

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE
FAKULTA JADERNÁ A FYZIKÁLNĚ INŽENÝRSKÁ
KATEDRA INŽENÝRSTVÍ PEVNÝCH LÁTEK

**Difrakční studie modifikace kovového
klastru S1 nukleasy**
**X-ray structure analysis of S1 nuclease after
modification by chelating agents**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vypracoval: Jakub Hrubý
Vedoucí práce: doc. Ing. Petr Kolenko, Ph.D.
Konzultant: Ing. Jan Dohnálek, Ph.D.
Rok: 2021



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE
FAKULTA JADERNÁ A FYZIKÁLNĚ INŽENÝRSKÁ
Katedra inženýrství pevných látek

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Student: **Jakub Hrubý**

Studijní program: **Aplikace přírodních věd**

Obor: **Inženýrství pevných látek**

Akademický rok: **2020/2021**

Název práce: **Difrakční studie modifikace kovového klastru S1 nukleasy**
(česky)

Název práce: **X-ray structure analysis of S1 nuclease after modification by chelating agents**
(anglicky)

Pokyny pro vypracování:

Bakalářská práce je zaměřena na studium strukturních změn způsobených chelatací přirozeně obsažených iontů uvnitř S1 nukleasy metodami monokrystalové rentgenové difrakce. Budou provedeny krystalizační experimenty za přítomnosti chelatačního činidla, například EDTA. Získané krystaly budou užity pro účely strukturní analýzy. Získaná strukturní data budou zpracována a vyhodnocena pomocí moderních výpočetních metod. Experimenty budou realizovány na zařízení Bruker D8 Venture v Centru molekulární struktury Biotechnologického ústavu AV ČR, v.v.i.

Při řešení postupujte podle následujících bodů.

I. Rešeršní/teoretická část

- 1) Difrakce na monokrystalu.
- 2) Experimentální přístroje a jejich popis.
- 3) Nukleasy.

II. Experimentální část

- 1) Krystalizace S1 nukleasy.
- 2) Difrakční experiment.
- 3) Vyhodnocení difrakčních dat.
- 4) Výsledky a jejich diskuze

Doporučená literatura:

- [1] B. Rupp: Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology, Garland Science, New York 2010.
- [2] J. Marek, Z. Trávníček: Monokrystalová rentgenová strukturní analýza, Univerzita Palackého v Olomouci (UPOL) 2002.
- [3] T. Kovař, et al.: PLoS ONE **11** (2016) e0168832.
- [4] M. Malý: Strukturní analýza komplexů oxidázy s ligandem, Diplomová práce, KIPL FJFI ČVUT v Praze, 2018.

Jméno a pracoviště vedoucího práce:

doc. Ing. Petr Kolenko, PhD., Katedra inženýrství pevných látek, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, ČVUT v Praze.

Jméno a pracoviště konzultanta:

Ing. Jan Dohnálek, PhD., Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i.

Datum zadání bakalářské práce: 5. 10. 2020

Termín odevzdání bakalářské práce: 7. 7. 2021

Doba platnosti zadání je dva roky od data zadání.

.....
garant

.....
vedoucí katedry



.....
děkan

V Praze dne 5. 10. 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci vypracoval zcela samostatně a použil jsem pouze podklady (literaturu, obrázky, software) uvedené v příloženém seznamu.

V Praze dne

.....

Jakub Hrubý

Poděkování

Děkuji svému školiteli doc. Ing. Petru Kolenkovi, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce, cenné rady a vždy pozitivní přístup. Dále děkuji také Ing. Janu Dohnálkovi, Ph.D. za všechny podnětné připomínky a celému týmu Laboratoře struktury a funkce biomolekul BTÚ AV ČR za vynikající pracovní prostředí.

Jakub Hrubý

Název práce:

Difrakční studie modifikace kovového klastru S1 nukleasy

Autor: Jakub Hrubý

Obor: Inženýrství pevných látek

Druh práce: Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. Ing. Petr Kolenko, Ph.D.
České vysoké učení technické v Praze
Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská
Katedra inženýrství pevných látek

Konzultant: Ing. Jan Dohnálek, Ph.D.
Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i., Biocev, Vestec

Abstrakt: Nukleasa S1 je metaloenzym široce používaný v biotechnologickém průmyslu. Byly vypěstovány krystaly této nukleasy za přítomnosti chelačního činidla EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), se kterými byly následně provedeny difrakční experimenty. Vyhodnocení získaných difrakčních dat naznačuje, že došlo k částečné chelaci kovových iontů přirozeně přítomných ve struktuře nukleasy. Navíc analýza anomální mapy elektronové hustoty získaná z krystalu chelovaného proteinu s dodatečným přidáním nadbytku niklu ukazuje, že na místa iontů zinku je pravděpodobně možné navázat ionty niklu, a to zejména na pozici nejbližší povrchu proteinu.

Klíčová slova: nukleasa, proteinová krystalografie, krystalizace, rentgenová strukturní analýza, zpracování difrakčních dat, chelace kovu

Title:

X-ray structure analysis of S1 nuclease after modification by chelating agents

Author: Jakub Hrubý

Abstract: S1 nuclease is a metaloenzyme commonly used in biotechnological applications. Crystals of this nuclease affected by chelating agent EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) were grown and X-ray diffraction experiments were subsequently performed. Diffraction data analysis shows that zinc ions, natively present in the S1 structure, were partially chelated and removed from the binding sites. In addition, results from the anomalous difference map obtained from chelated protein with added excess of nickel suggest that it is highly likely that nickel ions may bind in the positions of the original zinc ions. This phenomenon is most noticeable at the position closest to the surface of the nuclease.

Key words: nuclease, protein crystallography, crystallization, X-ray structure analysis, diffraction data processing, metal chelation

Obsah

Úvod	10
1 Teoretická část	12
1.1 Krystalizace proteinů	12
1.1.1 Průběh krystalizace	12
1.1.2 Faktory ovlivňující krystalizaci	14
1.1.3 Metody krystalizace	15
1.2 Makromolekulární krystalografie	16
1.2.1 Základní pojmy krystalografie	16
1.2.2 Difrakce	18
1.2.3 Zdroje rentgenového záření	22
1.2.4 Detektory	23
1.2.5 Metody měření	24
1.2.6 Hodnocení kvality difrakčních dat	24
1.2.7 Molekulární nahrazení	25
1.2.8 Shoda modelu s experimentem	26
1.3 S1 nukleasa	26
1.3.1 Úvod o nukleasách	26
1.3.2 S1-P1 nukleasy	27
1.3.3 S1 nukleasa z <i>Aspergillus oryzae</i>	27
2 Cíle	30
3 Výsledky	31
3.1 Krystalizace	31
3.1.1 Teplotní stabilita	31

3.1.2	Krystalizační pokusy	32
3.2	Difrakční experimenty a zpracování dat	33
3.2.1	Parametry experimentu	33
3.2.2	Zpracování dat	33
3.3	Analýza výskytu kovů	34
4	Diskuze	41
	Závěr	44
	Literatura	45
	Přílohy	47

Úvod

V roce 1840 pozoroval F. L. Hünefeld vůbec první krystal proteinu - hemoglobinu. Ačkoli šlo původně o šťastnou náhodu, přinesla tato událost nezvratný důkaz o tom, že i biologické makromolekuly, tedy například proteiny a nukleové kyseliny, jsou schopny krystalizace v podobném duchu jako soli a jiné anorganické látky. Už v následující dekádě poskytl jiný německý vědec O. Funke popis procesu produkce krystalů lidského hemoglobinu. Pokroky v dalších letech pak přinesly významné objevy v krystalizaci enzymů, nukleových kyselin i virů.

Makromolekulární krystalografie se od 50. let 20. století stala významnou vědní disciplínou na pomezí fyziky, chemie a biologie, významně přispívající nejen k základnímu biotechnologickému výzkumu, ale také například k vývoji léčiv proti nej-různějším nemocem. Mimo měření samotné difrakce na monokrystalu se zabývá též jak přípravou podmínek pro růst krystalů (hledání vhodných metod, fyzikálních parametrů a složení matečných roztoků), tak i zpracováním a vyhodnocením dat a následným sestavením strukturního modelu. Pro určení struktury krystalů biologických látek se nejčastěji využívá rentgenové difrakce (viz 1.2.2), aplikované poprvé otcem a synem Braggovými v roce 1912¹. V roce 1934 byl pomocí této metody získán vůbec první difrakční obraz proteinového krystalu - pepsinu. Studium rozptýleného záření, které vzniká při interakci vzorku s dopadajícím (primárním) rentgenovým zářením, lze v nejlepší podobě určit absolutní strukturu, tedy nejen typ krystalové mřížky, ale i polohy atomů spolu s délkami a úhly vazeb mezi nimi. V poslední době probíhá dramatický rozvoj dalších metod určování struktur, jako je například kryo-elektronová mikroskopie, nukleární magnetická rezonance, ve výpočetní oblasti začíná nacházet uplatnění umělá inteligence.

V přírodě existuje skupina makromolekul - proteinů - schopných katalyzovat chemické reakce. Enzymy, jak tyto molekuly nazýváme, se právě díky schopnosti umožnit energeticky méně náročný průběh reakcí staly nepostradatelnou součástí všech živých organismů. Ve skupině enzymů navíc existují takové, které vážou do svého aktivního místa iont (nebo ionty) kovu, a proto se nazývají metaloenzymy. Mezi metaloproteiny obecně patří například enolasa (obsahující dva ionty Mg^{2+} v aktivním místě), hemoprotein (např. již zmíněný hemoglobin s iontem železa) nebo právě nukleasa S1 se třemi ionty zinku.

¹Za úspěšné určení struktury anorganických látek byli v r. 1915 vyznamenáni Nobelovou cenou za fyziku.

Tato práce se zabývá studiem strukturních změn kovového klastru nukleasy S1 z *Aspergillus oryzae*, které jsou způsobeny chelací zinečnatých iontů kyselinou ethylen-diamintetraoctovou, neboli EDTA. Strukturní analýza proběhla za využití základních metod proteinové krystalografie. Postupně byla provedena krystalizace proteinu za přítomnosti chelačního činidla, difrakční experiment na zdroji rentgenového záření a následně zpracování a vyhodnocení naměřených dat moderním softwarem. Případné změny ve struktuře kovového klastru a metody jejich dosažení mohou být použity v následném biotechnologickém výzkumu.

Kapitola 1

Teoretická část

1.1 Krystalizace proteinů

Krystaly biologických molekul mají, obecně vzato, naprosto rozdílné vlastnosti od svých anorganických protějšků. Krystaly malých molekul jsou vysoce uspořádané, tvrdé, odolné vůči manipulaci (tzn. i vůči vystavení vzduchu), disponují dobrými optickými i difrakčními vlastnostmi a prakticky nejsou omezeny v rozměrech, které mohou dosahovat až několika metrů. Naproti tomu krystaly biomolekul narůstají nejvýše pár milimetrů (navíc zřídka přesáhnou velikost 1 mm), jsou křehké, náchylné k poškození při manipulaci a citlivé na jakékoli změny podmínek (pH, teplota, dehydratace, radiační poškození). To je dáno zejména vysokým obsahem rozpouštědla v krystalu, což krystal samotný a jeho vlastnosti omezuje. Nezřídka je potřeba k získání kvalitních dat měření z několika krystalů, avšak díky pokroku v technologiích (kvalitní detektory, záření s vysokou intenzitou aj.) se postupně daří tyto problémy překonávat. [1, 2]

1.1.1 Průběh krystalizace

Proces krystalizace dělíme do dvou základních kroků: nukleace a růst krystalu. V některé literatuře se lze setkat i se třetím krokem; ukončení růstu.

Proces **nukleace** je charakteristický vznikem krystalizačních jader - nukleí. Dochází ke kontaktu molekul a tvorbě vazeb mezi nimi, díky čemuž látka přechází ze stavu s chaotickým uspořádáním do stavu lokálně uspořádaného. Takto vytvořené agregáty se za vhodných podmínek stabilizují a vytvoří jádro. Jelikož se jedná o úplný počátek krystalizace, je tento proces problematický, velice špatně předvídatelný, a tudíž dosud špatně zdokumentovaný.

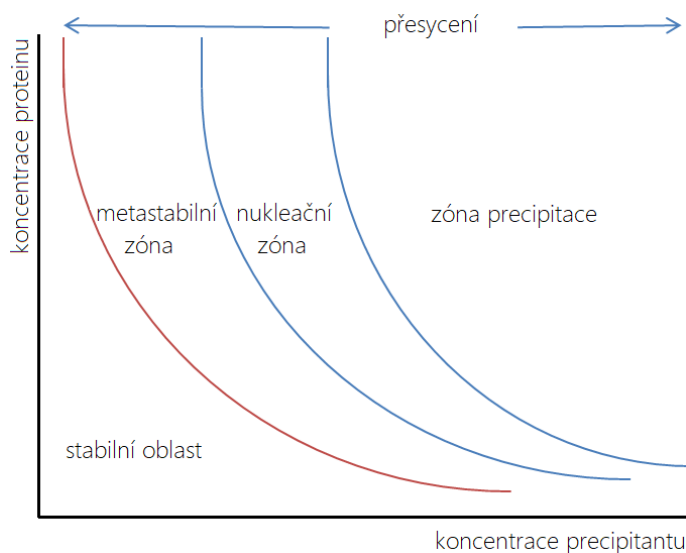
Po nukleaci přichází na řadu **růst**. Jde o dynamický proces, při kterém dochází ke kontaktu mezi jádry a molekulami proteinu v roztoku. Jsou-li molekuly vhodně orientované, uspořádají se na povrchu nukleí a krystal tak roste. Velmi záleží na rychlosti růstu - je-li příliš vysoká, v krystalu může docházet k tvorbě defektů (dislokací) nebo se tvoří mnoho malých jader, která jsou pro další experimenty nepoužitelná.

Růst je ukončen v momentě dosažení rovnováhy mezi krystalem a roztokem. Celý proces je více předvídatelný než nukleace, je tedy i lépe prozkoumán.

Pro oba kroky krystalizace je extrémně důležité tzv. přesycení (supersaturace); fáze, kdy je v rozpouštědle obsaženo více látky, než při rovnovážném stavu (jde tedy o stav nerovnovážný). Tohoto stavu lze dosáhnout vícero způsoby - zvýšením koncentrace proteinu, změnou pH či teploty nebo přidávkem precipitantu. Při přechodu k rovnováze dochází k vyloučení proteinu, což za vhodných podmínek vede právě ke vzniku nukleí a iniciaci krystalizace.

Níže okomentujeme několik možných situací, které mohou při přesycení nastat (Obr. 1.1).

1. Stabilní oblast. Přesycení je zde příliš nízké a krystalizace vůbec neprobíhá, nebo se zastavuje.
2. Metastabilní zóna. V této oblasti, při nižším přesycení, nedochází ke spontánní tvorbě nukleí, avšak roztok silně podporuje růst. Krystalizace sama od sebe neprobíhá, avšak jsou-li přítomna jádra, krystal roste.
3. Nukleační zóna. Je charakteristická vyšším stupněm přesycení než metastabilní oblast. Dochází zde zejména k nukleaci, avšak růst krystalů je také v omezené míře možný. Někdy se tato oblast nazývá též labilní.
4. Zóna precipitace. Při vysokém přesycení dochází ke srážení (precipitaci) proteinu. Nedochází zde k nukleaci, nebo jen velmi omezeně (s rostoucím přesycením klesá počet vzniklých jader, nakonec dochází pouze k precipitaci).



Obrázek 1.1: Stavový diagram proteinové krystalizace.

Ideální situace je následující: proces začíná přechodem koncentrace proteinu do zóny nukleace a po vytvoření několika málo jader koncentrace klesne do metastabilní zóny, kde dojde k růstu krystalů na vzniklých jádrech. Takto vznikne relativně malý počet krystalů větších rozměrů, které často mívají kvalitnější parametry pro rentgenovou difrakci. [1, 2]

1.1.2 Faktory ovlivňující krystalizaci

Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují celý průběh krystalizace - od pravděpodobnosti výskytu nukleí přes tempo růstu až po finální tvar a kvalitu krystalů. Mnoho z nich je na sobě vzájemně závislých, vztahy mezi jednotlivými faktory jsou velice často netriviální, a tedy těžko odhadnutelné bez předchozích zkušeností. Navíc je každý protein jedinečný, tudíž neexistuje jediná konkrétní „jistá“ podmínka krystalizace. Faktory, které jsou pro krystalizaci obecně zcela zásadní, shrnuje tato kapitola.

Jedním z nejdůležitějších parametrů je **čistota a homogenita** proteinu. Jsou to totiž právě nečistoty, které velmi často komplikují uspořádání proteinu a degradují tak výsledný krystal (nebo jeho vzniku zcela zabrání). Proto na počátku experimentu prochází proteiny purifikací (čištěním), při které se odstraňují například jiné proteiny, nukleové kyseliny, neznámé ligandy aj.

Koncentrace proteinu je důležitý faktor pro dosažení přesycení (to je totiž lineární funkcí koncentrace), nukleaci a následný růst krystalu. Na volbě startovní koncentrace závisí například velikost výsledných krystalů, která pak ovlivňuje kvalitu difrakčního experimentu. Dodejme ještě, že různé krystalizační metody vyžadují různé koncentrace proteinu.

Protože **změny pH** ovlivňují náboj na povrchu molekul proteinu, mají za následek také změny ve způsobu interakce jednotlivých molekul. Právě hodnoty pH jsou častou proměnnou při tzv. screeningu, kde hledáme vhodnou krystalizační podmínku. Aby pH zůstalo konstantní, využívá se speciálních roztoků - pufrů. Většina proteinů preferuje přibližně neutrální pH (tzn. v rozmezí 6 - 8).

Pro docílení stavu přesycení používáme **precipitanty** (srážedla). Ty dělíme rámcově do čtyř skupin: soli (NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), dlouhořetězcové polymery (polyethylen glykoly; PEG 1000, PEG 3350), polymery s krátkým řetězcem (PEG 400, ethylen glykol) a organická rozpouštědla (ethanol, 2-methyl-2,4-pentandiol; MPD). Stále není přesně objasněn mechanismus účinku precipitantu při krystalizaci. Víme, že organické precipitanty snižují dielektrickou konstantu roztoku, čímž zvyšují přitažlivé síly mezi molekulami proteinu, specifické interakce polymerů mění povrchové vlastnosti proteinů a že soli rozrušují vrstvy vody kolem proteinu (dehydratací se dosáhne snížené rozpustnosti).

Teplota je určující parametr pro rozpustnost, stabilitu proteinů a pro dynamiku procesů ve stavu přesycení. Kvůli termolabilitě proteinů a slabým vazbám uvnitř krystalu probíhá krystalizace především v teplotách mezi 0 °C a 30 °C, mimo tento interval jen výjimečně. Teplota by měla být udržována konstantní, není-li teplotní gradient přímo vyžadován pro regulaci krystalizace.

Mezi další faktory pak jistě patří také čas (čím déle probíhá proces v metastabilní zóně, tím kvalitnější krystaly obvykle vznikají), aditiva (přidávají se např. pro zvýšení stability, patří mezi ně soli, inhibitory, chelační činidla, sacharidy aj.), umělé modifikace povrchu proteinu či přítomnost ligandu (ta může krystalizaci znemožnit nebo naopak být její nutnou podmínkou). [1, 2]

1.1.3 Metody krystalizace

Výběr vhodné krystalizační metody je stejně důležitý jako určení správné podmínky. A stejně jako samotná podmínka, i volba metody se odvíjí od konkrétního proteinu. Proto existuje mnoho různých metod, které pracují s různými fyzikálními principy a různými objemy proteinu a mateřského roztoku. V této části zmíníme ty nejrozšířenější a nejznámější - metodu difuze par, dialýzu a krystalizaci pod olejem.

Metoda difuze par je jednoznačně nejrozšířenější metodou. Základními znaky jsou mikropapka a zásobník s mateřským roztokem. Mikropapka obsahuje směs roztoku proteinu a mateřského roztoku ze zásobníku (často v nestejném poměru), přičemž její celkový objem nepřesahuje jednotky mikrolitrů. Naproti tomu zásobník s mateřským roztokem má mnohonásobně vyšší objem (desítky až stovky mikrolitrů) a spolu s mikropapkou tvoří uzavřený systém. Jak už název napovídá, dochází v tomto systému k difuzi par vody či jiné těkavé látky mezi kapkou a zásobníkem, čímž se postupně zvyšuje koncentrace proteinu až do stavu přesycení (objem mikropapky přitom klesá), kdy může dojít ke krystalizaci. Využívá se třech konfigurací, přičemž všechny se zakládají na kontaktu mikropapky s povrchem:

1. Visící kapka (hanging drop) - kapka visí na vnitřní straně sklíčka nad zásobníkem s mateřským roztokem.
2. Sedící kapka (sitting drop) - kapka je umístěna na můstku nebo stupínku uvnitř zásobníku.
3. Kombinace obou předchozích (sandwich drop) - kapka je v kontaktu s povrchem nahoře i dole

Celý systém je chráněn před dehydratací uzavřením - v případě visící kapky se využívá vakuového tuku, u sedící kapky nejčastěji lepicí pásky. Konfigurace visící a sedící kapky jsou přehledně znázorněny na Obr. 1.2.



Obrázek 1.2: Konfigurace pro metodu difuze par. Vlevo: visící kapka na sklíčku nad rezervoárem. Vpravo: sedící kapka na můstku nad hladinou rezervoáru. Kapka vznikla smísením proteinu a mateřského roztoku z rezervoáru (tmavě modře). [3]

Díky malému objemu mikropapky a tím i nízké spotřebě proteinu se tato metoda hojně využívá i pro hledání různých krystalizačních podmínek (tzv. screening). Další výhodou je snadné skladování a přehlednost (lze je jednoduše prohlížet pod mikroskopem).

Dialýza pracuje na principu oddělení roztoků proteinu a precipitantu propustnou membránou, která dovoluje pouze difuzi malých molekul (např. pufrů, rozpouště-

del) z roztoku precipitantu do roztoku proteinu. Proud částic vytváří potřebný koncentrační gradient, dochází k přesycení a krystalizaci. Výhodou metody je pomalé dosažení rovnovážného stavu a snadná kontrola rychlosti. Na podobném principu funguje také méně často využívaná metoda volné difuze (free-interface diffusion), při které se koncentrační gradient vytváří na rozhraní dvou roztoků uvnitř tenkých kapilár. Takto vzniklé lokální přesycení pak podporuje vznik nukleí a krystalizaci.

Krystalizace pod olejem je nejstarší a nejjednodušší metoda založená na přímém smíchání roztoku proteinu s koncentrovaným roztokem precipitantu. Jsou-li zvoleny ostatní podmínky (teplota, pH aj.) vhodně, protein se dostane do stavu přesycení a následně dochází ke krystalizaci. Výhodou metody je jednoduchost (požaduje pouze kontejner na uchování kapaliny) a reprodukovatelnost. Naopak nevýhodou je velmi vysoký pracovní objem, kvůli němuž se tato technika nevyužívá pro screening - spotřeba proteinu při neznalosti konkrétních podmínek může být obrovská. Nově vyvinutá micro-batch metoda ale požaduje objem pouze 1 - 6 μl a je tedy pro screening poměrně vhodná. Nejvíce se ale využívá pro získání většího množství krystalů při znalosti konkrétní podmínky. [1, 2, 3]

1.2 Makromolekulární krystalografie

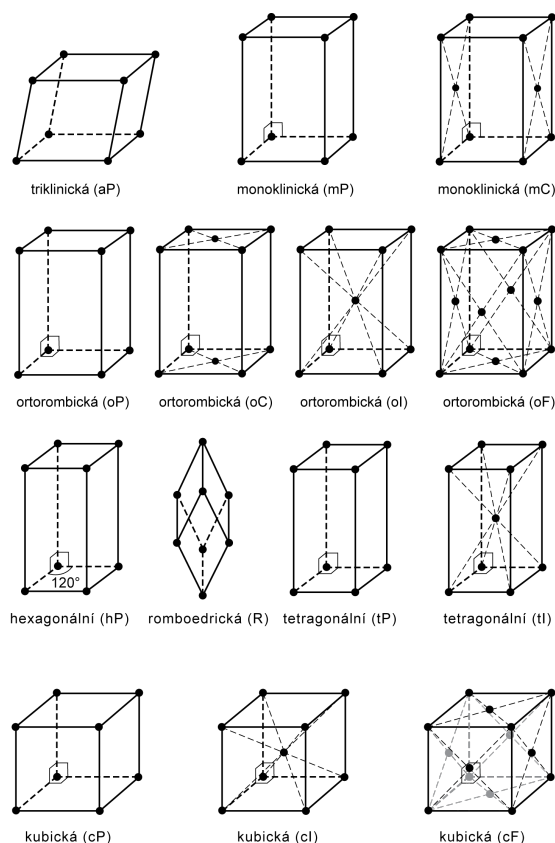
1.2.1 Základní pojmy krystalografie

Jako krystal označujeme pravidelné periodické uspořádání atomů¹ do prostorové mřížky. Tuto mříž nazveme krystalovou a definujeme ji jako soustavu uzlových bodů, které reprezentují rovnovážné polohy atomů. Důležitý je požadavek na stejné a stejně uspořádané okolí každého atomu, v tom případě lze hovořit o mřížce Bravaisově. Bazí krystalické mřížky nazveme skupinu atomů, jejíž určitý bod se ztotožňuje s bodem uzlovým. Může být tvořena jediným atomem (typicky u kovů) nebo stovkami atomů (např. u biomolekul).

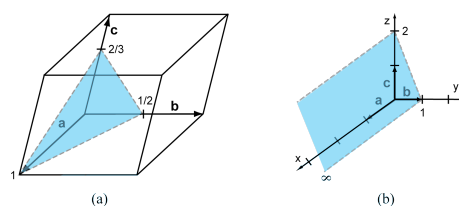
Základní buňka je rovnoběžnostěn, jehož vrcholy jsou ztotožněny s uzlovými body mřížky. Lze ji definovat pomocí translačních vektorů v hranách tohoto rovnoběžnostěnu (ozn. \mathbf{a} , \mathbf{b} , \mathbf{c}). Mřížkovými parametry rozumíme šestici obsahující délky translačních vektorů a úhly, které tyto vektory svírají. Obsahuje-li základní buňka uzlové body jen ve svých vrcholech, hovoříme o tzv. primitivní buňce. Pokud se další uzly nachází na průsečících stěnových, resp. prostorových úhlopříček základní buňky, dostáváme mřížky centrované bazálně (ozn. A, B, C), plošně (F), resp. prostorově (I). V prostoru rozlišujeme celkem 14 takových mřížek a všechny uvádíme v Obr. 1.3).

K popisu krystalografických rovin užíváme Millerovy indexy, definované jako reciproké hodnoty úseků, které rovina vytíná na osách souřadného systému určeného pomocí základních vektorů, a označované písmeny h, k, l . Indexem dané roviny potom rozumíme symbol (hkl) . Je-li rovina s nějakým ze základních vektorů rovnoběžná, definujeme její reciprokou hodnotu jako $\frac{1}{\infty} \equiv 0$ (Obr. 1.4). [4, 5, 6]

¹místo atomů lze v celém textu uvažovat také molekuly



Obrázek 1.3: Přehled všech 14 Bravaisových mřížek. [6]



Obrázek 1.4: Určení Millerových indexů: (a) (243), (b) (021). [6]

Symetrie a bodové grupy

V krystalech jsou povolené jen rotační osy s četností řádu $n = 1, 2, 3, 4$ a 6 (tzn. je potřeba daným bodem n -krát otočit o úhel $\varphi = \frac{360^\circ}{n}$, abychom dostali výchozí polohu). Ostatní hodnoty n jsou zakázané, tělesa s takovými četnostmi nazýváme kvazikrystaly. Je-li s operací rotace kolem osy spjata též inverze, jde o tzv. nevlastní rotaci, kterou označujeme symbolem \bar{n} .

Jedna mřížka typicky splňuje více možných operací symetrie, které sdružujeme do tzv. bodových grup. Aplikací operací symetrie bodové grupy dostaneme ekvivalentní polohy zvoleného bodu. Celkem rozlišujeme 32 skupin - tzv. krystalových tříd - které mají stejnou bodovou grupu. Poznamenejme ale, že proteiny krystalizují jen v 11 třídách, neboť jim chybí operace inverzní symetrie a zrcadlení. Ze stejného důvodu najdeme proteinové krystaly jen v 65 z celkem 230 prostorových grup. [4, 5]

Reciproká mřížka

Pro zjednodušení popisu krystalů je výhodné zavést pojem abstraktní reciproké mřížky. Reciprokou mřížku získáme tak, že k rovině (hkl) původní mřížky vedeme kolmici, na kterou nanese vzdálenost $\frac{1}{d_{hkl}}$, kde d_{hkl} označuje mezivrstevnou vzdálenost. Tím obdržíme bod reciproké mřížky reprezentující danou rovinu. Translační vektory v reciproké mřížce označíme \mathbf{a}^* , \mathbf{b}^* , \mathbf{c}^* . Matematicky lze reciprokou mřížku vyjádřit například pomocí skalárního součinu příslušných dvojic vektorů z přímého a reciprokého prostoru:

$$\mathbf{a}_i \cdot \mathbf{a}_j^* = \delta_{ij}, \quad (1.1)$$

kde δ_{ij} je tzv. Kroneckerovo delta definované jako

$$\delta_{ij} = \begin{cases} 1 & \text{pro } i = j, \\ 0 & \text{pro } i \neq j. \end{cases}$$

[5]

1.2.2 Difrakce

Fotony rentgenového záření interagují s látkou v zásadě dvěma možnými způsoby: absorpcí, při níž je foton absorbován atomy terčíku (může docházet například k fotoelektrickému jevu), nebo rozptylem. Absorpci fotonů v této práci nebudeme dále rozebírat, rozptyl je však zásadní pro studium materiálu pomocí rentgenové difrakce.

Jako Comptonův rozptyl označujeme situaci, při níž foton (resp. fotonový svazek) interaguje s elektronem tak, že mu předává část své energie, což má za následek excitaci elektronu a změnu vlnové délky fotonu. Záření, které při Comptonově rozptylu vzniká posunem vlnové délky fotonu, je nekoherentní, nelze tedy určit vztah mezi fázemi dopadajícího a rozptýleného záření, a nepodílí se na interferenčních jevech. Naopak má za následek stále přítomné pozadí difrakčního obrazce.

K tzv. Thompsonovu rozptylu dochází, pokud svazek fotonů interaguje s atomem (odchyluje se ze své původní dráhy) bez ztrát energie. Protože je tento rozptyl koherentní, podílí se na interferenci a je příčinou vzniku difrakčních maxim. Při interakci dochází k oscilaci elektronu vlivem síly $\vec{F} = e\vec{E}$, kde \vec{E} je intenzita elektrického pole fotonu. Takto oscilující elektron se sám stává zdrojem sekundárního sférického elektromagnetického záření. Intenzitu nepolarizovaného koherentního záření, které se rozptyluje na elektronu s hmotností m_e a nábojem e , vyjadřuje tzv. Thompsonův vztah:

$$I_e = I_0 \frac{e^4}{m_e^2 c^2 r^2} \frac{1 + \cos^2(2\theta)}{2}, \quad (1.2)$$

kde I_0 je intenzita dopadajícího záření, r vzdálenost od rozptylujícího objektu a θ je úhel mezi svazkem dopadajícího záření a rovinou krystalu. Člen $\frac{1 + \cos^2(2\theta)}{2}$ se nazývá polarizační faktor. [4, 7]

Interference

Nechť O, O' jsou dvě bodová rozptylová centra vzdálená o mřížkový vektor \mathbf{r} , na která ve stejném okamžiku dopadne rovinná elektromagnetická vlna. Oba body se stanou zdroji sekundárních vln, které spolu mohou dále interferovat. Označíme-li po řadě \mathbf{s}_0, \mathbf{s} vektory ve směru dopadajícího a rozptýleného paprsku (resp. normály k dopadajícím vlnám), můžeme jejich fázový rozdíl psát ve tvaru

$$\delta = \frac{2\pi}{\lambda}(\mathbf{s} - \mathbf{s}_0) \cdot \mathbf{r} = 2\pi \mathbf{r}^* \cdot \mathbf{r}. \quad (1.3)$$

Pokud v rovnici (1.3) nastane, že $\lambda \gg |\mathbf{r}|$, fázový rozdíl δ bude zanedbatelný a interferenci nebudeme pozorovat. Proto se ke studiu krystalů používá právě rentgenového záření, neboť jeho vlnová délka je srovnatelná s meziatomovou vzdáleností (v řádu jednotek Å)².

Nechť je v buňce umístěno N rozptylových center (např. atomů) tak, že m -té centrum zaujímá polohu \mathbf{r}_m . Pak výsledná vlna bude dána vztahem

$$F(\mathbf{r}^*) = \sum_{m=1}^N A_m \exp(2\pi i \mathbf{r}^* \cdot \mathbf{r}_m), \quad (1.4)$$

kde A_m je amplituda vlny rozptýlené na m -tém rozptylovém centru. Zavedeme-li navíc tzv. rozptylový faktor (scattering factor) $f^2 = I/I_e$ jako poměr intenzit záření rozptýleného na jednom centru a na volném elektronu (z rovnice (1.2)), lze výraz (1.4) přepsat do tvaru

$$F(\mathbf{r}^*) = \sum_{m=1}^N f_m \exp(2\pi i \mathbf{r}^* \cdot \mathbf{r}_m), \quad (1.5)$$

který nazýváme strukturním faktorem. Je-li navíc splněna Laueho podmínka difrakce (viz dále sada rovnic (1.9)), lze strukturní faktor pro rovinu (hkl) upravit na

$$F_{hkl} = \sum_{m=1}^N f_m \exp(2\pi i (hx_m + ky_m + lz_m)) \quad (1.6)$$

Jistě jde o komplexní číslo, tedy platí

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| e^{i\alpha}, \quad (1.7)$$

kde α je fázový úhel, jehož experimentální určení je poměrně náročné - řešením se zabývá tzv. fázový problém. Přímou měříme intenzitu dopadajícího záření, která je úměrná kvadrátu amplitudy strukturního faktoru: $I_{hkl} \sim |F_{hkl}|^2$.

Pokud N diskrétních center nahradíme spojitým rozptylujícím prostředím, nabude rovnice (1.5) tvaru

$$F(\mathbf{r}^*) = \int_V \rho(\mathbf{r}) \exp(2\pi i \mathbf{r}^* \cdot \mathbf{r}) d\mathbf{r} = \mathcal{F}[\rho(\mathbf{r})], \quad (1.8)$$

²1 Å = 10⁻¹⁰ m ; Ångström je jednotka vzdálenosti, která se v krystalografii běžně používá k vyjádření meziatomových vzdáleností, vlnových délek atp., není však součástí soustavy SI. Je pojmenována po švédském fyzikovi A. J. Ångströmovi.

kde $\rho(\mathbf{r})$ je elektronová hustota a \mathcal{F} označuje operaci Fourierovy transformace. Amplituda rozptýlených vln je tedy rovna Fourierově transformaci elektronové hustoty a naopak inverzní Fourierovou transformací lze ze strukturního faktoru získat rozložení elektronové hustoty. To je velice důležitý poznatek pro mapování struktury krystalů z difrakčního experimentu. [4, 6, 7]

Laueho a Braggova rovnice, Ewaldova sféra

Základním předpokladem této sekce je platnost tzv. kinematické teorie difrakce. Rozptyl považujeme za elastický, koherentní a slabý (tj. zanedbáváme sekundární vlny - první Bornova aproximace) a předpokládáme, že všechny atomy byly ozářeny stejnou intenzitou. Tato teorie dobře odpovídá difrakci neutronů a rentgenového záření, pro elektrony má jen omezenou platnost.

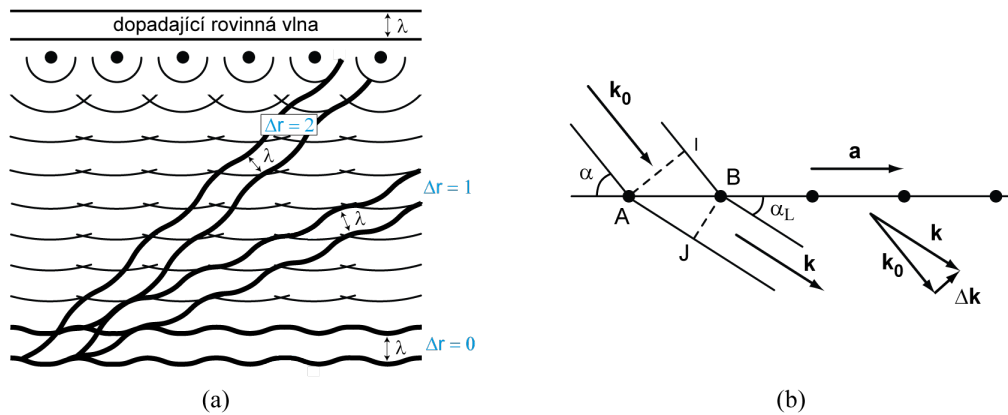
Nechť je dána mřížka s vektory $\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}$ a monochromatická rovinná vlna rentgenového záření o vlnové délce λ . Nechť tato vlna dopadá na mřížku ze směru \mathbf{n}_0 a rozptyluje se do směru \mathbf{n} (obecně $\mathbf{n}_0 \neq \mathbf{n}$). Ke konstruktivní difrakci dochází, je-li splněna tzv. Laueho podmínka difrakce daná sadou tří rovnic:

$$\begin{aligned} \mathbf{a} \cdot (\mathbf{n} - \mathbf{n}_0) &= h\lambda, \\ \mathbf{b} \cdot (\mathbf{n} - \mathbf{n}_0) &= k\lambda, \\ \mathbf{c} \cdot (\mathbf{n} - \mathbf{n}_0) &= l\lambda, \end{aligned} \quad (1.9)$$

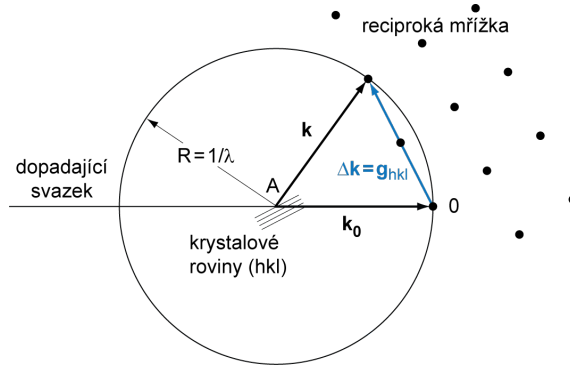
které jednoznačně definují směr difraktovaného záření \mathbf{n} . Definujeme-li navíc vlnový vektor $\mathbf{k} = \mathbf{n}/\lambda$ (analogicky také \mathbf{k}_0) a tzv. difrakční vektor $\Delta\mathbf{k} = \mathbf{k} - \mathbf{k}_0$ (Obr 1.5b), dají se Laueho podmínky přepsat do tvaru

$$\mathbf{a} \cdot \Delta\mathbf{k} = h \quad , \quad \mathbf{b} \cdot \Delta\mathbf{k} = k \quad , \quad \mathbf{c} \cdot \Delta\mathbf{k} = l. \quad (1.10)$$

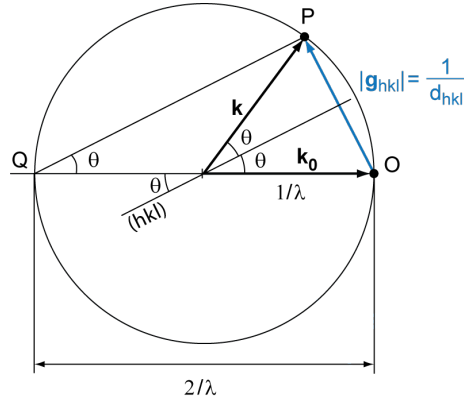
Pokud nyní za vektor $\Delta\mathbf{k}$ dosadíme speciálně vektor reciproké mříže $\mathbf{g}_{hkl} = h\mathbf{a}^* + k\mathbf{b}^* + l\mathbf{c}^*$, bude Laueho podmínka identicky splněna. Difrakce tedy nastává právě tehdy, když je difrakční vektor shodný s vektorem reciproké mříže. Jinak řečeno, difrakční obrazec je zobrazení reciproké mřížky.



Obrázek 1.5: (a) Difrakce jako výsledek konstruktivní interference, (b) Odvození Laueho podmínky. [6]



Obrázek 1.6: Ewaldova konstrukce. [6]



Obrázek 1.7: Odvození Braggova zákona pomocí Ewaldovy konstrukce. [6]

K odvození Braggova zákona lze dojít vícero způsoby, v této práci použijeme s výhodou grafickou konstrukci tzv. Ewaldovy sféry, respektive pro zjednodušení její 2D varianty (Obr. 1.6). Jde o kružnici s poloměrem $1/\lambda$, v jejímž středu je umístěn krystal. Bod O ležící na kružnici v Obr. 1.7 definuje počátek reciproké mřížky. K difrakci dojde pouze tehdy, natočíme-li krystal tak, aby se některý z uzlů \mathbf{g}_{hkl} (reprezentovaný bodem P) nacházel přesně na Ewaldově sféře. Z Thaletovy věty je zřejmé, že trojúhelník $\triangle OPQ$ je pravoúhlý, navíc z podobnosti trojúhelníků je úhel $\angle OQP$ stejný jako úhel θ (polovina úhlu mezi vektory \mathbf{k} , \mathbf{k}_0), takže platí

$$\sin \theta = \frac{|\mathbf{g}_{hkl}|}{2/\lambda}. \quad (1.11)$$

Dosadíme-li za $|\mathbf{g}_{hkl}| = \frac{1}{d_{hkl}}$, dostaneme Braggovu rovnici (Braggův zákon) pro difrakci 1. řádu:

$$2d_{hkl} \sin \theta = \lambda, \quad (1.12)$$

nebo obecně pro n -tý řád platí

$$2d_{hkl} \sin \theta = n\lambda \quad , \quad n \in \mathbb{N}. \quad (1.13)$$

Rovnice (1.12) určuje také vztah pro velikost difrakčního vektoru

$$|\Delta \mathbf{k}| = |\mathbf{g}_{hkl}| = \frac{2 \sin \theta}{\lambda}, \quad (1.14)$$

který dává jasné omezení na rozptylový vektor \mathbf{k} . Braggova rovnice (1.13) navíc určuje množinu všech možných, tzv. Braggových, úhlů.

Ewaldova sféra zdůvodňuje podobu experimentálních difrakčních dat, která představují množiny bodových reflexí. Následující část blíže představí samotný difrakční experiment, vybavení a metody zpracovávání dat. [5, 6, 7]

1.2.3 Zdroje rentgenového záření

Konvenční, nebo také klasické, zdroje rentgenového záření využívají principu emise fotonů při kolizi elektronového svazku s kovovým terčem. Základem všech těchto zdrojů je vakuová komora s katodou, z níž se termoemisí uvolňují elektrony. Ty jsou následně urychlovány vysokým napětím (v řádu jednotek až stovek kV) a fokusovány ke kovové anodě. Při interakci s atomy kovu na anodě dochází k silnému zpomalování elektronů a vzniku rentgenového záření. Elektrony svou energii ztrácejí postupně (spíše než o jedinou jde postupně o více srážek), díky čemuž je výsledné spektrum rentgenového záření spojitě. Navíc, mají-li dopadající elektrony dostatečnou energii, může dojít k vyražení elektronu z vnitřních slupek elektronového obalu atomu kovu. Toto prázdné místo může zaujmout atom z vyšší energetické hladiny se současným vyzářením fotonu o frekvenci, která je pro každý kov jedinečná - v tom případě hovoříme o tzv. charakteristickém rentgenovém záření. Jednotlivé ostré (a přesně definované) píky v charakteristickém spektru se značí písmeny K, L, M.

Klasické zdroje se vzájemně odlišují mj. typem použité anody. U standardní rentgenky je anoda statická, zdroje s rotační anodou využívají anodu otáčející se vysokou úhlovou rychlostí (tisíce ot./min). Výhodou této technologie je snazší chlazení (elektronový svazek nedopadá pouze do jednoho bodu), a tedy možnost použít vyšší výkon.

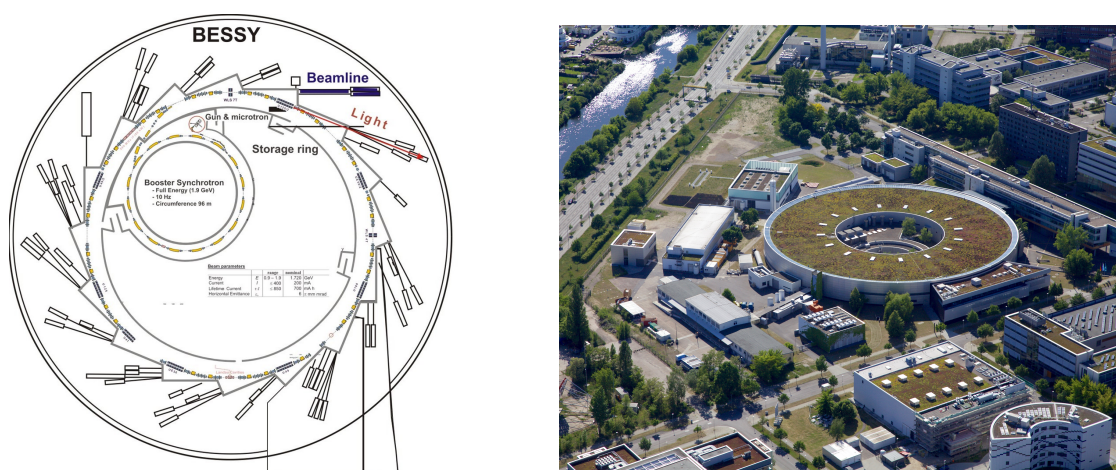
Zdroje s tekutou anodou využívají proudu tekutého kovu (např. slitiny Ga/In). Tato technologie ještě výrazněji zlepšuje chlazení, lze tedy užít vyšší výkon a získat tak záření o vyšší intenzitě (v porovnání s klasickými zdroji). Protože má navíc gallium a indium podobná charakteristická záření jako kovy běžných „pevných“ anod (měď, resp. stříbro), je zdroj s tekutou anodou výbornou alternativou. Jedním takovým zdrojem, na kterém proběhlo i několik měření v rámci této práce, je Excillum MetalJet na difraktometru Bruker D8 Venture v Biotechnologickém ústavu AV ČR ve Vestci u Prahy. [4, 7]

Synchrotrony

Zdroje synchrotronového záření pracují na principu, se kterým jsme se již setkali v části 1.2.2. Urychlený elektron (nebo obecně nabitá částice) se stává zdrojem elektromagnetického záření, jehož energie závisí na rychlosti dané částice. V synchrotronech se elektron pohybuje rychlostí blízkou rychlosti světla, což vede při ohybu jeho trajektorie v magnetickém poli k emisi tzv. synchrotronového záření (energie elektronu přitom dosahuje až jednotek GeV). Díky relativistickým efektům je záření nejen velmi málo divergentní (emituje se jen do úzkého kužele tangenciálně k

původní trajektorii elektronu), ale zejména disponuje vlnovou délkou odpovídající rentgenovému záření.

Synchrotronový komplex se skládá z několika částí. První je urychlovač (často typu LinAc), který elektronu udělí počáteční rychlost a energii v řádu jednotek MeV. Následuje tzv. booster, kde dochází k dalšímu urychlování (před opuštěním boosteru má částice svou finální energii v řádu jednotek GeV). Booster je mimo jiné jediný synchrotron ve fyzikálním slova smyslu, ačkoli se tímto termínem často (i v této práci) označují celé komplexy a všechny jejich části (Obr. 1.8)



Obrázek 1.8: Synchrotron Bessy II (vlevo schématický náčrt, vpravo letecký pohled). [8]

Elektrony urychlené boosterem jsou následně injektovány do největší části komplexu - akumulárního prstence (angl. storage ring), kde mohou obíhat několik hodin po přibližně kruhové trajektorii o poloměru stovek metrů, na které jsou udržovány pomocí ohybových magnetů umístěných podél prstence (jejich trajektorie je tvarem podobná spíše mnohoúhelníku, neboť mezi jednotlivými segmenty magnetů se elektrony pohybují přímo). V místech, kde se dráha elektronů stáčí vlivem vnějšího magnetického pole, dochází k emisi synchrotronového záření, jehož vlnovou délku lze navíc měnit (změnami zakřivení trajektorie elektronu v mag. poli). Součástí storage ringu jsou i radiofrekvenční systémy, které elektronům dodávají energii ztracenou emisí záření.

Z akumulárního prstence vystupují v místech ohybových magnetů v tangenciálním směru tzv. beamlines - zařízení s optikou pro rentgenové záření. Nacházejí se zde kolimátory, filtry, monochromátory, zrcadla (za účelem čištění a fokusace rentgenového svazku) a na jejím konci pak experimentální vybavení (tzn. samotný vzorek a detektory měřící výslednou difrakci a rozptyl sekundárního záření). Měření v rámci této práce probíhala na synchrotronu Bessy II, Helmholtz Zentrum Berlin. [4, 7, 9]

1.2.4 Detektory

Existuje mnoho různých, více či méně používaných, typů detektorů. Pro analýzu krystalů malých molekul se využívají například scintilační detektory: foton rentgenového záření se absorbuje fluorescenčním krystalem (scintilátorem), který následně

emituje viditelné světlo, jehož intenzita se dále zesiluje fotonásobičem a detekuje. Pro analýzu makromolekul je však takový detektor nevhodný, neboť v jeden čas dokáže měřit jen intenzitu jedné reflexe.

V proteinové krystalografii se častěji používají detektory typu CCD (Charge-Coupled Device), které jsou dostatečně citlivé a mají kvalitní rozlišení. Před samotným CCD čip je postavena fluorescenční deska, jež převádí rentgenovské záření na fotony viditelného světla, které jsou dále odváděny optickými vlákny k detektoru. Při dopadu na čip dochází k fotoelektrickému jevu, výsledný elektrický proud je pak de facto analogovým signálem, který se dále zpracovává (digitalizuje, vyhodnocuje).

Detektory typu CMOS fungují na podobném principu jako CCD, avšak zpracování signálu zde probíhá paralelně, neboť každý pixel představuje samostatný miniaturní integrovaný obvod s polovodičem a zesilovačem. To umožňuje navýšit počet snímků v čase a potlačit výsledný šum na snímku, detektory tohoto typu tedy postupně nahrazují CCD. [7, 10]

1.2.5 Metody měření

Krystaly proteinů mají v porovnání s krystaly malých molekul mnohonásobně větší bázi. Mřížkové parametry elementární buňky jsou tedy nutně mnohem větší, což má za následek hustě obsazenou reciprokou mřížku (velký počet reflexí, viz např. Obr. P7). Použití klasických metod měření reflexí není vhodné, neboť by docházelo k překryvu sousedních reflexí, navíc by měření trvalo poměrně dlouho (a obecně křehký vzorek by tak utrpěl větší radiační poškození). Proteinové krystaly tedy měříme pomocí oscilačních či rotačních metod, které přiblížíme v následující části.

Obě metody se zakládají na otočení krystalu o malý úhel $\Delta\phi$ (buď rotací, nebo oscilací) kolmo k dopadajícímu rentgenovému svazku. Hustě obsazená reciproká mřížka znamená, že v jedné poloze krystalu nalezneme prakticky jistě hned několik uzlových bodů na povrchu Ewaldovy sféry, a tedy je pro ně splněna Braggova podmínka. Všechny tyto body se nacházejí uvnitř tzv. lunet. Protože uzly mají nenulový objem a úhel $\Delta\phi$ je relativně malý, poměrně velká část bodů prochází Ewaldovou sférou jen částečně. Reflexe těchto uzlových bodů nazýváme částečně změřené (partially recorded).

Z difrakčního měření získáme obvykle několik tisíc snímků. Jejich vyhodnocování sestává z několika částí: indexace reflexí, určení parametrů základní buňky a její symetrie (a následně i Laueho grupy), integrace intenzit jednotlivých reflexí, seškálování, výpočet výsledných intenzit (spolu s odhadem chyby určení intenzit) a nakonec určení prostorové grupy. Všechny tyto kroky jsou automatizovány, využívá se různých počítačových programů, např. XDS nebo iMosflm. [4, 7, 11]

1.2.6 Hodnocení kvality difrakčních dat

Důležitou součástí práce s difrakčními daty je použití kritérií pro ověření správnosti, nebo lépe řečeno přesnosti (kvality), našeho strukturního modelu. Toto hod-

nocení se provádí jak při zpracování difrakčních dat (rovnou z intenzit reflexí), tak při finální rafinaci. Naměřené intenzity jsou základem pro hodnocení R -faktory:

$$R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{h,k,l} \sum_{m=1}^{N_{hkl}} |I_{m,hkl} - \overline{I_{hkl}}|}{\sum_{h,k,l} \sum_{m=1}^{N_{hkl}} I_{m,hkl}}, \quad (1.15)$$

$$R_{\text{meas}} = \frac{\sum_{h,k,l} \sqrt{\frac{N_{hkl}}{N_{hkl}-1}} \sum_{m=1}^{N_{hkl}} |I_{m,hkl} - \overline{I_{hkl}}|}{\sum_{h,k,l} \sum_{m=1}^{N_{hkl}} I_{m,hkl}}, \quad (1.16)$$

po zprůměrování změřených dat lze zavést navíc ještě

$$R_{\text{p.i.m.}} = \frac{\sum_{h,k,l} \sqrt{\frac{1}{N_{hkl}-1}} \sum_{m=1}^{N_{hkl}} |I_{m,hkl} - \overline{I_{hkl}}|}{\sum_{h,k,l} \sum_{m=1}^{N_{hkl}} I_{m,hkl}}, \quad (1.17)$$

kde ve všech sumách značí N_{hkl} počet pozorovaných reflexí rovin (hkl) a $\overline{I_{hkl}}$ průměr všech naměřených intenzit $I_{m,hkl}$.

Další důležitý ukazatel kvality je odhad poměru intenzit k jejich směrodatným odchylkám I/σ definovaný předpisem

$$I/\sigma = \frac{1}{N} \sum_{h,k,l} \frac{I_{hkl}}{\sigma(I_{hkl})}, \quad (1.18)$$

kde N je počet všech pozorovaných reflexí a $\sigma(I_{hkl})$ statistický rozptyl intenzity reflexe na rovině (hkl).

Korelační koeficient $\text{CC}_{1/2}$ je definován jako

$$\text{CC}_{1/2} = \frac{\sum_{m=1}^{N/2} (I_m - \overline{I})(J_m - \overline{J})}{\sqrt{\sum_{m=1}^{N/2} (I_m - \overline{I})^2} \sqrt{\sum_{m=1}^{N/2} (J_m - \overline{J})^2}}, \quad (1.19)$$

kde N je opět počet naměřených reflexí a I, J označují dvě náhodně vybrané poloviny naměřených dat. Tento ukazatel vyjadřuje shodu uvnitř datasetu. [4, 7]

1.2.7 Molekulární nahrazení

Pro získání strukturního modelu lze využít například metodu tzv. molekulárního nahrazení. Ta, jak již název vypovídá, umísťuje známou strukturu (nebo její fragment) do dané krystalové mříže. K tomu stačí najít trojici rotačních a trojici translačních proměnných (na začátku je tedy celkem 6 neznámých), přičemž v praxi se kvůli dimenzi celého problému a výpočetní náročnosti hledá nejdříve rotační transformace a až následně translační. Metoda využívá Pattersonových map krystalových struktur (tj. mapy meziatomových vektorů) a hodí se mimo jiné právě pro řešení struktur, u nichž je předpoklad, že jsou jen málo odlišné od nějaké známé a již objasněné. Molekulární nahrazení bylo využito při řešení všech struktur v rámci této práce. [4]

1.2.8 Shoda modelu s experimentem

Po sestavení strukturního modelu, k čemuž lze využít právě molekulární nahrazení z kap. 1.2.7 či metodu experimentálního fázování, lze kvalitu dat při upřesňování struktury hodnotit ještě R -faktorem, který vyjadřuje shodu mezi naměřenými (ozn. $F_O(\mathbf{r}^*)$) a teoreticky vypočtenými (ozn. $F_C(\mathbf{r}^*)$) strukturními faktory (proto se někdy nazývá také shodnostním faktorem):

$$R = \frac{\sum_{\mathbf{r}^*} ||F_O(\mathbf{r}^*)| - K |F_C(\mathbf{r}^*)||}{\sum_{\mathbf{r}^*} |F_O(\mathbf{r}^*)|}, \quad (1.20)$$

kde K je škálovací koeficient a $F(\mathbf{r}^*)$ jsme definovali dříve v rovnici (1.5).

Získaná data se navíc dělí do dvou množin - pracovní (ozn. W) a testovací (ozn. T). Upřesňování se provádí pouze s daty z pracovní množiny W , která obsahuje okolo 95 % všech reflexí. Z nich se určuje parametr R_{work} na základě rovnice (1.20):

$$R_{\text{work}} = \frac{\sum_{k \in W} ||F_{O,k}| - |F_{C,k}||}{\sum_{k \in W} |F_{O,k}|}, \quad (1.21)$$

zatímco z mnohem menší testovací množiny T se vypočítává R_{free} jako

$$R_{\text{free}} = \frac{\sum_{k \in T} ||F_{O,k}| - |F_{C,k}||}{\sum_{k \in T} |F_{O,k}|}. \quad (1.22)$$

Protože bylo dokázáno, že R_{free} je silně korelován s přesností fází, slouží tento postup k ověření správnosti upřesňování, neboť by nemělo docházet ke snižování R_{work} bez současného poklesu hodnot R_{free} .

Nižší hodnoty všech R -faktorů a vyšší hodnoty I/σ , $CC_{1/2}$ by měly znamenat kvalitnější, lépe zpracovaná data a správně vyřešenou strukturu. Názory na interpretaci a využitelnost těchto kritérií se však často rozcházejí, objevují se také zcela nové techniky hodnocení kvality získaných dat. [4, 7]

1.3 S1 nukleasa

1.3.1 Úvod o nukleasách

Nukleasy jsou enzymy schopné hydrolyticky štěpit fosfodiesterovou vazbu (resp. katalyzovat její štěpení) v nukleových kyselinách. Pro jakýkoli organismus jsou tyto enzymy nezbytné, neboť se podílejí na celé řadě fyziologických procesů v buňce. Mají vliv na transkripci a translaci RNA, u DNA jsou součástí opravných procesů, restriční endonukleasy zase hrají roli při obraně buňky (štěpí cizorodé nukleové kyseliny, čímž chrání genom napadeného organismu) a tak dále.

Samotné třídění nukleas je velmi obtížné, neboť možných kritérií můžeme nalézt celou řadu. Lze je dělit podle preference k DNA, resp. RNA na DNasy, resp. RNasy (existují i nukleasy nespecifické, které štěpí obě nukleové kyseliny) a dále podle

preferenci k různým typům DNA a RNA (některé štěpí všechny, jiné například pouze jednořetězcové nebo dvouřetězcové apod.). Dále lze nukleasy odlišovat podle místa, ve kterém štěpení nukleových kyselin probíhá, na exonukleasy (požadují volný konec), endonukleasy (volný konec nepožadují, mohou štěpit např. i kruhovou DNA) a endo-exo nukleasy. Nakonec zmiňme ještě dělení podle aktivity v závislosti na přítomnosti kovů: mohou být na kovech nezávislé, závislé na přítomnosti jednoho kovu či více kovů (takové nukleasy se řadí mezi metaloenzymy, patří sem například i rodina S1-P1). [1, 12]

1.3.2 S1-P1 nukleasy

S1-P1 je široká rodina nukleas, které se vyskytují v houbách, bakteriích, prvocích či rostlinách. Z celé řady jejích členů jmenujme, kromě S1 nukleasy z *Aspergillus oryzae*, jež je tématem této práce a podrobněji se jí věnujeme v kapitole 1.3.3, například nukleasu P1 z *Penicillium citrinum*, AtBFN2 z *Arabidopsis thaliana* a TBN1 (z angl. tomato bifunctional nuclease) z rostliny *Solanum lycopersicum*, rajčete jedlého. Všechny tyto nukleasy mají, spolu s S1, již známou strukturu a jsou tak vzácnými výjimkami v rodině S1-P1.

S1-P1 nukleasy jsou obvykle závislé na zinečnatých iontech Zn^{2+} , méně často na iontech Ca^{2+} nebo Mg^{2+} . Jejich pH optimum je většinou kyselé až neutrální, hmotnost mívají mezi 25 a 45 kDa a jsou poměrně termostabilní (přibližně do 60 °C).

Až 50% sekundární struktury těchto nukleas je tvořeno α -šroubovicemi spojenými disulfidickými můstky. Aktivní místo - kapsa poblíž povrchu nukleasy - obsahuje 3 katalyticky aktivní kationty Zn^{2+} ; dva na dně kapsy a jeden blíže povrchu nukleasy. Nedaleko tohoto místa se nachází ještě NBS1 (Nucleoside binding site 1), kde se vážou sacharidové části substrátu a báze.

Potenciál těchto nukleas není ještě zcela objasněn. Jedno z možných využití (například u nukleasy TBN1) může spočívat v léčbě nádorových onemocnění za využití inhibice růstu nádoru, výzkum na toto téma však stále pokračuje. Jejich přirozená role se liší v závislosti na daném organismu a taktéž ještě není plně známa. V bakteriích se zřejmě účastní interakce s hostitelem, v rostlinách ovlivňují například procesy klíčení a buněčné smrti, zatímco v plísniích se účastní štěpení živin. [1, 12]

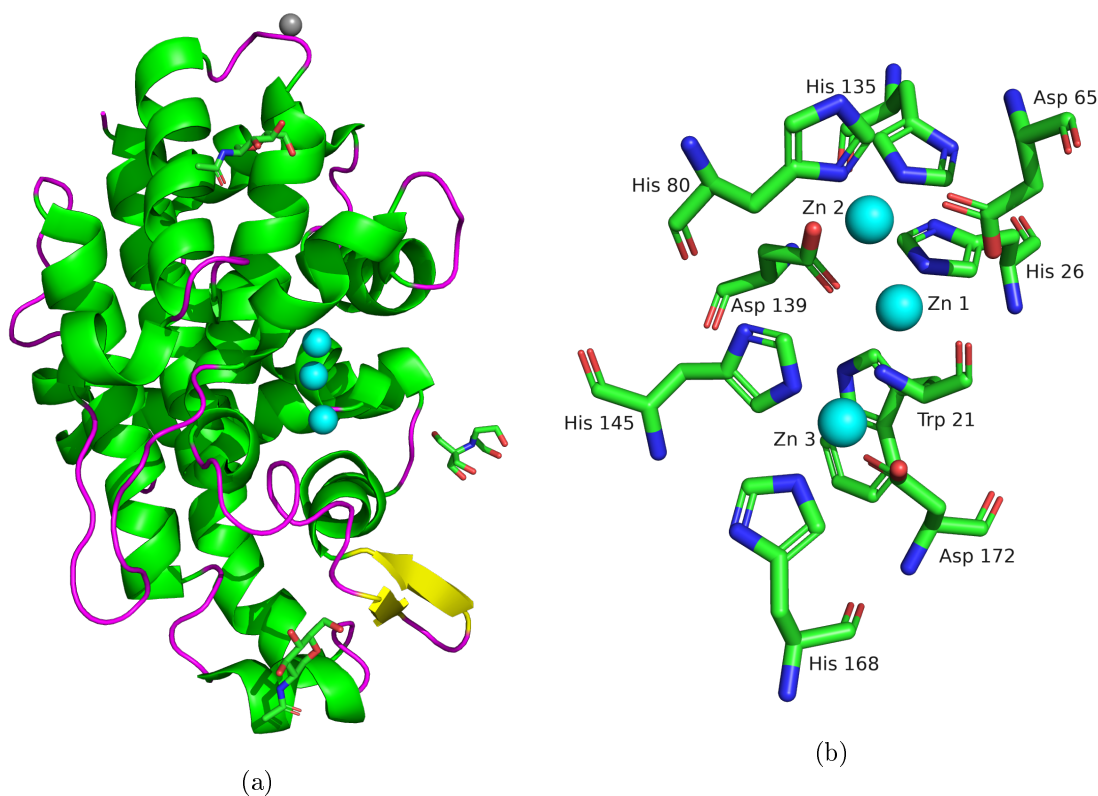
1.3.3 S1 nukleasa z *Aspergillus oryzae*

S1 nukleasa z rodiny S1-P1 je původem z plísně *Aspergillus oryzae*, která se, kromě biotechnologického výzkumu, často využívá v asijském potravinářském průmyslu (v Japonsku slouží k výrobě saké, fermentaci sojových bobů či přípravě rýžového octa).

Nukleasu S1 řadíme mezi endonukleasy, které dokáží štěpit vazby uvnitř nukleových kyselin (včetně kruhové DNA). Navíc preferuje jednořetězcové nukleové kyseliny, patří tedy mezi tzv. single-strand specifické nukleasy. Aktivita na ssDNA je

až 75 000x vyšší než na nativní DNA. Nevýhodou této nukleasy je však hodnota optimálního pH pro katalýzu, které se pohybuje v kyselé oblasti mezi hodnotami pH 4 a 4,5.

S1 je metaloenzym s hmotností kolem 35 kDa závislý na přítomnosti třech zinečnatých kationtů v aktivním místě. Jak bylo zmíněno výše, tvar aktivního místa připomíná kapsu, přičemž dva ze tří iontů Zn^{2+} jsou umístěny na dně kapsy (Zn 1, Zn 2), třetí (Zn 3) blíže povrchu. Morfologie nukleasy spolu s detailem aktivního místa jsou prezentovány na Obr. 1.9. [13, 14, 15]



Obrázek 1.9: Stavba nukleasy S1 s ionty Zn^{2+} zobrazenými tyrkysově.

(1.9a) Pohled na celý protein v reprezentaci sekundární struktury. Zeleně α -šroubovice, žlutě β -listy, fialově smyčky.

(1.9b) Detail kovového klastaru a okolních aminokyselin do vzdálenosti 4 Å. Zeleně je zobrazen uhlík, modře dusík, červeně kyslík. Vytvořeno pomocí programu PyMOL, [SW1].

Vazebná místa

Místo NBS1, které se nechází vedle kapsy se zinky, dokáže vázat nukleové báze ve dvou možných konfiguracích, pro které zde uijeme jejich anglické označení „shallow“ a „deep“ (v překladu mělké a hluboké). Odlišují se způsobem zapojení molekuly vody, která je v aktivním místě standardně přítomna. NBS1 má navíc schopnost rozsáhlé strukturní remodelace, díky níž je pak nukleasa S1 schopna vázat poměrně širokou škálu nukleotidů nebo nukleosidů.

Mimo místa NBS1 má S1 nukleasa ještě další vazebné místo, tzv. „Half-Tyr site“, vzdálené od NBS1 přibližně 13 Å. Toto místo je analog k tyrosinovému místu (Tyr-site, odtud pochází dané pojmenování), které nalezneme u příbuzné P1 nukleasy. [15]

Příprava S1 nukleasy je relativně snadná, díky čemuž má široké uplatnění v biotechnologickém výzkumu. Lze ji využít k analýze heteroduplexní DNA, detekci mezer ve šroubovicové DNA či k analýze tzv. superhelix DNA (superhelix je struktura, v níž je šroubovice sama stočena do šroubovice).

S1 je inhibována například produkty štěpení RNA, fosfáty a fosfátovými ionty. Už 50 μM ATP inhibuje nukleasu částečně a koncentrace 1 mM ATP prakticky úplně, zatímco ligand 5'-dCMP (2'-deoxycytidin - 5'-monofosfát) nukleasu výrazně inhibuje při koncentraci 30 mM. [12, 14, 16]

Kapitola 2

Cíle

- Krystalizace S1 nukleasy z *Aspergillus oryzae* za přítomnosti chelačního činidla EDTA.
- Provedení difrakčního experimentu, zpracování a vyhodnocení získaných strukturních dat.
- Interpretace výsledků strukturních studií.

Kapitola 3

Výsledky

3.1 Krystalizace

3.1.1 Teplotní stabilita

Před samotnou krystalizací je vhodné zjistit, jak se mění teplotní stabilita proteinu při přidání chelačního činidla, popřípadě dalších kovů.

Chelační činidlo, v našem případě kyselina ethylendiamintetraoctová (dále jen EDTA), má za úkol navázat a odstranit z S1 zinečnaté ionty, na jejichž místo se pak mohou vázat ionty jiných kovů. Proces vyvázání kovových iontů chelačním činidlem se nazývá chelace.

Teplotní stabilitu takto vzniklého modifikovaného proteinu (vzhledem k „referenční“ teplotní stabilitě nativního proteinu) měříme pomocí metody nano-diferenční skenovací fluorimetrie, zkráceně nanoDSF. Ta využívá fluorescenci aminokyselin tyrosinu a tryptofanu ke sledování vývoje rozbalování proteinu, k němuž přirozeně dochází při zvyšující se teplotě. Intenzita i maxima fluorescence těchto aminokyselin (při nanoDSF sledujeme dvě vlnové délky 330, resp. 350 nm) silně závisí na jejich blízkém okolí, díky čemuž můžeme monitorovat strukturní změny v teplotním gradientu. Samotná teplotní stabilita je pak určena teplotou t_m („melting point“), při které je rozbaleno právě 50% proteinu, což odpovídá přechodu mezi sbaleným a rozbaleným proteinem.

O samotné teplotní stabilitě vypovídá nejlépe vždy spodní z dvojice grafů na obrázcích P1 - P4 v sekci Přílohy. Byly provedeny 4 základní měření teplotní stability, vždy s proteinem o koncentraci $12 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$:

- S1 + EDTA v různých molárních poměrech
- S1 + EDTA + kovy v molárním poměru 1:1:5, respektive 1:3:5
- S1 + EDTA + NiCl_2 v různých molárních poměrech

Při každém měření byla přítomna i kapilára s nativní S1 jako referenční prvek.

Nukleasa S1, s níž bylo v celé této práci experimentováno, pocházela od dánské biotechnologické společnosti Novozymes A/S (dodávka S1-U7GUV). Při dvou příležitostech (Obr. P3, P4) byla měřena i schopnost opětovného sbalení proteinu při snižování teploty (refolding phase), ta však kvůli příliš vysoké koncové teplotě (80 °C) nepřinesla žádné výsledky.

Na první pohled je zřejmé, že růst koncentrace EDTA v roztoku výrazně zhoršuje teplotní stabilitu - teplota t_m se posouvá z původních cca 75 °C až k 50 °C (Obr. P1). Při poměrech 1:1:5 s různými kovy se teplotní stabilita více či méně obnovuje (Obr. P3), pro vyšší koncentraci EDTA (poměr 1:3:5, Obr. P4) už to ale neplatí a rozdíly jsou poměrně markantní. Jedinou výjimkou je přidání niklu, který, zdá se, dokáže protein termálně stabilizovat mnohem lépe. Právě proto byla směs obsahující nikl podrobněji studována a z výsledků měření (Obr. P2) bylo vybráno několik slibných koncentračních poměrů pro následnou krystalizaci a difrakční experiment.

3.1.2 Krystalizační pokusy

Pro experimenty s krystalizací bylo vybráno více různých kombinací v závislosti na předchozích výsledcích měření teplotní stability. Krystalizace probíhala v naprosté většině případů za použití metody visící kapky v teplotě 18 °C a s krystalizační podmínkou PEG 3350 (20% - 28% (w/v), nejčastěji 25%), 200 mM NaCl, 50 mM CaCl₂, 100 mM Bis-Tris pH 5,5. Doplnkově byla nasazena i krystalizace metodou sedící kapky (v teplotách 10 a 18 °C), ta však žádné nové výsledky nepřinesla. V několika případech bylo použito i citrátové podmínky (PEG 3350 25 % (w/v), 100 mM Citric acid pH 3,5), ze které však žádné krystaly nevyrostly, a proto od ní bylo brzy upuštěno. V průběhu práce bylo experimentováno také s použitím různých olejů pro zpomalení difuze (ve snaze minimalizovat defekty vzniklé příliš rychlým růstem).

Na pohled zcela bezdefektní krystaly přinesla poprvé až aplikace metody očkování (tzv. seedingu), kdy se do kapky pomocí vlasu či chlupu zanesou krystalizační zrna vzniklá např. rozbitím jiného (defektního) krystalu. Problémy ve fázi nukleace se díky tomu vyřešily a výsledkem byly bezdefektní bipyramidy (Obr. P6 v sekci Přílohy). Bez očkování vznikaly v naprosté většině případů krystaly defektní, viz například Obr. P5a nebo P5b, část měla podobu desek (P5c).

Doba růstu krystalů se pohybovala okolo jednoho týdne, některé však vyrostly až po několika měsících od nasazení. Krystalizovalo se několik základních variant: samotný nativní protein S1 (tyto krystaly nakonec nebyly využity), dále S1 ve směsi s EDTA a nakonec roztok S1 s EDTA, do kterého byl přibližně po 30 minutách inkubace přidán kov (resp. halogenid kovu, např. CoCl₂, NiCl₂, FeCl₃ apod.). Tato manipulace probíhala při pokojové teplotě. Nejčastěji bylo využíváno koncentračních poměrů 1:1:5 (v pořadí S1:EDTA:kov), které bylo nejsnazší vypěstovat a odezva teploty tání t_m nukleasy S1 na nízké koncentrace EDTA naznačovala náhradu kovu v aktivním místě. Později byly tedy nasazeny také poměry 1:3:5 a 1:5:10, které měly náhradu atomů zinku za jiné kovy ve struktuře S1 ještě zvýraznit.

Většina krystalů s přidávanými kovy obsahovala kobalt a nikl, neboť tyto kovy

vykazovaly nejslibnější výsledky teplotní stability, viz kap. 3.1.1. Kobalt byl přidáván do směsí s poměrem 1:1:5 (S1:EDTA:kov), nikl byl využíván zejména pro vyšší koncentrace EDTA. Doplnkově bylo experimentováno i s hořčíkem a železem, tyto krystaly však nakonec nebyly využity pro difrakci a další vyhodnocení struktury. Výsledky krystalizace byly průběžně fotografovány přes optický mikroskop a jejich výběr je k dispozici v sekci Přílohy.

3.2 Difrakční experimenty a zpracování dat

3.2.1 Parametry experimentu

Krystaly určené k difrakčnímu měření na synchrotronu (konkrétně na obrázcích 3.1 a 3.2, dále označené jako X3.1, resp. X3.2) byly vyloveny z kapek a v tekutém dusíku převezeny na synchrotron BESSY II, Helmholtz Zentrum Berlin. Kvůli nepříznivé situaci kolem pandemie nemoci Covid-19 proběhlo samotné měření (listopad 2020) metodou „remote-control“, tzn. difrakční experiment byl uskutečněn na dálku online v reálném čase za spolupráce s německými kolegy. V případě měření na domácím zdroji Bruker D8 Venture v BTÚ byl krystal X3.3 (Obr. 3.3) po vylovení z kapky přesunut rovnou na goniometr a měření bylo zahájeno okamžitě. Jako kryoprotektant byl u všech měřených krystalů použit perfluoropolyether (PFPE).

Na synchrotronu byla použita vlnová délka rentgenového záření o hodnotě 0,918 Å, vzdálenost detektoru Pilatus 6M od krystalu činila 150 mm. U krystalu X3.1 bylo navíc kvůli vyšší multiplicitě u prostorové grupy P1 využito dvou různých hodnot úhlu $\kappa = 0^\circ$ a 100° . Domácí zdroj operoval s fixní vlnovou délkou 1,342 Å, vzdálenost detektoru Bruker byla nastavena na 90 mm.

Výstupem ze všech měření byla sada difrakčních snímků, přičemž jeden z nich (od krystalu X3.1) je na obrázku P7 v sekci Přílohy. Jde evidentně o difrakci proteinového krystalu, neboť vysoká hustota bodů (difrakčních maxim) značí velké vzdálenosti rovin v krystalu, což je pro makromolekuly typické. Bílé oblasti nezaznamenávají žádnou intenzitu - mříž je způsobena sestavou detektoru (ten je složen z vícero dílčích senzorů), od centra obrazce doleva je pak místo tzv. lapače primárního svazku. Černé soustředné kruhy s vysokou intenzitou vznikají v důsledku difrakce rentgenového záření na ledu na povrchu krystalu.

3.2.2 Zpracování dat

Před každým měřením byly všechny krystaly nejprve otestovány. Naměřeno bylo několik zkušebních snímků, ze kterých bylo možno ihned poznat, zda skutečně jde o dobře difraktující proteinový krystal. V několika případech totiž krystal nedifraktoval, zcela chyběl nebo se jednalo o krystal soli (takový difrakční obrazec je pak od proteinového snadno odlišitelný). Snímky byly okamžitě zpracovány programem iMosflm a na základě výsledků tohoto zpracování pak byla navržena strategie pro měření kompletních datasetů.

Ke zpracování kompletních dat byl využit program XDS. Naměřená data se pro každý krystal vyhodnocovala odděleně - zpracovávaly se tedy dva datasey dohromady od krystalu X3.1, jeden od X3.2 a později ještě jeden od X3.3. Následně byla data seškálována a zprůměrována pomocí programu AIMLESS z balíčku CCP4. Krystal X3.1 byl zpracován až do atomárního rozlišení 1,1 Å, X3.2 do velmi vysokého rozlišení 1,5 Å, měření na domácím zdroji přineslo uspokojivé výsledky do rozlišení 1,9 Å (X3.3). Výsledky zpracování dat pro tyto krystaly jsou uvedeny v tabulkách 3.1, 3.2, 3.3. Difrakční limit u jednotlivých krystalů byl uvážlivě volen podle hodnot I/σ , R_{merge} a kompletnosti dat s přihlédnutím k jejich dalšímu využití. [SW2, SW3, SW4]

3.3 Analýza výskytu kovů

V případě všech měřených krystalů byla po zpracování dat využita metoda molekulárního nahrazení (viz kap. 1.2.7), neboť zde byl předpoklad, že přidaná EDTA by měla působit strukturní změny nanejvýš v oblasti aktivního místa obsahujícího zinečnaté ionty. Jako známá struktura byla pro provedení molekulárního nahrazení využita nukleasa S1 z [15], PDB ID 5FBB.

Struktura vypočtená na základě modelu po molekulárním nahrazení byla zpřesněna pomocí 50 cyklů programu Refmac5. Výsledky tohoto zpřesňování jsou pro data ze všech tří krystalů uvedeny v Tab. 3.4. Je nutno poznamenat, že se nejedná o kompletní vyřešenou strukturu, neboť cílem bylo pouze získání diferenčních a anomálních map, jejichž maxima v násobcích σ ¹ jsou uvedena v Tab. 3.5. [SW4]

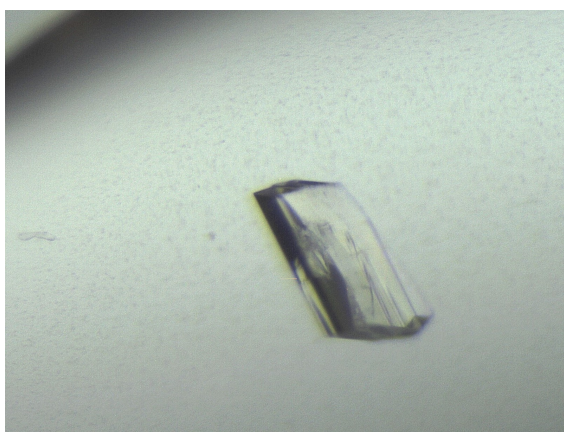
Ani jedno z měření na synchrotronu nebylo optimalizováno na získání anomálních signálů od jednotlivých těžkých kovových iontů. Při analýze výsledků chelace byly použity pouze diferenční (rozdílové $F_O - F_C$) mapy elektronové hustoty získané molekulárním nahrazením strukturou, která chelací neprošla. Tyto mapy zobrazené na hladině 10σ jsou na obrázcích 3.4 a 3.5.

Anomální signál byl získán až z měření difrakce krystalu X3.3 na domácím zdroji Bruker D8 Venture v Centru molekulární struktury (BTÚ, AV ČR). Mimo rozdílovou $F_O - F_C$ mapu elektronové hustoty (Obr. 3.6) byla tedy vypočtena i mapa anomální, viz Obr. 3.7 (modře). Anomálního rozptylu se v proteinové krystalografii využívá zejména při práci s těžkými atomy, typicky kovy (podrobnější výklad této problematiky je k dispozici v [4]). Rozdílová anomální mapa na Obr. 3.7, zobrazená na hladině 3σ , ukazuje zřetelná maxima na pozicích, kde by se ve struktuře klastru měly nacházet těžké anomálně rozptylující kovové atomy.

¹ σ je směrodatná odchylka elektronové hustoty vypočtené Fourierovou transformací, viz 1.2.2.

Tabulka 3.1: Výsledky zpracování dat krystalu X3.1 (1:1 S1:EDTA) pomocí programu AIMLESS z balíčku CCP4 [SW4]. Středníky v horní části tabulky oddělují parametry měření pro $\kappa = 0^\circ$ a 100° . Naměřeno na synchrotronu Bessy II, HZB.

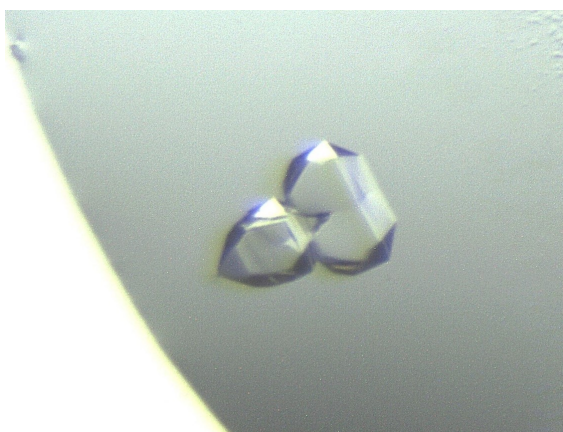
vlnová délka λ [Å]	0,918		
celkový úhel ϕ [°]	360 ; 360		
oscilační úhel $\Delta\phi$ [°]	0,1 ; 0,1		
κ [°]	0 ; 100		
expoziční čas [s/snímek]	0,1 ; 0,1		
difrakční limit [Å]	44,77 – 1,10	(44,77 – 6,02)	{1,12 – 1,10}
celkový počet reflexí	1 220 694	(8 982)	{62246}
počet nezávislých reflexí	193 512	(1 211)	{9668}
kompletnost dat [%]	96,9	(99,8)	{97,6}
multiplicita	6,3	(7,4)	{6,4}
prostorová grupa	<i>P1</i>		
parametry elementární buňky			
délka hran [Å]	$a = 43,31; b = 48,92; c = 65,43$		
velikosti úhlů [°]	$\alpha = 72,8; \beta = 89,9; \gamma = 74,1$		
$CC_{1/2}$	0,995	(0,997)	{0,835}
$\langle I/\sigma \rangle$	10,5	(22,3)	{2,6}
R_{merge}	0,110	(0,069)	{0,933}
R_{meas}	0,119	(0,074)	{1,015}
R_{pim}	0,046	(0,027)	{0,392}
Wilson B [Å ²]	9		



Obrázek 3.1: Krystal X3.1 nukleasy S1 ($12 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) s chelačním činidlem EDTA pěstovaný metodou visící kapky při teplotě 18°C v podmínce PEG 3350 25% (w/v), 200 mM NaCl, 50 mM CaCl₂, 100 mM Bis-Tris pH 5,5. Difrakční experiment byl proveden na synchrotronu Bessy II, HZB.

Tabulka 3.2: Výsledky zpracování dat krystalu X3.2 (1:1 S1:EDTA) pomocí programu AIMLESS z balíčku CCP4. [SW4] Naměřeno na synchrotronu Bessy II, HZB.

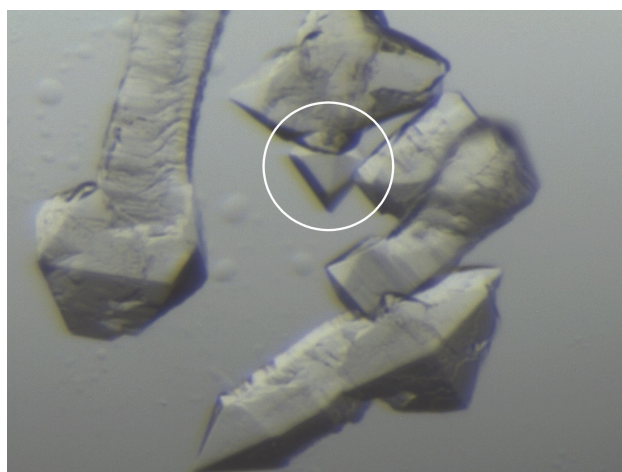
vlnová délka λ [Å]	0,918		
celkový úhel ϕ [°]	360		
oscilační úhel $\Delta\phi$ [°]	0,1		
κ [°]	0		
expoziční čas [s/snímek]	0,1		
difrakční limit [Å]	44,53 – 1,50	(44,53 – 8,22)	{1,53 – 1,50}
celkový počet reflexí	1 018 943	(6 075)	{48333}
počet nezávislých reflexí	40 350	(323)	{1905}
kompletnost dat [%]	99,9	(99,5)	{99,4}
multiplicita	25,3	(18,8)	{25,4}
prostorová grupa	$P4_32_12$		
parametry elementární buňky			
délka hran [Å]	$a = 62,97; b = 62,97; c = 122,59$		
velikosti úhlů [°]	$\alpha = 90,0; \beta = 90,0; \gamma = 90,0$		
$CC_{1/2}$	0,999	(0,999)	{0,183}
$\langle I/\sigma \rangle$	11,2	(53,9)	{0,5}
R_{merge}	0,242	(0,051)	{9,068}
R_{meas}	0,247	(0,052)	{9,249}
R_{pim}	0,049	(0,011)	{1,801}
Wilson B [Å ²]	18		



Obrázek 3.2: Srostlice krystalů X3.2 nukleasy S1 ($12 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) s chelačním činidlem EDTA v molárním poměru 1:1 pěstovaná metodou visící kapky při 18°C v podmínce PEG 3350 25% (w/v), 200 mM NaCl, 50 mM CaCl₂, 100 mM Bis-Tris pH 5,5. Před difrakčním experimentem na synchrotronu Bessy II, HZB byla srostlice štěpena na třetiny, z nichž jedna byla měřena.

Tabulka 3.3: Výsledky zpracování dat krystalu X3.3 (1:5:10 S1:EDTA:NiCl₂) pomocí programu AIMLESS z balíčku CCP4. [SW4] Naměřeno na difraktometru Bruker D8 Venture v BTÚ AV ČR.

vlnová délka λ [Å]	1,342		
celkový úhel ϕ [°]	360		
oscilační úhel $\Delta\phi$ [°]	0,2		
κ [°]	0		
expoziční čas [s/snímek]	15		
difrakční limit [Å]	43,37 – 1,90	(43,37 – 9,11)	{1,94 – 1,90}
celkový počet reflexí	183 063	(2 140)	{5670}
počet nezávislých reflexí	17 302	(210)	{1081}
kompletnost dat [%]	99,9	(99,6)	{99,5}
multiplicita	10,6	(10,2)	{5,2}
prostorová grupa	$P4_32_12$		
parametry elementární buňky			
délka hran [Å]	$a = 61,69; b = 61,58; c = 110,77$		
velikosti úhlů [°]	$\alpha = 90,0; \beta = 90,0; \gamma = 90,0$		
$CC_{1/2}$	0,991	(0,996)	{0,659}
$\langle I/\sigma \rangle$	10,8	(24,3)	{1,8}
R_{merge}	0,184	(0,109)	{0,937}
R_{meas}	0,193	(0,114)	{1,038}
R_{pim}	0,057	(0,032)	{0,435}
Wilson B [Å ²]	5		



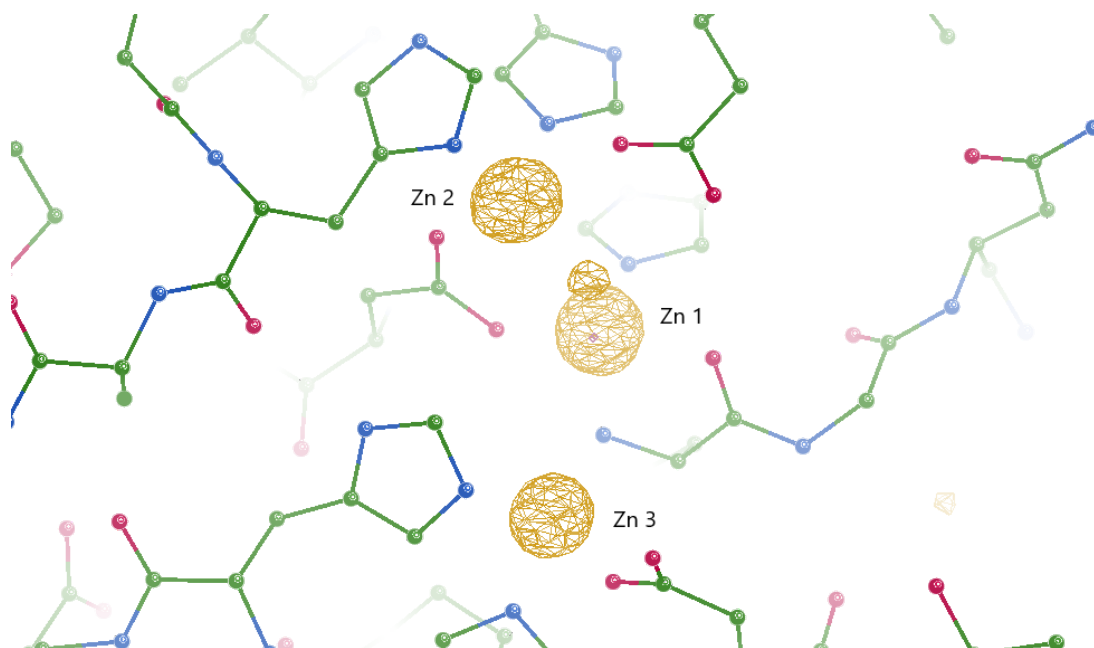
Obrázek 3.3: Krystal X3.3 (v kroužku) nukleasy S1 (12 mg·ml⁻¹) s chelačním činidlem EDTA a NiCl₂ v molárním poměru 1:5:10 pěstovaný metodou visící kapky při 18°C v podmínce PEG 3350 25% (w/v), 200 mM NaCl, 50 mM CaCl₂, 100 mM Bis-Tris pH 5,5, měřený na difraktometru Bruker Venture D8, BTÚ AV ČR.

Tabulka 3.4: Výsledky upřesňování struktur po molekulárním nahrazení (data z krystalů X3.1, X3.2, X3.3) pomocí 50 cyklů programu Refmac5 [SW4].

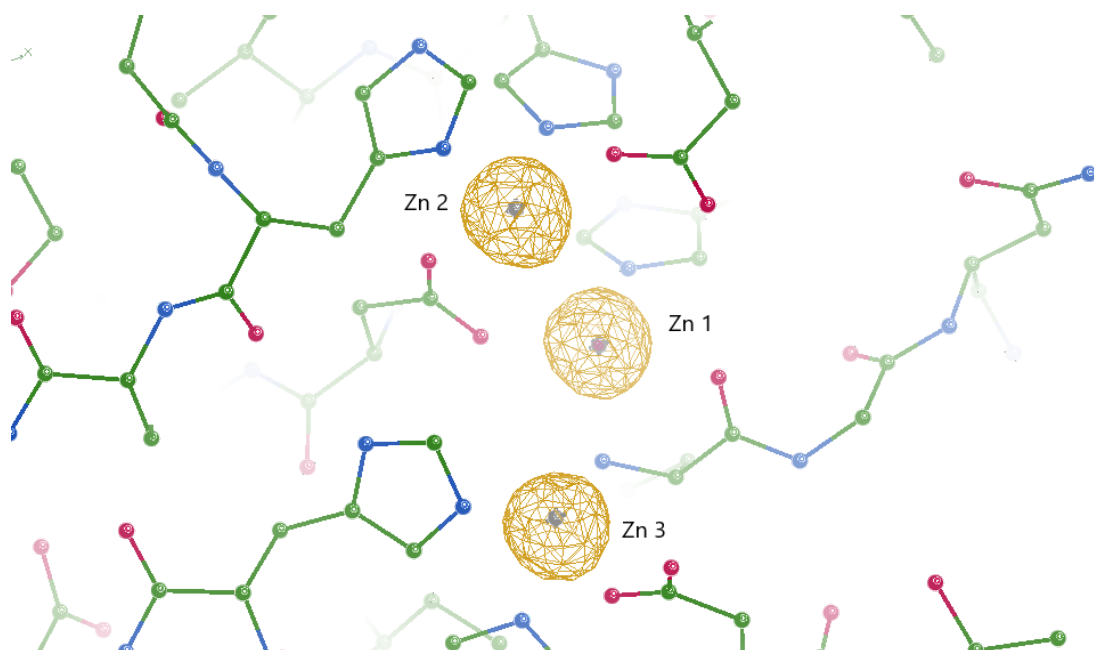
data	X3.1	X3.2	X3.3
rozlišení [\AA]	36,01 – 1,10	43,96 – 1,50	43,40 – 1,90
počet reflexí (celkové)	193 503	40 268	17 250
počet reflexí (free)	3 867	829	849
R_{work}	0,288	0,283	0,256
R_{free}	0,307	0,300	0,307
střední odchylky (r.m.s.d.)			
délky vazeb [\AA]	0,012	0,011	0,010
velikosti úhlů [$^{\circ}$]	1,775	1,702	1,721

Tabulka 3.5: Porovnání maxim diferenčních (rozdílových $F_O - F_C$) map a anomální mapy ze získaných datasetů od krystalů X3.1, X3.2, X3.3.

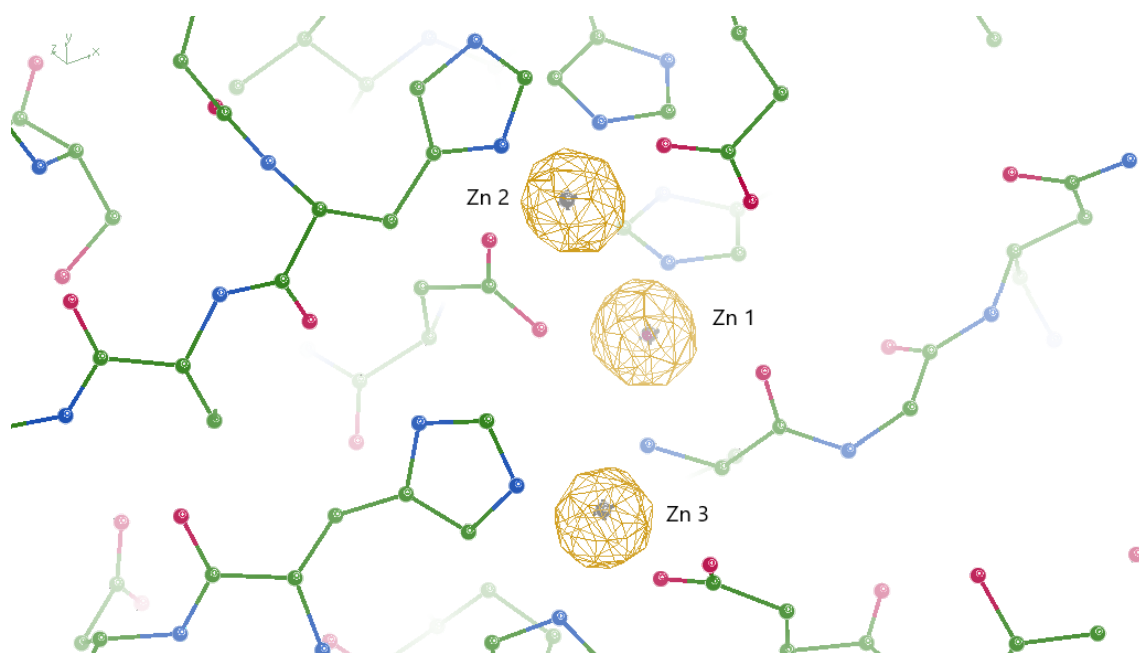
pozice	maxima diferenčních map [σ]			maxima anom. mapy [σ]
	X3.1	X3.2	X3.3	X3.3
Zn 1	64,16	28,06	23,63	3,93
Zn 2	60,98	28,30	22,90	5,01
Zn 3	48,51	24,42	22,04	6,16



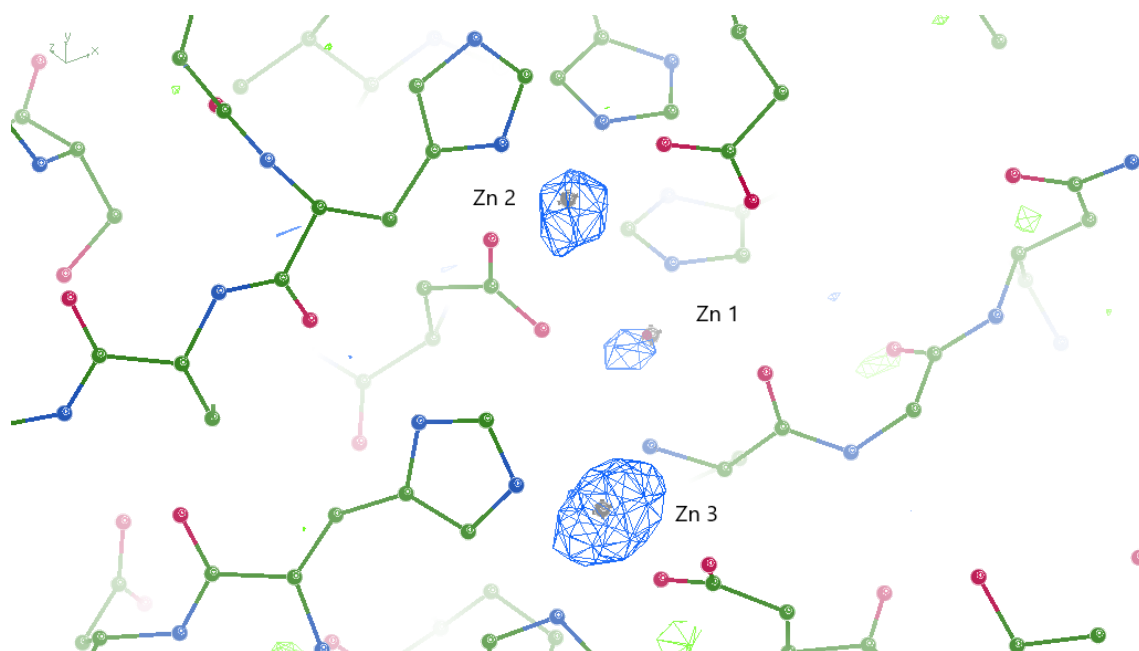
Obrázek 3.4: Rozdílová $F_O - F_C$ mapa (oranžově) elektronové hustoty kovového klástru krystalu X3.1 (protein S1 s chelačním činidlem EDTA v molárním poměru 1:1) na hladině 10σ . Zobrazení pomocí kuličkového a tyčinkového modelu: zeleně uhlík, červeně kyslík, modře dusík, vodíkové atomy nejsou zobrazeny. Data byla graficky zpracována v programu Coot [SW4].



Obrázek 3.5: Rozdílová $F_O - F_C$ mapa (oranžově) elektronové hustoty kovového klástru krystalu X3.2 (protein S1 s chelačním činidlem EDTA v molárním poměru 1:1) na hladině 10σ . Zobrazení pomocí kuličkového a tyčinkového modelu: zeleně uhlík, červeně kyslík, modře dusík, vodíkové atomy nejsou zobrazeny. Data byla graficky zpracována v programu Coot [SW4].



Obrázek 3.6: Rozdílová $F_O - F_C$ mapa (oranžově) elektronové hustoty kovového klástru krystalu X3.3 (protein S1 s chelačním činidlem EDTA a NiCl_2 v molárním poměru 1:5:10) na hladině 10σ . Zobrazení pomocí kuličkového a tyčinkového modelu: zeleně uhlík, červeně kyslík, modře dusík, vodíkové atomy nejsou zobrazeny. Data byla graficky zpracována v programu Coot [SW4].



Obrázek 3.7: Anomální diferencní mapa (modře) na hladině 3σ v kovovém klástru krystalu X3.3 (protein S1 s chelačním činidlem EDTA a NiCl_2 v molárním poměru 1:5:10). Zobrazení pomocí kuličkového a tyčinkového modelu: zeleně uhlík, červeně kyslík, modře dusík, vodíkové atomy nejsou zobrazeny. Data byla graficky zpracována v programu Coot [SW4].

Kapitola 4

Diskuze

Kovové ionty jsou pro aktivitu metaloenzymů zcela stěžejní. Důležitost zinečnatých iontů pro strukturní stabilitu nukleasy S1, která je přirozeně obsahuje, byla studována v této práci. Nukleasa byla ovlivněna chelačním činidlem EDTA, přičemž výsledkem chelace mělo být vyvázání iontů Zn^{2+} z její struktury. Takto modifikovaný protein byl krystalizován a následně podroben difrakčnímu experimentu.

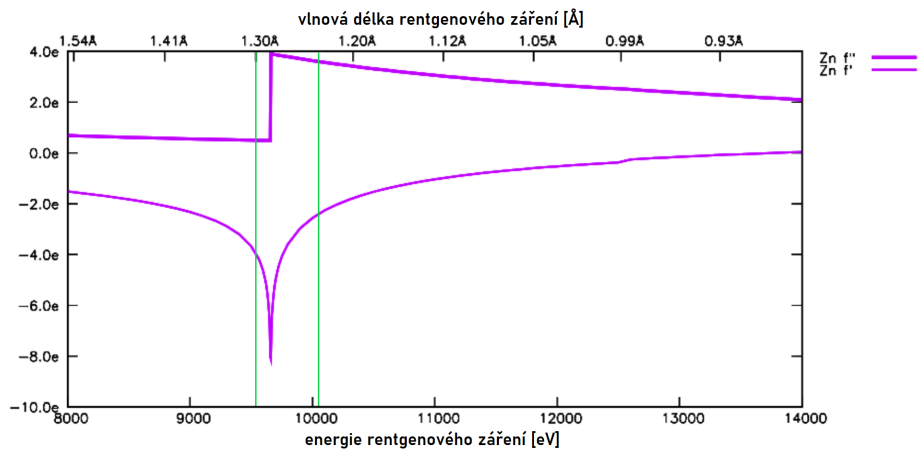
Před zahájením krystalizace byla měřena teplotní stabilita nukleasy S1 ve směsích s chelačním činidlem EDTA, popřípadě i chloridy různých kovů. Výsledky těchto měření sloužily jako základ pro výběr molárních poměrů vhodných pro krystalizaci. Nasazeny byly řádově dvě stovky kapek, krystaly vyrostly přibližně ve třetině z nich. Získané krystaly byly však v naprosté většině případů defektní. Snížená reprodukovatelnost a kvalita krystalů může být vysvětlena právě přidáním chelačního činidla. EDTA totiž může strukturu rozrušit natolik, že způsobí omezení výtěžnosti krystalizace a finální kvality. Tyto změny se ale velmi pravděpodobně nijak zásadně neprojevují na teplotní stabilitě proteinu.

Difrakční měření získaných krystalů se uskutečnila jak na synchrotronu (s vlnovou délkou 0,918 Å), tak i na zdroji s tekutou anodou (fixní vlnová délka 1,342 Å). Data byla zpracována do poměrně vysokých rozlišení pod 2 Å, v případě krystalu X3.1 dokonce až na atomární rozlišení 1,1 Å. Vedle prostorové grupy $P1$ rostly krystaly také v grupě $P4_32_12$, což zatím nebylo u S1 nukleasy pozorováno, alespoň dle dosud publikovaných struktur v databázi PDB. Všechny datasety mají dobrou kompletnost i multiplicitu. Hodnoty určitých parametrů mají potenciál k dalšímu zlepšení, avšak za cenu snížení rozlišení. Pro účely této práce jsou však data dostatečné kvality.

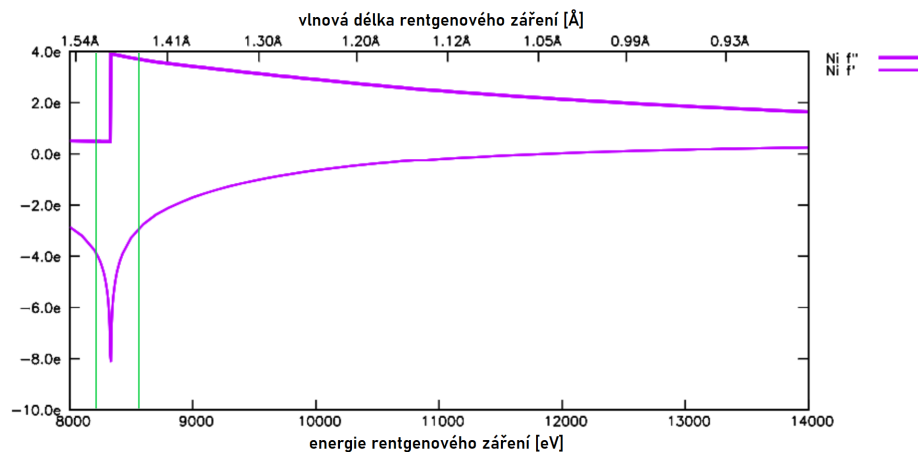
Analýza diferenčních map elektronové hustoty ukazuje na sníženou okupanci atomů zinku v případě krystalů X3.1 a X3.2. Tento jev je nejvíce patrný vždy na pozici zinku číslo 3, který se nachází nejbližší povrchu. Nižší okupance znamená vyvázání zinku ze struktury klastru, které však neproběhlo u všech molekul v krystalu. Toto je pravděpodobně způsobeno použitím nedostatečného množství (resp. koncentrace) chelačního činidla.

V případě krystalu X3.3, který mimo S1 a EDTA obsahoval ještě přidávaný nikl, jsou zajímavé především výsledky z anomální mapy. Pokud by k výměně kovů nedošlo, byl by zde anomální signál slabý (ne-li žádný). Nicméně anomální mapa vykazuje

tři zřetelná maxima, která se navíc nachází prakticky přesně na pozicích původních zinečnatých iontů. Z analýzy anomální mapy elektronové hustoty plyne, že u větší části molekul pravděpodobně došlo k vyvázání atomů zinku a následně i k navázání atomů niklu na stejné pozice. K tomuto procesu byla nejvíce náchylná, dle předpokladu, pozice Zn 3 nejbliže povrchu nukleasy (viz mapa na Obr. 3.7).



(a)



(b)

Obrázek 4.1: Anomální signál zinku (4.1a) a niklu (4.1b) v závislosti na vlnové délce, resp. energii rentgenového záření. Zelenými čarami jsou znázorněny vlnové délky vhodné pro měření anomálního signálu před a za hranou. Dostupné z [SW5].

Pomocí rentgenového záření o vlnových délkách, jaké byly použity v provedených experimentech, nelze spolehlivě odlišit zinečnaté a nikelnaté ionty v aktivním místě. Měření, která by přítomnost iontů Ni^{2+} v proteinu mohla prakticky s určitostí potvrdit, by se měla zaobírat studiem charakteristik anomálního signálu. Jeden z možných, a zřejmě nejlépe proveditelných, postupů je měření anomálního rozptylu při různých vlnových délkách v blízkém okolí tzv. absorpčních hran (podobně, jak je zelenými čarami naznačeno v grafech na obrázku 4.1), což jsou pro každý prvek

specifické vlnové délky, při kterých dochází ke zvýšené absorpci dopadajícího záření (de facto dochází k rezonančním jevům v elektronovém obalu). Takový experiment jde nejspíše uskutečnit se synchrotronovým zářením, jehož vlnovou délku lze, v porovnání s klasickými rentgenkami, poměrně snadno měnit.

Zbývá také zodpovědět otázku, jež se přirozeně okamžitě nabízí. Jaká koncentrace EDTA (respektive jaký molární poměr k S1) dokáže vyvázat všechny zinky? A je tato koncentrace únosná pro opětovné navázání jiných kovů? Jak již bylo řečeno, poměr S1:EDTA 1:1 k výrazným změnám nestačí, zatímco poměr 1:5 už vykazuje mnohem nadějnější výsledky. Je však možné, že chelace všech třech iontů zinku bude nevyhnutelně spjata s nevratnou degradací proteinu. Podobně bude pravděpodobně existovat i jisté nadlimitní množství EDTA, které taktéž způsobí znehodnocení proteinu (toto množství přitom stále nemusí být dostatečné k chelaci všech zinků). Takové experimenty zůstávají možnou náplní budoucího výzkumu, například v rámci Výzkumného úkolu.

Pozornost by se měla věnovat taktéž optimalizaci krystalizace, neboť získané krystaly byly v naprosté většině případů defektní, a tedy ne zcela vhodné pro difrakční experiment. Slibné řešení tohoto problému nabízí metoda očkování, z níž vznikaly krystaly byt malých rozměrů, avšak na pohled prakticky výlučně bezdefektní. Tyto však dále nebyly použity k žádnému měření, jejich difrakční vlastnosti tedy zůstávají prozatím neznámé. Dodejme však, že ani intenzivní optimalizace nezaručuje jistotu kvalitních a velkých krystalů, neboť protein podrobený chelaci takové vůbec nemusí vytvořit.

Další výzkum by se mohl zaměřit na studium aktivity modifikovaného proteinu. Zůstává totiž stále neznámé, zda je protein po výměně kovů v aktivním místě (například právě za nikl) vůbec aktivní či aktivní při stejných podmínkách. Například posun v optimálním pH pro katalýzu by mohl být základem nových a odlišných biotechnologických aplikací. Podobně se může modifikací pozměnit i preference nukleasy. Takové experimenty však přesahují rozsah bakalářské práce.

Závěr

V rámci této práce byly provedeny krystalizační experimenty s proteinem S1 z *Aspergillus oryzae*, který byl ovlivněn chelatačním činidlem EDTA. Krystaly byly následně podrobeny difrakčním experimentům na zdrojích rentgenového záření na synchrotronu Bessy II (Helmholtz Zentrum Berlin) a domácím zdroji Bruker D8 Venture (BTÚ AV ČR).

Získaná data byla zpracována do poměrně vysokých rozlišení, konkrétně do 1,1 Å, resp. 1,5 Å v případě krystalů měřených na synchrotronu a 1,9 Å u difrakce krystalu na domácím zdroji, která však byla optimalizována především na získání anomálního signálu. Kromě prostorové grupy $P1$ byla u tohoto proteinu vůbec poprvé (alespoň dle dosavadních záznamů PDB) pozorována také grupa $P4_32_12$.

Na základě analýzy diferenčních map elektronové hustoty lze usoudit, že v případě krystalů X3.1 a X3.2 nedošlo ke kompletní chelaci zinečnatých iontů, pouze ke snížení okupance. Struktura kovového klastru nebyla nijak výrazně změněna. V případě krystalu X3.3, který byl měřen především s cílem získat anomální signál a skládal se z nukleasy S1, EDTA a NiCl_2 v molárním poměru 1:5:10, došlo k částečné chelaci původních iontů Zn^{2+} a náhradě za ionty Ni^{2+} . Naznačuje to získaná anomální mapa, která rovněž ukazuje, že náhrada proběhla v největší míře na pozici Zn 3 nejbližší povrchu nukleasy.

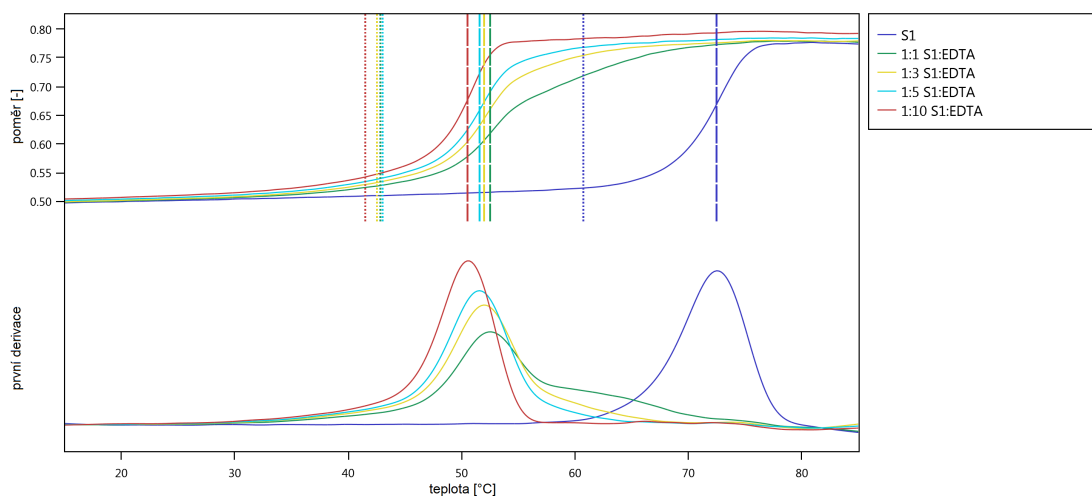
Literatura

- [1] K. Adámková. Krystalizace biomedicínsky významné plísňové nukleasy s 5'- mononukleotidovými ligandy. *Bakalářská práce*. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha. 2015.
- [2] A. J. McPherson, A. Gavira. Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F* **70(1)**, p. 2-20. DOI: 10.1107/S2053230X13033141. 2014.
- [3] I. Russo Krauss, G. Ferraro, A. Pica, J. A. Márquez, J. R. Helliwell, A. Merlino. Principles and methods used to grow and optimize crystals of protein-metallo-drug adducts, to determine metal binding sites and to assign metal ligands. *Metallomics* **9(11)**, p. 1534 - 1547. DOI: 10.1039/C7MT00219J. 2017.
- [4] J. Marek, Z. Trávníček. Monokrystalová rentgenová strukturní analýza. Univerzita Palackého, Olomouc. ISBN 80-244-0551-2. 2002.
- [5] I. Kraus, J. Fiala. Elementární fyzika pevných látek. 2. přepracované vydání. České vysoké učení technické v Praze. ISBN 9788001059425. 2016.
- [6] M. Karlík. Úvod do transmisní elektronové mikroskopie. České vysoké učení technické v Praze. ISBN 978-80-01-04729-3. 2011.
- [7] M. Malý. Optimalizace parametrů zpracování difrakčních dat oxidázy z *Microdochium nivale*. *Bakalářská práce*. České vysoké učení technické v Praze. 2016.
- [8] Bessy II, synchrotron. Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie. [online] Dostupné z: https://www.helmholtz-berlin.de/forschung/quellen/bessy/index_de.html. 2021.
- [9] P. F. Tavares, *et al.* Status of the Max IV accelerators. *10th Int. Particle Accelerator Conf.*, p. 1185 - 1190. JACoW Publishing. DOI: 10.18429/JACoW-IPAC2019-TUYPLM3. 2019.
- [10] L. Brügemann, E. K. Gerndt. Detectors for X-ray diffraction and scattering: a user's overview. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A* **531(1-2)**, p. 292 - 301. DOI: 10.1016/j.nima.2004.06.019. 2004.
- [11] Z. Dauter. Data-collection strategies. *Acta Crystallographica: Section D*. **55(10)**, p. 1703 - 1717. DOI: 10.1107/s0907444999008367. 1999.

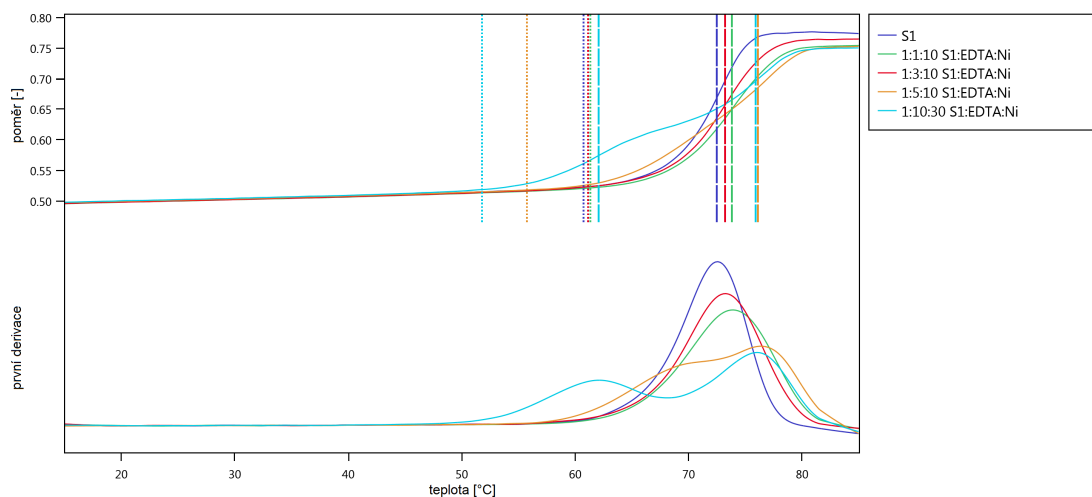
- [12] K. Adámková. Studium interakcí na zinku závislých nukleas s inhibitory pomocí rentgenové krystalografie a biofyzikálních metod. *Diplomová práce*. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha. 2017.
- [13] C. A. Blatt, M. Lou Tortello. Encyclopedia of Food Microbiology: *Aspergillus oryzae*, 2nd edition: Academic Press, p. 92 - 96. ISBN 978-0-12-384733-1. 2014.
- [14] R. C. Wiegand, G. N. Godson, C. M. Radding. Specificity of the S1 nuclease from *Aspergillus oryzae*. *The Journal of Biological Chemistry*. PMID: 171268. 1975.
- [15] T. Koval', L. H. Østergaard, J. Lehmbeck, *et al.* Structural and Catalytic Properties of S1 Nuclease from *Aspergillus oryzae* Responsible for Substrate Recognition, Cleavage, Non-Specificity, and Inhibition. *PLoS ONE* **11(12)**. DOI: 10.1371/journal.pone.0168832. 2016.
- [16] X. Yang, F. Pu, J. Ren, X. Qu. DNA-templated ensemble for label-free and real-time fluorescence turn-on detection of enzymatic/oxidative cleavage of single-stranded DNA. *Chemical Communications* **47(28)**. DOI: 10.1039/c1cc12216a. 2011.
- [SW1] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0. Schrödinger, LLC. Dostupné z: <https://pymol.org/2/>. 2021.
- [SW2] T. G. G. Battye, L. Kontogiannis, O. Johnson, H. R. Powell, A. G. W. Leslie. iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallographica Section D* **67(4)**, p. 271 - 281. DOI: 10.1107/S0907444910048675. 2011.
- [SW3] W. Kabsch. XDS. *Acta Crystallographica Section D* **66(2)**, p. 125 - 132. DOI: 10.1107/S0907444909047337. 2010.
- [SW4] M. D. Winn, C. C. Ballard, K. D. Cowtan, *et al.* CCP4. *Acta Crystallographica Section D* **67(4)**, p. 235 - 242. DOI: 10.1107/S0907444910045749. 2011.
- [SW5] Anomalous Scattering Coefficients. BMSC University of Washington [online] Dostupné z: http://skuld.bmsc.washington.edu/scatter/AS_form.html. 2021.

Přílohy

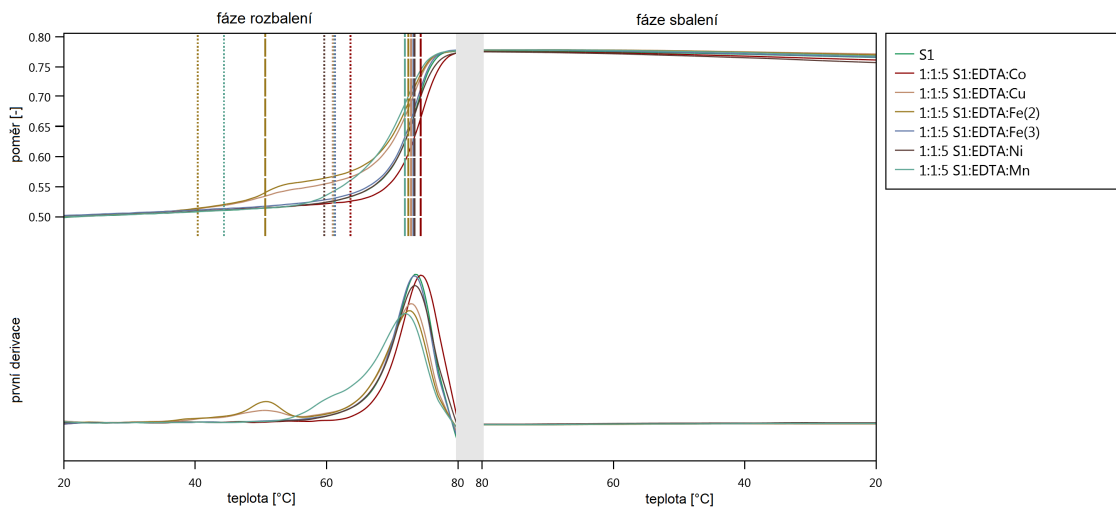
Teplotní stabilita



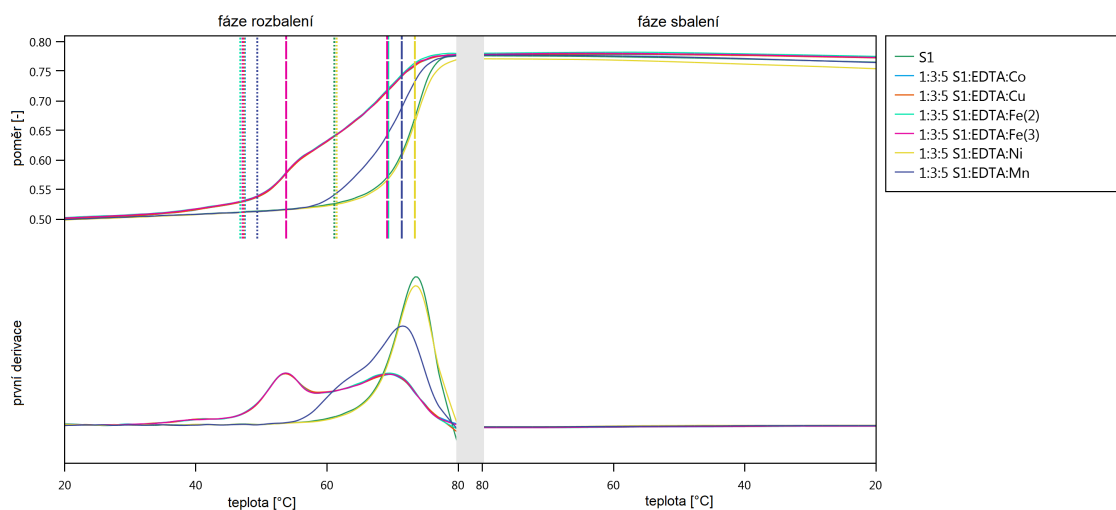
Obrázek P1: Teplotní stabilita nukleasy S1 (koncentrace $12 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) v roztoku s EDTA v různých molárních poměrech. Oproti nativní S1 (tmavě modře) lze vidět zřetelné zhoršení teplotní stability po ovlivnění chelačním činidlem. Měřeno metodou nanoDSF.



Obrázek P2: Teplotní stabilita směsi nukleasy S1 (koncentrace $12 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), EDTA a NiCl_2 v různých molárních poměrech. Přidání niklu k chelovanému proteinu dokáže částečně obnovit teplotní stabilitu (v porovnání s Obr. P1). Měřeno metodou nanoDSF.

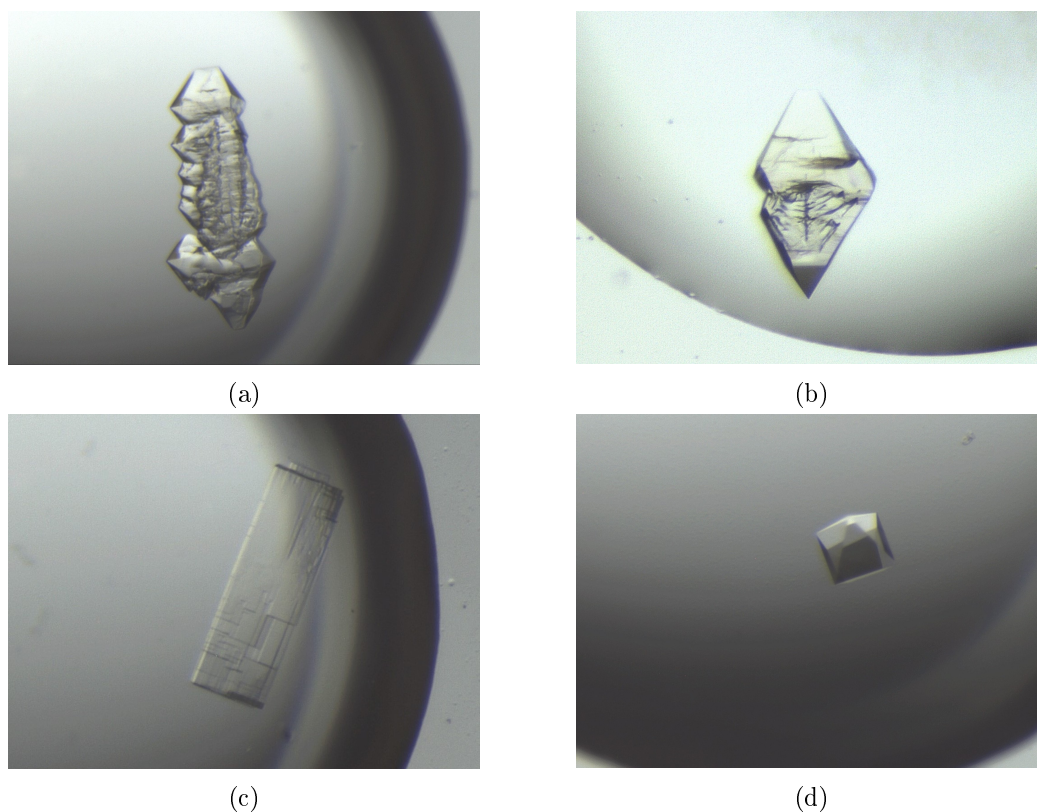


Obrázek P3: Teplotní stabilita směsí S1 (koncentrace $12 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), EDTA a chloridů různých kovů v molárním poměru 1:1:5. Po chelaci a přidání kovů se teplota t_m přibližně vrací na hodnoty nativní S1 (zeleně). Měřeno metodou nanoDSF.



Obrázek P4: Teplotní stabilita směsí S1 (koncentrace $12 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), EDTA a chloridů různých kovů v molárním poměru 1:3:5. Vyšší koncentrace EDTA působí, navzdory následnému dodání kovů, zhoršení teplotní stability proti nativnímu proteinu (zeleně). Výjimkou je přidání niklu, který teplotní stabilitu obnovuje. Tento jev byl dále studován, viz Obr. P2. Měřeno metodou nanoDSF.

Krystalizace



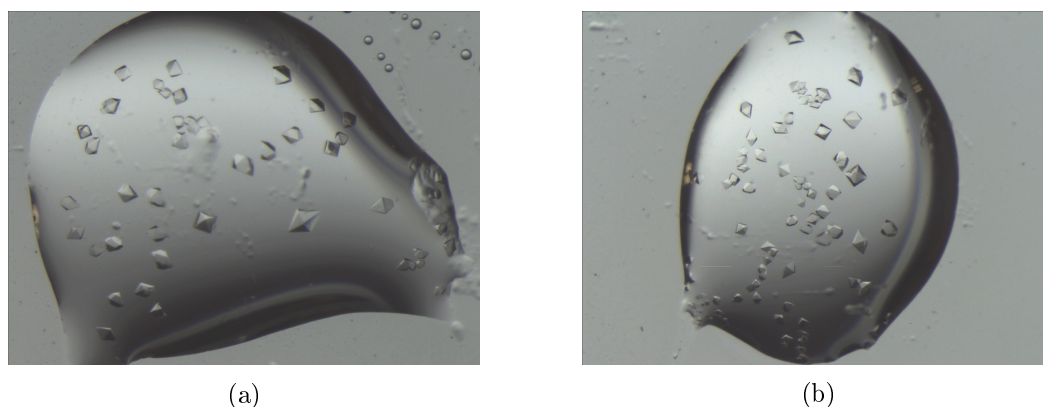
Obrázek P5: Různé tvary krystalů pěstovaných v podmínce PEG 3350, 200 mM NaCl, 50 mM CaCl₂, 100 mM Bis-Tris pH 5,5 metodou visící kapky při teplotě 18 °C. Pokaždé byla použita S1 o koncentraci 12 mg·ml⁻¹.

(P5a) Defektní srostlice S1:EDTA:NiCl₂ v molárním poměru 1:3:5, PEG 3350 25%.

(P5b) Defektní bipyramida S1:EDTA:CoCl₂ v molárním poměru 1:1:5, PEG 3350 25%.

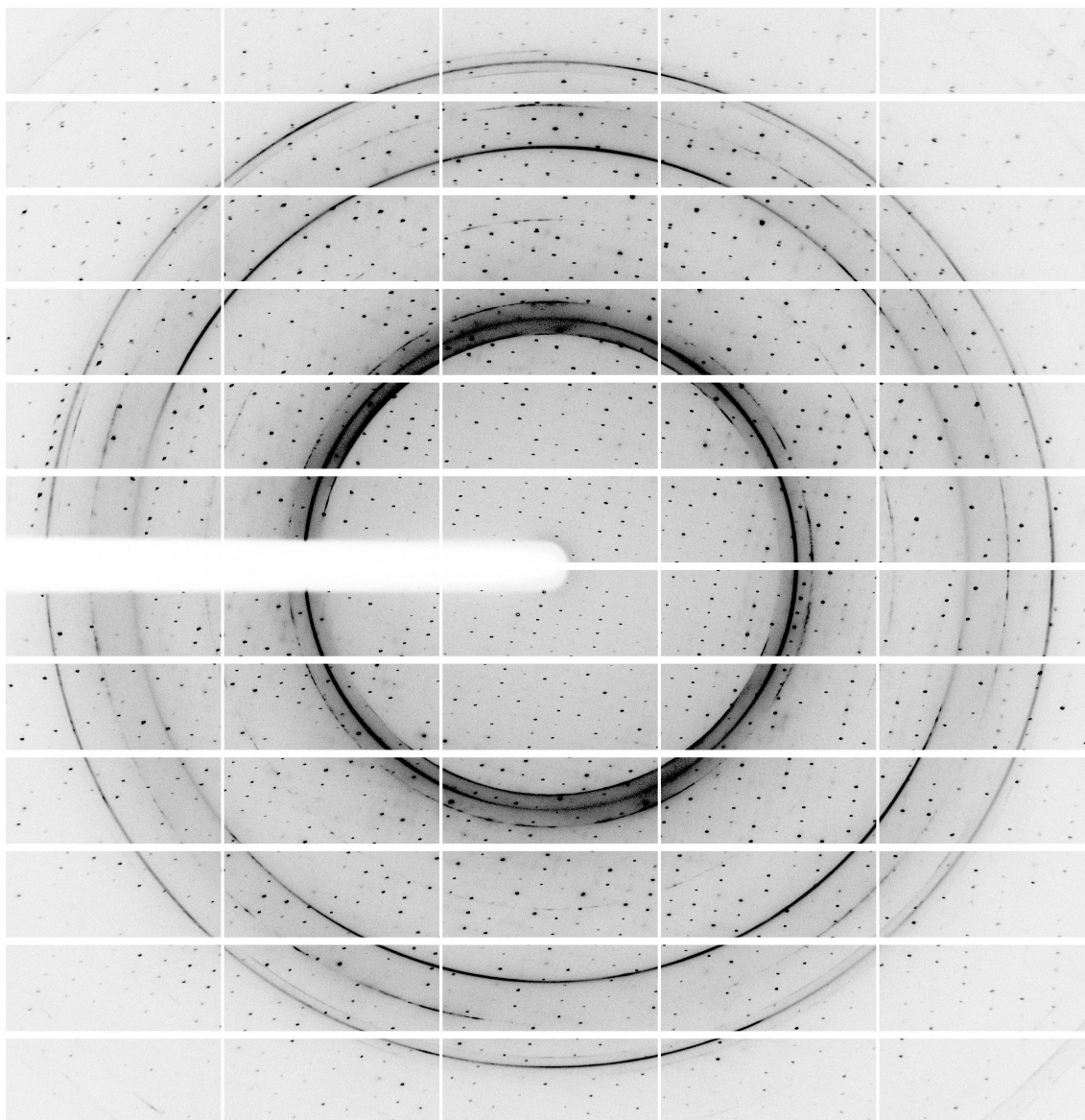
(P5c) Deskový krystal S1:EDTA:CoCl₂ v molárním poměru 1:1:5, PEG 3350 19%.

(P5d) Krystal S1:EDTA:CoCl₂ v molárním poměru 1:1:5, PEG 3350 25%.



Obrázek P6: Bipyramidové krystaly směsi S1:EDTA:CoCl₂ v molárním poměru 1:1:5 získané za využití metody očkování zrna z krystalu stejného druhu. Pěstováno ve visící kapce při teplotě 18 °C v podmínce PEG 3350 23% (P6a), 24% (P6b) (w/v), 200 mM NaCl, 50 mM CaCl₂, 100 mM Bis-Tris pH 5,5. Byla použita koncentrace S1 12 mg·ml⁻¹.

Difrakční experiment



Obrázek P7: Difrakční obrazec krystalu nukleasy S1 ($12 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) s chelačním činidlem EDTA v molárním poměru 1:1, vypěstovaného v podmínce PEG 3350 25% (w/v), 200 mM NaCl, 50 mM CaCl_2 , 100 mM Bis-Tris pH 5,5 (visící kapka, $18 \text{ }^\circ\text{C}$), naměřený na synchrotronu Bessy II, HZB.