

Optimalizace parametrů zpracování difrakčních dat oxidázy z *Microdochium nivale*

Martin Malý¹, Jarmila Dušková², Lars Henrik Østergaard³, Jan Stránský^{1,2},
Leona Švecová^{1,2}, Petr Kolenko^{1,2}, Jan Dohnálek²

¹Katedra inženýrství pevných látek, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, České vysoké učení technické v Praze, Břehová 7, 115 19, Praha 1, Česká republika

²Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i., BIOCEV, Průmyslová 595, 252 50, Vestec, Česká republika

³Novozymes A/S, Brudelysvej 26, DK-2880 Bagsvaerd, Dánsko

Abstrakt

Microdochium nivale je plíseň napadající trávníky. Její karbohydrátová oxidáza má uplatnění v různých průmyslových odvětvích. Krystaly tohoto enzymu byly podrobeny difrakčnímu experimentu na synchrotronu Petra III. Naměřené snímky obsahovaly rozštěpené reflexe. Bylo pozorováno radiační poškození krystalu. Optimální zpracování dat bylo provedeno pomocí softwaru XDS při rozlišení 2,0 Å.

Klíčová slova: Rentgenová strukturní analýza; Difrakce; Radiační poškození.

Úvod

Karbohydrátové oxidázy jsou skupina enzymů katalyzujících oxidaci primárních či sekundárních alkoholů za současné redukce molekulárního kyslíku na peroxid vodíku. Jedná se o flavoenzymy nebo metaloenzymy. Tyto enzymy mají velký potenciál pro využití v biotechnologiích. Jejich navrhované nebo již uskutečněné aplikace jsou například výroba aditiv pro potravinářský a papírenský průmysl, konstrukce biosenzorů na krevní cukr a biosyntéza funkčních chirálních molekul ve farmakologii [1].

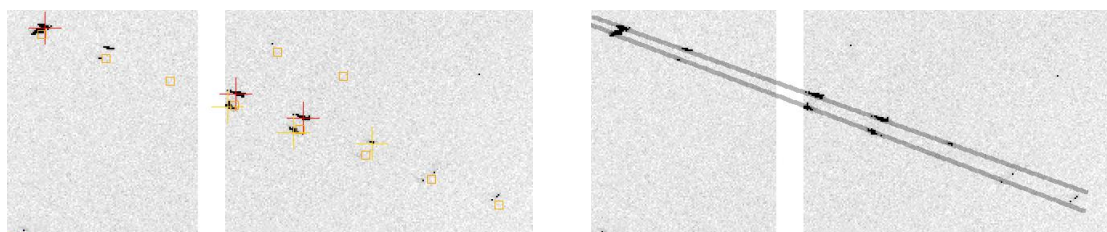
Oxidáza z *Microdochium nivale* (*MnCO*) je glykosylovaný flavoenzym tvořený řetězcem 473 aminokyselin s celkovou relativní molekulovou hmotností okolo 60 kDa s izoelektrickým bodem 9,0. Její nejvíce preferované substráty jsou disacharidy, např. celobióza a laktóza. Prostetická skupina flavinadenin dinukleotid (FAD) je navázána dvěma kovalentními vazbami na reziduích His70 a Cys132. Databáze proteinových struktur PDB [2] obsahuje strukturu *MnCO* (PDB kód 3RJ8) a strukturu komplexu *MnCO* s inhibitorem ABL (PDB kód 3RJA) [3]. Pro plné pochopení funkce tohoto enzymu jsou však potřebná další data odhalující mechanismus vazby ligandů do aktivního místa enzymu.

Experiment

MnCO byla krystalizována metodou visící kapky. Protein o koncentraci 20 mg/ml byl rozpuštěn v pufru obsahujícím 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Krystalizační kapky vznikly smícháním 1 μ l proteinu a 1 μ l rezervoáru o celkovém objemu 1 ml o složení 0,01 M ZnSO₄, 12 % (v/v) PEG550 MME, 0,1 M MES pH 6,5. Krystalizační destičky byly uchovávány při teplotě 298 K. Před měřením byly krystaly namočený do roztoku rezervoáru s přidáním ligandem a poté rychle zmrazeny v kapalném dusíku. Krystaly byly exponovány na synchrotronu Petra III v Hamburku (měřicí stanoviště P 13) zářením o vlnové délce $\lambda = 0,9201$ Å.



Obrázek 1: Difrakční snímek krystalu $MnCO$ pořízený na synchrotronu Petra III (měřicí stanoviště P13) v Hamburku. Snímek zobrazen pomocí programu iMOSFLM [4].



Obrázek 2: Vlevo je ukázána rozštěpená řada reflexí na snímku 3 proložená přímkou. Vpravo je znázorněno označení reflexí programem iMOSFLM [4] (červený kříž značí silné pozorované reflexe použité pro indexaci, žlutý kříž značí slabé pozorované reflexe nepoužité pro indexaci a čtverce znázorňují předpokládanou polohu dalších reflexí).

Vzdálenost vzorku od detektoru byla 419,67 mm. Bylo naměřeno 2 000 snímků rotační metodou, každý při rotaci o úhel $\Delta\phi = 0,1^\circ$, celkem tedy byla provedena rotace o úhel 200° . Jeden z difrakčních snímků je pro ilustraci přeložen na obrázku 1.

Reflexe byly při vizuální inspekci spatřeny při rozlišení $2,25 \text{ \AA}$. Na snímcích byly pozorovány řady rozštěpených reflexí, viz obr. 2. Vzorek je tedy tvořen dvěma krystaly, které pravděpodobně vznikly naštěpením jednoho.

Výsledky a diskuze

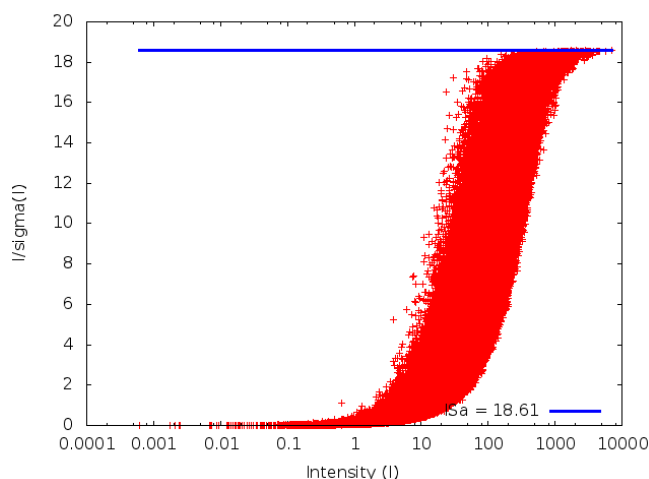
Difrakční data byla zpracována pomocí programu XDS [5]. Prostorová grupa krystalu byla ve shodě s předchozími strukturami stanovena jako $C 1 2 1$ [3]. V průběhu měření docházelo k radiačnímu poškození krystalu a data z konce měření jsou zatížena znatelnou chybou. Pro výsledné zpracování bylo vybráno pouze prvních 1 550 snímků. Výsledné rozlišení difrakčních dat je $2,0 \text{ \AA}$. Souhrn charakteristik zpracování difrakčních dat je uveden v Tabulce 1.

Tabulka 1: Statistické výsledky zpracování difrakčních snímků pomocí XDS. Hodnoty v závorkách odpovídají hodnotám ve slupce s nejvyšším rozlišením.

Použité snímky	1–1 550
Difrakční limit [Å]	50,00–2,00 (2,12–2,00)
Prostorová grupa	$C 1 2 1$
	$a = 132,77$
	$b = 56,99$
Parametry elem. buňky [Å]	$c = 86,88$
	$\alpha = \gamma = 90,00^\circ$
	$\beta = 95,66^\circ$
Počet reflexí	118 941 (17 525)
Počet nezávislých reflexí	42 072 (6 477)
Kompletnost [%]	95 (91)
Redundance	2,8 (2,7)
Mozaicita [°]	0,3
$CC_{1/2}$	0,995 (0,571)
R_{meas}	0,113 (0,898)
R_{merge}	0,093 (0,738)
Wilsonův B-faktor [Å ²]	36
I/σ	9,0 (2,0)

Analýza expozice dat

Difrakční data byla podrobena analýze distribuce intenzit pomocí skriptu *IIs.py* [6]. Tento nástroj používá software XDS a umožňuje odhadnout optimálnost zvolené expozice vzhledem k dosažitelným hodnotám I/σ . Přexponovaná data se vyznačují velkým množstvím intenzivních reflexí s hodnotou I/σ velice blízké limitní hodnotě ISa . Naopak u podexponovaných dat se hodnoty I/σ intenzivních reflexí k ISa neblíží.



Obrázek 3: Graf závislosti poměru difrakční intenzity k chybě měření I/σ na intenzitě I . Limitní hodnota ISa je znázorněna modře.

Reflexe s vysokými intenzitami tohoto měření se hodnotami I/σ ve spoustě případů blíží limitní hodnotě ISa . Krystal tedy nebyl při měření podexponován. Takových reflexí však není výrazně dominantní množství, takže krystal nebyl při měření ani přexponován. To značí, že čas expozice byl nastaven optimálně. Delší expozice by nevedla k vyšším hodnotám I/σ a navíc by se stále více projevovало nežádoucí radiační poškození krystalu. Graf závislosti poměru difrakční intenzity k chybě měření I/σ na intenzitě I pro zde zpracovávaná data je uveden na Obrázku 3.

XSCALE – interpolace dat

Jelikož docházelo k radiačnímu poškození krystalu v průběhu měření, byla učiněna korekce dat vzhledem k tomuto vlivu. Pomocí programu XSCALE [5] byla provedena interpolace dat k hypotetické nulové absorbované dávce záření při doporučeném snímku 350 [7]. Vylepšení indikátorů kvality dat pomocí této interpolace je uvedeno v Tabulce 2.

Tabulka 2: Porovnání statistik indikátorů kvality optimalizovaného zpracování dat provedeného programem XDS a jeho dodatečné interpolace pomocí programu XSCALE. Použitý difrakční limit je 50–2 Å. Hodnoty v závorkách odpovídají hodnotám ve slupce s nejvyšším rozlišením (2,12–2,00 Å).

Software	XDS		XDS & XSCALE	
$CC_{1/2}$	0,995	(0,571)	0,996	(0,613)
R_{meas}	0,113	(0,898)	0,099	(0,847)
R_{merge}	0,093	(0,738)	0,082	(0,697)
I/σ	9,0	(2,0)	11,3	(2,4)

Tabulka 3: Porovnání statistik indikátorů kvality optimalizovaného zpracování dat provedeného programem XDS a jeho dodatečné interpolace pomocí programu XSCALE. Použitý difrakční limit je 50–2 Å. Hodnoty v závorkách odpovídají hodnotám ve slupce s nejvyšším rozlišením (2,12–2,00 Å).

Software	XDS		XDS & XSCALE	
$CC_{1/2}$	0,995	(0,571)	0,996	(0,613)
R_{meas}	0,113	(0,898)	0,099	(0,847)
R_{merge}	0,093	(0,738)	0,082	(0,697)
I/σ	9,0	(2,0)	11,3	(2,4)

Závěr

Difrakční data karbohydrátové oxidázy z *Microdochium nivale* s ligandem byla naměřena a zpracována s rozlišením 2 Å. Během měření docházelo k radiačnímu poškození krystalu. Korekce dat pro zohlednění tohoto vlivu byla provedena metodou interpolace na nulovou dávku. Zpětná analýza distribuce intenzit měřených reflexí ukázala, že radiační poškození nešlo před experimentem relevantně odhadnout. Zpracovaná data budou použita pro řešení struktury oxidázy a vyhodnocení interakce enzymu s ligandem.

Reference

- [1] F. Xu, E. J. Golightly, C. C. Fuglsang, P. Schneider, K. R. Duke, L. Lam, S. Christensen, K. M. Brown, C. T. Jørgensen, S. H. Brown. A novel carbohydrate:acceptor oxidoreductase from *Microdochium nivale*. *Eur. J. Biochem.* **268**: 1136-1142, 2001.
- [2] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **28**: 235-242, 2000.
- [3] J. Dušková, J. Dohnálek, T. Skálová, L. H. Østergaard, C. C. Fuglsang, P. Kolenko, A. Štěpánková, J. Hašek. Crystallization of carbohydrate oxidase from *Microdochium nivale*. *Acta Cryst.* **F65**: 638-640, 2009.
- [4] 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 Cryst.* **D67**: 271-281, 2011.
- [5] W. Kabsch: XDS. *Acta Cryst.* **D66**: 125-132, 2010.
- [6] J. Stránský, J. Dohnálek. Zanedbávaný parametr difrakčního experimentu: expoziční čas. *Sborník příspěvků 5. studentské vědecké konference fyziky pevných látek*. ČVUT v Praze, Praha, 22-27, 2015. ISBN 978-80-01-05842-8.
- [7] K. Diederichs, M. Junk. Post-processing intensity measurements at favourable dose values. *J. Appl. Cryst.* **42**: 48-57, 2009.

Poděkování

Tato práce byla podpořena Interní grantovou agenturou ČVUT (projekt SGS16/246/OHK4/3T/14), Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (projekty NPUII - LQ1604, LM2015043 a LG14009), ERDF (projekt BIOCEV - CZ.1.05/1.1.00/02.0109) a institucionální podporou BTÚ AV ČR, v.v.i. (RVO: 86652036).