével az ideális értékhez közeli értéken van tartva (nagyon jó, atomi felbontás esetén azonban az adat/paraméter arány lehetővé teszi, hogy ezeket a megkötéseket elhagyjuk). Általánosságban akkor alkalmaztuk ezeknek a kényszerfeltételeknek jó súlyozását a finomítás során, ha a geometriai értékek átlagos négyzetes eltérése (r.m.s.) az ideális értéküktől hasonló a kémiai krisztallográfiában tapasztaltnak. A nemkötő kölcsönhatások vizsgálata során egyrészt a térben túlságosan közeli atomcsoportok azonosítása történik (túl rövid távolság, vagy apoláris és poláris/töltött csoportok közelsége; 14.1.6. ábra), másrészt a hidrogénkötések vizsgálata (jellegzetes távolságtartományban vannak-e a csoportok, konfigurációjuk megfelelő-e). A hidrogénkötésnél rövidebb távolságok jellemzik az ionos kötéseket (töltött aminosavoldalláncok). A vízmolekulákkal izoelektronos ionok megkülönböztetése ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) szintén a rövidebb nemkötő távolságok alapján, és a környező csoportok konfigurációja alapján történhet (vízmolekula: hidrogénkötések tetraédes irányokban;  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ : oktaédes). Az aszparagin, glutamin és hisztidin oldalláncok helyes orientációja szintén a lehetséges hidrogénkötések alapján dönthető el (14.1.7. ábra).

When finished, you should

Hint: Use File | Save As... to save a copy of this page

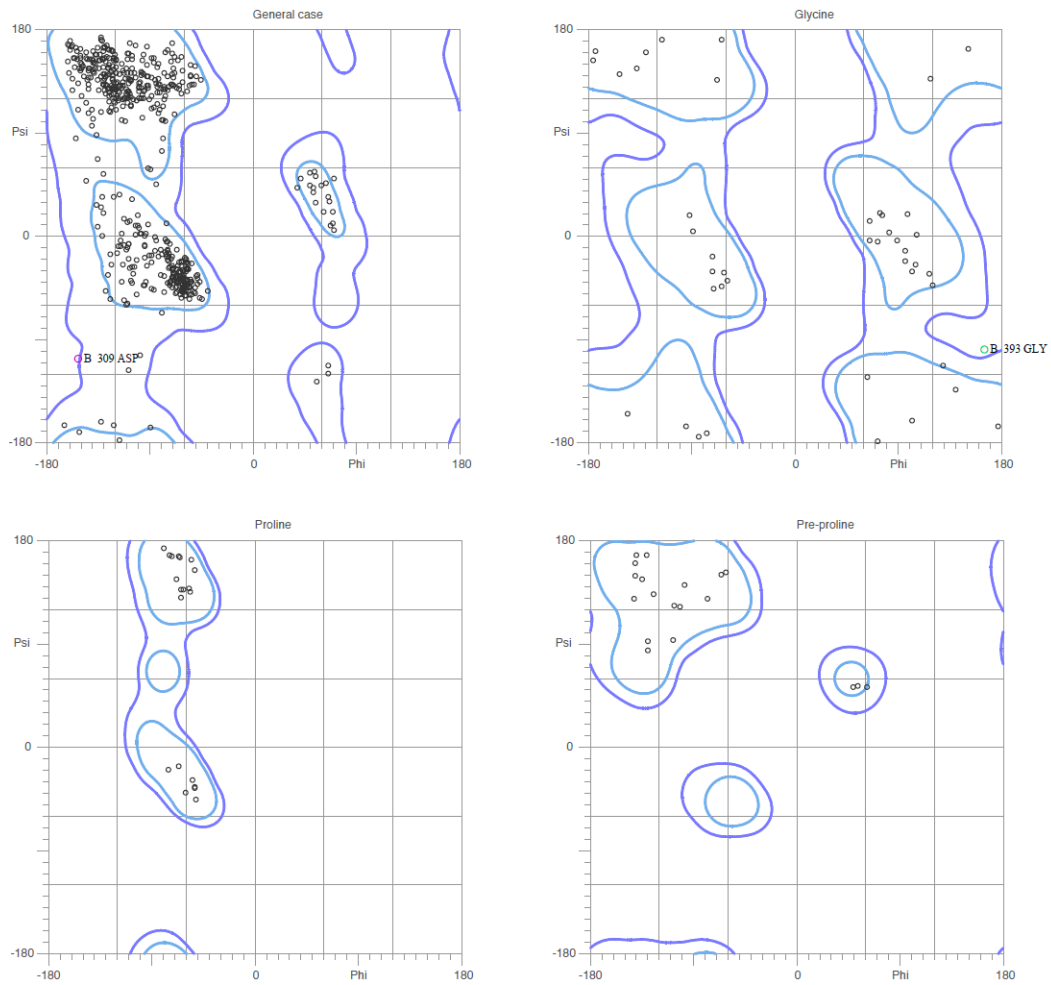
All-Atom Contacts		Clashscore, all atoms:	8.62	75 <sup>th</sup> percentile* (N=718, 1.60Å ± 0.25Å)
Protein Geometry		Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.		
	Poor rotamers		1.37%	Goal: <1%
	Ramachandran outliers		0.33%	Goal: <0.2%
	Ramachandran favored		96.22%	Goal: >98%
	C $\beta$ deviations >0.25Å		7	Goal: 0
	MolProbity score <sup>^</sup>		1.82	65 <sup>th</sup> percentile* (N=7200, 1.60Å ± 0.25Å)
	Residues with bad bonds:		0.81%	Goal: 0%
	Residues with bad angles:		0.65%	Goal: <0.1%

\* 100<sup>th</sup> percentile is the best among structures of comparable resolution; 0<sup>th</sup> percentile is the worst.

<sup>^</sup> MolProbity score is defined as the following:  $0.42574 \cdot \log(1 + \text{clashscore}) + 0.32996 \cdot \log(1 + \max(0, \text{pctRotOut} - 1)) + 0.24979 \cdot \log(1 + \max(0, 100 - \text{pctRamaFavored} - 2)) + 0.5$

#	Res	High B	Clash > 0.4Å	Ramachandran	Rotamer	C $\beta$ deviation	Bond lengths.	Bond angles.
		Avg: 30.99	Clashscore: 8.62	Outliers: 2 of 609	Poor rotamers: 7 of 511	Outliers: 7 of 584	Outliers: 5 of 615	Outliers: 4 of 615
B 15	ALA	16.88	0.448Å HB1 with B 31 LEU CD1	Favored (42.44%) General case / -93.1,132.3	-	0.062Å	-	-
B 20	PRO	20.55	0.425Å HB2 with B 313 ILE HD12	Favored (65.19%) Proline / -65.2,138.1	84.3% (C $\gamma$ _endo) chi angles: 31.6	0.027Å	-	-
B 23	ARG	42.59	0.507Å HG3 with B 66 ILE HG22	Favored (16.85%) General case / -145.0,129.8	-	0.186Å	-	-
B 24	LYS	60.77	0.426Å HD2 with B 70 GLY HA3	Allowed (0.89%) General case / -55.0,-127.0	2.4% (mttp) chi angles: 324.9,191.3,131.3,48.6	0.196Å	-	1 OUTLIER(S) worst is N-CA-C: 4.487 & sigma
B 25	ASN	56.63	0.903Å HD21 with B 25 ASN H	Favored (44.44%) General case / -56.2,0.8	0% chi angles: 39,131	0.063Å	-	-
B 27	VAL	23.94	0.793Å HG11A with B 325 LEU HD21	Favored (57.94%) General case / -123.8,138.9	51.6% (t) chi angles: 182.3	0.176Å	-	-
B 31	LEU	19.81	0.448Å CD1 with B 13 ALA HB1	Favored (46.72%) General case / -102.2,119.2	27.6% (tp) chi angles: 166.7,64.1	0.102Å	-	-
B 32	THR	16.83	0.421Å	Favored (57.71%)	89.2% (m)	0.056Å	-	-

14.1.4. ábra. Geometria és másodlagos kölcsönhatások vizsgálata Molprobity szerverten (a táblázat elején hasonló felbontású szerkezetekkel való összehasonlítás, lejjebb a problémás aminosavak felsorolásának részlete látható).



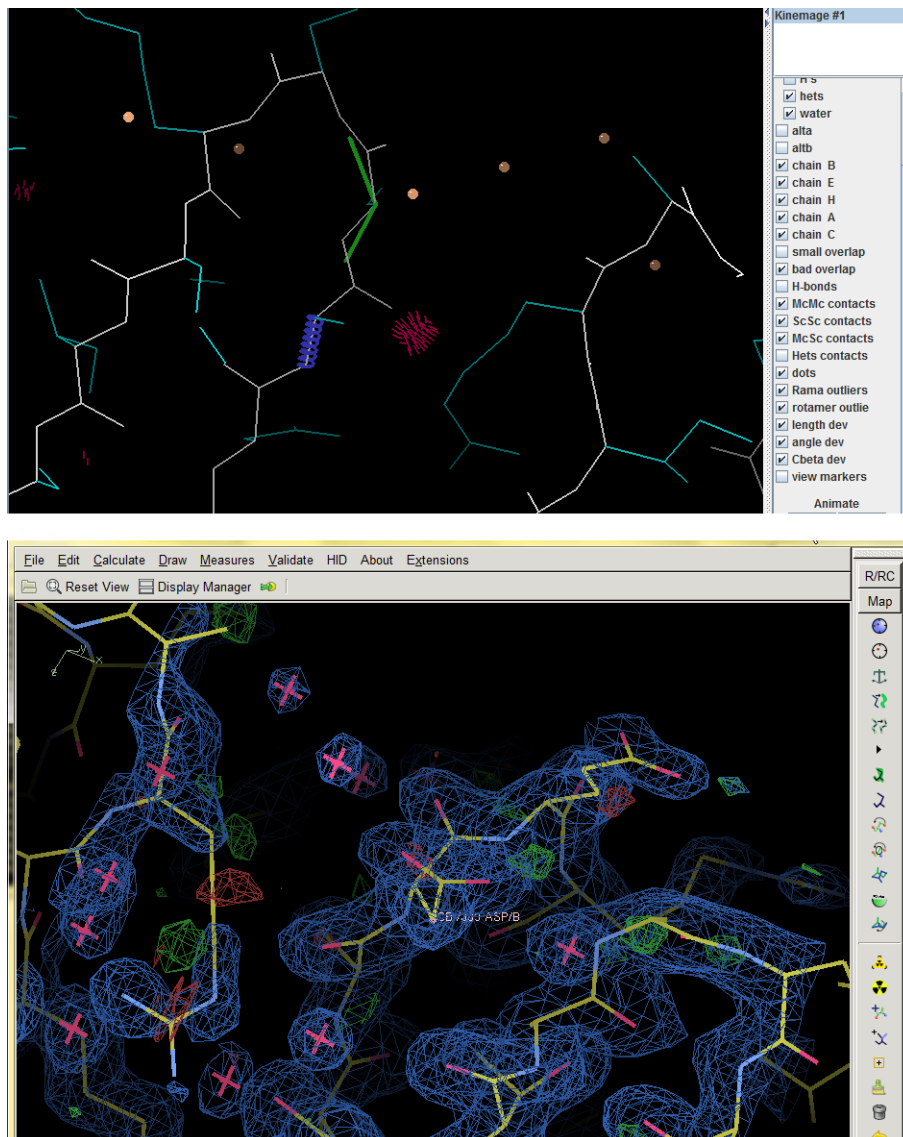
96.3% (601/624) of all residues were in favored (98%) regions.  
 99.7% (622/624) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

There were 2 outliers (phi, psi):  
 B 309 ASP (-153.4, -106.9)  
 B 393 GLY (165.1, -98.3)

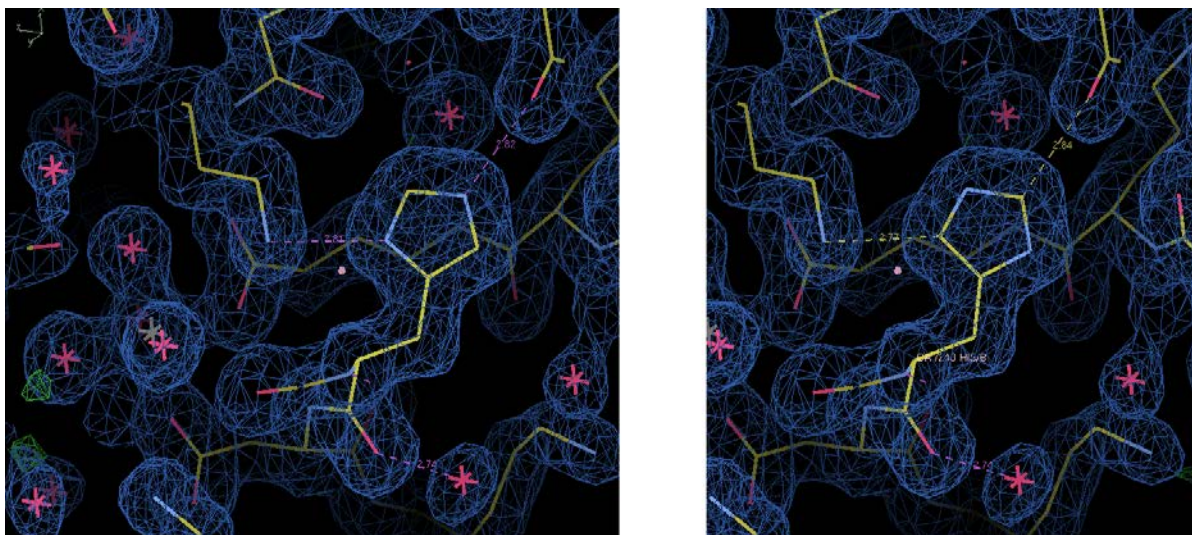
<http://kinemage.biochem.duke.edu>

Lovell, Davis, et al. Proteins 50:437 (2003)

14.1.5. ábra. Az előbbi szerkezet Ramachandran térképe.



14.1.6. ábra Gyanús régió megjelenítése Molprobity szerveren (fent). A 308. aminosavnál kedvezőtlen közeli kontaktus (lila) és kötэшossz torzulás (sötétkék) észlelhető, a 309. főlánc torziós szögei a Ramachandran térkép tiltott régiójában vannak (zöld). Lent: a kérdéses régió elektronsűrűségi térképe (Coot program)  $2F_o-F_c$  térkép (kék)  $1,0\sigma$  szinten, az  $F_o-F_c$  térkép  $+3,5$  (zöld) és  $-3,5\sigma$ (piros) elektronsűrűségi szinten van ábrázolva). A 308-309. aminosavak főláncja jól illeszkedik a térképbe, javításra nem szorul. A kedvezőtlen kölcsönhatást ugyanakkor egy olyan arginin oldallánc okozza, ami a térképek alapján nem helyes konformációban lett a modellbe építve (valójában rendezetlen), ez törölnendő.



14.1.7. ábra. Hisztidin oldallánc orientációjának meghatározása hidrogénkötés mintázat alapján. Bal oldal: az imidazol gyűrű jó orientációjában két hidrogénkötést létesít (egy lizin aminos csoportjával és egy aszparagin karbonil oxigénjével). (A hisztidintől balra egy  $Mg^{2+}$  ion látható, környezetében hat, oktaédres elrendeződésű oxigén, köztük kettő negatív töltésű oldallánc oxigénje). Jobb oldal: az imidazol csoport másik orientációjában hidrogénkötéseket nem, csak kedvezőtlen másodlagos kölcsönhatásokat létesítene.

A kritikus régiók felülvizsgálata után, ha változtattunk a szerkezeten, egy utolsó finomítási lépés következik, mielőtt a fehérje szerkezeti adatbázisba elküldjük a szerkezetet.

## 14.2. A PDB adatbázis, PDB formátum

A fehérje szerkezeti adatbázist (PDB, [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) 1971-ben alapították, eredetileg 7 szerkezetet tartalmazott. Ingyenesen hozzáférhető internetes adatbázis, amiben kristallográfiai, NMR és elektronmikroszkópiával meghatározott szerkezetek találhatóak. Jelenleg (2013.) közel 90000 szerkezetet tartalmaz, ezek döntően fehérjék, nukleinsavak és komplexeik szerkezetei. Nemzetközileg elismert tudományos folyóiratokban csak akkor fogadják el szerkezetet leíró publikációt, ha a szerzők a PDB-ben nyilvánossá teszik a szerkezetet és a mért adatkészlet(ek)et. A koordináták letölthetők PDB formátumban, és a CIF formátum makromolekulákra módosított változatában, mmCIF formátumban, a szerkezeti tényezők pedig mmCIF formátumban (tervezik, hogy a nyers adatok-diffrakciós felvételek is deponálандók legyenek, az adatok manipulálásának kivédése végett). Az adatbázis tartalmaz linkeket más adatbázisokba: publikáció, szekvencia, fehérje és fehérjedomén családok.

A PDB formátum kötött, szöveges fájlformátum, ami az atomi koordinátákat Descartes koordinátarendszerben (Å egységgel) tartalmazza. A fájl fejlécének mai formája fokozatosan alakult ki, ezért nem feltétlenül tartalmaznak minden adatot az adatbázisban megtalálható szerkezetek. A fejléc sorai: szerkezet besorolására (HEADER, TITLE sorok) után a szerkezetben található molekulák felsorolása (COMPND, SOURCE), a kulcsszavakra, szerzőkre és publikációra vonatkozó sorok (KEYWDS, AUTHOR, JRNL és REMARK 1 sorok) következnek. A felbontás után a finomítási statisztikák következnek, amit a finomító program ad hozzá a fájlhoz (REMARK 3). Az adatgyűjtésre és kristályosításra vonatkozó adatokat a



REMARK 200 és REMARK 280 sorok tartalmazzák. A biológiailag funkcionális egység gyakran szimmetrikus multimer, aminek szimmetriája krisztallográfiai szimmetria is egyben, tehát az aszimmetrikus egység csak egy részét tartalmazza –ilyenkor a multimer a REMARK 350 sorokban definiált transzformációkkal (forgatási mátrix + eltolási vektor) generálható. További REMARK sorokban található a PDB által elvégzett automatikus validálás eredménye (hiányzó atomok, geometriai torzulások, kedvezőtlen másodlagos kölcsönhatások, automatikusan azonosított kötőhelyek). Ezt követi a szekvenciára vonatkozó információ: szekvencia adatbázisbeli kódja (DBREF), mutációk (SEQADV) és szekvencia (SEQRES). A szerkezetben található egyéb (kis)molekulák leírása, a PDB által automatikusan meghatározott másodlagos szerkezeti elemek és kovalens kapcsolatok szintén a fejléc részei.

A szerkezet megjelenítéséhez elengedhetetlen sorok közül az első a CRYST1 sor, ami tartalmazza a cellaparamétereket, tércsoportot, és az aszimmetrikus egységek számát az elemi cellában (Z). Az ORIGX sorokkal a PDB fájl koordinátái az eredeti szerkezetbe transzformálhatók (forgatási mátrix és translációs vektor; a 14.2.1. ábrán egységoperátor) és SCALE sorokkal konvertálhatók a PDB fájl Descartes koordinátarendszerben leírt koordinátái frakcionális koordinátarendszerbe. Az atomi koordináták sorai kötött hosszúságú adatokként tartalmazzák:

- ATOM (vagy HETATM, ha nem fehérje/nukleinsav építőegység)
- Az atom sorszáma
- Atomnév (aminosavak esetén a hagyományos elnevezésből származik, pl. C<sub>α</sub> CA, C<sub>γ1</sub> pedig CG1 lesz)
- Aminosav név
- Lánc név (a különböző polipeptid láncok más-más betűjelet kapnak)
- Aminosav sorszáma (a 14.2.1. ábrán az aminosav szekvencia első három tagja rendezetlen a szerkezetben, ezért a 4. aminosavval kezdődik az atomi koordináták felsorolása)
- Descartes koordináták [Å]
- Betöltöttség (0 és 1 közötti szám)
- B-faktor [Å<sup>2</sup>]
- Atomtípus

Ha az atomok anizotróp atomi mozgástényezővel lettek finomítva (atomi felbontású szerkezet) vagy a TLS finomítás következtében a szerkezet nagyobb egységeire jellemző anizotrópia lett finomítva, a PDB fájl ANISOU sorokat is tartalmaz, amik az atomi mozgástényező tenzor hat elemét tartalmazzák (U<sub>11</sub>, U<sub>22</sub>, U<sub>33</sub>, U<sub>12</sub>, U<sub>13</sub>, U<sub>23</sub>).

CRYST1	184.057	184.057	145.529	90.00	90.00	120.00	H 3 2	18				
ORIGX1	1.000000	0.000000	0.000000			0.000000						
ORIGX2	0.000000	1.000000	0.000000			0.000000						
ORIGX3	0.000000	0.000000	1.000000			0.000000						
SCALE1	0.005433	0.003137	0.000000			0.000000						
SCALE2	0.000000	0.006274	0.000000			0.000000						
SCALE3	0.000000	0.000000	0.006871			0.000000						
ATOM	1	N	ILE	B	4	15.729	-29.742	-23.348	1.00	50.68		N
ANISOU	1	N	ILE	B	4	5871	7079	6303	-444	335	7	N
ATOM	2	CA	ILE	B	4	14.355	-30.221	-22.952	1.00	49.09		C
ANISOU	2	CA	ILE	B	4	5729	6826	6096	-404	305	8	C
ATOM	3	C	ILE	B	4	14.321	-31.727	-22.593	1.00	49.81		C
ANISOU	3	C	ILE	B	4	5801	6925	6199	-335	295	-10	C
ATOM	4	O	ILE	B	4	14.732	-32.528	-23.403	1.00	40.17		O
ANISOU	4	O	ILE	B	4	4557	5731	4974	-310	325	-23	O
ATOM	5	CB	ILE	B	4	13.347	-30.019	-24.080	1.00	52.42		C
ANISOU	5	CB	ILE	B	4	6211	7219	6485	-408	325	22	C
ATOM	6	CG1	ILE	B	4	13.641	-28.716	-24.894	1.00	44.63		C
ANISOU	6	CG1	ILE	B	4	5236	6237	5482	-472	353	44	C
ATOM	7	CG2	ILE	B	4	11.957	-30.075	-23.443	1.00	48.07		C
ANISOU	7	CG2	ILE	B	4	5719	6614	5932	-385	288	27	C
ATOM	8	N	GLU	B	5	13.829	-32.094	-21.382	1.00	46.97		N

14.2.1. ábra PDB fájl részlete, CRYST1: cellaparaméterek, tércsoport (H32) és Z. Az anizotróp atomi mozgástényezők (ANISOU sorok 6 számértéke) a TLS finomítás eredményei, nem függetlenek egymástól.

A makromolekula láncát TER sor zárja, a makromolekulák atomjai után található az egyéb atomok (HETATM) a PDB fájlban (14.2.2. ábra). Az alternatív oldallánc pozícióra a 14.2.3. ábra mutat példát: az aminosav kódja előtt A és B jelet kap a két atomi pozíció, betöltöttségük összege 1 (a B-faktor és betöltöttség korrelál, egyidejűleg nem finomíthatók).

HETATM	5189	O1	HEZ	B	715	-16.778	-38.640	-47.873	1.00	62.34		O
HETATM	5190	C1	HEZ	B	715	-18.062	-38.732	-47.255	1.00	62.05		C
HETATM	5191	C2	HEZ	B	715	-17.997	-39.789	-46.166	1.00	56.24		C
HETATM	5192	C3	HEZ	B	715	-18.964	-39.511	-45.030	1.00	58.34		C
HETATM	5193	C4	HEZ	B	715	-18.420	-40.034	-43.704	1.00	56.61		C
HETATM	5194	C5	HEZ	B	715	-19.341	-41.044	-43.041	1.00	62.07		C
HETATM	5195	C6	HEZ	B	715	-18.990	-41.059	-41.580	1.00	59.28		C
HETATM	5196	O6	HEZ	B	715	-17.588	-41.122	-41.691	1.00	66.30		O
HETATM	5197	CL	CL	B	716	-16.150	2.375	-33.691	1.00	19.53		CL
HETATM	5198	O	HOH	B	801	-18.183	-13.172	-34.084	1.00	10.30		O
HETATM	5199	O	HOH	B	802	-9.588	-26.369	-13.029	1.00	12.79		O

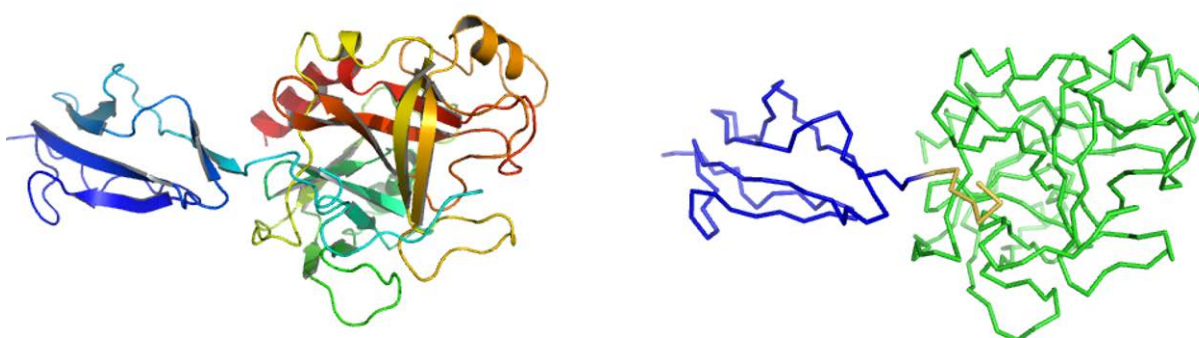
14.2.2. ábra. A kristályosító oldatból származó molekulák és ligandumok koordinátái. Az ábrán egy 1,6-hexándiol (HEZ) molekula, egy kloridion (CL) és két vízmolekula (HOH) koordinátáit tartalmazó sorok láthatók.

ATOM	394	N	VAL	B	27	-6.396	-14.791	-40.341	1.00	16.04	B	N
ATOM	395	CA	AVAL	B	27	-6.661	-15.802	-39.355	0.50	13.58	B	C
ATOM	396	CA	BVAL	B	27	-6.741	-15.764	-39.309	0.50	13.75	B	C
ATOM	399	CB	AVAL	B	27	-5.810	-16.960	-39.732	0.50	13.49	B	C
ATOM	400	CB	BVAL	B	27	-6.166	-17.201	-39.465	0.50	14.89	B	C
ATOM	403	CG1AVAL	B	27	-5.981	-18.161	-38.783	0.50	14.34	B	C	
ATOM	404	CG1BVAL	B	27	-4.653	-17.293	-39.409	0.50	9.16	B	C	
ATOM	411	CG2AVAL	B	27	-6.253	-17.359	-41.137	0.50	9.47	B	C	
ATOM	412	CG2BVAL	B	27	-6.791	-18.100	-38.343	0.50	12.60	B	C	
ATOM	419	C	VAL	B	27	-6.301	-15.215	-38.019	1.00	13.61	B	C
ATOM	420	O	VAL	B	27	-5.258	-14.501	-37.958	1.00	15.20	B	O
ATOM	422	N	ALA	B	28	-7.101	-15.451	-36.982	1.00	11.44	B	N
ATOM	423	CA	ALA	B	28	-6.724	-15.083	-35.613	1.00	9.75	B	C
ATOM	425	CB	ALA	B	28	-7.589	-13.967	-35.031	1.00	10.16	B	C

14.2.3. ábra. Alternatív oldallánc pozíció: a 27. valin oldallánca ( $C_{\beta}$ ,  $C_{\gamma 1}$  és  $C_{\gamma 2}$  atomjai) 50-50%-os betöltöttséggel az A vagy B pozícióban vannak

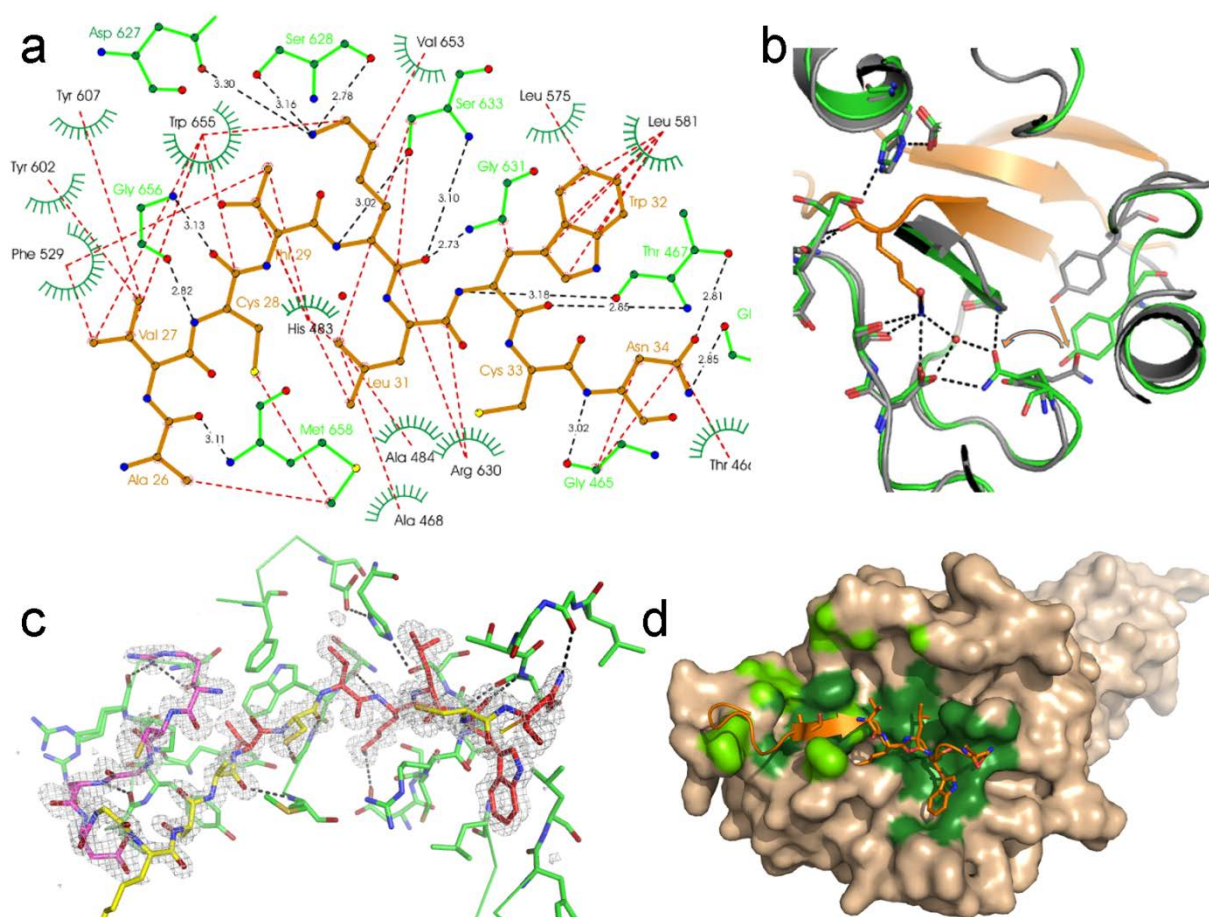
### 14.3. A fehérjeszerkezet grafikus megjelenítése

A fehérje szerkezetek olyan sok atomot tartalmaznak, hogy ezek együttes ábrázolása áttekinthetetlen dzsungelt eredményezne, ezért ábrakészítéskor körültekintően kell kiválasztani, hogy a szerkezet mely részlete látszódjon az ábrán, és milyen ábrázolásmódban. Eddig ismeretlen feltekeredésű (fold) molekuláknál fontos a fehérjelánc megjelenítése, ami általában szalagmodellel, a másodlagos szerkezeti elemek jelzésével történik (14.3.1. ábra). Ez az ábrázolásmód akkor is hasznos, ha valamilyen nagyobb léptékű, a főláncre is kiterjedő konformáció változást akarunk bemutatni, a grafikus megjelenítő programok segítségével ekkor egymásra illesztjük az összehasonlítandó szerkezeteket (a programok a homológia alapján automatikusan egymásra illesztik a szerkezeteket). Színezéssel jelezhetjük a fehérjelánc lefutását, fontos régiókat, doméneket, vagy a mozgékonyt (B-faktor) is. Új feltekeredés esetén hasznos lehet a másodlagos szerkezeti elemek kapcsolatainak topológiáját (harmadlagos-negyedleges szerkezet) síkban kiterített sematikus ábrán is bemutatni.

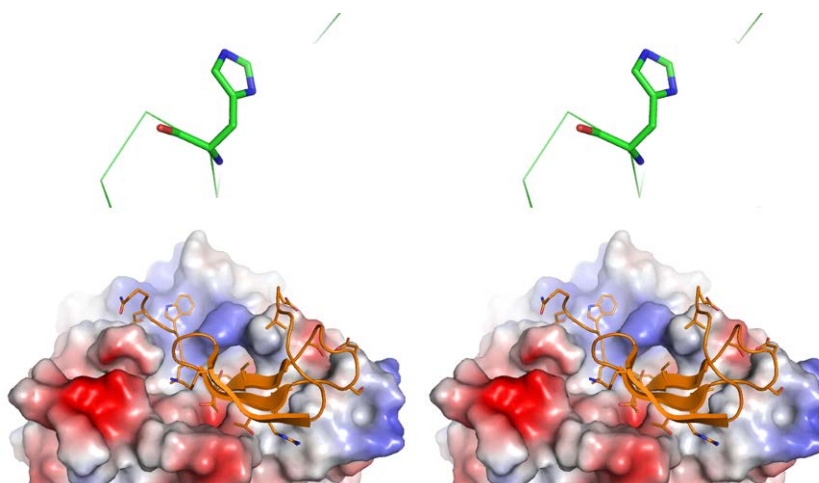


14.3.1. ábra Két modulból álló fehérje főlánc konformációjának megjelenítése. Balra: Szalagmodell a másodlagos szerkezeti elemeket is bemutatja (hélixek,  $\beta$ -redő). Színezés: a szekvencia szerint kéktől pirosig szivárványszínekben változik. Jobbra:  $\alpha$  szénatom váz ábrázolása a modulok szerint színezve (kék és zöld; aktivációkor elhasadó, de a molekulához diszulfid híddal kötve maradó peptidszakasz: sárga; PDB kód: 1Q3X).

Ha fontos kölcsönhatásokat akarunk megjeleníteni (14.3.2. ábra), a kölcsönható aminosavakat általában pálcikás modellként ábrázoljuk. Az ábrák általában nem mutatják a hidrogénatomok helyzetét (ahogy a PDB fájlok sem). Ezek még atomi felbontású szerkezetek esetén sem mind látszódnak az elektronsűrűségi térképen –de modellezhetjük őket (pl. a finomítás során) kémiai ismereteink alapján. A kölcsönhatásokat ábrázoló ábrák tartalmazhatják a fehérje kevésbé fontos részeit pl. szalagmodellel érzékeltetve a fehérjeatomokkal kitöltött térrészeket. Az irányított kölcsönhatások (hidrogénkötések) vonalakkal jelezhetők. A térbeli és elektrosztatikus illeszkedés molekuláris felszín ([www.ccp4.ac.uk/newsletters/newsletter38/03\\_surfarea.html](http://www.ccp4.ac.uk/newsletters/newsletter38/03_surfarea.html)) segítségével szemléltethető, ez utóbbi esetben az elektrosztatikus potenciál ábrázolható a felszínen (14.3.3. ábra). A bonyolultabb kölcsönhatási hálózatokat síkba kiterítve (14.3.2a. ábra), vagy sztereó ábraként (14.3.3. ábra) is ábrázolhatjuk. Fehérjekristallográfiai publikációk esetén követelmény, hogy az elektronsűrűségi térkép egy jellegzetes részletét is bemutassuk – részletgazdagságából és a modellhez való illeszkedéséből lehet következtetni a modell általános minőségére. Ez lehet például kihagyásos térkép is, ami azt bizonyítja, hogy az adott ligandum tényleg megkötődött a szerkezetben.



14.3.2. ábra Fehérje-fehérje kölcsönhatások megjelenítése (szerin-proteáz enzim, zöld és inhibitora, narancs, PDB kód:3TVJ; hidrogénkötések ábrázolása fekete szaggatott vonallal). a: A kölcsönhatások sematikus ábrázolása síkban kiterítve (ligplot program). b: Konformáció változás a szerin proteázban az inhibitor megkötésének hatására (narancs nyilak; referenciaszerkezet: a komplexátlan enzim szürkével, PDB kód: 1Q3X; fontos vízmolekulák: gömbök). c: Az inhibitor kötőárokban elhelyezkedő szakasza (lila, sárga és piros; szürke háló: az inhibitor  $F_o-F_c$  típusú kihagyásos elektronsűrűségi térképe), és környezete. d: A kölcsönhatások kiterjedtségének bemutatása: az inhibitor kötőárokban elhelyezkedő szakasza (narancs), és a kötőárok molekuláris felszíne (drapp, kölcsönható régiók: zöld).



14.3.3. ábra Sztereó ábrák (relaxált szemmel kell nézni őket, vagyis az ábrák mögé nézni, amíg a jobb és baloldali ábrák hasonló részei össze nem csúsznak). Fent: egy hisztidin aminosav (a peptidlánc  $C_{\alpha}$ -vázként van ábrázolva). Lent: Fehérje-inhibitor (narancs szalagmodell, a kölcsönható oldalláncok pálcikával vannak ábrázolva) kötődése enzim felszínén (molekuláris felszín elektrosztatikus potenciál szerint van színezve, kék: pozitív, piros: negatív). A 14.3.1-3. ábrák a 14.3.2.a kivételével a pymol programmal készültek.

[Teszt](#)

## 15. Egykristály röntgendiffrakció a gyakorlatban: egy probléma megoldása részletesen (Bényei Attila, Harmat Veronika)

### Irodalom

A bemutatott példa szerkezetmegoldások adatkészletei és a szerkezetmegoldás fontosabb állomásainak fájljai letölthetők: <http://olps.elte.hu/~veronika/>

Az ORTEP-3 for Windows program installálása: <http://www.chem.gla.ac.uk/~louis/software/ortep3/>

A PovRay program installálása: <http://www.povray.org/download/>

A WINGX program installálása: <http://www.chem.gla.ac.uk/~louis/software/wingx/index.html>

Részletes tanácsok a WINGX használatához

Lizozim kristályosítása (pl.):

- [hamptonresearch.com/documents/product/hr002676\\_new\\_user\\_guide\\_6.12.12.pdf](http://hamptonresearch.com/documents/product/hr002676_new_user_guide_6.12.12.pdf)
- [www.rigaku.com/products/protein/recipes](http://www.rigaku.com/products/protein/recipes)

A fehérjeszerkezet megoldáshoz felhasznált programok honlapjai (letöltés, kézikönyv):

- XDS, [xds.mpimf-heidelberg.mpg.de/](http://xds.mpimf-heidelberg.mpg.de/)
- CCP4 programcsomag (molrep, refmac, coot), [www.ccp4.ac.uk](http://www.ccp4.ac.uk) , [ccp4wiki.org](http://ccp4wiki.org)

Adatbázisok:

- PDB szerkezeti adatbázis, [www.pdb.org](http://www.pdb.org)
- Szekvencia adatbázis, [www.expasy.org](http://www.expasy.org)

Validálás, megjelenítés:

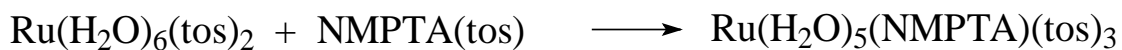
- CCP4
- pymol (ingyenes verzió), <http://pymol.en.uptodown.com/>
- molprobability server, <http://molprobability.biochem.duke.edu/>

## 15.1. Kismolekulás szerkezet megoldása (Bényei Attila)

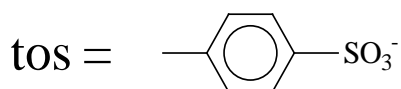
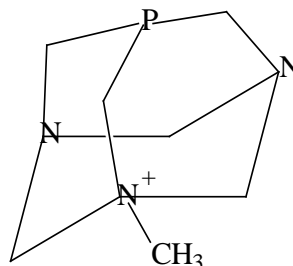
### 15.1.1. Az első lépés a megoldandó szerkezeti probléma megfogalmazása és a szükséges eszközök biztosítása

A röntgendiffrakciós módszer a jelentős erőforrás-igénye miatt nagyon fontos az alap szerkezeti probléma körvonalazása. Természetesen egy megválaszolt kérdés itt is több új kérdést vet/vethet fel, de célszerű legalábbis az első problémára a várt válaszok feltérképezése is. A szükséges eszközök felmérése is kulcs a sikerhez. Ma már szinte bármilyen kísérleti eszköz, akár szinkrotronnál végzett adatgyűjtés elérhető több-kevesebb utánjárással. Az is fontos, hogy a házon belül rendelkezésünkre álló eszközöket kihasználjuk, de ne próbáljuk meg számukra megoldhatatlan feladatra használni. Például ha az abszolút konfiguráció meghatározása a cél és a molekulában nincs nehéz atom, akkor csak réz anódú röntgensóvel vagy szinkrotron használatával lehet eredményesen megválaszolni a problémát. Ha molibdén anódú csövkünk van, akkor olyan származékot kell vizsgálni, pl. sóképzéssel előállítani, amely P vagy S atomnál nagyobb rendszámú elemet tartalmaz. A cél és az eszközök behatárolása a követendő adatgyűjtési és kiértékelési stratégiára is befolyással van. Példánkban a cél a szerkezet igazolása volt, de kiderült, hogy a fémkomplex szerkezete eltért a várttól. Végül a katalizátorként való alkalmazással kapcsolatos vizsgálatokkal kiegészítve publikálni lehetett az eredményt.

**Feladat: A  $Ru(H_2O)_6(tos)_2$  komplex és az NMPTA ligandum reakciójának (fém:ligandum arány 1:1) terméke egyetlen  $^{31}P$  NMR szinglet jelet adó komplex szerkezetének meghatározása, a ruténium(II) körüli koordináció igazolása (15.1.1.1. ábra)**



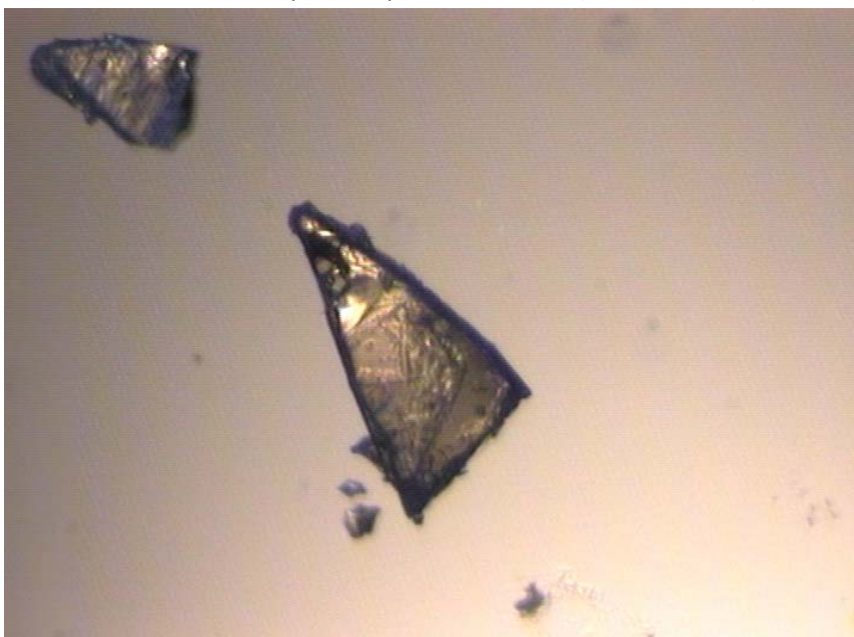
NMPTA = N-metil PTA,



15.1.1.1. ábra. A szerkezeti probléma (PTA= 1,3,5-triaza-7-foszfatriciklo-[3.3.1.1.<sup>3,7</sup>]dekán)

### 15.1.2. A tiszta anyag előállítása és egykristály növelése az első buktató

Az egykristály röntgendiffrakciós módszer nem működik egykristály nélkül. A szintézis eredményes volt, különböző fém:ligandum arányoknál is ugyanazt a <sup>31</sup>P jelet adó fémkomplexet lehetett előállítani. Több esetben az oldatból ruténium vált ki, de a hexaakva-ruténium(II) komplex korábbi tapasztalataink alapján nagyon érzékeny a levegőre különösen oldatban, ezért ennek nem tulajdonítottak nagyobb jelentőséget. Szerencsére több esetben sikerült szép kristályokat is növelni (15.1.2.1. ábra).



15.1.2.1. ábra. Az egykristályok, ruténium komplex.

### 15.1.3. Az első röntgendiffrakciós kísérlet: az elemi cella meghatározása, majd adatgyűjtés 4 napig

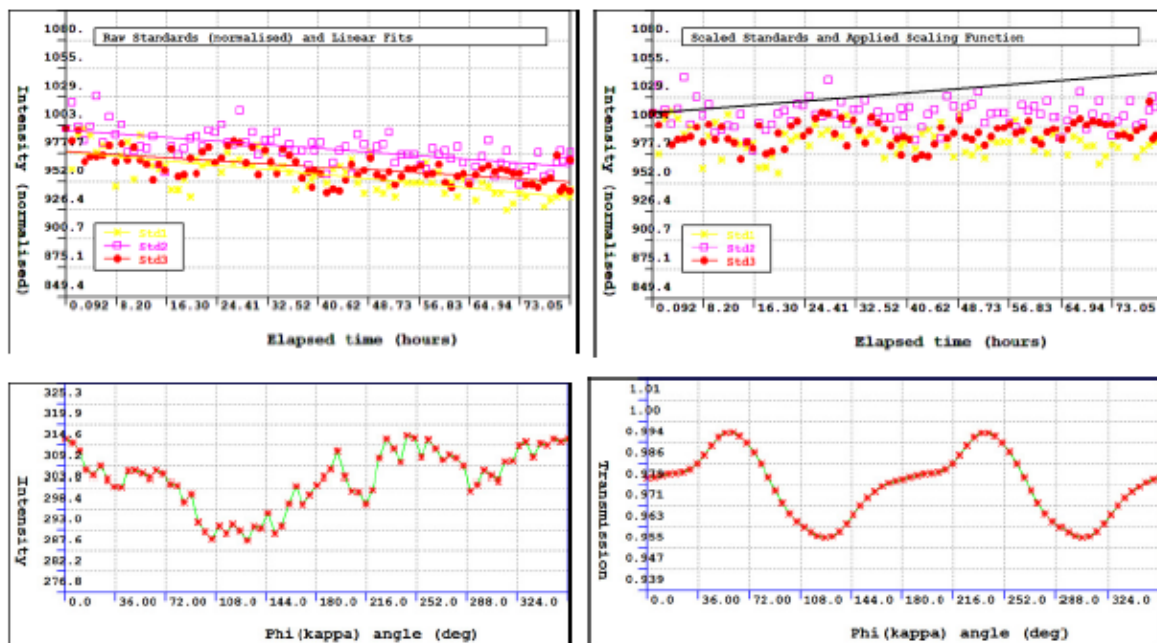
Az egyik dárda alakú kristályt egy üveg kapillárisra felragasztva elkezdtük a reflexiók keresését molibdén anódú röntgencső használatával és néhány óra alatt egyértelműen sikerült meghatározni az elemi cella paramétereit. Ezek  $a = 9.149(1) \text{ \AA}$ ,  $b = 10.653(1) \text{ \AA}$ ,  $c = 28.236(3) \text{ \AA}$ , monoklin rendszer,  $\beta = 91.8(1)^\circ$  és az elemi cella térfogata  $V = 2748 \text{ \AA}^3$ . Itt ért minket az első meglepetés. Ugyanis a  $18 \text{ \AA}^3$  szabály értelmében (3.7. fejezet) a vizsgált anyag molekulájában (itt kémiai helyesen ionpárjában) a nem hidrogén atomok száma körülbelül  $2748/18/4=38$ , vagy ha más szimmetria elemek is vannak a továbbra is monoklinnak feltételezett kristályban akkor ennek fele, 19. Ugyanakkor, mivel a várt összetétel  $C_{28}H_{46}N_3O_{14}PS_3Ru$ , ennek az értéknek  $28+3+14+1+3+1=50$ -nek, vagy ha szolvát vízmolekulák is vannak a rendszerben (ami szulfonát csoportot (tozilát) tartalmazó vegyületek esetén gyakori) ennél többnek kellene lenni. A megoldás további IR, NMR és elemanalízis vizsgálatok végzése, vagy folytatni az adatgyűjtést és a röntgendiffrakciós adatokból egyértelműen meghatározni a szerkezetet. Ez utóbbi utat követtük és 4 nap alatt egy teljes adatkészletet kaptunk. Az adatok feldolgozását az XCAD programmal végeztük (15.1.3.1. ábra). Csak néhány reflexió bizonyult kiugróan alacsony vagy negatív intenzitásúnak, de ezeket is figyelembe véve a szisztematikus hiányok (3.8. fejezet) alapján a javasolt tércsoport  $P2_1/n$ , ami az egyik leggyakoribb tércsoport (No. 14).

A tömörített Ru alkönyvtárt letöltve majd kibontva megkapjuk a szükséges adatokat és néhány támpontot jelentő fájlt. Az alábbiakban a WINGX rendszert használva vázlatosan ismertetjük a számítási lépéseket. Például az OREX rendszert használva a menürendszer más, de alapvetően az itt megadott lépéseket kell tenni.

Szoftveres (WINGX) lépések:

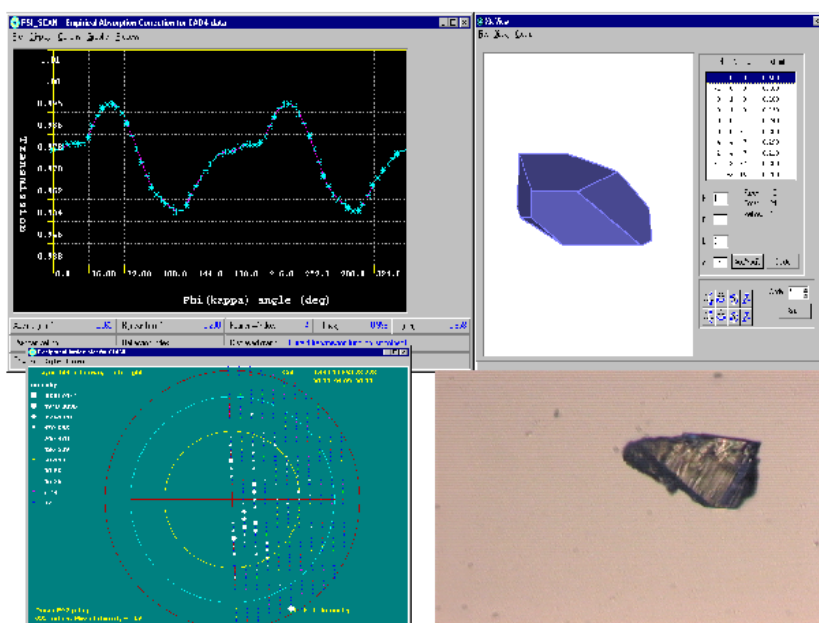
- Az ORTEP, majd a PoVRay és végül a WINGX programcsomag installálása, ORTEP és WINGX licence fájl beszerzése. Célszerű a PLATON programot is telepíteni, ehhez nem kell licence. <http://www.chem.gla.ac.uk/~louis/software/index.html>
- Az adatkészlet letöltése, a ru.dat, a ru.ins és a ru.psi fájlok másolása egy ru alkönyvtárba (nem célszerű a könyvtárstruktúra elnevezéseiben szóközt és ékezetes betűt használni, néhány program nem indítható ilyenkor.)
- A WINGX elindítása, a FILE-PROJECT-START/SELECT NEW PROJECT-BROWSE a ru könyvtár megkeresése, a ru.\* fájlra kattintva a projekt neve ru lesz. (Hibaüzenet: No reflection file, mert nincs .hkl adatfájl, ezt később korrigáljuk)
- Adatfeldolgozás: DATA-SERIAL DETECTORS-XCAD-ru.dat kiválasztása, Write files for STDANAL
- A hibás reflexiók esetén itt célszerű a Take no action, majd az Apply previous.. választása, később ellenőrizni lehet a reflexiókat (pl. mérési hiba?)
- Tércsoport meghatározása (MODEL-PRELIM-ASSIGN SPACE GROUP-MONOCLINIC, a javasolt  $P2_1/n$  elfogadása).
- Kezdő .ins fájl létrehozása: MODEL-PRELIM-INITIALISE FILES- ru.ins felülírása. CRYST-DATA Megadjuk a (most még hibás) összetételt,  $C_{28}H_{46}N_3O_{14}PS_3Ru$ , Z értékre 3-at kapunk, ami nem valószínű, de elfogadjuk, NEW.INS és STRUCT.CIF fájl készül. Itt lehet megadni a kristály morfológiáját is. (A mért kristály sárga prizmás, mérete  $0.35\text{mm} \times 0.25\text{mm} \times 0.12\text{mm}$ ). A helyes összetétel:  $C_{42}H_{70}N_6O_{18}P_2S_4Ru$ , Z=2.





15.1.3.1. ábra. A röntgendiffrakciós adatok feldolgozása. Felső sor: a mérés alatti bomlás miatti korrekció. Alsó sor: az abszorpció miatti korrekció.

Elvégeztük az empirikus abszorpció korrekciót, a meghatározott kristály alak jó egyezést mutat a mikroszkópos felvételen látható kristály alakjával. A finomításhoz a psi scan adatokkal korrigált intenzitás adatokat használtuk: mivel a molekulában számos nehéz atom van, jelentős abszorpciót tapasztalunk, ha a kristályt körbeforgatva ugyanazon reflexió intenzitását mérjük (15.1.3.1. alsó sor és 15.1.3.2. ábra)



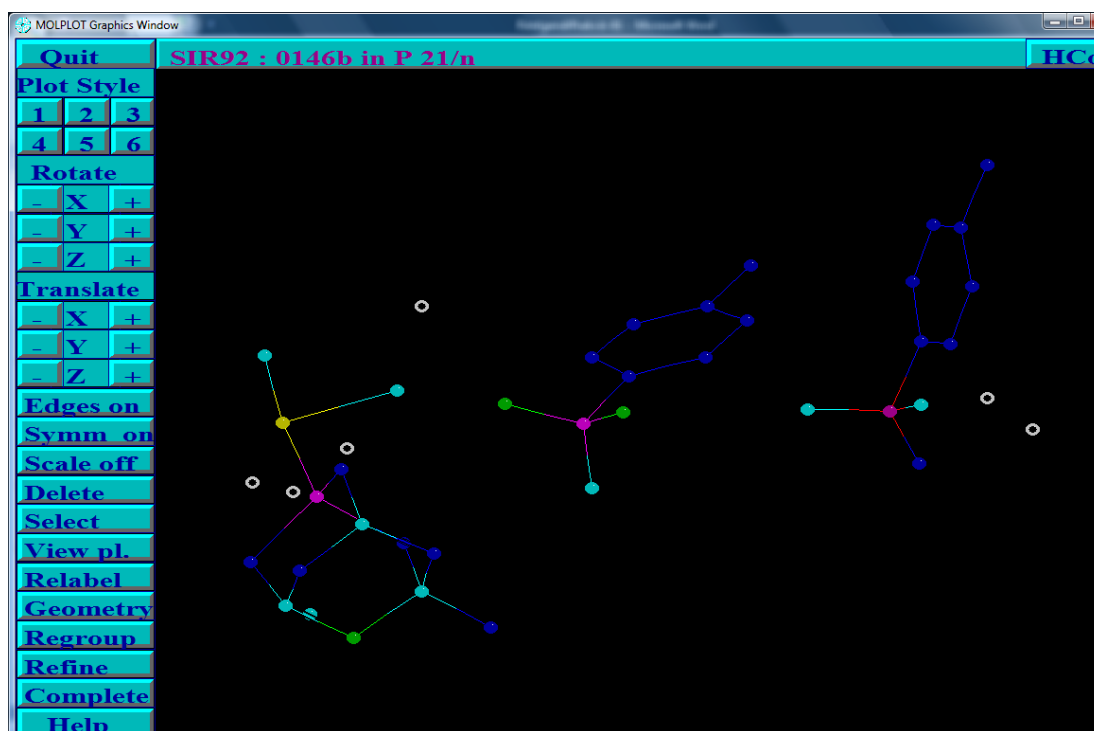
15.1.3.2. ábra, Abszorpció korrekció, bal oldalt szemempirikus psi scan adatokból, jobb oldalt numerikus, a kristály alakjának és méreteinek megadásával (itt nem részletezzük)

Szoftveres (WINGX) lépések:

- *ABSORB-SEMI-EMPIRICAL-PSIABS- PROCESSING-FOURIER SMOOTHING, WINDOW 5 (deg), - OK-PROCESS REFLECTION FILE – OK, majd az ablakok bezárása*

#### 15.1.4. A szerkezet megoldása megadja a helyes összetételt, a hidrogén atomok is láthatóak

A direkt módszer, vagy a nehézatom módszer alkalmazásával a szerkezet megoldható (15.1.4.1. ábra), és kiderül, hogy a komplex valóban nem a várt szerkezetű: nem egy, hanem két foszfin ligandum épült be. A ruténium atom inverziós centrumban van, tehát az aszimmetrikus egység a komplex felét (és két ellenion) tartalmaz. Az atomtípusok azonosítása után elkezdhető a szerkezet finomítása (6. fejezet, 15.1.4.2. ábra). A SIR programcsomag nagy előnye, hogy az atomok típusát a könnyű elemekre (C, N, O) is elég jó találati aránnyal megállapítja.



15.1.4.1. ábra. A szerkezet megoldása SIR-92 programmal, a kémiai entitás fele van az aszimmetrikus egységben

Szoftveres (WINGX) lépések:

- *SOLVE-SIR-92-GUI CONTROL-OK-QUIT-QUIT-OK*
- *GRAPHICS-CAMERON-USE .RES FILE – EXCLUDE Q – SHOW LABELS. Látható a komplex fele és az ellenionok. Átnevezzük az atomokat*
- *RENAME Ru01 Ru1 ENTER (A Ru01 nevű atom neve Ru1 lett) SHOW LABELS. Ezen a szinten nem minden atomot találunk meg a minőségének megfelelően illetve az összetétel sem volt jó. Ha a*

korábban feltételezett (rossz) összetételűt adtuk meg, akkor az egyik két atomot oxigénként kezeli a program.

- **RENAME O004 S2** Az O004 atom helyesen két atom és a neve S2. Ezt minden atomra elvégezzük a kívánt számozással. Alternatívaként az ru.ins fájlt szerkesztőben is javíthatjuk, az atomok felsorolásánál az első a név, utána a szám az atom minőségét jelenti, az SFAC utasításban megadott sorszámát.
- **END-** Az ablak bezárása, majd a cameron.out fájl átnevezése ru.ins-re.
- **FILE-BASIC TEXT EDITOR-FILE-OPEN-cameron.out FILE-SAVE AS – ru.ins** Minden atom átnevezése után az ruatnevezett.ins fájlt kapjuk

5345 adat, 331 paraméter

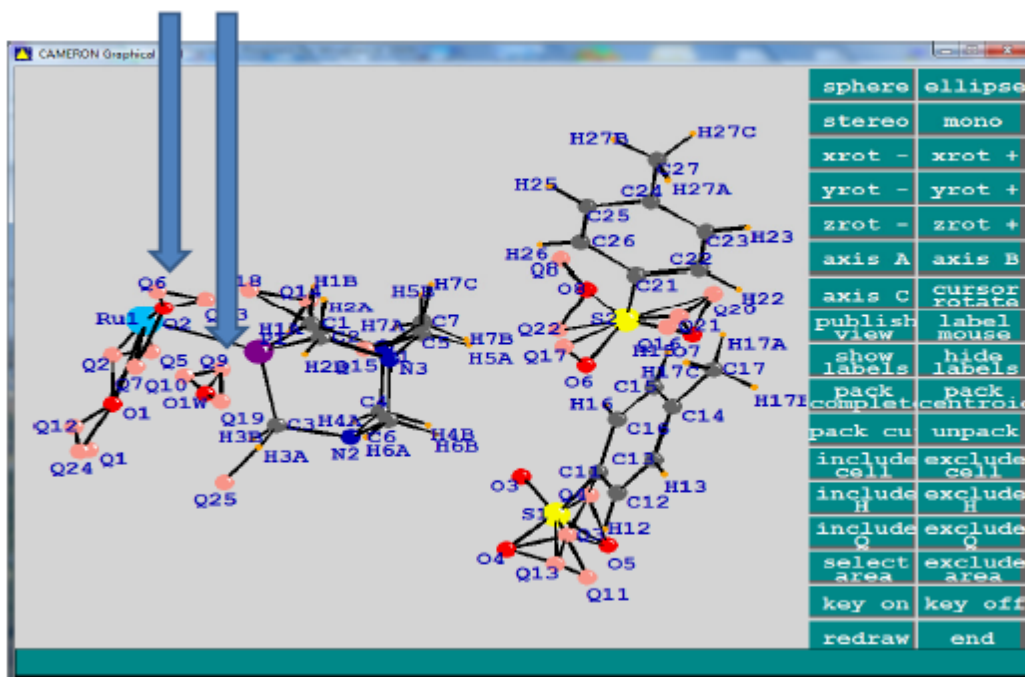
Maradó csúcs  $1.22 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$

15.1.4.2. ábra. A szerkezet finomítása, közbenső lépés

Szoftveres (WINGX) lépések:

- **REFINE-SHELXL-97** (ehhez célszerű A SHELX.EXE fájlt és a használati engedélyt kérni, regisztrálni <http://shelx.uni-ac.gwdg.de/SHELX/download.php>) kiválasztjuk a ru.hkl vagy a psiabs.hkl fájlt. A SHELX programot csak a STOP gombbal célszerű leállítani. Az ablak bezárása.
- A CAMERON programmal (USE res file) láthatjuk a hidrogén atomoknak megfelelő csúcscokat is.

Hamarosan csúcscént tűnnek fel a különbségi elektronsűrűség térképen a hidrogén atomok (15.1.4.3. ábra). A szén atomokhoz kapcsolódó hidrogéneket geometriai megfontolások alapján helyezük a szerkezetbe. A következő finomítási ciklus után már a vízmolekulák hidrogén atomjai is láthatóak (ezek helyzete egyéb esetekben a hidrogénkötés rendszer feltérképezésével lenne kiválasztható).



15.1.4.3. ábra. A hidrogén atomok is megtalálhatóak, ha az adatok minősége megfelelő

Szoftveres (WINGX) lépések:

Célszerű a ru.ins fájl javítása szerkesztőben. A PLAN sor után beírjuk:

- ACTA (CIF fájl készítés, további számítások)
- ANIS (anizotrópos finomítás)
- HFIX 23 C1 (A C1 metilén szén két hidrogénnel, geometriai pozícióban), a megfelelő AFIX utasításokat generálja a program és a finomítás során a megfelelő számú és helyzetű hidrogén atomok együtt mozognak a szén atommal.
- HFIX 41 C12 (A C12 aromás szén egy hidrogénnel a síkban)
- HFIX 137 C7 (A C7 metil csoport szene, a hidrogének pozicionálására minimumot keres a különbségi elektronsűrűség térképen)
- A többi szénatomra is elvégezzük a hidrogének geometriai pozícióba való tételét. A kapott fájl: ruhidrogenekgeompozicioba.ins
- A víz molekulák hidrogén atomjait a különbségi elektronsűrűség térképen talált csúcsok átnevezésével (15.1.4.3. ábra Q1, Q5, Q6, Q19 stb.) vagy a MAPS CALC-OH funkcióval és a HATOMS.OUT fájlból az adatok beillesztésével.
- A hidrogén atomok távolságát az oxigénhez illetve egymáshoz célszerű rögzíteni (dfix utasítások).
- A hidrogén kötések adatait a HTAB utasítással deríthetjük fel illetve adhatjuk meg.

A finomítások után kapott fájl ruvegojoins.ins, az eredményeket a 15.1.4.4. ábra mutatja (a SHELX program leírása, lehetséges paraméter-beállítások bővebben: <http://shelx.uni-ac.qwdg.de/SHELX/wikis.php>).

```

*****
+ SHELXL-97 - CRYSTAL STRUCTURE REFINEMENT - WINGX VERSION +
+ Copyright(C) George M. Sheldrick 1993-7 Release 97-2 +
+ ru started at 15:49:40 on 18-May-2012 +
*****

Read instructions and data - PSIBAS.HKL
Data: 5343 unique, 0 suppressed R(int) = 0.0510 R(sigma) = 0.0629
Systematic absence violations: 0 Bad equivalents: 13
wR2 = 0.2313 before cycle 1 for 5343 data and 352 / 352 parameters
GoF = S = 1.059; Restrained GoF = 1.058 for 11 restraints
Mean shift/su = 0.002 Maximum = 0.019 for U11 Ru1 at 15:49:50
Max. shift = 0.000 Å for H170 Max. dU = 0.000 for C14
wR2 = 0.2313 before cycle 2 for 5343 data and 352 / 352 parameters
GoF = S = 1.059; Restrained GoF = 1.058 for 11 restraints
Mean shift/su = 0.001 Maximum = 0.006 for U11 Ru1 at 15:50:05
Max. shift = 0.000 Å for H210 Max. dU = 0.000 for C14
wR2 = 0.2313 before cycle 3 for 5343 data and 352 / 352 parameters
GoF = S = 1.059; Restrained GoF = 1.058 for 11 restraints
Mean shift/su = 0.000 Maximum = 0.000 for U11 Ru1 at 15:50:20
Max. shift = 0.000 Å for H210 Max. dU = 0.000 for C14
wR2 = 0.2313 before cycle 4 for 5343 data and 352 / 352 parameters
GoF = S = 1.059; Restrained GoF = 1.058 for 11 restraints
Mean shift/su = 0.000 Maximum = 0.004 for x H210 at 15:50:27
Max. shift = 0.000 Å for H210 Max. dU = 0.000 for C15
wR2 = 0.2313 before cycle 5 for 5343 data and 0 / 352 parameters
GoF = S = 1.059; Restrained GoF = 1.058 for 11 restraints
R1 = 0.0648 for 5343 data and 0 / 352 parameters
wR2 = 0.2313, GoF = S = 1.059, Restrained GoF = 1.058 for all data
R1 = 0.1421 for 5343 unique reflections after merging for Fourier
Highest peak 1.30 at 0.2659 0.0683 0.0949 [ 1.93 Å from H120 ]
Deepest hole -0.69 at 0.8197 0.8862 0.0101 [ 0.51 Å from H110 ]

*****
+ ru finished at 15:50:33 Total CPU time: 9.3 secs +
*****

When refining structures with SHELXL-97 please quote the following reference:

G. M. Sheldrick (2008) Acta Cryst., A64, 112-122.

```

← Megfelelő adat/paraméter arány (>10)  
 ← Néhány megkötés

A paraméterek értéke közel állandó a  
 finomítási ciklusok során (0.000)

Elfogadható wR2 (<25% ). R1 (<10%)  
 És GOF érték

← A maradó csúcs nagy (> 1 elektron/Å<sup>3</sup>), de  
 ez a közeli a ruténium atom miatt van

15.1.4.4. ábra. A finomítás végeredménye.

### 15.1.5. A CIF fájl elkészítése után validálható a szerkezet-meghatározás

A különböző programok (adatfeldolgozó, megoldó, finomító) által készített CIF-ek összevonásával (7. fejezet, 15.1.5.1. ábra) 'betakarítjuk' az eredményeket, amit angolul data harvestingnek mondanak. Az adatokat a checkcif szerverre elküldve vagy a PLATON programmal a végleges CIF fájlt megvizsgálva azt kapjuk (15.1.5.2. ábra), hogy a szerkezet adatai nem mondanak ellen az adatbázis adatainak és a szerkezet-meghatározás kielégítő pontosságú.

Szoftveres (WINGX) lépések:

- PUBLISH-CREATE CIF-ACTA-C
- Kiválasztjuk az elsődleges és a további információkat tartalmazó CIF fájlt.
- Validáljuk az acta\_c.cif fájlt: PUBLISH-VALIDATE CIF-Platon Validate ACTA

Checking the syntax and contents of input CIF :

5 CIFs loaded

```
Value for _chemical_name_systematic obtained from CIF ru
Value for _chemical_formula_moiety obtained from CIF struct
Value for _chemical_formula_sum obtained from CIF ru
Value for _chemical_formula_weight obtained from CIF ru
Value for _symmetry_cell_setting obtained from CIF struct
Value for _symmetry_space_group_name_H-M obtained from CIF struct
Value for _symmetry_space_group_name_Hall obtained from CIF struct
Value for _cell_length_a obtained from CIF ru
Value for _cell_length_b obtained from CIF ru
Value for _cell_length_c obtained from CIF ru
Value for _cell_angle_alpha obtained from CIF ru
Value for _cell_angle_beta obtained from CIF ru
Value for _cell_angle_gamma obtained from CIF ru
Value for _cell_volume obtained from CIF ru
Value for _cell_formula_units_Z obtained from CIF ru
Value for _cell_measurement_reflns_used obtained from CIF struct
Value for _cell_measurement_theta_min obtained from CIF struct
Value for _cell_measurement_theta_max obtained from CIF struct
Value for _cell_measurement_temperature obtained from CIF ru
Value for _exptl_crystal_description obtained from CIF struct
Value for _exptl_crystal_colour obtained from CIF struct
Value for _exptl_crystal_size_max obtained from CIF struct
Value for _exptl_crystal_size_min obtained from CIF struct
Value for _exptl_crystal_size_max obtained from CIF struct
Value for _exptl_crystal_density_diffrn obtained from CIF ru
Value for _exptl_crystal_density_method obtained from CIF ru
Value for _exptl_crystal_F_000 obtained from CIF ru
Value for _exptl_absorpt_coefficient_mu obtained from CIF ru
Value for _exptl_absorpt_correction_type obtained from CIF psiabs
Value for _exptl_absorpt_process_details obtained from CIF psiabs
Value for _exptl_absorpt_correction_I_min obtained from CIF psiabs
Value for _exptl_absorpt_correction_I_max obtained from CIF psiabs
Value for _exptl_special_details obtained from CIF ru
Value for _diffrn_ambient_temperature obtained from CIF ru
Value for _diffrn_radiation_type obtained from CIF ru
Value for _diffrn_radiation_wavelength obtained from CIF ru
Value for _diffrn_source obtained from CIF dreduc
Value for _diffrn_radiation_monochromator obtained from CIF dreduc
Value for _diffrn_measurement_device_type obtained from CIF dreduc
Value for _diffrn_measurement_method obtained from CIF dreduc
Value for _diffrn_reflns_number obtained from CIF ru
```

```
Value for _computing_data_reduction obtained from CIF dreduc
Value for _computing_structure_refinement obtained from CIF ru
Value for _computing_molecular_graphics obtained from CIF struct
Value for _computing_publication_material obtained from CIF struct
Value for _geom_special_details obtained from CIF ru
```

Requested looped item(s) not found - item #1 = \_geom\_contact\_atom\_site\_label\_1

Requested looped item(s) not found - item #1 = \_geom\_torsion\_atom\_site\_label\_1

The following requested data items are still missing and may be required.

```
_chemical_name_common
_chemical_formula_analytical
_chemical_formula_sumpac
_chemical_melting_point
_chemical_absolute_configuration
_chemical_enantiomeric_bulk
_chemical_enantiomeric_bulk_technique
_chemical_enantiomeric_crystal
_chemical_enantiomeric_crystal_technique
_space_group_crystal_system
_space_group_name_H-M_alt
_space_group_name_Hall
_exptl_crystal_size_max
_exptl_crystal_size_min
_exptl_crystal_density_meas
_exptl_transmission_factor_max
_exptl_transmission_factor_min
_diffrn_detector_area_resol_mean
_diffrn_reflns_L_max_measured_fraction_full
_diffrn_reflns_L_min_measured_fraction_max
_diffrn_reflns_point_group_measured_fraction_full
_diffrn_reflns_point_group_measured_fraction_max
_diffrn_reflns_reduction_process
_refine_ls_hk_factor_all
_refine_ls_goodness_of_fit_all
_refine_ls_number_constraints
_refine_ls_extinction_coef
_refine_ls_abs_structure_details
_refine_ls_abs_structure_Flack
_refine_ls_abs_structure_Rogors
_computing_structure_solution
```

Writing the CIF file: AC18\_C.CIF

### 15.1.5.1. ábra. A CIF fájlok összevonása.

```
=====
# PLATON/CHECK-(280612) versus check.def version of 290609 for entry: ru
# Data From: platon.input - Data Type: CIF Bond Precision C-C = 0.0141 Å
# Refl Data: platon.fcf - Data Type: SHELXL Temp = 293 K
#
# UCL 9.1426(10) 10.6533(10) 28.2278(10) 90 91.887(10) 90
# WaveLength 0.71073 Volume Reported 2747.9(4) Calculated 2747.9(4)
# SpaceGroup from Symmetry P 21/n Hall: -P 2yn
# Reported P 21/n -P 2yn
#
# MoietyFormula C14 H38 N6 O4 P2 Ru, 4(C7 H7 O3 S), 2(H2 O)
# Reported C28 H46 N3 O14 P1 Ru1 S3
# SumFormula C42 H70 N6 O18 P2 Ru S4
# Reported C42 H70 N6 O18 P2 Ru S4
#
# Mr = 1238.33[Calc], 1238.29[Rep]
# Dx,gcm-3 = 1.497[Calc], 1.497[Rep]
# Z = 2[Calc], 2[Rep]
# Mu (mm-1) = 0.569[Calc], 0.569[Rep]
# F000 = 1292.0[Calc], 1292.0[Rep] or F000' = 1291.45[Calc]
# Reported T Limits: Tmin=0.895 Tmax=0.932 AbsCorr=PSI-SCAN
# Calculated T Limits: Tmin=0.843 Tmin'=0.819 Tmax=0.934
# Reported Hmax= 10, Kmax= 13, Lmax= 34, Nref= 5343 , Th(max)= 25.970
# Obs in FCF Hmax= 10, Kmax= 13, Lmax= 34, Nref= 5343 , Th(max)= 25.967
# Calculated Hmax= 11, Kmax= 13, Lmax= 34, Nref= 5383 , Ratio = 0.993
# Reported Rho(min) = -0.69, Rho(max) = 1.30 e/Ang**3 (From CIF)
# Calculated Rho(min) = -0.69, Rho(max) = 1.14 e/Ang**3 (From CIF+FCF data)
# w=1/[sigma**2( Fo**2)+(0.1214P)**2+ 6.0595P], P=(Fo**2+2*Fc**2)/3
# R= 0.0648( 3370), wR2= 0.2314( 5343), S = 1.059 (From CIF+FCF data)
# R= 0.0648( 3370), wR2= 0.2313( 5343), S = 1.059 (From FCF data only)
# R= 0.0648( 3371), wR2= 0.2313( 5343), S = 1.059, Npar= 352
#
For Documentation: http://www.platonsoft.nl/CIF-VALIDATION.pdf
#
>>> The Following Model ALERTS were generated - (Acta-Mode) <<<
#
Format: alert-number_ALERT_alert-type_alert-level text
=====
420_ALERT_2_B D-H Without Acceptor O1W - H2W ... ?
420_ALERT_2_B D-H Without Acceptor O2 - H21O ... ?
#
242_ALERT_2_C Check Low Ueq as Compared to Neighbors for Ru1
242_ALERT_2_C Check Low Ueq as Compared to Neighbors for S1
242_ALERT_2_C Check Low Ueq as Compared to Neighbors for C14
242_ALERT_2_C Check Low Ueq as Compared to Neighbors for S2
245_ALERT_2_C U(iso) H110 Smaller than U(σ) O1 bv ... 0.018 AngSσ
=====
```

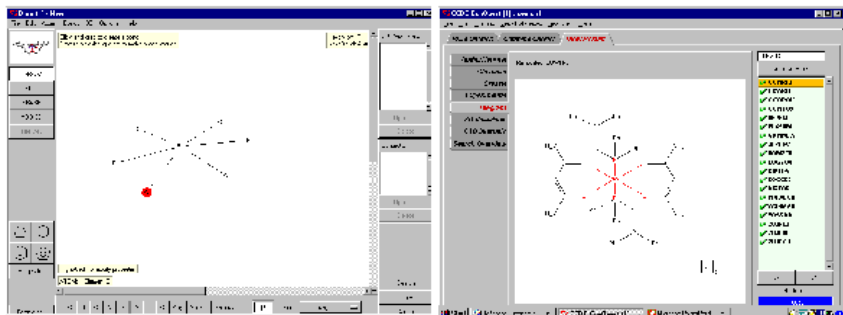
### 15.1.5.2. ábra. Sikeres szerkezet validálás eredménye.

Néhány B és C jelű hibánk is van, amit a közleményben meg kell indokolni. Az oldószer vízmolekulák különböző orientációban lehetnek hidrogénkötésekkel rögzítve. Ezek eloszlása a rácsban statisztikus (rendezetlenség), de a hidrogén atomok csekély elektronsűrűsége miatt ez nem modellezhető. Mivel ez a hidrogénkötés mintázatát is befolyásolja a szerkezet szupramolekuláris vizsgálatánál ezt figyelembe kell venni. Másrészt a ruténium atom környezetében fellépő fodrok (5.2. fejezet) a különbségi elektronsűrűség térképen az  $1 \text{ eÅ}^{-3}$  értéknél nagyobb csúcsot eredményez. Ezek a kisebb hibák magyarázhatóak és elfogadhatóak.

### 15.1.6. A szerkezet értelmezése, ábrák és videó készítése, majd publikálás

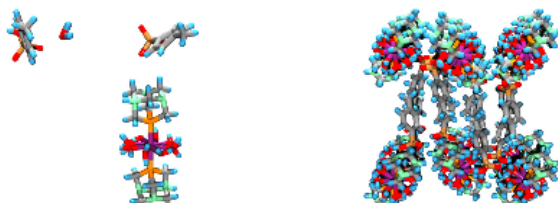
A szerkezet értelmezését, további számítások végzésében segít a PLATON és a CSD. A CSD szerkezeti adatbázisban (10. fejezet) néhány hasonló szerkezetet találunk (15.1.6.1. ábra). A leghasonlóbb az általunk néhány évvel korábban meghatározott és közölt protonált PTA ligandumot tartalmazó komplex szerkezete. A PLATON kristallográfiai programcsomaggal (9. fejezet, 15.6.1.2. ábra) elvégezzük a kristallográfiai számításokat, leírjuk a hidrogén-kötések (ebben az esetben egy lehetséges mintázat) geometriai adatait és topológiáját, elkészítjük a kötésszög- és kötéstávolság-táblázatokat. Az ORTEP programmal elkészítjük az ábrákat (15.1.6.3. ábra).

A közleményt publikáltuk: J.Kovacs, F.Joo, A.C.Benyei, G.Laurenczy (2004), Dalton Trans. ,2336

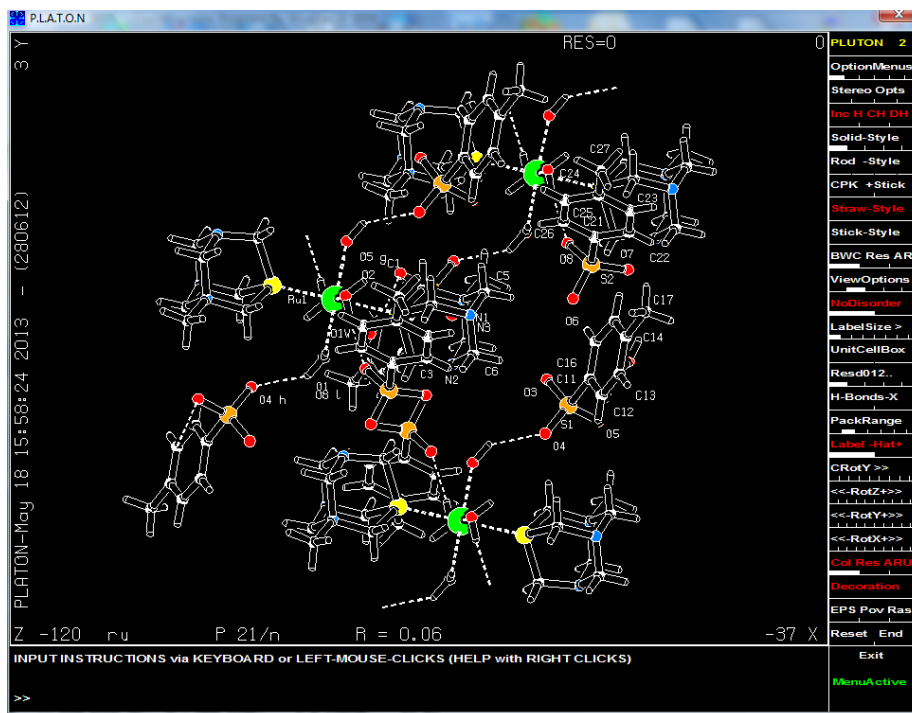


Mind karboxilát- vagy diketonát-komplexek

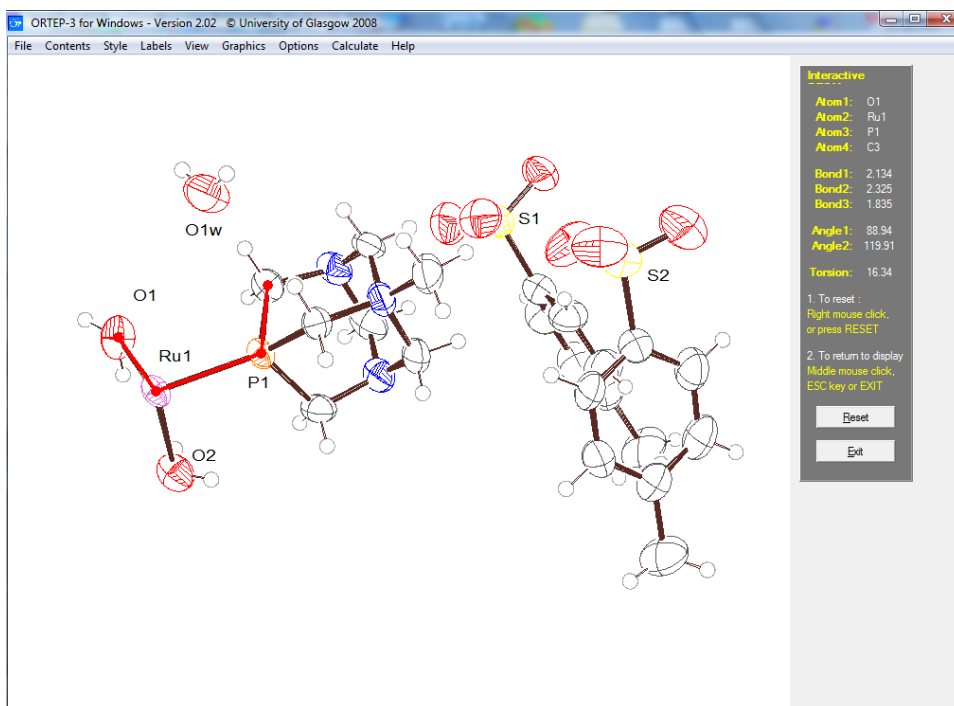
Saját szerkezet:  
 $\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{HPTA})_2(\text{tos})_4$   
 (Nádasdi Levente)



15.1.6.1. ábra. A CSD keresés eredménye néhány hasonló szerkezet



15.1.6.2. ábra. PLATON kristallográfiai program a hidrogén kötések vizsgálatában



15.1.6.3. ábra. A szerkezet ORTEP rajza. Jelölhetjük az atomokat az ábrán vagy kötéstávolság-kötésszög-torziós szög adatokat számolhatunk

Szoftveres (WINGX) lépések:

- *ANALYSE-PLATON-Hbonds* A hidrogénkötések paramétereinek meghatározása (vagy *ANALYSE-PLATON-Graphical Menu*-az *acta\_c.cif* kiválasztása *Calc Hbond* vagy *Calc ALL*)



- ANALYSE-GEOM táblázatok készítése (tables.lst)
- GRAPHICS-ORTEP3 rajz készítése
- Az ORTEP3 Label menüben feliratokat, a Contents-Unit cell content menüben elemi cellát, a Calculate interactive geometry menüben számításokat végezhetünk, a Files Write POV-Ray file menüből prezentációs ábrát kérhetünk. A POV-Ray egy magas szintű program nyelv, amihez a PLATON és az ORTEP3 megfelelő indító fájlt generál. A megrajzolt képkockákat összefűzve videót is készíthetünk ([ruvideo.avi](#))

## 15.2. Fehérjeszerkezet megoldása (Harmat Veronika)

A háziyúk tojásfehérjéből származó lizozimot hozzáférhetősége, egyszerű és jól reprodukálható kristályosíthatósága miatt széles körben alkalmazzák a kristályosítás oktatásában és tesztfehérjeként. Az utóbbi alkalmazásra példa a fehérjekristályosítás és fázisprobléma megoldás új módszereinek kidolgozása, a kristályosodás kinetikájának, adalékanyagok hatásának vizsgálata, a kristály sugárzás általi károsodásának vizsgálata. Egyike a fehérjekristallográfia hőskorában megoldott szerkezetű fehérjéknek, amelyek először nyújtottak betekintést az enzimműködés szerkezeti hátterébe ([www.pdb.org/pdb/101/motm.do?momID=142](http://www.pdb.org/pdb/101/motm.do?momID=142)). A fehérje 129 aminosavból álló enzim, a tojásban védő funkciót lát el: mikroorganizmusok sejtfalát alkotó szénhidrátláncok hidrolízisét katalizálja.

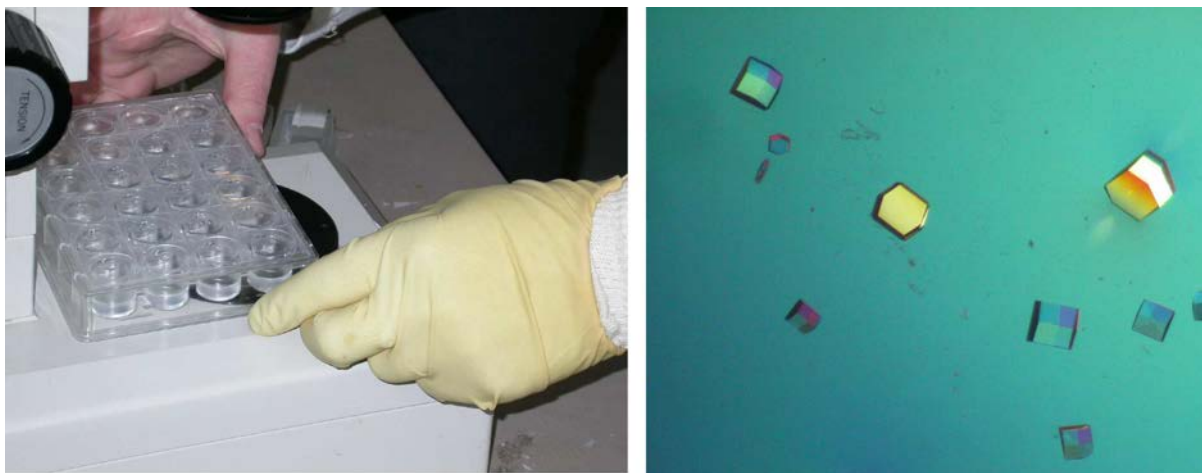
Töltsük le az uniprot szekvencia adatbázisból a fehérje szekvenciáját FASTA formátumban ([www.expasy.org](http://www.expasy.org), keresőkód: P00698)! A formátum az aminosavak egybetűs kódját tartalmazza, amelyek a második sorban kezdődnek, az első sor „>” jellel kezdődik, ez csak szöveges információt tartalmaz. A fehérje szerkezeti adatbázisban ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)) végezzünk keresést „lysozyme” keresőszóval! Hány háziyúk (*Gallus gallus*) tojásfehérjéből származó lizozim, és hány egyéb fajból származó lizozim szerkezet van? A tyúktojás lizozim milyen kristályformákban kristályosodik (a szerkezetek felsorolása fölött „Reports” – „X-Ray” – „Unit Cell”), melyik a leggyakoribb? Töltsük le egy tetragonális tyúktojás lizozim szerkezetét, és egy más fajból származóét is. A más fajból származó lizozim szekvenciáját töltsük le a pdb-ből (FASTA formátumban), majd hasonlítsuk össze a tyúktojás lizoziméval ([www.expasy.org](http://www.expasy.org), „proteomics” – „ClustalO”), hány %-os a szekvencia azonosság?

### 15.2.1. Lizozim kristályosítása

A kristályosítás során szükség van az irodalmi kristályosítási körülmények optimalizálására, elsősorban a vegyszerek és fehérje nem pontosan azonos minősége, és a koncentráció mérés pontatlansága miatt. A kísérlet során járjuk körbe az irodalmi körülményeket: töményebb törzsoldatok segítségével 24 lyukú (pl. VDX Linbro) kristályosító tálcán állítsuk össze a kristályosító oldatokat (15.2.1. ábra): A: 6 féle körülmény, amelyben a NaCl koncentrációja 5-9 w/v% között változik, a 0,1 M acetát puffer pH-ja pedig 4-5 között (a körülmények összeállításánál hanyagoljuk el a térfogati kontrakciót). B: további 6 körülményben változzon a NaCl koncentrációja 10-15 w/v% között, az acetát puffer pH-ja legyen 4,5 (0,1M), és az oldat tartalmazzon 25 v/v% etilénlikolt. C: a B körülmények még egyszer, más fehérjekoncentrációval lesznek kipróbálva. D: üresen marad csíráztatási kísérletekre vagy adalékanyagok kipróbálására. A lizozimból készítsünk 80 mg/ml törzsoldatot 0,1M pH=4,5 acetát pufferben (C), ebből hígítsunk 60mg/ml (B) és 15 mg/ml (A) törzsoldatokat, majd mikrocentrifugán magas fordulatszámon centrifugáljuk le (10 perc). A

fehérjeoldat készítésénél vegyük figyelembe, hogy 2 $\mu$ l fehérjeoldat + 2 $\mu$ l kristályosító oldat összterfogatú cseppekben (függő csepp) végezzük a kristályosítást. A kristályosító tálcát szobahőmérsékleten tároljuk.

A fehérjekristályok 1-2 nap alatt kinőnek. A kristályosítási kísérlet kiértékelésénél vegyük figyelembe a kinőtt kristályok nagyságát, alakját és hogy vannak-e látható hibák (ikerkristály). Hogyan függ a paraméterek változásától a kristályok száma, mérete és morfológiája? Jegyezzük fel a kiértékelő lapra ([hamptonresearch.com/documents/growth\\_101/17.pdf](http://hamptonresearch.com/documents/growth_101/17.pdf))!



15.2.1. ábra. Kristályosítás függőcsepp módszerrel, a kristályok vizsgálata mikroszkóppal. Jobbra: tetragonális lizozim kristályok

### 15.2.2. Adatgyűjtés, adatredukció

Az adatgyűjtést térdetektoros diffraktométeren alacsony hőmérsékleten (100 K) végezzük. Vizsgáljuk egy A, B és C típusú körülmény esetén is kristály nélkül, csak az anyalúgból kivett cseppecskével, hogy kriokörülmény-e, vagyis a hideg nitrogén áramban amorf vagy kristályos jégfázis képződik-e. (A: nem kriokörülmény, B, C igen). Az A körülményben növesztett kristályok esetén próbálkozhatunk a körülmény víztartalma egy részének etilén-glikollal való helyettesítésével, és a kristály beáztatásával. Mi történik?

A krio körülményben nőtt kristályokat megfelelő méretű hurokkal kihalászva a cseppből teszteljük: Rövid expozíció után vizsgáljuk, hogy fehérjekristályt jelez-e a diffrakciós kép a felbontást, hogy a diffrakciós mintázat nem utal-e ikerkristályra, károsodott kristályra, hogyan függ a kristály orientációtól a felbontás. 1-2 felvétel alapján indexeljük a diffrakciós képeket. Jegyezzük fel az elemi cella dimenzióit! Ellenőrizzük, sikeres volt-e az indexelés: jó-solt reflexió pozíciók megegyeznek a valóságosakkal? Ha elégedettek vagyunk a kristállyal, hosszabb expozíciós idő kipróbálásával tesztelhetjük, hogy növelhető-e a felbontás. A mozaicitás megbecslése után a mérő programmal mérési stratégiát állíthatunk fel (milyen orientációban kell kezdeni az adatgyűjtést, és a kristályt mekkora szögterületben kell körbeforgatni teljes adatkészlet gyűjtéséhez – ezt a tartományt megnövelve az adatkészlet redundanciája nő, és így minősége javul). A detektortávolságot a várható legjobb felbontás, az oszcillációs szöget a mozaicitás és celladimenziók figyelembevételével állítjuk be. Elindítjuk az adatgyűjtést.

Az adatkészlet feldolgozásához, az integráláshoz, és skálázáshoz és adatredukcióhoz az XDS és XSCALE programokat használjuk. Ezek szerkeszthető paraméterfájl segítségével futnak. Az XDS.INP paraméterfájl elő van készítve különböző detektortípusokra (laborkoordináta rendszer irányjai, detektor méretei, pixelméret, stb.). A paraméterfájlban a mérésnek megfelelően át kell írni a hullámhossz, oszcillációs szög, detektortávolság értékeit, a diffrakciós képek elérési útvonalát, nevét és számát, és kiválasztani, hogy melyik felvételek felhasználásával történjen az indexelés. A program futásakor az egyes lépések sikerességéről az LP kiterjesztésű fájlokban találunk információt. Ezek közül legfontosabb az IDXREF.LP és CORRECT.LP. IDXREF.LP: az indexelés során hány reflexiót használt fel a program, ezeknek hány százaléka illeszkedett jól a talált triklin primitív elemi cellára, a talált primitív triklin cella milyen magasabb szimmetriájú cellává konvertálható (milyen Bravais-rács valószínű; 15.2.2. ábra), ikres-e a kristály, megtalálta-e nagy biztonsággal a program a reciproktér origóját. CORRECT.LP: az integrálás után az összes obszerváció birtokában (minden reflexió összes megmért szimmetria-ekvivalensének összehasonlítása) a program automatikusan kiválasztja a szimmetriát (lehetséges tércsoportokat, vizsgálja a kioltási szabályokat), a közölt táblázatok tartalmazzák az adatkészlet minőségi jellemzőit (komplettesség, R-faktorok,  $\langle 1/\sigma(I) \rangle$ , redundancia; 15.2.3. ábra), következtethetünk a felbontásra, és az esetleges problémákra (pl. meroéderes ikresség, jegesedés, a kristály bomlása a mérés közben, vagy, ha az indexelés közben rosszul határozta meg a program a reciproktér origóját). Az XSCALE programskálazza és egyesíti (az akár több adatkészletből származó) adatokat. az XDSCONV program segítségével pedig más formátumra konvertálhatjuk az adatkészletet tartalmazó fájlt ( $h, k, l, l, \sigma(I)$  értékek).

LATTICE-CHARACTER	BRAVAIS-LATTICE	QUALITY OF FIT	UNIT CELL CONSTANTS (ANGSTROM & DEGREES)					
			a	b	c	alpha	beta	gamma
* 44	aP	0.0	36.9	78.7	78.7	90.1	90.1	90.1
* 31	aP	1.5	36.9	78.7	78.7	89.9	90.1	89.9
* 35	mP	3.5	78.7	36.9	78.7	90.1	90.1	90.1
* 25	mC	3.6	111.2	111.4	36.9	90.0	90.1	90.0
* 34	mP	4.6	36.9	78.7	78.7	90.1	90.1	90.1
* 33	mP	5.1	36.9	78.7	78.7	90.1	90.1	90.1
* 32	oP	6.6	36.9	78.7	78.7	90.1	90.1	90.1
* 23	oC	6.6	111.2	111.4	36.9	90.0	90.1	90.0
* 20	mC	6.6	111.2	111.4	36.9	90.0	90.1	90.0
* 21	tP	9.7	78.7	78.7	36.9	90.1	90.1	90.1
39	mC	249.5	161.5	36.9	78.7	90.1	90.1	76.9
37	mC	250.5	161.6	36.9	78.7	90.1	90.1	76.9
38	oC	252.5	36.9	161.5	78.7	89.9	90.1	103.1
29	mC	253.3	36.9	161.5	78.7	89.9	89.9	76.9
36	oC	253.6	36.9	161.6	78.7	89.9	90.1	103.1
28	mC	254.6	36.9	161.6	78.7	89.9	89.9	76.9
27	mC	501.0	161.5	36.9	111.2	89.9	133.4	76.9
19	oI	504.1	36.9	111.2	117.3	89.9	71.7	89.9
26	oF	623.0	36.9	161.5	161.7	86.9	103.3	103.1
18	tI	626.0	111.2	117.3	36.9	71.7	90.1	90.1
1	cF	999.0	117.3	117.1	117.3	95.7	95.7	143.3
2	hR	999.0	86.9	86.9	117.3	118.4	61.7	100.5

15.2.2. ábra. Az IDXREF.LP fájl részlete a lehetséges szimmetriákkal. Legvalószínűbb a kis büntetőpontot (quality of fit) kapott elemi cellák közül, a legnagyobb szimmetriájú (a vizsgált lizozim kristály esetén tP, azaz primitív tetragonális).

## COMPLETENESS AND QUALITY OF DATA SET

## R-FACTOR

observed =  $(\text{SUM}(\text{ABS}(I(h,i)-I(h))))/(\text{SUM}(I(h,i)))$   
 expected = expected R-FACTOR derived from  $\text{Sigma}(I)$

COMPARED = number of reflections used for calculating R-FACTOR

I/SIGMA = mean of intensity/Sigma(I) of unique reflections  
 (after merging symmetry-related observations)

Sigma(I) = standard deviation of reflection intensity I  
 estimated from sample statistics

R-meas = redundancy independent R-factor (intensities)

Rmrgd-F = quality of amplitudes (F) of this data set  
 For definition of R-meas and Rmrgd-F see  
 Diederichs & Karplus (1997), Nature Struct. Biol. 4, 269-275.

Anomal Corr = mean correlation factor between two random subsets  
 of anomalous intensity differences

SigAno = mean anomalous difference in units of its estimated  
 standard deviation ( $|F(+)-F(-)|/\text{Sigma}$ ). F(+), F(-)  
 are structure factor estimates obtained from the  
 merged intensity observations in each parity class.

Nano = Number of unique reflections used to calculate  
 Anomal\_Corr & SigAno. At least two observations  
 for each (+ and -) parity are required.

SUBSET OF INTENSITY DATA WITH SIGNAL/NOISE $\geq -3.0$ AS FUNCTION OF RESOLUTION													
RESOLUTION	NUMBER OF REFLECTIONS			COMPLETENESS	R-FACTOR	R-FACTOR	COMPARED	I/SIGMA	R-meas	Rmrgd-F	Anomal	SigAno	Nano
LIMIT	OBSERVED	UNIQUE	POSSIBLE	OF DATA	observed	expected					Corr		
4.03	6362	1035	1119	92.5%	2.6%	2.8%	6327	57.47	2.8%	1.4%	35%	1.245	590
2.88	11223	1726	1771	97.5%	2.7%	2.9%	11177	56.15	2.9%	1.5%	15%	1.016	1165
2.36	14724	2194	2226	98.6%	3.1%	3.3%	14695	48.24	3.4%	1.8%	24%	1.074	1653
2.05	17233	2571	2582	99.6%	3.6%	3.7%	17220	42.24	4.0%	2.2%	18%	0.997	2109
1.83	19281	2906	2909	99.9%	4.5%	4.8%	19274	32.74	4.9%	3.0%	17%	0.935	2498
1.68	21067	3200	3200	100.0%	6.4%	6.8%	21065	23.98	6.9%	4.3%	20%	0.918	2827
1.55	22292	3444	3444	100.0%	8.5%	9.3%	22290	18.35	9.2%	5.8%	12%	0.829	3067
1.45	23483	3703	3703	100.0%	12.3%	13.2%	23480	13.33	13.4%	8.5%	5%	0.805	3325
1.37	12930	3454	3923	88.0%	15.4%	16.1%	12406	7.73	17.7%	14.9%	-3%	0.771	1412
total	148595	24233	24877	97.4%	3.8%	4.1%	147934	28.14	4.2%	3.8%	13%	0.914	18646

NUMBER OF REFLECTIONS IN SELECTED SUBSET OF IMAGES 151037  
 NUMBER OF REJECTED MISFITS 2439  
 NUMBER OF SYSTEMATIC ABSENT REFLECTIONS 0  
 NUMBER OF ACCEPTED OBSERVATIONS 148598  
 NUMBER OF UNIQUE ACCEPTED REFLECTIONS 24234

15.2.3. ábra. A CORRECT.LP fájl részlete: az adatkészlet minőségének jellemzői a felbontás függvényében. Az R faktorok és  $\langle I/\text{sig}(I) \rangle$  értékek alapján az adatkészlet felbontása jobb lenne, mint  $1,37\text{\AA}$ , a detektor szélein kívül is lettek volna zajszint feletti intenzitású reflexiók, amik más detektor beállításával mérhetőek lettek volna.

### 15.2.3. A fázisprobléma megoldása molekuláris helyettesítéssel

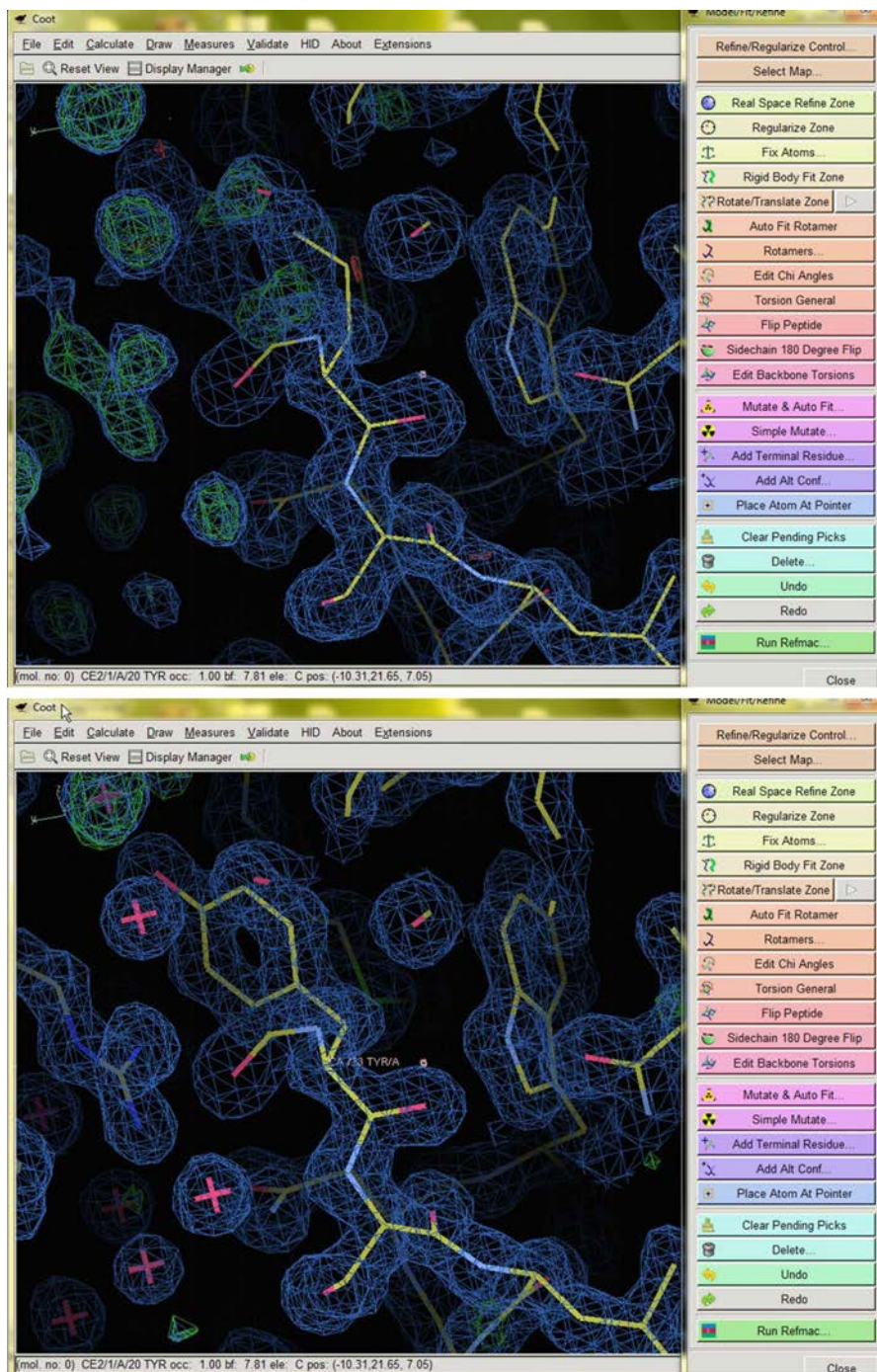
Mivel ismert a vizsgált fehérjéhez hasonló szerkezet, a fázisproblémát molekuláris helyettesítéssel oldjuk meg. (Kristályunk izostrukturális a PDB-ben található tetragonális lizozim szerkezetekkel, ezért tulajdonképpen erre sem lenne szükség, elég lenne csak a modell merev test finomítása és differencia Fourier számítás – a molekuláris helyettesítést a módszer bemutatása céljából végezzük.) A felhasznált modellszerkezetből el kell távolítani a nem fehérjeatomokat (víz, ligandumok, ionok). Az adatkészletet a megfelelő formátumra konvertáljuk (a CCP4 programcsomag használata esetén MTZ kiterjesztésű fájl), és az intenzitásokat szerkezeti tényezőkké konvertáljuk, valamint kiválasztjuk a szabad R faktor számítására elkülönítendő reflexiókat (Reflection Data Utilities > Convert to/modify/extend MTZ). A molekuláris helyettesítés előtt hasznos tájékozódni arról, hogy hány fehérjemolekulát tartalmazhat az

aszimmetrikus egység (Molecular Replacement> Analysis>Cell Content Analysis), és ha többet, akkor önrotációs függvényt számítani.

A molekuláris helyettesítést végezhetjük a MOLREP vagy PHASER alprogrammal (pl. Molecular Replacement>Run Molrep –auto MR). A paraméterek beállítása során a felbontást állítsuk 3 Å-re, végezzünk rotáció és transláció keresést is. Az adatfeldolgozás esetén nem lehet megállapítani, hogy a tércsoport  $P4_12_12$  vagy  $P4_32_12$ -e (vö. kioltási szabályok), állítsuk be, hogy a program mindkét tércsoportban végezze el a translációs keresést – az eredmény alapján tudunk dönteni a tércsoportról. A log fájlban vizsgáljuk meg, hogy a rotációs függvény maximumai közül kiugrik-e a jó megoldás (sokkal nagyobb-e az első maximum), és azt is, hogy milyen korrelációs tényező és R-faktor jellemzi a molekuláris helyettesítés végén kapott megoldást. A kapott molekulát jelenítsük meg grafikus programmal, és vizsgáljuk meg a környezetét a kristályban, (pl. pymol programba beolvasva A>generate>symmetry mates> within 8Å) létezik-e ilyen molekula-elrendeződést tartalmazó kristály: nincs-e jelentős átfedés a szomszédokkal, a kristálykontaktusokkal egymáshoz kapcsolódó molekulák hálózata 3 dimenziós-e. A módszer vizsgálata céljából végezzük el a molekuláris helyettesítést kevésbé teljes modellel (pl. MOLREP-ben: The Model>convert to polialanine & shift to origin) és homológ szerkezetet tartalmazó modellel is (másik fajból származó lizozim koodrinátái, ekkor használjuk fel a tyúktojás lizozim letöltött szekvenciáját – a program szekvenciaillesztést hajt végre, és a modell aminosavjait ennek megfelelően mutálja, bár plusz atomokat nem ad a szerkezethez). Hasonlítsuk össze a három molekuláris helyettesítés eredményeit a fentieknek megfelelően! Ugyanazt a megoldást találta a program a három esetben (vegyük figyelembe, hogy több megengedett origó van a vizsgált tércsoportban)?

#### 15.2.4. Modellépítés, szerkezetfinomítás

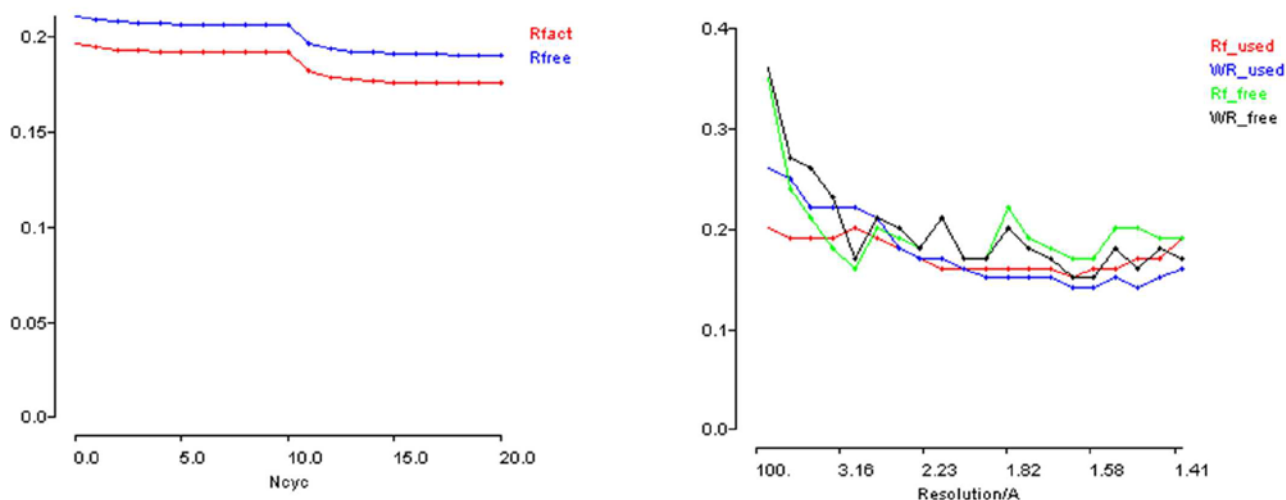
A modellépítés-szerkezetfinomítás folyamatának demonstrálására a harmadik molekuláris helyettesítés eredményét használjuk. A finomításhoz Refmac (CCP4-ben Refinement>Run Refmac5), a modellépítéshez Coot programot használunk. A modellépítés előtt végezzünk merev test finomítást a Refmac programmal, az eredményül kapott mtz fájl a mért adatokon kívül tartalmazza a differencia elektronsűrűségi térképek számításához szükséges koefficienseket ( $2F_o-F_c$  típusú térképhez „FWT” és  $F_o-F_c$  típusú térképhez „DELFWT”) és fázisokat. Az eredményül kapott modellt és mtz fájlt a Coot programba beolvasva a modell kiválasztott atomjának környezetében látható a két térkép (15.2.4. ábra). A megjelenített izo-elektronsűrűségi szintet az egér görgővel állíthatjuk ( $2F_o-F_c$  típusú térkép: legalább  $1,0\sigma$ ,  $F_o-F_c$  típusú térkép: legalább  $3,0\sigma$ ). Az első modellépítési lépés során a szekvencia szerint haladva illesztjük a modellt a  $2F_o-F_c$  térképhez az  $F_o-F_c$  térképet is figyelembe véve (csonka aminosavak kiegészítése, helyes rotamer beállítása, a térképből kilógó atomok eltörlése, hiányzó aminosavak pótlása és a modell kis szakaszainak automatikus illesztése a térképbe: valós térbeli illesztés). Jegyezzük fel a problémás régiókat!



15.2.4. ábra. Modellépítés Coot programmal. Fent: első modellépítési lépés ( $2F_o-F_c$  típusú térkép:  $1,1\sigma$ , világoskék,  $F_o-F_c$  típusú térkép:  $3,0\sigma$ , zöld +, piros – és a kiindulási modell). Lent: modellépítés folytatása a finomítási lépés után.

Az ily módon javított modell finomítása során a felbontástól (adat/paraméter aránytól) függő módon választunk stratégiát. A fehérjeszerkezetek nagy részére jellemző, az atomi felbontásnál rosszabb, 1,5-2,5 Å felbontás esetén izotróp individuális atomi mozgástényezők finomítása és geometriai kényszerfeltételek alkalmazása a megfelelő stratégia. Nagyobb régiók mozgásának anizotrópiáját TLS finomítás során kevés paraméter bevezetésével modellezhetjük (Refmac program: Do TLS & restrained refinement). A TLS

finomításhoz az egész molekula legyen a merev régió (Create TLSIN). Futtassunk 10 kör TLS és 10 kör maximum likelihood finomítást többféleképpen. Próbáljuk ki, milyen hatása van a következő paraméterek változtatásának: a TLS finomításnál a kezdeti B-faktorok 20-ra állítása, hidrogén atomok generálása vagy elhagyása, Babinet vagy egyszerű skálázás alkalmazása. A különböző finomítási próbálkozások R-faktor diagramjait hasonlítsuk össze (View Files from Job>View Log Graphs; 15.2.5. ábra). Konvergált a finomítás, vagy több lépés szükséges? Annak a finomításnak az eredményét (pdb és mtz fájl) használjuk a további modellépítéskor, ahol a legalacsonyabb lett az R-faktor, de a szabad R-faktor sem nagyon tér el tőle (kb. maximum 0,05).



15.2.5. ábra. R-faktor diagram. Balra: az  $R$  és  $R_{free}$  változása a finomítás során. Jobbra  $R$  és  $R_{free}$  ábrázolása a felbontás függvényében

A következő modellépítés az elsőhöz hasonlóan zajlik. Ha jelentősen javult az R-faktor a finomítás során, az elektronsűrűségi térkép is javulni fog. Vizsgáljuk meg a „problémás régiókat”! A beépített új peptidrészek esetén vizsgáljuk meg a Ramachandran térképet is. Ezután újabb szerkezetfinomítás és modellépítés következik. Ha modellépítés során nem tudunk jelentősebb változtatásokat végrehajtani, akkor a finomítás során ugyanannak a lokális minimumnak a környékén maradunk és a finomítás sem fog jelentős változást okozni a modellben. Beépíthetünk alternatív oldallánc konformációkat, majd a következő körökben ligandumokat (pl. az anyalúgból származó molekulákat), vízmolekulákat: automatikusan kereshetők, gömbszerű elektronsűrűséggel jellemezhetők, tetraéderez irányokban helyezkednek el tőlük H-kötés donor és/vagy akceptor atom(ok) (ezeket az ismérveket szigorúan vizsgáljuk, mert a fehérjeatomoknál mozgékonyabb vízmolekulák elektronsűrűsége kisebb, akár az elektronsűrűségi térkép zajszintjéhez közeli, tehát fennáll a veszélye, hogy ezt a zajt modellezzük a vízmolekulákkal). Az Asn, Gln és His oldalláncok orientációját szintén a lehetséges hidrogénkötések figyelembevételével állapítsuk meg!

A finomítás-modellépítés akkor tekinthető befejezettnek, ha már nem sikerül csökkentenünk az R-faktort, illetve újabb atomokat beépítenünk a modellbe.

### 15.2.5. Validálás

A validálás során vizsgáljuk a modell megfelelését az adatkészletnek (R-faktorok), fizikai-kémiai ismeretinknek (geometria, másodlagos kölcsönhatások) és biológiai ismereteinknek (szerkezet-funkció összefüggések). A validáláshoz futtassuk le az SFcheck és Procheck programokat (CCP4-ben: Validation/Deposition>Validate model and/or data), és értékeljük a szerkezetet a kapott ps fájlok alapján. Töltsük fel a szerkezetet a Molprobit serverre és generáljunk hidrogéneket, majd vizsgáljuk meg a geometriát! Vannak-e a Ramachandran térképen tiltott régióban levő aminosavak, rossz oldallánc rotamerek vagy egyéb geometriai torzulások? A hasonló felbontású szerkezetekkel összevetve a geometriai torzulások átlagosnak tekinthetők-e? Vannak-e hibás orientációjú oldalláncok vagy kedvezőtlen kontaktusok? Vannak-e alacsony elektronsűrűség korrelációjú régiók a szerkezetben? Ha szükséges, javítsuk a modellt, majd végezzünk egy utolsó finomítási lépést!

#### Teszt

## 16. Animációk, videók forgatókönyve

### 16.1. Videók

1.1.1. videó: <http://www.youtube.com/watch?v=NMaQeec7cpE&feature=youtu.be>

Cím: Diffrakciós kép létrehozása. (40mp, 47MB)

A fény hullámtermészete és diffrakciós kép kialakulása jól szemléltethető egy lézer és egy optikai rács segítségével. Esetünkben a fényforrás egy lézeres mutatópálca a rács pedig egy átlátszó függönydarab. A lézer fényforrás elé helyezve a rácsot diffrakciós képet kapunk.

Helyszín: Debreceni Egyetem Kémiai Intézet Fizikai Kémiai Tanszék

Készítette: Bényei Attila és Szikszai Dorina (Debreceni Egyetem Fizikai Kémiai Tanszék)

Címkék: fény hullámtermészete, diffrakció, optikai rács, röntgendiffrakció.

2.3.2.1. videó <http://www.youtube.com/watch?v=bELkFHTN2IM&feature=youtu.be> vagy [http://index.hu/tudomany/kornyezet/2011/03/10/a\\_pillanatok\\_alatt\\_megfagyo\\_viz\\_titka/](http://index.hu/tudomany/kornyezet/2011/03/10/a_pillanatok_alatt_megfagyo_viz_titka/)

Cím: Túlhűtött víz.

A video készítője, Härtlein Károly engedélyével



A túlhűtött víz rázás hatására hirtelen megfagy. Túlhűtéssel a metastabil zónába juttatható az egy komponensű, egyensúlyban kétfázisú rendszer. Víz esetén a túlhűtés nehezen reprodukálható, szerves anyagok (pl. benzaldehid, acetofenon) hajlamosak túlhűlésre. Härtlein Károly egyéb információt is szolgáltat a honlapon (pl. napi hőmérséklet a kísérlet során).

Helyszín: Härtlein Károly lakása

Készítette: Härtlein Károly (Budapesti Műszaki Egyetem Fizika Intézet)

Címkék: túlhűtés, kristályosítás, időjárás, TÁMOP, röntgendiffrakció.

2.3.2.2. videó: <http://www.youtube.com/watch?v=tYgHZzXWFEA&feature=youtu.be>

Cím: Nátrium-acetát kristályosodása beoltás hatására.

Túltelített oldat általában mechanikai hatásra szilárd anyag kiválása közben stabilizálódik. Nátrium-acetát tömény vizes oldata (800g nátrium-acetát, 100g víz forróan homogén oldat, lehűtve szobahőmérsékletűre) azonban nem kristályosodik még erőteljes rázásra sem. A kristályosodás elindítható egy oltókristály segítségével. A hőmérséklet változása mutatja, hogy a kristály kiválása ebben a rendszerben exoterm folyamat.

Helyszín: Debreceni Egyetem Kémiai Intézet Fizikai Kémiai Tanszék

Készítette: Bényei Attila és Udvardy Antal (Debreceni Egyetem Fizikai Kémiai Tanszék)

Címkék: túltelített oldat, kristályosítás, metastabil rendszer, nukleáció.

2.6.1. videó: <http://www.youtube.com/watch?v=HITifwjs16A&feature=youtu.be>

Cím: Lizozim kristályok kiválása 36 óra alatt.

A lizozim kristályosodását széleskörűen vizsgálták. A video a kristályok kiválását mutatja függő csepp módszerrel

George Sheldrick engedélyével

Helyszín: Göttingeni Egyetem

Forrás: George Sheldrick honlapja <http://shelx.uni-ac.gwdg.de/xtal/xtal.htm#xtalgrowth>

Címkék: túltelített oldat, lizozim, kristályosítás, metastabil rendszer.

4.2.1. videó: [http://www.youtube.com/watch?v=7\\_Vq\\_GhJpFE&feature=youtu.be](http://www.youtube.com/watch?v=7_Vq_GhJpFE&feature=youtu.be)

Cím: Kristály centírozása. (20mp, 250kB)

A kiválasztott egykristályt úgy kell rögzíteni a goniométeren, hogy a kristály bármilyen elforgatása során teljes terjedelmével a röntgensugárban legyen és a kristály tömegközéppontja egybeessen a diffraktométer tengelyeinek metszéspontjában lévő origóval. Ehhez epokitt ragasztóval üveg kapilláris

hegyére (szobahőmérsékletű adatgyűjtés) vagy olajjal (alacsony hőmérsékletű adatgyűjtés) mylarból vagy kevlarból készített hurokra rögzítjük a kristályt. Ezután a kristály tartóját a goniométerbe helyezzük, majd körbefordítva addig mozgatjuk, míg ezek a feltételek a kristály minden orientációjánál teljesülnek.

Helyszín: Texas A and M University

Készítette: Bényei Attila (Debreceni Egyetem Fizikai Kémiai Tanszék)

Címkék: röntgendiffrakció, adatgyűjtés, egykristály, goniométer.

4.2.2. video: <http://www.youtube.com/watch?v=mTJQvFQMvuc&feature=youtu.be>

Cím: Adatgyűjtés térdetektoros készüléken (40mp, 640kB)

Az adatgyűjtést elkezdve CCD detektoros (térdetektoros) készülék esetén először a detektor automatikus kalibrációja történik (dark frame). Ezután történik az első diffrakciós kép készítése: a képernyő monitorán feltűnnek a diffrakciós foltok, amik minden néhány másodperces expozíció után egyre erőteljesebbek. Az első kép expozíciója után a goniométer a következő helyzetbe fordul, és kezdődik a következő frame felvétele. A kép bal oldalán látható a direkt-sugár fogó fekete foltja.

Helyszín: Texas A and M University

Készítette: Bényei Attila (Debreceni Egyetem Fizikai Kémiai Tanszék)

Címkék: röntgendiffrakció, adatgyűjtés, egykristály, goniométer, térdetektor.

4.5.1. videó: <http://www.youtube.com/watch?v=qeG2PZEeAIU&feature=youtu.be>

Cím: Diffrakciós kép és Ewald gömb (40mp, 9,5MB)

A kristály direkt sugárhoz képesti forgatásakor más és más reflexiók kerülnek reflektáló pozícióba (a reciprokrács más és más pontjai metszik az Ewald-gömböt). Az XrayView program segítségével szimulálhatjuk a diffrakciós kép létrejöttét. A magyarázathoz lásd még a 4.2. fejezetet és az XrayView program (<http://phillips-lab.biochem.wisc.edu/software.html>) használatát.

Helyszín: Debreceni Egyetem Kémiai Intézet Fizikai Kémiai Tanszék

Készítette: Bényei Attila (Debreceni Egyetem Fizikai Kémiai Tanszék)

Címkék: fény hullámtermészete, diffrakció, XrayView, Ewald-gömb.

4.5.2. videó: <http://www.youtube.com/watch?v=CTeyL5Sm8ag&feature=youtu.be>

Cím: A reciprok tér animált (torzított) képe: felvételek térdetektoros készülékkel. (3mp, 720kB)

A térdetektoros készülékkel készült felvételekből videó készíthető. A filmkockái a reciprok rács egy-egy kis részletét mutatják: azokat a reciprokrács pontokat, amik éppen áthaladnak az Ewald-gömbön.

James Holton engedélyével

Helyszín: Berkeley Egyetem

Készítette: James Holton (Berkeley Egyetem); forrás: <http://ucxray.berkeley.edu/~jamesh/movies/>

Címkék: reciprok rács, diffrakció, térdetektor.

11.1. videó (<http://youtu.be/mbSy3lpuNNA>)

Cím: Automatizált fehérjekristályosítás (Mosquito kristályosító robot)

A kristályosító robotokkal kis fehérjemennyiség felhasználásával hatékonyan nagyon sok kristályosító körülményt kipróbálhatunk. A videón egy ülőcsepp módszerrel történő kristályosítási kísérlet látható.

Helyszín: Biostruct Laboratórium (Budapesti Műszaki Egyetem-MTA TKI Enzimológiai Intézet)

Készítette: Zagyva Imre és Leveles Ibolya (MTA TKI Enzimológiai Intézet, Genom metabolizmus Laboratórium) és Harmat Veronika (ELTE Kémiai Intézet, Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium, MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport)

Címkék: fehérjekrisztallográfia, kristályosítás, TÁMOP, röntgendiffrakció, Biostruct Laboratory.

12.1. videó (<http://youtu.be/mtTjna6xaBl>)

Cím: Xenon atomok bevitele fehérjekristályba

Nehéz atomok fehérjekristályba való bejuttatásának elegáns módja xenon atomok megkötése a kristályban (fázisprobléma megoldása izomorf helyettesítéssel: MIR, SIR, MIRAS, SIRAS).

Helyszín: EMBL-Hamburg Outstation

Készítette: Harmat Veronika, Kassainé Jáger Edit (ELTE Kémiai Intézet, Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium, MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport), Leveles Ibolya (MTA TKI Enzimológiai Intézet, Genom Metabolizmus Laboratórium) és Baska Ferenc (SOTE KKK, Vichem Chemie)

Címkék: fehérjekrisztallográfia, fázisprobléma, TÁMOP, röntgendiffrakció, izomorf helyettesítés.

## 16.2. Interaktív animációk

[point\\_group.exe](#) (9.28MB)

A program telepítés után a c:/pointgrp/win95/pointgrp.exe 64 bites operációs rendszer alatt is futtatható. A pontcsoportok interaktív tanulására alkalmas program.

Forrás: Emory University

[XRayView.4.1.setup.exe](#) (5MB)

Telepítés után menüvezérelten és nagyon felhasználóbarát módon mutatja meg a diffrakció jelenségét, Ewald-gömb szerkesztését, a reciprok rácsot, szisztematikus hiányokat stb. Lásd a program részletes Help menüjét.

A software készítője, George Philips engedélyével.

5.6.1. [chargeflip-jar \(369 kB\)](http://escher.epfl.ch/flip/) <http://escher.epfl.ch/flip/>

Java applet a charge flipping bemutatására. Készítette [Nicolas Schoeni](#) és [Gervais Chapuis](#) Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland.

Megrajzolhatunk a bal oldali ablakban egy mintázatot, aminek az FFT-re kattintva láthatjuk a Fourier transzformáltját. A Loop opciót használva az algoritmus megtalálja a mintázatot, az algoritmus jellege miatt esetleg eltolódva vagy 180 fokkal elfordítva. Újabb ábra készítéséhez a RESET gombot megnyomva törölhetjük a mintázatot.

8.1.1. Interaktív táblázat

<https://docs.google.com/spreadsheet/ccc?key=0Ao5e1nqD3GGvdDhpaGoybGhfa3RtX1VfUGdTNEtIU2c#gid=0>

A táblázatban módosíthatjuk az elemi cella paramétereit és a hullámhosszat, az ábra mutatja a diffrakciós vonalak helyét. Az intenzitás minden vonalra egységnyi mert nem ismerjük a szerkezetet és a csúcsok szélességét sem vesszük figyelembe. Google táblázat . Készítette: Bényei Attila.

## 16.3. Nem interaktív animációk

5.3.1.videó: [http://www.youtube.com/watch?v=RrJvQ\\_H9fDY&feature=youtu.be](http://www.youtube.com/watch?v=RrJvQ_H9fDY&feature=youtu.be)

Cím: A felbontás hatása (19mp 2.5 MB)

A felbontás romlásával a kezdetben részletes elektronsűrűségi térkép egyre elmosódottabbá válik. Atomi felbontásnál ( $< 1 \text{ \AA}$ ) triptofán gyűrűi és a hidrogének is jól láthatóak,  $6 \text{ \AA}$  felbontásnál csak egy kis kitüremkedést látunk az oldallánc helyén és már a fő lánc iránya sem kivehető.

Helyszín: Biomedical Centre, Uppsala, Sweden

Készítette: Gerard Kleywegt, forrás: <http://xray.bmc.uu.se/embo2001/modval/01.html>

Címkék: felbontás, triptofán, elektronsűrűség.

9.3.1. videó: [http://www.youtube.com/watch?v=4YM5-KI\\_OrA&feature=youtu.be](http://www.youtube.com/watch?v=4YM5-KI_OrA&feature=youtu.be)

Cím: Ruténium komplex (9 mp 1.35MB)

Az ORTEP programmal készült ábrát POVRAY programmal képkockáknként megrajzoljuk és a képeket videó fájlba fűzhetjük. Itt egy ruténium-PTA komplex forog körbe. A MERCURY programmal is készíthető videó.

Helyszín: Röntgendiffrakciós laboratórium (Debreceni Egyetem Kémiai Intézet Fizikai Kémiai Tanszék)  
Készítette: Bényei Attila (Debreceni Egyetem Fizikai Kémiai Tanszék)

Címkék: ORTEP, POVRAY, MERCURY, videó készítés.

9.3.2. videó: <http://www.youtube.com/watch?v=ievGuY0HpnY&feature=youtu.be>

Cím: Az elemi cella körbefordítása (7 mp, 1.2 MB)

A 9.3.1. videón bemutatott fémkomplex több elemi celláját megrajoltuk az ORTEP programmal, és a POVRAY program számára bemeneti fájlt generáltunk. A filmet ezután a POVRAY programmal képkockáknként megrajoltuk (rendereltük) és a képeket videó fájlba fűzhetjük.

Helyszín: Röntgendiffrakciós laboratórium (Debreceni Egyetem Kémiai Intézet Fizikai Kémiai Tanszék)  
Készítette: Bényei Attila (Debreceni Egyetem Fizikai Kémiai Tanszék)

Címkék: ORTEP, POVRAY, elemi cella.

10.3. videó: <http://www.youtube.com/watch?v=ievGuY0HpnY&feature=youtu.be>

Cím: Alanin molekula hidrogénhid hálózata ( 12mp, 1.65MB)

Az alanin hidrogénkötés hálózatát a PLATON programmal vizsgáltuk. A program PLUTON rajzoló része a POVRAY programhoz megfelelő bemeneti fájlt generált. Az elfordítás szögének beállításával automatikusan renderelhető (kívánt minőségben és felbontásban előállítható) minden képkocka és a képekből videó készíthető.

Helyszín: Röntgendiffrakciós laboratórium (Debreceni Egyetem Kémiai Intézet Fizikai Kémiai Tanszék)  
Készítette: Bényei Attila (Debreceni Egyetem Fizikai Kémiai Tanszék)

Címkék: PLATON, PLUTON, POVRAY, videó készítés.

## 17. Szakkifejezések jegyzéke

abszolút konfiguráció	absolute configuration	6.4 (3.1, 4.1, 4.3, 4.5, 5.1, 5.5, 7.1, 12.4, 15.1)
abszorpció	absorption	1.3 (4.3, 7.4, 15.1.4)
abszorpciós él	absorption edge	12.4
adatbank, szekvencia	sequence database	13.1 (14.2, 15)
adatbank, Cambridge-i szerkezeti	Cambridge Structural Database; CSD	10 (3.3, 3.4, 4.3, 7.2, 7.5, 8.1, 9.3, 15)

adatbank, fehérje szerkezeti	Protein Data Bank; PDB	14 (11.1, 12.5, 13.4, 15)
adatbázis, Cambridge-i szerkezeti	Cambridge Structural Database; CSD	10 (3.3, 3.4, 4.3, 7.2, 7.5, 8.1, 9.3, 15)
adatbázis, fehérje szerkezeti	Protein Data Bank; PDB	14 (11.1, 12.5, 13.4, 15)
adatbázis; adatbank	database; data bank	10, 14 (3.3, 3.4, 4.3, 7.2, 7.5, 8.1, 9.3, 11.1, 11.4, 12.5, 13.1, 13.3.1, 13.4)
adatfeldolgozás	data processing	15,1,3, 15.2.2 (4.3)
adatkészlet	data set	4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 7.4,12.3, 12.4 (6.1, 10.2,13.3, 14.1, 14.2)
adatredukció	data reduction	15,1,3, 15.2.2 (4.3)
alternatív atomi pozíciók	alternate atomic positions	6.3.3, 13.3.1 (1.7, 7.1, 14.1, 14.2)
anomális diszperzió	anomalous dispersion	6.4.4, 12.4 (12.3)
anomális diszperzió, hullámhosszon mért	egy single anomalous dispersion; SAD	12.4 (12.3.1)
anomális diszperzió, hullámhosszon mért	több multiple anomalous dispersion; MAD	12.4 (12.3.1)
aszimmetrikus egység	asymmetric unit; ASU	2.1.2, 3.2, 3.8 (3.7)
atom, szimmetria ekvivalens	symmetry equivalent atom	3.1, 3.7, 3.8
atomi mozgástényező	atomic displacement parameter; ADP	6.1 (6.3, 12.3.1)
atomi szórástényező	atomic scattering factor	5.1, 6.4.4, 8.3, 12.4 (5.5, 5.6)
beeső röntgen sugár	incident X-ray beam	4.3, 5.1 (8.1)
betöltöttség	occupancy; site occupation factor	6.3.3, 1.7, 2.1.2 (7.1, 12.3, 14.2)
B-faktor	B-factor	1, 13.3.2, 14
Bragg-egyenlet	Bragg's equation	3.6 (5.1, 8.1)
Bragg-szög	Bragg angle	3.6
Bragg-törvény	Bragg's law	3.6 (5.1, 8.1)
Bravais-rács	Bravais Lattice	3.4
célfüggvény	target function	6.1, 12.5, 13.3.2
célfüggvény, legkisebb négyzetes	least squares target function	6.1
célfüggvény, maximum valószínűségi	maximum likelihood target function (ML)	13.3.2
cellaparaméterek	cell parameters	2.1.1
centroszimmetrikus	centrosymmetric	5.5 (4.3, 12.2, 12.3.1)
centrum	szimmetria; inversion centre	3.1, 3.8
centrum, inverziós		
charge flipping algoritmus	charge flipping algorithm	5.7
csavartengely	screw axis	3.1, 3.8
csúszósík	glide plane	3.1, 3.8
detektor	detector	4.4, 4.5 (3.1, 4.2, 4.3, 6.3.1, 15.2.2)
diasztereomer só	diastereomeric salt	6.4.4
diffrakciós kép; diffrakciós mintázat	diffraction pattern	3.6, 4.3, 4.4, 4.5, 5.1, 5.5
direkt módszerek	direct methods	5.6, (9.1, 9.3, 12.1, 12.3)
direkt tér	direct space	3.6
direktsugár-fogó	beam stop; beam catch	4.4
egykristály	single crystal	2.1.1, 2.6
egykristály diffrakció	single crystal diffraction	1.7, 1.8, 3.6, 4.1,
elektronsűrűség	electron density	1.7, 5.1

elektronsűrűség térkép, különbségi	difference electron density map; difference Fourier map	12.3.2
elektronsűrűségi térkép	electron density map	5.1, 5.7, 12.3.3, 13.3,15.1.4
elektronsűrűségi térkép, differencia	difference electron density map; difference Fourier map	12.3.2
elemi cella	unit cell	2.1.1
elemi cella meghatározás; indexelés	indexing	4.3, 8.1, 15.2.2
elemi cella, bázislapon centrált	base-centered unit cell	3.4
elemi cella, egyszerű (primitív)	primitive unit cell	3.4
elemi cella, minden lapon centrált	face-centered unit cell	3.4
elemi cella, tércentrált	body-centered unit cell	3.4
elmozdulási tényező (ld. atomi mozgástényező)	displacement parameter	6.1 (6.3, 12.3.1)
eloszlás, Wilson	Wilson distribution	13.3.2
Ewald-gömb	Ewald sphere	3.6, 4.4
fájlformátum, CIF	CIF file format	7.2, 7.3, 7.5,10.2, 14.2, 15.1
fájlformátum, PDB	PDB file format	14.2
fázisdiagram	phase diagram	2.3, 2.4, 11.3
fázisok	phases	5.1 (5, 12)
fázisösszefüggések, valószínűségi	probability phase relationships	5.6
fázisprobléma	phase problem	5, 12
fázisprobléma megoldása	solving the phase problem; phasing	5, 12
felbontás	resolution	5.3, 7.4, 13.3.1, 14.1
felvétel, Laue	Laue image	3.6, 4.4, 5.1
felvétel, oszcillációs	oscillation image	4.4, 4.5, 15.2.2
finomítás	refinement	6.1, 13.3.2, 12.3, 12.5
finomítás F <sup>2</sup> -re (intenzitásra)	refinement against F <sup>2</sup>	6.2
finomítás, konjugált gradiens	conjugated gradient refinement	13.3.2
finomítás, laza kötöttségű	restrained refinement	6.2, 13.3.2
finomítás, legkisebb négyzetes	least squares refinement	6.1
finomítás, maximum valószínűségi	maximum likelihood refinement	13.3.2
finomítás, merev kötöttségű	constrained refinement	6.2, 13.3.2
Flack paraméter; abszolút szerkezeti paraméter	Flack parameter	6.1, 6.4.4
forgóanód	rotating anode	4.4
Fourier fodrok	Fourier ripples	5.2, 5.3, 13.3.1, 14.1
Fourier transzformáció	Fourier transformation	5.1, 5.2, 5.3
Fourier transzformált	Fourier transform	5.1, 5.2, 5.3
Friedel-pár	Friedel opposites; Friedel pair	5.5, 6.4.4, 12.4 (4.5)
Friedel-törvény	Friedel's law	5.5
függvény, elektronsűrűségi	electron density function	5.1, 5.7, 12.3.3, 13.3,15.1.4
függvény, Patterson	Patterson function	12.2, 5.4
függvény, rotációs	rotation function	12.5
függvény, translációs	translation function	12.5
gócképződés	nucleation	2.4
gócnövekedés	crystal growth; growth of nuclei	2.4, 2.5, 11
goniométer	goniometer	4.2, 4.4
görbe, Wilson	Wilson plot	12.3
gyémánt csúszósík	diamond glide plane	3.1
Harker szekció; Harker metszet	Harker section	12.3

határgömb	limiting sphere	3.6
hexagonális	hexagonal	3.4
hiba, záródási	lack of closure	12.3.1
hidrogén-kötés	hydrogen bond	3.7, 6.3.3, 6.4.1, 13.1, 13.3.1, 13.4
hisztogram illesztés	histogram matching	12.3.3
hőmozgás (elmozdulási ellipszoid)	ellipszoid thermal ellipsoid	9.3
ikerkristály	twinned crystal	6.3.1, 6.4.3, (4.2, 4.3, 11.5, 11.6, 14.1)
ikresedés	twinning	6.3.1, 6.4.3
illeszkedés	packing	3.7, 12.5, 14.3
indexek, Laue	Laue indices	3.6, 5.1
indexek, Miller	Miller-indices	3.5
integrálás	integrating	4.3
izomorf helyettesítés, egyszeres	single isomorphous replacement; SIR	12.3
izomorf helyettesítés, egyszeres, anomális szórással	single isomorphous replacement with anomalous scattering; SIRAS	12.3, 12.4
izomorf helyettesítés, többszörös	multiple isomorphous replacement; MIR	12.3
izomorf helyettesítés, többszörös, anomális szórással	multiple isomorphous replacement with anomalous scattering; MIRAS	12.3, 12.4
izostrukturális	isostructural	12.3
jósági tényező	R-factor	6.1, 6.2, 7.4
jósági tényező, súlyozott; súlyozott R	weighted R	6.1, 6.2, 7.4, 13.3.2, 14.1
K(alfa1-alfa2) felhasadás	K(alpha1-alpha2) splitting	4.4
kétfogású tengely	two-fold axis	3.1, 3.8
kioltási szabály	absence conditions	4.3, 5.5
kioltások	extinctions	4.3, 5.5
kioltások, szisztematikus	systematic absences	4.3, 5.5
konvolúció	convolution	5.1, 5.2, 3.2
koordináta, frakcionális; koordináta, relatív	fractional coordinate	3.1, 3.8, 5.1, 7.3
korrekció, abszorpciós	absorption correction	4.3 (7.4, 15.1.4)
korrekció, empirikus abszorpciós	empirical absorption correction	15.1.4
korrekció; Lorentz-polarizációs	Lorentz-polarization correction	4.3
köbös	cubic	3.4
kölcsönhatások, másodlagos	secondary interactions	1.7, 2.1, 3.7, 3.8, 7.4, 10.2, 14.1
körülmény, krio-	cryo condition	11.6
körülmény, kristályosítási	crystallization condition	2.4, 11, 15.2.1
kristályosztály	crystal class	3.4
kristályrács	crystal lattice	2.1
kristályrendszer	crystal system	3.4 (3.5, 3.7, 4.3, 4.5, 11.5)
kristályszimmetria	crystal symmetry	3.1, 3.7, 3.8
laponcentrált	face centered	3.4
Laue-feltételek	Laue conditions	5.1
meroéderes	merohedral	6.3.1, 6.4 (15.2.2)
modell	model	7.4, 13.3.1, 14.1
modell, golyós-pálcikás	ball and spoke model; ball and stick model	9.3, 14.3



modell, szabad atom	free atom model	13.3.1
modell, szalag-	ribbon representation; cartoon representation of the molecule	14.3
modellépítés	model building	7.4, 13.3.1
modellépítés, automatizált	automated model building	13.3.1
módszer, dialízis	dialysis method	11.3
módszer, függő csepp	hanging drop method	11.3
módszer, gőzdiffúziós	vapor diffusion method	11.3
módszer, kristályosító	crystallization method	2.3, 2.4.4, 2.6, 11
módszer, legkisebb négyzetes	least squares method	6.1
módszer, ülő csepp	sitting drop method	11.3
módszer, szabad határfelületi diffúziós	free interface diffusion method	11.3
módszerek, Patterson	Patterson methods	5.4 (12.2)
molekuladinamika	molecule dynamics; MD	13.3.2
molekuláris boríték	molecular envelope	12.3.3, 13.2
molekuláris helyettesítés	molecular replacement; MR	12.5
monoklin	monoclinic	3.4
monokromátor	monochromator	4.4
mozaicitás	mosaicity	3.6
négykörös diffraktométer	four circle diffractometer	4.4
nehézatomos módszer	heavy-atom method	5.4 (12.2)
nem-centroszimmetrikus; acentrikus	non-centrosymmetric; acentric	12.3, 12.4
neutrodiffrakció	neutron diffraction	8.3
oldat, telítetlen	unsaturated solution	2.4.3, 11.3, 11.4, 11.5
oldat, telített	saturated solution	2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6.3, 11.3, 11.5
oldat, túltelített	supersaturated solution	2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 11.3, 11.5
oldhatóság	solubility	2.4.4, 2.6.4
oldószersimítás	solvent flattening	12.3.3
Patterson-vektor	Patterson vector	12.2, 12.5
polimorfia	polimorphism	8.2
pontcsoport	point group	3.1, 3.3, 3.8, 4.3
pontdetektor	point detector	4.4, 4.5 (4.2, 4.3)
pordiffrakció	powder diffraction	8.1 (8.2)
rács	lattice	2.1, 3
rács, centrált	centred lattice	3.4
rács, primitív	primitive cell	3.4
rács, reciprok	reciprocal lattice	3.6, 5.1 (4.1, 4.3, 5.2, 6.3.1)
reciprok cella	reciprocal cell	3.6
reciprok tér	reciprocal space	3.6, 5.1 (4.3, 4.5, 6.3)
reflexió	reflection	3.6
reflexió amplitúdó	reflection amplitude	5.1
reflexió fázisa	phase of reflection	5.1
reflexió intenzitás	reflection intensity	5.1, 3.6, 4.3, 4.4, 4.5, 8.1
reflexió, szimmetria ekvivalens	symmetry equivalent reflection	5.5 (12.3.1)
reflexió feltétel	reflection condition	5.5
rendezetlenség	disorder	6.3, 6.4
R-faktor; kristallográfiai jósági tényező	R factor	6.1, 6.2, 7.4, 13.3.2, 14.1
robot, kristályosító	crystallization robot	11.1

robot, mintacserélő	sample changer robot	4.4
romboédes	rhombohedral	3.4
rombos	orthorhombic	3.4
röntgensugár	X-ray beam	4.4
síksereg	crystal lattice planes, a set of parallel	3.5, 3.6, 5.1
skálafaktor, általános	overall scale factor	12.3.1 (6.1, 6.2)
skálázás, Wilson	Wilson scaling	12.3.1
sorcsonkítási hiba	series termination error	5.2
startreflexió	start reflection	5.6
sugár(zás); fehér	white beam	4.4
sugárforrás	X-ray source	4.4
sugárforrás, forgóanódos	rotating anode X-ray source	4.4
sugárforrás, szinkrotron	synchrotron source	4.4 (4.1, 4.2, 4.6, 6.4.4, 8.1, 11.1, 12.4)
sugárforrás, zárt	sealed X-ray source/tube	4.4
sugárzás, röntgen	X-ray radiation	1
sűrűségmódosítás	density modification; DM	12.3.3
szekvencia, aminosav	amino acid sequence	13.1 (12.5, 13.3.1, 14)
szerkesztés, Harker	Harker construction	12.3.1, 12.4
szerkezet megjelenítés	visualization of the structure	9.3, 14.3
szerkezet, harmadlagos	tertiary structure	13.1
szerkezet, másodlagos	secondary structure	13.1
szerkezet, negyedleges	quaternary structure	13.1
szerkezeti invariáns	structure invariant	5.6
szerkezeti szemiinvariáns	structure semiinvariant	5.5
szerkezeti tényező	structure factor	5.1
szerkezeti tényező abszolút érték	absolute value of structure factor	5.1
szerkezeti tényező amplitudó	structure factor amplitude	5.1
szerkezeti tényező fázis	phase of structure factor	5.1
szimmetria, nem-krisztallográfiai	non-crystallographic symmetry; NCS	3.8, 12.1, 12.3.3, 13.3.6
szimulált hőkezelés	simulated annealing	13.3.2
szórás, anomális	anomalous scattering	6.4.4, 12.4 (4.3, 4.4, 5.1, 5.5, 9.4, 12.3)
szórási vektor	scattering vector	5.1
szóródás, rugalmas, szabad elektronokról	elastic scattering of X-rays from free electrons (Thompson scattering)	1.1, 1.2, 5.1, 5.5
szoros illeszkedés	close packing	3.3, 3.7
tényező, hitelességi	figure of merit	12.3.1, 12.3.2
tércentrált	body centered	3.4
tércsoport	space group	3.3, 3.8
térdetektor	area detector	4.4, 4.5 (3.1, 4.2, 4.3, 6.3.1, 15.2.2)
tetragonális	tetragonal	3.4
torziós szög dinamika	torsion angle dynamics	13.3.2
trigonális	trigonal	3.4
triklin	triclinic	3.4
validálás	validation	7.4, 14.1, 15.1.5, 15.2.5
vektorháromszög	vector triangle	12.3, 12.4
Wilson-görbe; Wilson diagram	Wilson plot	12.3