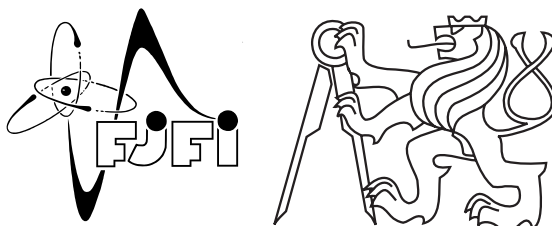


ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE
FAKULTA JADERNÁ A FYZIKÁLNĚ INŽENÝRSKÁ

Katedra inženýrství pevných látek

Obor: Inženýrství pevných látek



Optimalizace parametrů zpracování
difrakčních dat oxidázy
z *Microdochium nivale*

Optimization of processing of diffraction
data of oxidase from *Microdochium nivale*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vypracoval: Martin Malý

Vedoucí práce: Ing. Petr Kolenko, PhD.

Rok: 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci vypracoval samostatně a použil jsem pouze podklady (literaturu, projekty, SW atd.) uvedené v příloženém seznamu.

V Praze dne

.....
Martin Malý

Poděkování

Děkuji Ing. Petru Kolenkovi, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce a za podnětné návrhy, které ji obohatily.

Martin Malý

Název práce:

Optimalizace parametrů zpracování difrakčních dat oxidázy z *Microdochium nivale*

Autor: Martin Malý

Obor: Inženýrství pevných látek

Druh práce: Bakalářská práce

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

Konzultant: —

Abstrakt: *Microdochium nivale* je stopkovýtrusná houba napadající trávníky. Její karbohydrátová oxidáza nachází uplatnění v mnoha průmyslových odvětvích. Krystaly tohoto enzymu byly měřeny na synchrotronu Petra III. Vizuální kontrolou byl odhalen rozštěp krystalu. Data byla zpracována několika programy: XDS, Xia2 a iMOSFLM (se seškálováním pomocí Aimless). Bylo pozorováno radiační poškození krystalu. Optimální zpracování experimentu bylo provedeno pomocí XDS při rozlišení 2,0 Å a vynechání části snímků, na kterých se již výrazně projevilo radiační poškození.

Klíčová slova: oxidáza, proteinová krystalografie, rentgenová strukturní analýza, zpracování difrakčních dat

Title:

Optimization of processing of diffraction data of oxidase from *Microdochium nivale*

Author: Martin Malý

Abstract: *Microdochium nivale* from the phylum Basidiomycota is a pathogen that causes disease in turf grass. The carbohydrate oxidase from this organism has potential in industrial applications. The diffraction data of the crystallized enzyme have been measured at synchrotron Petra III. Visual inspection has revealed split reflections. The data were processed with three software packages: XDS, Xia2 and iMOSFLM (including scaling with Aimless). Radiation damage to the crystal has been observed. The optimal data processing has been done with XDS at resolution 2.0 Å. Images with high influence of radiation damage have been omitted.

Key words: oxidase, protein crystallography, X-ray structural analysis, diffraction data processing

Obsah

Úvod	7
1 Teoretická část	9
1.1 Difrakce rentgenového záření	9
1.1.1 Rozptyl na nabitě částici	9
1.1.2 Laueho rovnice, Ewaldova konstrukce, Braggův zákon	10
1.1.3 Difrakce na krystalu	11
1.2 Experimentální uspořádání	12
1.2.1 Zdroje rentgenového záření	12
1.2.2 Monochromatizace a kolimace	15
1.2.3 Detekce rentgenového záření	17
1.2.4 Uspořádání difrakčního experimentu	20
1.2.5 Rotační metoda	20
1.3 Zpracování difrakčních dat	21
1.3.1 Indikátory kvality	22
1.3.2 Software pro zpracování difrakčních dat	23
1.4 Srovnání s analýzou nízkomolekulárních krystalů	24
1.5 Oxidáza z <i>Microdochium nivale</i>	24
1.5.1 <i>Microdochium nivale</i>	24
1.5.2 Karbohydrátové oxidázy	25
1.5.3 Dosud známá fakta o oxidáze z <i>Microdochium nivale</i>	25
2 Cíle	28
3 Výsledky	29
3.1 Vstupní parametry experimentu	29

3.2	Zpracování pomocí XDS	29
3.3	Zpracování pomocí Xia2 (DIALS a Aimless)	31
3.4	Zpracování pomocí iMOSFLM a Aimless	32
3.5	Analýza expozice dat	35
3.6	XSCALE – korekce radiačního poškození	36
4	Diskuze	37
	Závěr	40
	Seznam použitých zdrojů	41
	Přílohy	44
A	Výstupní soubory programu XDS	45
A.1	Zpracování všech dat	45
A.2	Optimalizované zpracování dat	45
A.3	Interpolace dat pomocí XSCALE	46

Úvod

Experimentální určení struktury pomocí makromolekulární krystalografie je nezastupitelnou a velmi mocnou technikou, která dokáže zodpovědět spoustu biochemických otázek týkajících se daného proteinu. První struktura organické látky byla pomocí krystalografických metod stanovena už ve dvacátých letech 20. století. V počátcích krystalografie bylo objasnění každé struktury obrovský úspěch, zvláště řešení prvních biologických molekul často trvalo několik desítek let. Struktury prvních biologických makromolekul se podařilo určit teprve v padesátých letech 20. století. Významným přelomem bylo použití synchronového záření v osmdesátých letech 20. století.

Význam krystalografie lze dokumentovat tím, že hned několik desítek krystalografů se za krátkou dobu existence této vědní disciplíny stalo laureáty Nobelových cen za chemii, medicínu nebo fyziku. Díky makromolekulární krystalografii známe mimo jiné strukturu penicilinu, inzulínu, hemoglobinu a DNA. Proteinová krystalografie je stále hlavní metoda určování struktury biologicky aktivních molekul.

Proteiny jsou základní stavební a funkční jednotkou organismů, a proto je znalost jejich struktury důležitá pro pochopení principů jejich funkce a také umožňuje racionálně navrhnout úpravy, které povedou ke změně či ovlivnění této funkce. Informace o struktuře proteinů či jiných biologických molekul tak nacházejí velké uplatnění v biotechnologiích a farmaceutickém průmyslu, např. v boji proti rakovině, AIDS nebo Alzheimerově chorobě. Makromolekulární krystalografie je pro určení struktury stěžejní disciplínou.

Proteinová krystalografie prochází i dnes neustálým vývojem. Pokrok je patrný jednak v dokonalejších experimentálních aparaturách (instrumentaci) nebo v nových metodách zpracování dat, které jsou vyžadovány právě na základě nových experimentálních metod a vybavení.

V poslední době došlo k významnému vylepšení konvenčních zdrojů rentgenového záření. Také pracoviště na synchrotronech prochází neustálým vývojem. Intenzita rentgenového záření dostupných zdrojů tak neustále roste a díky tomu lze touto metodou řešit neustále složitější problémy. Další metodický průlom je očekáván se zavedením tzv. „Free-electron laserů“, což jsou ještě výkonnější zdroje než dnešní synchrotrony.

Vývojem prochází také detekce rentgenového záření. Zatímco před rokem 2010 byla většina synchrotronových pracovišť vybavena polovodičovými senzory technologie CCD, na moderních pracovištích (i konvenčních) dnes převažují senzory techno-

logie CMOS. Tyto nové technologie umožňují optimalizovat experiment a současně vyžadují nové přístupy (zejména statistické) ve zpracování experimentálních dat.

Tato práce se zabývá zpracováním difrakčních dat enzymu oxidázy z houby *Microdochium nivale*, která byla naměřena na synchrotronu Petra III v Hamburku. Správné zpracování difrakčních dat je základní a nutnou podmínkou stanovení prostorové struktury makromolekul. Různými postupy zpracování dat lze dojít k mírně odlišným výsledkům, proto budou data analyzována více způsoby. Výsledky budou porovnány a nejlepší zpracování bude použito pro další výzkum.

Kapitola 1

Teoretická část

1.1 Difrakce rentgenového záření

1.1.1 Rozptyl na nabitých částicích

Krystalová strukturní analýza je principiálně založená na difrakci, tzn. interakci paprsků záření s hmotou. Kromě elektronového a neutronového záření je zejména používáno záření rentgenové. Tento druh elektromagnetického záření je velmi vhodný díky tomu, že jeho vlnové délky jsou srovnatelné s meziatomovými vzdálenostmi v krystalech (řádově desítky nanometrů).

Základním předpokladem kinematické teorie difrakce je zanedbání interakcí dopadajících a difraktovaných vln. Index lomu rentgenového záření je ve všech prostředích téměř rovný jedné, takže je možné také zanedbat lom na povrchu krystalu a předpokládat, že se paprsky v krystalu šíří rychlostí světla.

Při dopadu fotonu záření na nabitou částici může docházet k nepružnému (Comptonovu) nebo pružnému (Thomsonovu) rozptylu. Nekoherentní Comptonův rozptyl probíhá vždy, jeho důsledkem je zvolna se měnící pozadí difrakčního obrazu. Z hlediska difrakce je však mnohem důležitější koherentní Thomsonův rozptyl, při němž je zachována velikost vlnové délky záření a který je příčinou vzniku difrakčních maxim. Dopad rovinné vlny záření na nabitou částici vyvolá rozkmitání částice, která se tak stane zdrojem sekundárních vln. Intenzitu koherentního rozptylu nepolarizovaného záření na volné částici o hmotnosti m s nábojem q vyjadřuje Thomsonův vztah

$$I = I_0 \left(\frac{q^2}{4\pi\epsilon_0 mc^2} \right)^2 \frac{1}{r^2} \frac{1 + \cos^2(\theta)}{2}, \quad (1.1)$$

kde I_0 je intenzita dopadajícího záření, r je vzdálenost od rovnovážné polohy, kolem níž částice kmitá, a 2θ je úhel, který svírají směry dopadajícího a difraktovaného paprsku. Poslední součinitel $\frac{1 + \cos^2(\theta)}{2}$ se nazývá polarizační faktor.

1.1.2 Laueho rovnice, Ewaldova konstrukce, Braggův zákon

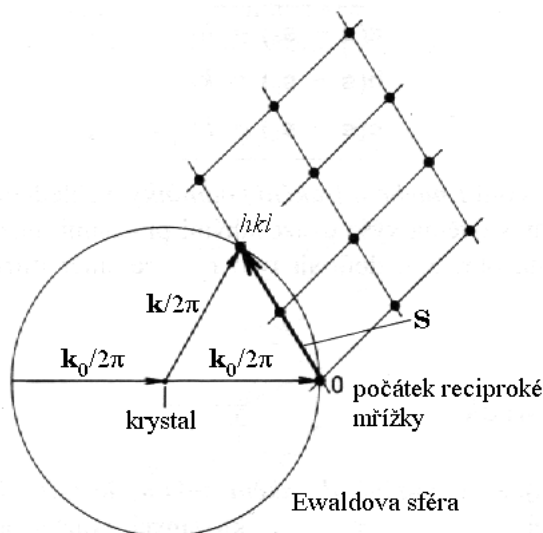
Nechť rovinné vlny monochromatického rentgenového záření vlnové délky λ s vlnovým vektorem \mathbf{k}_0 dopadají na atomy pravidelně uspořádané do krystalické mřížky s parametry \mathbf{a} , \mathbf{b} , \mathbf{c} . Předpokládejme elastický rozptyl: Atomy rozptylují záření a výsledný rozptýlený svazek má stejnou vlnovou délku λ a vlnový vektor \mathbf{k} stejné velikosti a obecně jiného směru. Aby došlo ke konstruktivní difrakci, musí být splněny Laueho rovnice:

$$\begin{aligned} \mathbf{a} \cdot (\mathbf{k} - \mathbf{k}_0) &= 2\pi h \\ \mathbf{b} \cdot (\mathbf{k} - \mathbf{k}_0) &= 2\pi k \\ \mathbf{c} \cdot (\mathbf{k} - \mathbf{k}_0) &= 2\pi l. \end{aligned} \quad (1.2)$$

Dosadíme-li do Laueho rovnic difrakční (neboli rozptylový) vektor definovaný jako $\mathbf{S} = \frac{(\mathbf{k} - \mathbf{k}_0)}{2\pi}$, získáme

$$\begin{aligned} \mathbf{a} \cdot \mathbf{S} &= h \\ \mathbf{b} \cdot \mathbf{S} &= k \\ \mathbf{c} \cdot \mathbf{S} &= l. \end{aligned} \quad (1.3)$$

Do rovnic lze za \mathbf{S} dosadit vektor reciproké mřížky $\mathbf{H}_{hkl} = h\mathbf{a}^* + k\mathbf{b}^* + l\mathbf{c}^*$. Laueho rovnice jsou tedy splněny, když je difrakční vektor \mathbf{S} shodný s některým vektorem reciproké mříže \mathbf{H}_{hkl} , který tudíž udává směry svazků rozptýleným krystalem. Jinak řečeno: Difrakční obraz je zobrazením reciproké krystalové mřížky. To lze demonstrovat pomocí Ewaldovy konstrukce.



Obrázek 1.1: Ewaldova konstrukce: Krystal je umístěn ve středu kulové plochy, tzv. Ewaldovy sféry, s poloměrem $1/\lambda$. V místě, kde primární svazek vychází ze sféry, leží počátek reciproké mřížky krystalu. Pokud se nějaký bod (hkl) reciproké mříže nalézá na Ewaldově sféře, jsou pro osnovu rovin (hkl) splněny Laueho difrakční podmínky.

Protože velikost vektoru reciproké mřížky \mathbf{H}_{hkl} je rovna převrácené hodnotě mezivzdálenosti d_{hkl} , platí

$$|\mathbf{H}_{hkl}| = \frac{1}{d_{hkl}} = |\mathbf{S}| = \frac{2 \sin \theta}{\lambda}, \quad (1.4)$$

z čehož lze jednoduchou úpravou získat Braggův zákon

$$2d_{hkl} \sin \theta = \lambda. \quad (1.5)$$

1.1.3 Difrakce na krystalu

Při popisu rozptylu vln záření na atomu se bere v úvahu jen rozptyl na elektronech v jeho obalu. Jádra atomů jsou totiž mnohem těžší a ze vztahu pro intenzitu rozptýlených vln 1.1 je vidět, že příspěvek intenzity vln rozptýlených jádry do celkové intenzity vln rozptýlených atomem je velice malý, a tedy zanedbatelný. Rozptyl na atomu vyjadřuje veličina **atomový rozptylový faktor**, která je definována jako poměr amplitud dopadajícího a rozptýleného záření. Závisí jen na poměru $\sin \theta / \lambda$ a lze ji získat integrací

$$f(\mathbf{S}) = \int \rho(\mathbf{r}) \exp[2\pi i(\mathbf{S} \cdot \mathbf{r})] dV = \mathcal{F}[\rho(\mathbf{r})], \quad (1.6)$$

kde $\rho(\mathbf{r})$ je rozdělení elektronové hustoty a \mathcal{F} značí operátor Fourierovy transformace. Inverzní Fourierovou transformací atomového rozptylového faktoru je teoreticky možné získat elektronovou hustotu:

$$\rho(\mathbf{r}) = \int f(\mathbf{S}) \exp[-2\pi i(\mathbf{S} \cdot \mathbf{r})] dV = \mathcal{F}^{-1}[F(\mathbf{S})]. \quad (1.7)$$

Popišme nyní difrakci na krystalu, tedy periodicky uspořádaném souboru atomů. Předpokládejme, že rozdělení elektronové hustoty není deformované kvůli působení vazebních sil mezi okolními atomy. Pro popis difrakce na celém krystalu stačí charakterizovat rozptyl na jedné základní buňce. Nechť základní buňku tvoří N atomů, poloha n -tého atomu je $\mathbf{r}_n = x_n \mathbf{a} + y_n \mathbf{b} + z_n \mathbf{c}$ a f_n je jeho atomový rozptylový faktor. Pak veličina popisující difrakci, tzv. **strukturní faktor**, je rovna

$$F(\mathbf{S}) = \sum_{n=1}^N f_n \exp[2\pi i(\mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_n)]. \quad (1.8)$$

Pokud je splněna Laueho podmínka difrakce na osnově rovin (hkl), tj. $\mathbf{S} = \mathbf{H}_{hkl}$, lze strukturní faktor vyjádřit jako

$$F_{hkl} = \sum_{n=1}^N f_n \exp[2\pi i(hx_n + ky_n + lz_n)]. \quad (1.9)$$

Strukturní faktor je zřejmě komplexní číslo:

$$F_{hkl} = A + iB = |F_{hkl}| e^{i\alpha}. \quad (1.10)$$

Při difrakčním experimentu jsme schopni naměřit intenzitu rozptýleného záření, která je však podle kinematické teorie závislá na kvadrátu absolutní hodnoty strukturního faktoru. Fázový úhel α nelze přímo z experimentu stanovit, jeho určení je velmi pracné a označuje se jako tzv. fázový problém.

$$I_{hkl} \sim |F_{hkl}|^2 \quad \tan \alpha = \frac{B}{A} \quad (1.11)$$

1.2 Experimentální uspořádání

1.2.1 Zdroje rentgenového záření

Zdroje rentgenového záření se dělí na konvenční (neboli „domácí“) a nekonvenční. Mezi konvenční zdroje patří zařízení, která si lze pořídit do běžné laboratoře, nemají tedy přehnané rozměry ani pořizovací náklady. Jejich typickým příkladem je rentgenka. Zato k nekonvenčním řadíme synchrotron, což je velký samostatný komplex budov a zařízení.

Rentgenka

Nejdůležitější částí zařízení je vakuová komora z materiálu, který nepropouští rentgenové záření, až na propustné okénko (obvykle z berylia). Katoda je žhavana elektrickým proudem a termoemisí se z ní uvolňují elektrony. Mezi elektrodami je vysoké napětí v řádu desítek až stovek kV, jeho vlivem se uvolněné elektrony urychlují a po fokuzaci dopadají na kovovou anodu-terč.

Právě v důsledku prudkého zpomalování elektronů při jejich kolizích s atomy kovu vzniká rentgenové záření. Většina elektronů však neztrácí energii najednou při jediné srážce, ale po částech při více srážkách, a proto je spektrum vznikajícího rentgenového záření spojitě. Navíc pokud mají urychlené elektrony dost velkou energii, dokáží vyrazit elektron z vnitřních slupek elektronového obalu atomu anody. V důsledku toho může jiný elektron z vyšší energetické hladiny zaujmout toto neobsazené místo a je vyzářena přebytečná energie ve formě fotonu. Vlnová délka těchto fotonů je charakteristická pro daný materiál terče. Spektrum je pak tedy tvořeno ostrými liniemi a má pro různé materiály přesně definované hodnoty maxim.

Jednotlivé linie charakteristického spektra jsou označovány písmeny K, L, M, jelikož odpovídají přechodům elektronů do orbitalů s , p a d . Přejedchod mezi sousedními hladinami se značí α , přechod ob jednu hladinu β atd.

Velkou nevýhodou rentgenových lamp je, že nelze měnit vlnové délky emitovaného rentgenového záření. Jedna rentgenka umí produkovat jen záření o neměnné vlnové délce a pokud bychom chtěli měřit při jiné vlnové délce, musíme k tomu použít jinou rentgenku s terčem z jiného materiálu. Často používanými materiály anody jsou např. měď a molybden.

Rotační rentgenka

Princip fungování rotační rentgenky je v podstatě stejný jako u klasické rentgenky se zatavenou anodou. Anoda však není fixována jako předešlém případě, nýbrž rotuje s úhlovou rychlostí v řádu několik tisíc otáček za minutu. Terč se tedy tolik nezahřívá, na katodu je možné přivádět větší proud a díky tomu rotační anoda poskytuje asi desetkrát větší poměr maximálního příkonu ku ploše ohniska než klasická rentgenka.

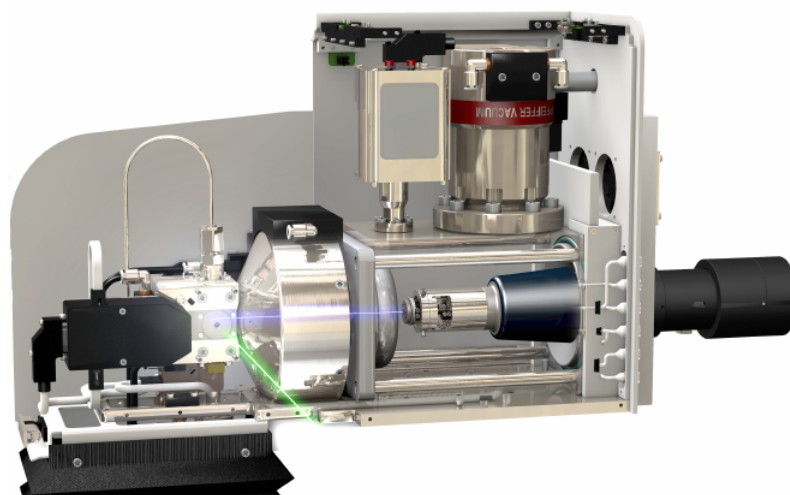
Nevýhodou však je, že celé zařízení potřebuje častější a kvalifikovanější údržbu. Dále je nepříjemné, že intenzita vydávaného záření vlivem otáčení anody fluktuje v čase, což může být při některých specifických měření problém (např. měření anomálního rozptylu).

Zdroje s tekutou anodou

Použití tekuté anody v konvenčním zdroji rentgenového záření je nová technologie. Princip je stále stejný jako u rentgenek, avšak jako terč je použit tekutý kov - slitina galia, india a dalších příměsí - který cirkuluje dokola rychlostí až 75 m/s. To ještě více umožňuje chladit anodu a dosahovat větších intenzit záření.

Charakteristická energie linie K_{α} galia je 9,3 keV, takže je srovnatelná s charakteristickou energií linie K_{α} mědi, která je 8,0 keV. Také charakteristická energie linie K_{α} india (24,2 keV) je blízká charakteristické energii K_{α} stříbra (22,2 keV). Zdroje s tekutou anodou jsou díky tomu dobrá náhrada klasických rentgenek: produkují záření o podobných charakteristických vlnových délkách a přitom o větší intenzitě.

Technologie zdrojů s tekutou anodou stále prochází velkým vývojem. Přístroj Excillum MetalJet využívající tuto technologii je v současnosti dostupný v Biotechnologickém a biomedicínském centru Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci.



Obrázek 1.2: Vnitřní konstrukce zdroje Excillum MetalJet – vlevo nahoře je vidět trubice s tekutou anodou, katoda je umístěna vpravo, zeleně je vyznačen výsledný paprsek emitovaného rentgenového záření. [26]

Synchrotron

Synchrotrony jsou obrovská zařízení, ve kterých se pohybují po přibližně kruhové dráze elektrony či pozitrony urychlené na relativistické rychlosti. Princip je založen na jevu, že elektricky nabitá částice, která se pohybuje pod vlivem magnetického pole, emituje elektromagnetické záření. Toto záření může mít obecně různé spektrum, proto se v synchrotronech urychlují částice na rychlosti srovnatelné s rychlostí světla, čímž se spektrum emitovaného záření rozšíří až do vyšších energetických oborů, takže je produkováno i rentgenové záření.

Praktická konstrukce synchrotronu je zpravidla následující: Elektrony či pozitrony jsou nejprve urychleny lineárním urychlovačem. Pak jsou injektovány do kruhového urychlovače (boosteru) s poloměrem v řádu jednotek metrů, kde jsou dále urychlovány. Když už je jejich energie dostatečně vysoká, pokračují do akumulárního prstence, kde krouží několik hodin.

Akumulární prsteneček obsahuje mnoho komponent. Pohyb částic po kruhových drahách zajišťují ohybové magnety. Prsteneček tedy není dokonalý kruh, ale spíše pravidelný mnohoúhelník, jelikož k zakřivení dráhy částic probíhá jen v ohybových magnetech a úseky drah mezi nimi jsou přímé. Právě na ohybových magnetech je generováno díky změně dráhy nabitých částic v magnetickém poli rentgenové záření, které je emitováno ve směru tečny prstence v daném místě. Záření také vzniká ve speciálních prvcích, undulátorech a wigglerch, které budou popsána později. Emitované záření se vyvádí evakovanou trubicí na jednotlivá experimentální pracoviště. Dále jsou přítomny elementy RF, což jsou zařízení, která dodávají částicím doplňkovou energii ve formě radiofrekvenčního elektromagnetického pole, aby kompenzovaly energetický úbytek zapříčiněný zářením částic. Na prstenci musí také být nainstalován element umožňující injekci částic z meziurychlovače.

Spektrální rozdělení produkovaného záření je velmi široké – jsou emitovány fotony v oboru infračerveného až rentgenového záření. Charakterizuje ho veličina kritická vlnová délka λ_c . Odpovídá takové hodnotě, pro kterou platí, že polovina energie je vyzářena fotony o vlnových délkách $\lambda < \lambda_c$. Zajímavé je, že takových fotonů je z celkového počtu jen 9 %. Experimenty bývají většinou prováděny se zářením o vlnových délkách v rozmezí od $1/4 \lambda_c$ do $4 \lambda_c$.

Pro dnešní synchrotrony je typické použití výše zmíněných wigglerů a undulátorů, jež se vkládají do jednotlivých experimentálních stanovišť za ohybovým magnetem akumulárního prstence. Jsou to zařízení s periodickým umístěním magnetů se střídající se polaritou. Perioda magnetických polí se pohybuje v řádu milimetrů až centimetrů. Nabitá částice při průchodu takovým elementem zvolní svoji dráhu. Zařízení se dělí podle velikosti magnetické indukce magnetů; element s velmi vysokou magnetickou indukcí se nazývá wiggler, zatímco prvek s nízkou magnetickou indukcí se označuje jako undulátor.

- V případě **wigglerů** je intenzita magnetického pole tak vysoká, že se trajektorie prolétající částice zvolní natolik výrazně, že se wiggler chová jako soustava ohybových magnetů. Díky tomu je spektrum velmi podobné spektru záření na ohybových magnetech. Intenzita záření se zvyšuje tolikrát, kolik má prvek pe-

riod magnetického pole. Z toho plyne, že kritická vlnová délka λ_C je posunuta k nižším hodnotám, proto jsou wigglery někdy označovány jako posouvače vlnových délek.

- V undulátorech je naopak používáno slabé magnetické pole, jenž je nejčastěji generované sérií permanentních magnetů. Záření téhož elektronu emitované v jednotlivých prvcích magnetického pole spolu koherentně interferuje, takže se sčítají amplitudy. Výsledné produkované záření má tedy spektrum tvořené relativně ostrými harmonicky umístěnými píky. Vlnové délky záření jsou závislé také směrově. Pro ilustraci: intenzita emitovaného záření na undulátoru s n póly je při nulovém pozorovacím úhlu zesílena přibližně n^2 -krát.

Vlastnosti rentgenového záření produkovaného nekonvenčním synchrotronovým zdrojem jsou v mnoha ohledech vhodnější pro experiment než vlastnosti záření emitovaného konvenčními zdroji. Ty nabízejí záření o jen několika různých vlnových délkách podle toho, jaký materiál byl použit jako terč ostřelovaný elektrony. Naopak synchrotron je schopný poskytovat široké spektrum záření, vlnovou délku je možno si volit. Toho se využívá například při řešení fázového problému. Další velkou výhodou je o několik řádů větší intenzita synchrotronového záření. Díky tomu je sběr dat na synchrotronech rychlejší, je možné analyzovat vzorky o velice malých rozměrech v řádu několika μm^3 a data mají větší rozlišení. Velkou výhodou synchrotronového záření je jeho lineární polarizace v rovině akumulárního prstence a eliptická polarizovatelnost nad a pod touto rovinou. Není tedy pro intenzity difraktovaného záření třeba používat různé opravy pro polarizační efekty jako u konvenčních zdrojů.



Obrázek 1.3: Synchrotron Bessy II (Helmholtz-Zentrum Berlin) – vlevo je letecký pohled [20], vpravo pohled zevnitř [19].

1.2.2 Monochmatizace a kolimace

Při realizaci difrakčního experimentu potřebujeme, aby použité rentgenové záření bylo monochromatické a jeho paprsky se šířily rovnoběžně. Popsané zdroje však záření s takovými ideálními vlastnostmi neemitují. Proto se v experimentálním uspořádání používají další prvky, díky nimž je možné upravit vlastnosti záření na vhodnější.

Filtry

Použitím filtru je možné do jisté míry dosáhnout monochromatického záření. Princip filtrů je jednoduchý: Rentgenovému záření za dá do cesty vhodný materiál, který nepropustí fotony s malou energií a fotony s energiemi, které odpovídají energiím potřebným pro vyražení elektronu atomu materiálu filtru z orbitalu.

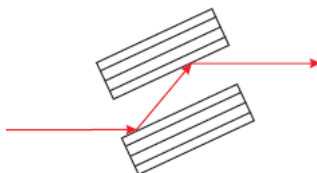
Spektrum záření emitované konvenčními zdroji obsahuje více maxim K_α, K_β, \dots , jak již bylo zmíněno v odstavci o rentgenové lampě. Empirickými zkušenostmi se došlo k následujícímu poznatku: Pokud chceme pro experiment použít jen záření o vlnové délce odpovídacích linií K_α , lze toho dosáhnout použitím filtru z materiálu, který je tvořen atomy prvku s protonovým číslem o jedna menším, než je protonové číslo anody konvenčního zdroje. Tato skutečnost platí pro protonová čísla menší nebo rovno 70. Navíc pro prvky s protonovým číslem menším než 40 lze použít také filtr tvořený atomy prvků s protonovým číslem o dva menší. Konkrétně záření emitované zdrojem s měděnou anodou lze tímto způsobem do jisté míry zmonochromatizovat filtry z niklu a kobaltu.

Nevýhodami filtrů jsou podstatný pokles intenzity záření a nepříliš selektivní monochromatizace.

Krystalové monochromátory

Dalším a mnohem selektivnějším způsobem, jak docílit monochromatického záření, je použití krystalových monochromátorů, nejčastěji vyrobených z velice kvalitního bezdislokačního monokrystalu křemíku. Emitované nemonochromatické rentgenové záření se pod malým úhlem θ nechá dopadat na monokrystal-monochromátor. Dochází k odrazu a difraktované záření je pozorováno rovněž pod úhlem θ , který závisí podle Braggovy rovnice na vlnové délce. Zvolením určitého úhlu tedy zapříčiní volbu úzkého intervalu příslušných vlnových délek, které se budou odrážet.

Existuje spousta typů krystalových monochromátorů. Nejjednoduším je rovinný monochromátor v symetrickém uspořádání, jehož difraktující roviny jsou rovnoběžné s povrchem. Pokud difraktující roviny svírají s povrchem krystalu malý úhel, pak se jedná o monochromátor v asymetrickém uspořádání a kromě monochromatizace také dochází k rozšíření či zúžení svazku rentgenového záření. Velmi časté je použití monolytických dvoukrystalových monochromátorů. Monochromátory vytvořené z ohnutých krystalů do tvaru např. eliptického válce mají navíc schopnost směrové fokuzace paprsků.



Obrázek 1.4: Nákres monolytického dvoukrystalového monochromátoru, jehož difraktující rovina je rovnoběžná s povrchem krystalu [15].

Kolimátory

Pomocí kolimátorů se dosahuje co největší rovnoběžnosti paprsků rentgenového záření. Zařízení tvoří podlouhlý úzký dutý válec s dvěma obvykle kruhovými clonami, každá z nich se nalézá na jiné straně a dohromady určují rentgenový paprsek. Na výstupní straně kolimátoru je navíc ještě třetí ochranná clona, která sice nemá vliv na tvar paprsků, ale eliminuje záření, jež se rozptyluje na hranách clon.

Na vstupní clonu kolimátoru září paprsky záření ze zdroje a na opačné straně vychází záření ve formě přibližně rovnoběžných paprsků.

Rentgenová zrcadla

Pomocí rentgenových zrcadel je možné monochromatizovat a fokuzovat rentgenové záření najednou. Rentgenové paprsky jednotlivých vlnových délek se od zrcadla odrazí, pokud dopadají pod úhlem menším než je kritický úhel, jenž závisí na vlnové délce záření.

Rentgenová zrcadla jsou velice vhodná pro monochromatizaci záření z konvenčních zdrojů. Pokud se zvolí úhel dopadu jen o trochu větší než je kritický úhel příslušný vlnové délce linie K_α , fotony s kratšími vlnovými délkami než je vlnová délka linie K_α odraženy nebudou. Takže nebudou odraženy ani paprsky odpovídající linii K_β a výsledné záření bude přibližně monochromatické o vlnové délce linie K_α .

Velice výhodné je použití zakřiveného zrcadla ve tvaru eliptického válce: Pokud je zdroj umístěn v jednom z ohnisek elipsy, paprsky odraženého záření budou mířit do ohniska druhého, kde pak bude získáno záření s velmi vysokou intenzitou. To nachází uplatnění u silných konvenčních zdrojů: zrcadlo soustřeďuje záření z velkého prostorového úhlu a výsledná intenzita v ohnisku je tak vysoká, že by pro její dosažení bez užití zrcadla muselo záření pocházet ze zdroje s několikanásobně vyšším nominálním příkonem. Dvojice zrcadel ve tvaru eliptického válce, které mají navzájem kolmé osy, se často používá na synchrotronových zdrojích při měření velmi malých makromolekulárních krystalů.

1.2.3 Detekce rentgenového záření

Jako první byly k detekování difraktovaných paprsků používány klasické fotografické filmy. Další technologií jsou plynem plněné detektory, které tvoří hermeticky uzavřená nádoba se dvěma elektrodami s rozdílným potenciálem vyplněná zpravidla argonem či xenonem a malým množstvím oxidu uhličitého nebo metanu. Dopadající záření způsobuje ionizaci plynu v nádobě a na elektrodách lze naměřit odpovídající změnu napětí. Podle velikosti přiváděného napětí na elektrody se tyto detektory dělí na ionizační komory, proporcionální detektory a Geiger-Müllerovy detektory.

V dnešní době jsou hlavně pro analýzu krystalů tvořených malými molekulami významné scintilační detektory. Fotony záření jsou absorbovány fluorescenčním krystalem, čímž dochází k ionizaci atomů krystalu za současné emise světla, které je dále

zesíleno pomocí fotonásobiče a může být detekována jeho intenzita. Pro potřeby makromolekulární krystalografie je však použití scintilačních detektorů nevhodné, protože jsou schopné v jednom časovém okamžiku měřit intenzitu jen jedné reflexe.

Mnohdrátový proporcionální detektor je zařízení, které už dokáže měřit intenzity více reflexí najednou. Princip fungování je analogický jako u proporcionálního detektoru, navíc jsou však v komoře tři sady rovnoběžných elektrod – dvě krajní jsou na sebe kolmé katody a mezi nimi se nalézá anoda, která je rovnoběžná s jednou z katod. Díky tomu je zaznamenávána i poziční informace. Rozlišení je dáno počtem použitých drátů, které tvoří elektrody, nejčastěji jde o počty 128x128 nebo 256x256. Nevýhodou těchto detektorů je nízká rychlost, vysoká hmotnost a malé rozlišení.

Jiným typem pozičně citlivých detektorů jsou obrazové desky. Fungují podobně jako fotografický film, lze je však použít opakovaně. Jedná se o desky s vrstvou obsahující BaFBr, které se aktivují ionty Eu^{2+} . Vyvolání difrakčního obrazce, které je založeno na jevu fotostimulované luminiscence, je možné až po jeho kompletním naměření. Obrazové desky jsou mnohem citlivější a mají velkou rozlišovací schopnost v porovnání s fotografickými filmy, jejich nevýhodou je ale omezená linearita, velký rozměr a váha.

Nejčastěji používanými detektory v proteinové krystalografii jsou plošné detektory s polovodičovými prvky technologie CCD (Charge-coupled device) nebo CMOS APS (Complementary metal oxide semiconductor Active pixel sensor). Jejich výhodou je velmi dobrá citlivost i rozlišení a malé rozměry. Protože jsou jednotlivé detekční body velmi malé (mají velikost v řádu mikrometrů), jsou pozorované fotony odváděny zužovacím segmentem z optických vláken do samotného polovodičového detektoru. Nevýhodou tohoto typu detektorů je jejich teplotní šum, je tedy nutné intenzivně chladit jejich polovodičovou část.

CCD

CCD je elektronická součástka schopná snímání obrazu. Má široké uplatnění, kromě detektorů v popisovaném experimentu je používána například v digitálních fotoaparátech, čtečkách čárových kódů, faxech a skenerech. Před samotným detektorem se umísťuje velká fosforeskující deska, která převádí fotony rentgenového záření na fotony viditelného světla. Ty dále pokračují optickými vlákny k CCD a jsou měřeny.

CCD prvek se skládá z polovodiče spojeným s anodou a výstupním zesilovačem a mnoha dalšími ekvidistantně vzdálenými katodami, které od polovodiče izoluje tenká vrstva průsvitného izolantu, zpravidla skla. Před zaznamenáváním obrazu je třeba odebrat z CCD bez přístupu světla všechny volné elektrony. Při expozici světlem se na každou třetí katodu v pořadí přivede kladné napětí, každá taková katoda představuje jeden pixel vznikajícího snímku. Dopadající fotony procházejí vrstvičkou skla, na základě fotoelektrického jevu excitují elektrony v polovodiči a ty, které přešly až do vodivostního pásu, jsou hned přitahovány nejbližší katodou. V polovodiči zůstávají kladně nabitě díry, které jsou přitahovány anodou spojenou s polovodičem.

Uzavřením závěrky expozice končí a je třeba zpracovat náboje, které se vyskytují u jednotlivých katod představujících pixely. Na katody se proto začne přivádět tzv.

trojfázový hodinový signál: na nabitých katodách se začne snižovat napětí za současného zvyšování napětí na té z dvou sousedních katod, která je blíž výstupnímu zesilovači. Díky tomu se shluky elektronů posunou právě k té nově nabité katodě. Tento postup se opakuje a elektrony se postupně posunují až k výstupnímu zesilovači, který zesílí malý proud generovaný jednotlivými shluky elektronů.

Náboj, který určoval nasnímaný obraz, byl tedy převeden na elektrický proud, tedy analogový signál, jenž byl nakonec zesílen a je možno ho dále zpracovávat. Před samotným dalším zpracováním je většinou analogový signál převeden na digitální. Je třeba poznamenat, že kromě výše popsaného CCD s třífázovým čtením existují také CCD detektory s dvoufázovým či čtyřfázovým čtením.

CMOS APS

V současnosti se od technologie CCD upouští a stále více se využívá aktivních pixelových snímačů CMOS APS, ať už v detektorech záření nebo digitálních fotoaparátech. Senzor je vyleptán do křemíkového čipu a je tvořen mnoha malými elektrickými obvody. Základní princip fungování zůstává stejný jako u CCD senzoru: na základě fotoelektrického jevu fotony excitují elektrony v polovodiči, jenž je od katody oddělen průsvitným izolantem.

Každý pixel zde však představuje malý samostatný integrovaný obvod, který obsahuje i vlastní výstupní zesilovač a často i převaděč analogového signálu na digitální. Převedení elektrických nábojů na elektrický proud, jeho zesílení a konverze na digitální signál tedy probíhá oproti CCD paralelně. V prvcích CMOS lze díky tomu použít operační zesilovače s užší šířkou pásma, takže výsledný snímek obsahuje méně šumu.

Také celkové zpracování obrazu po expozici je rychlejší, takže technologie CMOS umožňuje zaznamenat mnohem více snímků za jednotku času než CCD. Navíc mají prvky CMOS větší dynamický rozsah. Paralelní konstrukce technologie CMOS však způsobuje nižší uniformitu výstupu, což je v případě popisovaného experimentu dost nežádoucí. Tyto odchylky je nutno při zpracování difrakčních dat korigovat škálovacími faktory. Díky velmi malým rozměrům lze jednotlivé prvky CMOS skládat vedle sebe a vytvářet větší detektory s velmi dobrým rozlišením; např. detektor Dectris Pilatus 6M je sestaven z 60 základních prvků CMOS.

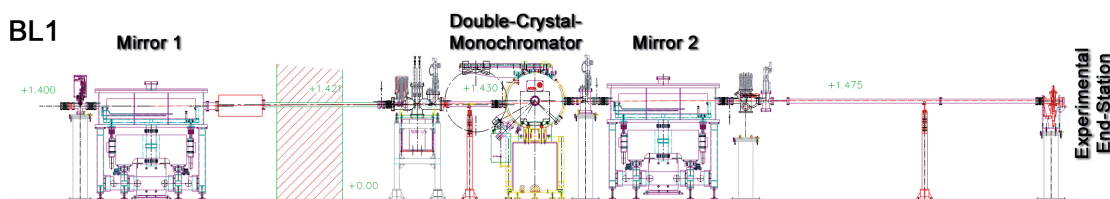
Některé detektory založené na této technologii už nepoužívají fosforeskující desku a měřeny jsou tudíž přímo fotony rentgenového záření.



Obrázek 1.5: Detektory Dectris Pilatus X Series s počty pixelů od 0,1 Mpx do 6 Mpx využívající technologie CMOS. [25]

1.2.4 Uspořádání difrakčního experimentu

Difrakční experiment se skládá ze zdroje záření, kombinace výše zmíněných prvků pro vylepšení vlastností paprsků, goniometru, ve kterém se nachází vzorek, a detektoru. Příkladem může být uspořádání na měřicím stanovišti 14.1 na synchrotronu Bessy II (Helmholtz-Zentrum Berlin). Synchrotronem produkované fotony rentgenového záření mají nastavitelnou energii v rozmezí 5–15,5 keV. V aparatuře jsou použita dvě křemíková rentgenová zrcadla a mezi nimi dvojitý křemíkový krystalový monochromátor (rovina (111)). Vzorek je umístěn v MD2 & Minikappa goniometru a chlazen dusíkem. Difrakční obrazec je zaznamenáván polovodičovým detektorem Dectris Pilatus 6M založeným na technologii CMOS.



Obrázek 1.6: Sestavení difrakčního experimentu na měřicím stanovišti 14.1 synchrotronu Bessy II (Helmholtz-Zentrum Berlin). Paprsek rentgenového zrcadla je emitován zleva a postupně prochází rentgenovým zrcadlem, dvojitým křemíkovým monochromátorem a druhým rentgenovým zrcadlem. [24]

1.2.5 Rotační metoda

Makromolekulární krystaly mají v porovnání s nízkomolekulárními krystaly podstatně větší bázi své krystalové struktury, a tedy i jejich mřížkové parametry musí být mnohem větší. Reciproká mřížka, jejíž parametry závisí na recipročných hodnotách mřížky přímé, je proto u proteinových krystalů velice hustě obsazena. Při použití běžných metod měření reflexí by vznikaly problémy: Naměření všech reflexí by trvalo příliš dlouho a navíc by pravděpodobně docházelo k překryvu sousedních reflexí. Pro měření reflexí proteinových krystalů se tedy používají metody rotační či oscilační, které takové nedostatky nemají.

Na makromolekulární krystal se září monochromatickým rentgenovým zářením za současného rotování, resp. oscilování krystalu o malý úhel $\Delta\phi$ podle osy kolmé na rentgenové paprsky. Takových expozic při stejné ose rotace je provedeno několik. Difraktované záření je detekováno plošným detektorem technologie CCD nebo CMOS.

Princip rotační metody se dá nejnázorněji předvést pomocí Ewaldovy konstrukce. Díky hustě obsazené recipročné mřížce makromolekulárních krystalů je téměř jisté, že v jedné poloze krystalu se na Ewaldově sféře nalézá hned několik uzlových bodů recipročné mřížky, pro něž je splněna Braggova podmínka a difraktují záření do různých směrů. Na plošném detektoru je tedy možno zachytit difrakční obrazec, který tvoří reflexe umístěné na několika soustředných kružnicích. Reflexe náležící stejné kružnici odpovídají rovině uzlových bodů s jedním stejným indexem.

Reálné uzlové body mají však nezanedbatelný objem, což je způsobeno zejména tím, že reálné rentgenové záření není dokonale monochromatické a jeho paprsky nejsou ideálně rovnoběžné. Proto je potřeba, aby se s krystalem rotovalo či oscilovalo. Naměřené difrakce pak odpovídají uzlovým bodům, které díky rotaci postupně přecházejí přes Ewaldovu sféru. To se dá také znázornit tak, že Ewaldova sféra rotuje a body, které se nalézají v místě, které vymezuje počáteční a konečná poloha Ewaldovy sféry, splňují Braggovu podmínku difrakce. Pozorované reflexe se tedy nalézají v párech půlměsíců, tzv. lunet, přičemž reflexe příslušné jednomu páru lunet odpovídají téže uzlové rovině reciprokého prostoru.

Jelikož rotace či oscilace probíhá jen přes malý úhel $\Delta\phi$, jsou naměřeny jak celé reflexe, které odpovídají uzlovým bodům, které přešly celé přes Ewaldovu sféru, tak rovněž částečné reflexe, jejichž uzlové body celým objemem přes sféru nepřešly. Těchto částečných reflexí je nezanedbatelná část a lze je dále použít. Zbytek reflexe bude totiž naměřen při příští expozici nebo už byl naměřen při expozici minulé. Proto je nutné, aby expozice na sebe bezprostředně navazovaly.

V blízkosti osy rotace, resp. oscilace, se však nalézá tzv. zakázaná oblast. Pro body z této oblasti je nemožné přejít přes Ewaldovu sféru. Aby byla získána kompletní data, je tedy třeba změřit dvě série expozic, které mají odlišné osy rotace krystalu, nebo při nichž je krystal jinak orientován.

1.3 Zpracování difrakčních dat

Po měření rotační metodou je zpravidla k dispozici několik set až tisíce difrakčních snímků, které je třeba vyhodnotit. Bylo vyvinuto několik počítačových programů, které jednotlivé kroky zpracování dat automatizují, např. soubor programů HKL, iMOSFLM (součást softwarového balíku CCP4) a XDS. Celý proces zpracování difrakčních dat se skládá z indexace jednotlivých reflexí, stanovení Laueho grupy, integrace intenzit reflexí, škálování a určení prostorové grupy. Mezi jednotlivými kroky lze ještě dále upřesňovat různé parametry (např. rozměry buňky, úhly, vzdálenost vzorek-detektor).

Pro indexaci se volí několik vhodných snímků s úhlovým rozdílem. Proces začíná určením poloh jednotlivých reflexí. Samotná indexace, tzn. přiřazení Laueho indexů jednotlivých nalezeným reflexím, využívá zákonitosti difrakčního obrazce, např. reflexe příslušné stejné lunetě mají jeden index společný aj. Aby byla indexace provedena úspěšně, musí být správně určena poloha primárního svazku, jeho vlnová délka a vzdálenost krystalu od detektoru.

Z pozic jednotlivých oindexovaných reflexí a zejména rozdílových vektorů těchto pozic lze následně určit parametry základní buňky. Z její symetrie se stanoví Laueho grupa, které krystal náleží.

Během měření jsou zaznamenávány nejen konstruktivně difraktující paprsky, ale také pozadí, které nic nevyovídá o struktuře krystalu a je nutné ho odečíst. Při tzv. profilové analýze se na intenzivní reflexe prokládá např. Gaussova funkce nebo polynom. Takto předpovězený profil je pak uplatněn i na reflexe s nižší intenzi-

tou a prokládané funkce všech reflexí jsou následně zintegrovány. Během procesu integrace mohou být parametry základní buňky dále upřesňovány.

Prostorová grupa nezávisí nejen na poloze reflexí, ale také na jejich intenzitě. Analýzou shody poloh a intenzit předpokládaných symetricky sdružených reflexí tedy lze určit prostorovou grupu symetrie krystalu.

1.3.1 Indikátory kvality

Pro vyjádření kvality zpracování dat byla zavedena řada statistik. Nejčastěji používanými statistikami jsou v současnosti faktory R_{merge} a R_{meas} a poměr I/σ , které jsou definovány následujícími vztahy:

$$R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_{i=1}^{N_{hkl}} |I_{i,hkl} - \overline{I_{hkl}}|}{\sum_{hkl} \sum_{i=1}^{N_{hkl}} I_{i,hkl}}, \quad (1.12)$$

$$R_{\text{meas}} = \frac{\sum_{hkl} \sqrt{\frac{N_{hkl}}{N_{hkl}-1}} \sum_{i=1}^{N_{hkl}} |I_{i,hkl} - \overline{I_{hkl}}|}{\sum_{hkl} \sum_{i=1}^{N_{hkl}} I_{i,hkl}}, \quad (1.13)$$

$$I/\sigma = \frac{1}{N} \sum_{hkl} \frac{|I_{hkl}|}{\sigma(I_{hkl})}, \quad (1.14)$$

kde N_{hkl} označuje multiplicitu reflexí s indexy (hkl) , $\overline{I_{hkl}}$ průměr všech intenzit $I_{i,hkl}$ s indexy (hkl) , N počet naměřených reflexí a $\sigma(I_{hkl})$ rozptyl intenzity reflexe (hkl) . Dále je důležitý Pearsonův korelační koeficient $CC_{1/2}$, který je definován pro dvě náhodně vybrané poloviny naměřených dat I_i a J_i vztahem

$$CC_{1/2} = \frac{\sum_{i=1}^{N/2} (I_i - \bar{I})(J_i - \bar{J})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{N/2} (I_i - \bar{I})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^{N/2} (J_i - \bar{J})^2}}. \quad (1.15)$$

Čím jsou R-faktory menší a I/σ a $CC_{1/2}$ větší, tím by měla být data zpracována kvalitněji. Názory na jejich interpretaci a konkrétní přípustné hodnoty těchto parametrů se ale mnohdy liší.

1.3.2 Software pro zpracování difrakčních dat

XDS

XDS (X-ray Detector Software) je program pro zpracování dat získaných rotační metodou [7], pracuje pouze v textovém režimu, ale existuje několik grafických nástaveb, které většinou poskytují grafický náhled na snímky i průběhy funkcí. Nejdříve je nutné spustit inicializační procesy XYCORR a INIT. COLSPOT vybírá intenzivní reflexe pro indexaci a IDXREF podle toho navrhne možné prostorové grupy. Není žádné omezení, kolik snímku se pro indexaci může použít. Potom je už možné vykonat proces DEFPIX, který navrženou grupu promítne do prostoru reflexe. INTEGRATE tyto reflexe zintegruje na detektoru. Vytváří trojrozměrný profil reflexí, který dále používá ke zpracování dalších (slabších) reflexí. Nakonec proces CORRECT provede sjednocení a seškálování reflexí. Součástí softwarového balíku je také program XSCALE poskytující pokročilejší možnosti škálování.

iMOSFLM/Aimless

Programy iMOSFLM a Aimless jsou součástí programového balíku CCP4. iMOSFLM je grafická nástavba programu MOSFLM [1]. Indexaci reflexí je možno provést na omezeném počtu snímků. Program umožňuje zobrazení difrakčních snímků včetně znázornění oindexovaných i předpovězených reflexí. Lze tedy provádět vizuální kontrolu výpočtů programu i během jeho běhu. Po určení prostorové grupy a tedy i mřížkových parametrů je vhodné provést ještě její upřesnění, které probíhá iterativní metodou. Posledním krokem je integrace, přičemž profily integrovaných reflexí jsou v průběhu zobrazovány a proces může díky tomu být opět vizuálně kontrolován. 2D profily pro fitování a integraci reflexí představují určitou nevýhodu vzhledem k programu XDS, která se projeví zvláště u dat sbíraných při malých oscilačních úhlech $\Delta\phi$ na jednu expozici (tzv. „fine slicing“) [10]. Na program iMOSFLM navazuje program Aimless, který provádí konečné seškálování reflexí [5].

DIALS

Program DIALS je relativně nová součást softwarového balíku CCP4 [13]. Jednotlivé kroky zpracování se spouští textovými příkazy, konkrétní parametry se specifikují ve vstupních souborech. Software umožňuje provedení indexace reflexí, upřesnění mřížkových parametrů a integraci. Podobně jako software XDS při integraci vytváří trojrozměrný profil reflexí. Navíc obsahuje také grafické nástroje např. pro zobrazení difrakčních snímků či reciproké mříže. Díky tomu je možné provádět vizuální kontrolu. Na program DIALS opět navazuje program Aimless.

Xia2

Program Xia2 je součástí softwarového balíku CCP4. Slouží ke kompletně automatickému zpracování difrakčních dat [17]. Možnost nastavení jednotlivých paramet-

trů je velice omezená a v průběhu procesu nelze do jednotlivých podúloh zasahovat. Xia2 dokáže využít různých druhů integrace programů XDS, iMOSFLM a DIALS. Na integraci navazuje opět program Aimless.

1.4 Srovnání s analýzou nízkomolekulárních krystalů

Rentgenová strukturní analýza nízkomolekulárních krystalů a se od makromolekulární principiálně neliší. Základní schéma experimentu zůstává stejné: Otáčející se krystal je ozařován monochromatickým rentgenovým zářením a detektorem je snímán difrakční obrazec. Rozdílné je však technické řešení experimentu a použití jiných, vhodnějších metod.

Nízkomolekulární krystaly se zpravidla nemusí chladit, což usnadňuje provedení experimentu. Samozřejmě existují i metody měření za vysokých a nízkých teplot, ale nepoužívají se tak často. Po provedení experimentu nejsou krystaly poškozeny, rentgenová strukturní analýza je pro ně neinvazivní metodou, zatímco proteinové krystaly po měření jsou zničené a dále nepoužitelné. K měření nízkomolekulárních krystalů většinou postačují konvenční zdroje rentgenového záření, většinou není třeba sbírat data na synchrotronu.

Při určování bodových a prostorových grup symetrie nízkomolekulárního krystalu je nutné vybírat ze všech možných existujících grup, tj. ze 32 bodových a 230 prostorových, nikoli jen z určitého výběru, jako tomu je u makromolekulárních krystalů, jejichž prvky souměrnosti mřížky neobsahují operace bodové inverze a roviny souměrnosti.

Mřížkové parametry nízkomolekulárních krystalů jsou několikanásobně menší než krystalů makromolekulárních. Vzdálenosti bodů reciproké mřížky jsou tudíž mnohem větší. Proto není pro měření těchto krystalů vhodná rotační metoda a používají se jiné postupy sběru difrakčních dat.

1.5 Oxidáza z *Microdochium nivale*

1.5.1 *Microdochium nivale*

Microdochium nivale je plíseň z kmene stopkovýtrusných hub. Tento patogen napadá trávníky a jeho mycelium na nich vytváří charakteristické narůžovělé skvrny veliké 10 až 20 cm v průměru. Nemoc se projevuje především při chladném počasí od podzimu do jara v Severní Americe. Na rozdíl od jiných podobných plísní se dokáže šířit i při absenci sněhové pokrývky. Škody způsobuje také na golfových trávnících, z čehož plyne poměrně velká ekonomická snaha likvidovat tento patogen. Tato práce se však problematice inhibice tohoto organismu nevěnuje.



Obrázek 1.7: Trávník napadený *Microdochium nivale* [23].

1.5.2 Karbohydrátové oxidázy

Karbohydrátové oxidázy jsou skupina enzymů s podobnou funkcí. Jedná se o flavoenzymy (tzn. mají FAD ve své prostetické skupině) nebo metaloenzymy. Katalyzují oxidaci primárních či sekundárních alkoholů za současné redukce molekulárního kyslíku na peroxid vodíku. Jsou široce rozšířené a velmi důležité pro různé metabolické děje.

Tyto enzymy mají velký potenciál pro použití v biotechnologiích. Jejich navrhované nebo už uskutečněné aplikace jsou například

- přeměna glykolipidů, glykoproteinů či polysacharidů na sladidla či jiná potravinová aditiva a aditiva pro lepší pevnost papíru;
- získávání peroxidu vodíku *in situ* v potravinářském průmyslu a dalších odvětvích;
- ekvivalentní ekonomičtější náhrada nákladného a nestabilního elektronového donoru NAD(P)H pro potřeby různých biokatalyckých reakcí;
- konstrukce biosenzorů na krevní cukr, kyslík nebo jiné látky;
- biosyntéza funkčních či chirálních molekul ve farmakologii. [18]

1.5.3 Dosud známá fakta o oxidáze z *Microdochium nivale*

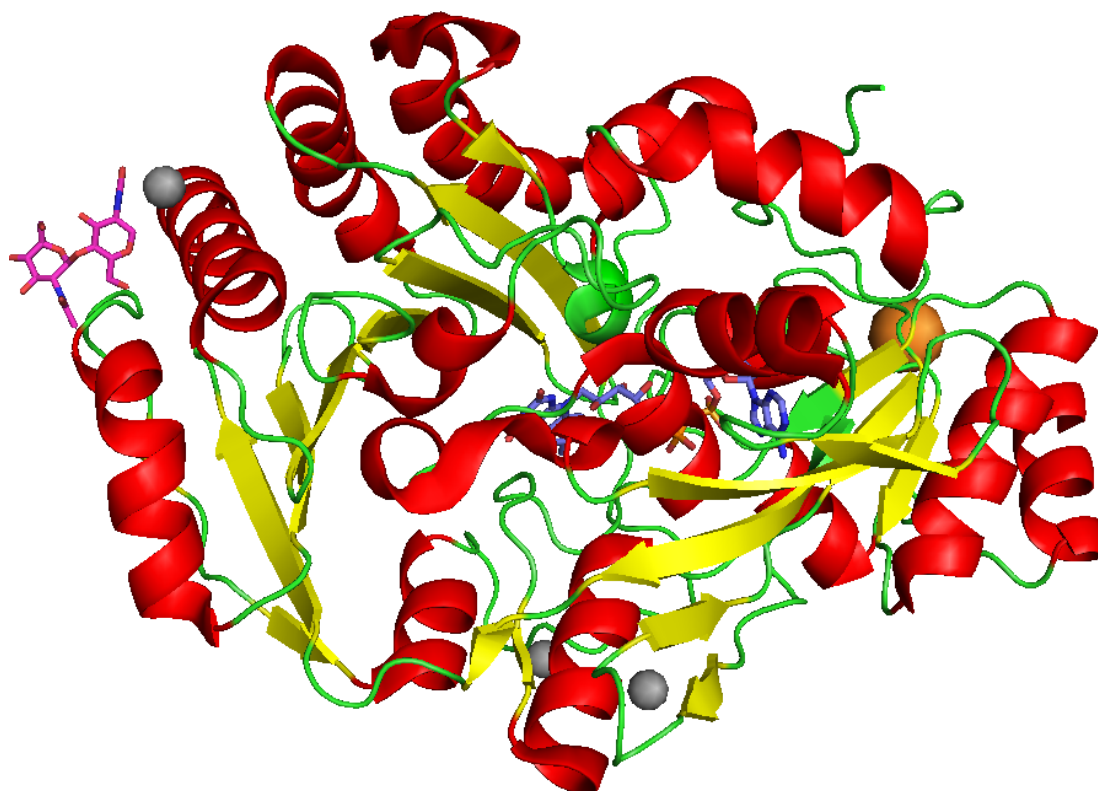
Oxidáza ze zmíněného organismu je tvořena řetězcem 473 aminokyselin s relativní molekulovou hmotností 55 kDa a izoelektrickým bodem 9,0. Lze ji najít v databázi proteinových struktur PDB pod kódem 3RJ8 [21]. Katalyzuje oxidaci primárních alkoholových skupin, nejvíce preferovanými substráty jsou disacharidy, např. cellobióza a laktóza. Konkrétně oxidace laktózy na laktobionovou kyselinu se již stala průmyslově užívaným technologickým procesem. [4]

Úspěšná krystalizace byla provedena za použití činidel ZnSO_4 , MES a PEG 550 při pH 6,5 a teplotě 298 K. Parametry základní buňky a symetrii krystalu shrnuje následující tabulka:

Krystalová soustava		Monoklinická	
Prostorová grupa		$C 1 2 1$	
a	33,71 Å	α	90°
b	56,96 Å	β	95,85°
c	87,05 Å	γ	90°

Tabulka 1.1: Mřížkové parametry a symetrie krystalu oxidázy z *M. nivale* [4].

Molekula ve své struktuře obsahuje α -šroubovice i β -listy. Pozoruhodné je, že se v ní vyskytují dvě skupiny β -listů, jedna tvořena pěti, druhá sedmi β -listy v antiparalelní orientaci. Prostetická skupina FAD je navázána dvěma kovalentními vazbami na reziduích His70 a Cys132, je umístěna uvnitř proteinu a na vazbě se také uplatňuje spousta vodíkových můstků. Součástí enzymu je N-acetylglucosamin, jenž je vázán na reziduum Asn222. Vodíkové můstky se na této vazbě nepodílí. Struktura na povrchu obsahuje také tři kationty zinku a jeden draselný kationt, které nejsou součástí enzymu – jedná se o pozůstatky krystalizačních činidel.



Obrázek 1.8: Struktura oxidázy z *Microdochium nivale* (PDB 3RJ8) [21]. Červeně jsou znázorněny α -šroubovice a žlutě β -listy. FAD uvnitř proteinu je vyobrazen modře a N-acetylglucosamin růžově. Struktura obsahuje také 3 kationty zinku (šedé koule) a kationt draslíku (oranžová koule).

V porovnání s analogickými oxidázami s podobnou strukturou a funkcí se oxidáza z *Microdochium nivale* poněkud liší substrátovou specifitou. Oxidáza z *Sarocladium strictum*, která má 41% shodu v sekvenci, nedokáže katalyzovat oxidaci galaktózy a xylózy s takovou účinností jako oxidáza z *M. nivale*. [4] Navíc je oxidáza z *M. nivale* schopna také katalyzovat oxidace oligosacharidů a polysacharidů, což jí podobné enzymy jako glukózooxidáza, hexózooxidáza či pyranózooxidáza nedokážou. [18] Přitom tyto tři zmíněné oxidázy už našly uplatnění v biotechnologiích, potravinářském, papírenském a textilním průmyslu. Díky širší substrátové specificitě si oxidáza z *M. nivale* jistě zaslouží pozornost a existuje velký potenciál jejího využití. Z výše zmíněných aplikací karbohydrátových oxidáz je pro tuto oxidázu nejvhodnější její využití v biosenzorech na hladinu cukru v krvi.

Přestože už je známa sekvence aminokyselin i struktura této oxidázy, úplně všechny otázky týkající se její struktury zatím nejsou objasněny. Odpověď na tyto otázky poskytne širší analýza struktury enzymu s ligandy (inhibitor, substrát, produkt a jejich analogy) a analýza mutovaných forem enzymu.

Kapitola 2

Cíle

- Zpracování difrakčních dat karbohydrátové oxidázy z *Microdochium nivale* dvěma programy.
- Stanovení optimálních parametrů zpracování předložených difrakčních dat.
- Diskuze indikátorů kvality a použitelnosti difrakčních dat karbohydrátové oxidázy pro následné řešení struktury.

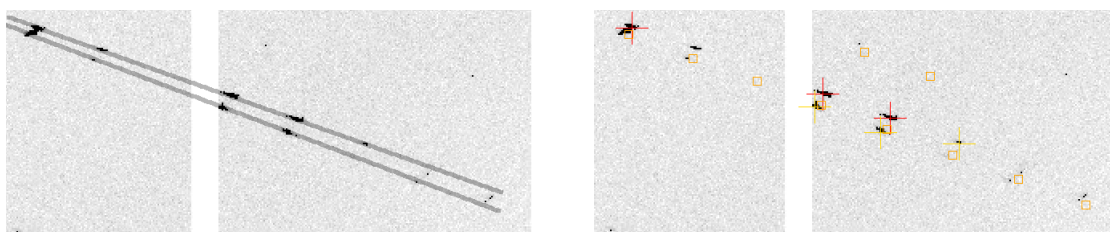
Kapitola 3

Výsledky

3.1 Vstupní parametry experimentu

Krystalizace oxidázy z *Microdochium nivale* byla úspěšná za podmínky: 0,01 M ZnSO₄, 12 % (v/v) PEG550 MME, 0,1 M MES pH 6,5. Krystalizační destičky byly uchovávány při teplotě 298 K. Krystaly byly exponovány na synchrotronu Petra III v Hamburku rentgenovým zářením o vlnové délce $\lambda = 0,9201 \text{ \AA}$. Vzdálenost vzorku od detektoru byla 419,67 mm. Bylo naměřeno 2 000 snímků rotační metodou, každý při rotaci o úhel $\Delta\phi = 0,1^\circ$ při expozici 0,15 s. Celkem tedy byla provedena rotace o 200° s celkovým expozičním časem 300 s.

Reflexe byly při vizuální inspekci spatřeny při rozlišení 2,25 \AA . Na difrakčních snímcích byly často pozorovány řady rozštěpených reflexí. Vzorek je tedy tvořen dvěma krystaly, které pravděpodobně vznikly naštěpením jednoho.



Obrázek 3.1: Vlevo je ukázána rozštěpená řada reflexí na snímku 3 proložená přímkou. Vpravo je znázorněno označení reflexí programem iMOSFLM (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).

3.2 Zpracování pomocí XDS

Většina parametrů vstupního souboru byla automaticky vygenerována přímo na pracovní stanici synchrotronu. Nejdříve byly spuštěny procesy XYCORR, INIT, COLSPOT, IDXREF. Program provedl indexaci reflexí na snímcích 1–10, 450–460,

900–920 a navrhl prostorovou grupu a mřížkové parametry.

Krystalová soustava		Monoklinická	
Prostorová grupa		$C 1 2 1$	
a	132,4 Å	α	90°
b	56,8 Å	β	96,1°
c	87,1 Å	γ	90°

Tabulka 3.1: Navržená prostorová grupa a mřížkové parametry po autoindexaci reflexí programem XDS.

Potom byly spuštěny procesy DEFPIX, INTEGRATE, CORRECT přes všechny snímky 1–2 000, čímž byla provedena integrace reflexí a upřesnění mřížkových parametrů.

Ze získaných indikátorů kvality bylo zřejmé, že ke konci měření docházelo k radi-
ačnímu poškození krystalu. Proces CORRECT byl tedy aplikován pouze na snímky
1–1 550, aby bylo dosaženo větší přesnosti výsledku při přijatelné kompletnosti dat.

Posledním krokem optimalizace zpracování bylo nastavení maximálního rozlišení
použitých reflexí. Cílem bylo dosažení hodnoty statistiky I/σ větší než 2 pro reflexe
ze slupky s nejvyšším rozlišením. Proto byl změněn difrakční limit pro vysoké roz-
lišení, který byl původně nastaven na hodnotu nejvyššího možného dosažitelného
rozlišení při daném nastavení experimentu (1,95 Å), na hodnotu 2,00 Å. Výsledky
zpracování s původním nastavením parametrů a po jeho optimalizaci jsou uvedeny
v tabulce 3.2.

Použité snímky	1–2 000	1–1 550
Difrakční limit [Å]	50,00–1,95 (2,07–1,95)	50,00–2,00 (2,12–2,00)
Prostorová grupa	<i>C</i> 1 2 1	<i>C</i> 1 2 1
Parametry elem. buňky [Å]	$a = 132,75$ $b = 56,97$ $c = 86,84$ $\alpha = \gamma = 90,00^\circ$ $\beta = 95,66^\circ$	$a = 132,77$ $b = 56,99$ $c = 86,88$ $\alpha = \gamma = 90,00^\circ$ $\beta = 95,66^\circ$
Počet reflexí	157 808 (22 970)	118 941 (17 525)
Počet nezávislých reflexí	46 312 (7 066)	42 072 (6 477)
Kompletnost [%]	97 (93)	95 (91)
Redundance	3,4 (3,3)	2,8 (2,7)
Mozaicita [°]	0,3	0,3
$CC_{1/2}$	0,994 (0,320)	0,995 (0,571)
Wilsonův B-faktor [Å²]	37	36
I/σ	8,0 (1,5)	9,0 (2,0)
R_{meas}	0,150 (1,404)	0,113 (0,898)
R_{merge}	0,127 (1,176)	0,093 (0,738)

Tabulka 3.2: Statistické výsledky zpracování difrakčních snímků softwarem XDS.

Hodnoty v závorkách odpovídají hodnotám ve slupce s nejvyšším rozlišením. V levém sloupci je uvedeno zpracování dat reflexí ve všech 2 000 snímcích v plném rozlišení detektoru, v pravém sloupci zpracování již po optimalizaci.

3.3 Zpracování pomocí Xia2 (DIALS a Aimless)

Pomocí programu Xia2, který používá software DIALS a Aimless, bylo provedeno kompletně automatizované zpracování dat. Kvalita obdrženého výsledku však byla velice neuspokojivá. Proto byl proces zpracování proveden znovu, avšak s odlišnými parametry. Podle předchozí zkušenosti byly použity reflexe pouze ze snímků 1–1 550. Navíc byl přidán parametr, díky němuž byl změněn difrakční limit na 60,00–2,41 Å, aby se vyhovělo požadavku na hodnotu statistiky I/σ ve slupce s nejvyšším rozlišením. Výsledky tohoto zpracování jsou uvedeny v tabulce 3.3.

Použité snímky	1–1 550
Difrakční limit [Å]	60,00–2,41 (2,45–2,41)
Prostorová grupa	<i>C</i> 1 2 1
Parametry elem. buňky [Å]	$a = 132,70$ $b = 57,04$ $c = 86,77$ $\alpha = \gamma = 90,00^\circ$ $\beta = 95,66^\circ$
Počet reflexí	70 294 (3 558)
Počet nezávislých reflexí	24 323 (1 201)
Kompletnost [%]	97 (98)
Redundance	2,9 (3,0)
Mozaicita [°]	N/A
$CC_{1/2}$	0,921 (0,753)
Wilsonův B-faktor [Å²]	21
I/σ	4,3 (2,4)
R_{meas}	0,207 (1,517)
R_{merge}	0,169 (0,425)

Tabulka 3.3: Statistické výsledky automatického zpracování difrakčních snímků 1-1 550 programem Xia2, který použil software DIALS a Aimless. Hodnoty v závorkách odpovídají hodnotám ve slupce s nejvyšším rozlišením.

Kvalita tohoto zpracování také není ideální. Aby ji bylo možné zvýšit, je potřeba mít možnost nastavovat parametry v jednotlivých krocích zpracování. Proto byla difrakční data zpracována ještě programy iMOSFLM a Aimless, které takovou optimalizaci parametrů umožňují.

3.4 Zpracování pomocí iMOSFLM a Aimless

Indexace v iMOSFLM byla provedena na snímcích 1, 321, 800 a 1 000. Program rovněž navrhl základní buňku s monoklinickou symetrií. Mřížkové parametry byly dále upřesněny použitím snímků 1–20, 451–470 a 901–920.

Při integraci však docházelo k následujícím problémům:

- Pokud nebyly hodnoty mřížkových parametrů a , b , c zafixovány, výpočet byl

záhy velice nestabilní a nebylo možné ho dokončit. Pro správné zpracování dat je však vhodné mít co nejmenší počet zafixovaných parametrů.

- Program se také pokoušel upravovat vzdálenost vzorku od detektoru, což vedlo k tomu, že integrace byla prováděna v oblastech detektoru, kde se žádné reflexe nenalézaly. Proto musel být tento parametr resetován na původní hodnotu.
- Mozaicita nabývala nepříliš pravděpodobných až nereálných hodnot. Její zafixování na hodnotu $0,3^\circ$, kterou navrhl software XDS, vedlo ke stabilnějšímu výpočtu.

V průběhu integrace program iMOSFLM vykresloval graf hodnot I/σ pro jednotlivé etapy zpracovaných snímků. Po snímku 1 550 byl z grafu zřejmý pokles hodnot této statistiky. Pro další postup byla vybrána 2 různá zpracování: první se zafixovanými parametry a , b , c a druhé se zafixovanými parametry a , b , c a mozaicitou na hodnotu $0,3^\circ$.

Konečné seškálování bylo provedeno pomocí procesu Aimless ze softwarového balíku CCP4. Pokud byla použita data ze všech snímků a v plném rozlišení, indikátory kvality vyjadřovaly, že zpracování nebylo ideální. Bylo tedy potřeba ho optimalizovat: Podobně jako v případě XDS byly použity pouze snímky 1–1 550 a limit rozlišení byl změněn na $50\text{--}2,8 \text{ \AA}$ v případě zpracování s volnou mozaicitou, resp. na $50\text{--}2,4 \text{ \AA}$ v případě zpracování s fixní mozaicitou.

Výsledky zpracování datasetu pomocí programů iMOSFLM a Aimless před i po optimalizací shrnují tabulky 3.4 a 3.5. Je uvedeno zpracování pro volnou mozaicitu i zafixovanou mozaicitu na hodnotě $0,3^\circ$.

Použité snímky	1–2 000	1–1 550
Difrakční limit [Å]	86,01–2,09 (2,15–2,09)	49,98–2,80 (2,95–2,80)
Fixované parametry	<i>a, b, c</i>	<i>a, b, c</i>
Prostorová grupa	<i>C</i> 1 2 1	<i>C</i> 1 2 1
Parametry elem. buňky [Å]	<i>a</i> = 132,81 <i>b</i> = 56,81 <i>c</i> = 86,48 $\alpha = \gamma = 90,00^\circ$ $\beta = 95,97^\circ$	<i>a</i> = 132,79 <i>b</i> = 56,81 <i>c</i> = 86,46 $\alpha = \gamma = 90,00^\circ$ $\beta = 95,86^\circ$
Počet reflexí	81 554 (5 035)	33 604 (4 925)
Počet nezávislých reflexí	35 096 (2 342)	14 514 (2 109)
Kompletnost [%]	92 (74)	91 (92)
Redundance	2,3 (2,1)	2,3 (2,3)
Mozaicita [°]	1,2	0,85
$CC_{1/2}$	0,364 (-0,010)	0,941 (0,676)
Wilsonův B-faktor [Å]	21	17
I/σ	2,5 (0,7)	4,1 (2,5)
R_{meas}	0,593 (5,653)	0,204 (0,478)
R_{merge}	0,478 (4,625)	0,162 (0,381)

Tabulka 3.4: Statistické výsledky zpracování difrakčních snímků softwarem iMOSFLM. Hodnoty v závorkách odpovídají hodnotám ve slupce s nejvyšším rozlišením. Mřížkové parametry *a*, *b*, *c* byly zafixovány, mozaicita byla v průběhu zpracování upřesňována. V levém sloupci je uvedeno zpracování dat reflexí ve všech 2 000 snímcích v plném rozlišení detektoru, v pravém sloupci zpracování již po optimalizaci na rozlišení a množství snímků.

Použité snímky	1–2 000	1–1 550
Difrakční limit [Å]	86,01–1,96 (2,01–1,96)	50,02–2,40 (2,49–2,40)
Fixované parametry	mozaicita, a , b , c	mozaicita, a , b , c
Prostorová grupa	$C 1 2 1$	$C 1 2 1$
Parametry elem. buňky [Å]	$a = 132,76$ $b = 56,81$ $c = 86,45$ $\alpha = \gamma = 90,00^\circ$ $\beta = 95,81^\circ$	$a = 132,75$ $b = 56,81$ $c = 86,44$ $\alpha = \gamma = 90,00^\circ$ $\beta = 95,74^\circ$
Počet reflexí	112 510 (7 396)	51 045 (5 464)
Počet nezávislých reflexí	43 416 (2 888)	22 497 (2 377)
Kompletnost [%]	94 (85)	89 (90)
Redundance	2,6 (2,6)	2,3 (2,3)
Mozaicita [°]	0,3	0,3
$CC_{1/2}$	0,826 (0,035)	0,929 (0,774)
Wilsonův B-faktor [Å]	12	8
I/σ	2,7 (0,8)	4,2 (2,3)
R_{meas}	0,537 (2,937)	0,206 (0,453)
R_{merge}	0,414 (2,290)	0,166 (0,385)

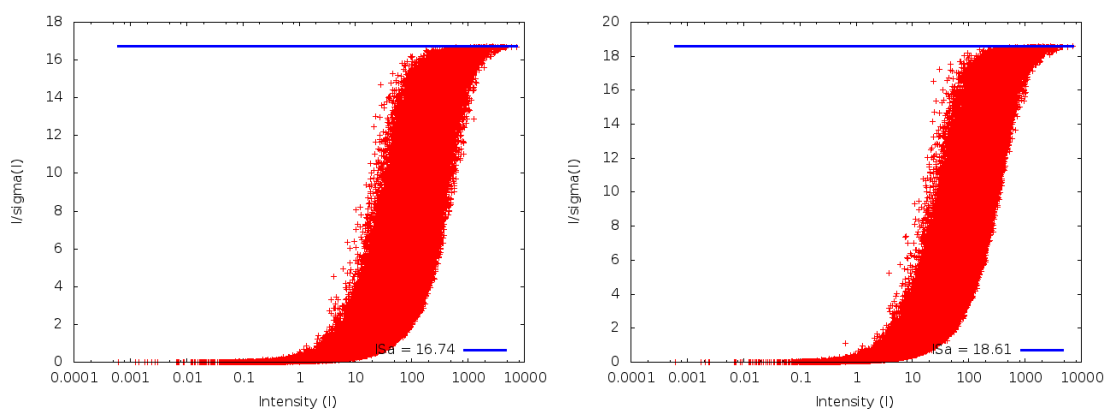
Tabulka 3.5: Statistické výsledky zpracování difrakčních snímků softwarem iMOSFLM. Hodnoty v závorkách odpovídají hodnotám ve slupce s nejvyšším rozlišením. Mřížkové parametry a , b , c a mozaicita byly zafixovány. V levém sloupci je uvedeno zpracování dat reflexí ve všech 2 000 snímcích v plném rozlišení detektoru, v pravém sloupci zpracování již po optimalizaci na rozlišení a množství snímků.

3.5 Analýza expozice dat

Nad rámec zadání bakalářské práce byla difrakční data podrobena analýze distribuce intenzit (skriptem *IIs.py* [14]). Tento nástroj používá softwarový balík XDS a umožňuje odhadnout optimálnost zvolené expozice vzhledem k dosažitelným hodnotám I/σ . Skript vykresluje graf závislosti poměru difrakční intenzity k chybě měření I/σ na intenzitě I .

Přexponovaná data se vyznačují velkým množstvím intenzivních reflexí s hod-

notou I/σ velice blízké limitní hodnotě ISa . Naopak u podexponovaných data se hodnoty I/σ intenzivních reflexí k ISa neblíží. Grafy pro zde zpracovávaná data jsou uvedeny v následujícím obrázku.



Obrázek 3.2: Grafy závislosti poměru difrakční intenzity k chybě měření I/σ na intenzitě I . Vlevo je graf při použití všech 2 000 snímků, pravý graf je vyneseno pro počátečních 1 550 snímků. Limitní hodnota ISa je znázorněna modře.

3.6 XSCALE – korekce radiačního poškození

Jelikož docházelo k radiačnímu poškození krystalu v průběhu měření, byla učiněna jeho korekce. Pomocí programu XSCALE byla provedena interpolace dat k hypotetické nulové absorbované dávce záření při doporučeném snímku 350 [3]. Byla použita již optimálně zpracovaná data softwarem XDS, u kterých byly vynechány reflexe ze snímků 1 551–2 000 a změněn difrakční limit na 50–2 Å. Indikátory kvality dat před touto interpolací a po ní jsou srovnány v tabulce 3.6.

Software	XDS	XDS & XSCALE
Difrakční limit [Å]	50,00–2,00 (2,12–2,00)	
$CC_{1/2}$	0,995 (0,571)	0,996 (0,613)
I/σ	9,0 (2,0)	11,3 (2,4)
R_{meas}	0,113 (0,898)	0,099 (0,847)
R_{merge}	0,093 (0,738)	0,082 (0,697)

Tabulka 3.6: Porovnání statistik indikátorů kvality optimalizovaného zpracování dat provedeného programem XDS a jeho dodatečná interpolace pomocí programu XSCALE.

Kapitola 4

Diskuze

Difrakční data karbohydrátové oxidázy z *M. nivale* byla naměřena a zpracována následujícími programy: XDS, Xia2 (DIALS & Aimless), iMOSFLM & Aimless. Použitím programů XDS a Xia2 byly difrakční snímky přímočaře a bez větších problémů zpracovány. Výpočet programem iMOSFLM vykazoval nestabilitu, k jeho provedení bylo nutné fixovat některé parametry, což však obecně není žádoucí.

Během zpracování všemi programy byla provedena optimalizace:

- Byly použity snímky 1–1 550 z celkového počtu 2 000 snímků z důvodu radičního poškození krystalu v průběhu měření.
- Bylo omezeno nejvyšší použité rozlišení, aby parametr I/σ měl pro data ze slupky s nejvyšším rozlišením hodnotu alespoň 2.

Výběr vhodných difrakčních dat pro další zpracování, které povede ke stanovení struktury makromolekuly, závisí na zvážení několika parametrů – indikátorů kvality. Výsledné hodnoty těchto statistik jednotlivých zpracování dat jsou uvedeny v tabulce 4.1.

Hodnoty R -faktorů zpracování programy iMOSFLM a DIALS jsou srovnatelné a poměrně vysoké. Oproti nim jsou hodnoty R -faktorů zpracování pomocí XDS přibližně dvakrát menší.

Podobně jsou pro zpracování programy iMOSFLM a DIALS téměř shodné hodnoty I/σ . Celkové zpracování softwarem XDS vykazuje hodnotu této statistiky zhruba dvakrát vyšší.

Hodnoty korelačního koeficientu $CC_{1/2}$ jsou pro všechna zpracování větší než 90 %. Zpracování programy iMOSFLM a Xia2 mají i u tohoto parametru opět podobné hodnoty. Při použití XDS má větší hodnotu této statistiky celkové zpracování, zato data ze slupky s nejvyšším rozlišením vykazují menší hodnotu tohoto parametru. To je samozřejmé, protože tyto parametry se vztahují k slupkám zcela jiného rozlišení a nelze je takto porovnávat.

Kompletnost všech zpracování je srovnatelná. Rozdílná redundance je způsobena odlišnými způsoby posuzování použitelných reflexí jednotlivými programy. Kvalita

automatického zpracování pomocí programu Xia2, který použil software DIALS a Aimless, a zpracování s možností detailního nastavení parametrů jednotlivých kroků provedené programy iMOSFLM a Aimless je podobná. Nejlepší indikátory kvality dat vykazuje v tomto případě zpracování softwarovým balíkem XDS.

Software	XDS	DIALS & Aimless	iMOSFLM & Aimless
Použité snímky	1–1 550		
Difrakční limit [Å]	50,00–2,00 (2,12–2,00)	60,00–2,41 (2,45–2,41)	50,02–2,40 (2,49–2,40)
Počet reflexí	118 941 (17 525)	70 294 (3 558)	51 045 (5 464)
Počet nez. reflexí	42 072 (6 477)	24 323 (1 201)	22 497 (2 377)
$CC_{1/2}$	0,995 (0,571)	0,921 (0,753)	0,929 (0,774)
I/σ	9,0 (2,0)	4,3 (2,4)	4,2 (2,3)
R_{meas}	0,113 (0,898)	0,207 (1,517)	0,206 (0,453)
R_{merge}	0,093 (0,738)	0,169 (0,425)	0,166 (0,385)

Tabulka 4.1: Porovnání statistik indikátorů kvality optimalizovaných zpracování dat, které provedly programy XDS, Xia2 (DIALS & Aimless) a iMOSFLM & Aimless. Ze dvou kompletně provedených zpracování pomocí iMOSFLM je vybráno to se zafixovanou mozaicitou.

Parametry základní buňky určené pomocí různých programů jsou velice podobné, liší se v řádu desetin Å, resp. desetin stupňů. Ve všech případech je navržena prostorová grupa symetrie $C 1 2 1$, čemuž také odpovídá stanovení dvou pravých úhlů základní buňky $\alpha = \gamma = 90^\circ$.

Zpracování pomocí iMOSFLM s fixovanou mozaicitou na hodnotě $0,3^\circ$ považuji za kvalitnější než s ponechanou volnou mozaicitou. Data při něm byla zpracována do vyššího rozlišení (2,4 Å) než u zpracování s volnou mozaicitou (2,8 Å). Navíc byla programem při výpočtu s volnou mozaicitou zobrazena spousta chybových hlášení zpochybnujících korektní zpracování.

U optimalizovaného zpracování pomocí iMOSFLM s fixní mozaicitou je pozoruhodné, že hodnota celkového R_{merge} (0,166) je menší než jeho hodnota pro data v nejvyšším (0,385) a nejnižším (0,170) rozlišení. Z toho plyne, že v nízkém rozlišení je velká neshoda intenzit jednotlivých reflexí.

Analýzou optimálnosti času expozice (pomocí skriptu *IIs.py*) bylo zjištěno, že reflexe s vysokými intenzitami se hodnotami I/σ se 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. S ohledem na dosažitelné hodnoty I/σ byl tedy čas expozice optimální. Delší expozice by nevedla k vyšším hodnotám I/σ a navíc by se stále více projevovало nežádoucí radiační poškození krystalu.

Provedená interpolace dat k nulové absorbované dávce záření by měla zohledňovat radiační poškození krystalu v průběhu měření. Hodnoty všech sledovaných

indikátorů kvality interpolovaných dat vykazují zlepšení. Takto interpolovaná data však mohou být zatížena těžko odhalitelnými chybami, nebo chybami systematicky zavedenými dalším výpočtem. Doporučuji tedy pro další zpracování použít původně optimální data a data intepolovaná případně použít až při následných problémech.

Závěr

Karbohydrátová oxidáza z *Microdocium nivale* byla úspěšně zkrystalizována a na synchrotronu PETRA III v Hamburku byla naměřena difrakční data. Vizuální inspekce odhalila, že difrakční snímky obsahují řady rozštěpených reflexí. Vzorek byl tedy nejspíš tvořen dvěma krystaly, které pravděpodobně vznikly naštěpením jednoho původního.

Difrakční data byla podrobena zpracování a analýze pomocí tří různých programů využívajících jiných početních metod. Nejlepší zpracování z hlediska monitorovacích statistických údajů bylo provedeno softwarovým balíkem XDS. Prostorová grupa krystalu je $C 1 2 1$. Část snímků, na kterých byl již významně pozorován vliv radiačního poškození krystalu, byla pro konečné zpracování vynechána. Postupnou optimalizací dalších parametrů zpracování dat byl stanoven difrakční limit krystalu na 2,0 Å.

Analýza délky expozice dat [14] ukázala, že s ohledem na dosažitelné hodnoty poměru difrakční intenzity k chybě měření I/σ byl čas expozice v tomto smyslu optimální. Rychlost radiačního poškození během experimentu nešla předem relevantně odhadnout.

Výsledky zpracování budou využity k určení elektronové hustoty karbohydrátové oxidázy a ke stavbě strukturního modelu tohoto enzymu.

Seznam použitých zdrojů

Knižní zdroje a články

- [1] BATTYE, T. G. G., KONTOGIANNIS L., JOHNSON, O., POWELL, H. R., LESLIE, A. G. W. iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction image processing with MOSFLM. *Acta Cryst.* 2011, D67, s. 271–281.
- [2] BRYNDA, J. Proteinový difraktometr - měření rotační metodou. *Materials structure*. 2002, vol. 9, s. 17–20.
- [3] DIEDERICHS, K., JUNK, M. Post-processing intensity measurements at favourable dose values. *J. Appl. Cryst.*, 2009, 42, s. 48–57.
- [4] DUŠKOVÁ, J., DOHNÁLEK, J., SKÁLOVÁ, T., ØSTERGAARD, L. H., FUGLSANG, C. C., KOLENKO, P., ŠTĚPÁNKOVÁ, A., HAŠEK, J. Crystallization of carbohydrate oxidase from *Microdochium nivale*. *Acta Cryst.*, 2009, F65, s. 638–640.
- [5] EVANS, P. R., MURSHUDOV, G. N. How good are my data and what is the resolution? *Acta Cryst.*, 2013, D69, s. 1204–1214.
- [6] HRDÝ, J. Wiggler, undulátory a další zdroje synchrotronového záření. *Materials structure*, 2008, vol. 15, s. k5–6.
- [7] KABSCH, W. XDS. *Acta Cryst.*, 2010, D66, s. 125–132.
- [8] KRAUS, I. *Úvod do strukturní rentgenografie*. 1. vydání. Praha: Academia, 1985. ISBN 21-014-85.
- [9] MAREK, J., TRÁVNÍČEK, Z. *Monokrystalová rentgenová strukturní analýza*. 1. vydání. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2002. ISBN 80-244-0551-2.
- [10] MUELLER, M., MEITIAN, W., SCHLUZE-BRIESE, C. Optimal Fine ϕ -Slicing for Single-Photon-Counting Pixel Detectors. *Acta Cryst.*, 2012, D68, s. 42–56.
- [11] RHODES, G. *Crystallography Made Crystal Clear*. 3. vydání. Burlington: Academic Press, 2006. ISBN 978-0-12-587073-3.

- [12] ROSSMANN, M. G., ARNOLD, E. *International Tables for Crystallography Volume F: Crystallography of biological macromolecules*. 1. vydání. Dordrecht: Springer, 2001. ISBN 978-0792368571
- [13] SAUTER, N. K., HATTNE, J., GROSSE-KUNSTLEVE, R. W., ECHOLS, N. New Python-based methods for data processing. *Acta Cryst.*, 2013, D69, s. 1274–1282.
- [14] STRÁNSKÝ, J., DOHNÁLEK, J. Zanedbávaný parametr difrakčního experimentu: expoziční čas. *Sborník příspěvků 5. studentské vědecké konference fyziky pevných látek*. Praha: ČVUT v Praze, 2015, s. 22–27. ISBN 978-80-01-05842-8.
- [15] VAGOVIČ, P. Monochromatization of the Hard X-ray Radiation. *Materials structure*, 2008, vol. 15, s. k11.
- [16] VALVODA, V., LUKÁČ, P., POLCAROVÁ, M. *Základy strukturní analýzy*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 1992. ISBN 80-200-0280-4.
- [17] WINTER, G. Xia2: an expert system for macromolecular crystallography data reduction. *J. Appl. Cryst.*, 2010, 43, s. 186–190.
- [18] XU, F., GOLIGHTLY, E. J., FUGLSANG, C. C., SCHNEIDER, P., DUKE, K. R., LAM, L., CHRISTENSEN, S., BROWN, K. M., JØRGENSEN, C. T., BROWN, S. H. A novel carbohydrate:acceptor oxidoreductase from *Microdochium nivale*. *Eur. J. Biochem.*, 2001, 268, s. 1136–1142.

Internetové a jiné zdroje

- [19] BESSY II Halle innen [online]. Helmholtz-Zentrum Berlin. [cit. 9. března 2016]. <https://www.helmholtz-berlin.de/mediathek/bildarchiv/-#1457546860885_16>.
- [20] Blick auf einen Speicherring der einzigen deutschen Synchrotronstrahlungsquelle der dritten Generation in Berlin-Köpenick. [online]. Helmholtz-Zentrum Berlin. [cit. 9. března 2016]. <https://www.helmholtz-berlin.de/mediathek/bildarchiv/-#1457546781976_2>.
- [21] DUŠKOVÁ, J., SKÁLOVÁ, T., ŠTĚPÁNKOVÁ, A., KOVAL, T., HAŠEK, J., ØSTERGAARD, L.H., FUGLSANG, C.C., KOLENKO, P., DOHNÁLEK, J. Crystal structure of carbohydrate oxidase from *Microdochium nivale* [online]. *RCSB Protein Data Bank*, 2012 [cit. 3. března 2016]. <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3RJ8>>.
- [22] ESPES, E. et al. Liquid-Metal-Jet X-Ray Tube Technology Applications and Tomography. *Excillum AB*, 2014.
- [23] *Microdochium patch – Microdochium nivale* [online]. MSU Plant Pathology, 2016 [cit. 3. března 2016]. <http://www.msuturfdiseases.net/details/_/microdochium_patch_9/>.

- [24] Optics-layout BL14.1 [online]. Helmholtz-Zentrum Berlin. [cit. 9. března 2016].
<https://www.helmholtz-berlin.de/media/media/grossgeraete/mi_synchro/bessy_mx/userguide/beamlines/bl14.1/hardware/bl1-hires.pdf>.
- [25] PILATUS3 S & X Series - DECTRIS [online]. 2015 [cit. 9. března 2016].
<https://www.dectris.com/PILATUS3_SandX.html>.
- [26] Product Sheet SC-XRD 49 METALJET - Liquid Metal Jet X-ray source for Structural Biology. Bruker AXS, 2012.

Přílohy

Příloha A

Výstupní soubory programu XDS

A.1 Zpracování všech dat

Vybraná část výstupního souboru CORRECT.LP po zpracování všech 2 000 snímků programovým balíkem XDS:

SUBSET OF INTENSITY DATA WITH SIGNAL/NOISE \geq -3.0 AS FUNCTION OF RESOLUTION													
RESOLUTION LIMIT	NUMBER OF REFLECTIONS			COMPLETENESS OF DATA	R-FACTOR observed	R-FACTOR expected	COMPARED	I/SIGMA	R-meas	CC(1/2)	Anomal Corr	SigAno	Nano
5.80	6361	1856	1892	98.1%	4.2%	4.3%	6320	24.63	5.0%	99.6*	-3	0.774	975
4.12	11448	3259	3284	99.2%	4.9%	4.8%	11386	22.39	5.7%	99.6*	-12	0.744	1681
3.37	14870	4142	4181	99.1%	7.1%	6.7%	14770	17.93	8.4%	99.3*	-15	0.755	2258
2.92	18379	4908	4959	99.0%	13.4%	13.7%	18306	11.71	15.7%	98.0*	-10	0.730	3042
2.61	18833	5509	5587	98.6%	23.0%	23.8%	18551	7.10	27.2%	94.4*	-9	0.749	2645
2.38	21146	6071	6174	98.3%	35.9%	37.3%	20874	4.95	42.4%	88.6*	-10	0.712	3157
2.21	21336	6540	6656	98.3%	50.9%	52.4%	20860	3.51	60.8%	79.7*	-15	0.697	2751
2.07	22464	6960	7191	96.8%	76.7%	81.5%	21879	2.34	91.7%	60.2*	-15	0.655	2972
1.95	22970	7066	7633	92.6%	117.6%	131.8%	22287	1.50	140.4%	32.0*	-14	0.600	3205
total	157808	46312	47557	97.4%	12.7%	13.0%	155233	7.98	15.0%	99.4*	-12	0.703	22686

NUMBER OF REFLECTIONS IN SELECTED SUBSET OF IMAGES	163020
NUMBER OF REJECTED MISFITS	5209
NUMBER OF SYSTEMATIC ABSENT REFLECTIONS	0
NUMBER OF ACCEPTED OBSERVATIONS	157811
NUMBER OF UNIQUE ACCEPTED REFLECTIONS	46314

A.2 Optimalizované zpracování dat

Vybraná část výstupního souboru CORRECT.LP po optimalizovaném zpracování programovým balíkem XDS, tzn. byla použita data ze snímků 1–1550 a difrakční limit 50–2 Å.

SUBSET OF INTENSITY DATA WITH SIGNAL/NOISE \geq -3.0 AS FUNCTION OF RESOLUTION													
RESOLUTION LIMIT	NUMBER OF REFLECTIONS			COMPLETENESS OF DATA	R-FACTOR observed	R-FACTOR expected	COMPARED	I/SIGMA	R-meas	CC(1/2)	Anomal Corr	SigAno	Nano
5.95	4764	1600	1767	90.5%	3.6%	3.8%	4614	25.64	4.4%	99.7*	2	0.792	667
4.22	8464	2875	3047	94.4%	3.9%	4.1%	8166	23.20	4.7%	99.6*	-14	0.683	1061
3.45	10926	3705	3886	95.3%	4.8%	4.8%	10520	19.72	5.9%	99.5*	-13	0.743	1429
2.99	13241	4401	4578	96.1%	7.9%	8.0%	12804	13.62	9.6%	98.9*	-7	0.772	1873
2.68	14437	5051	5187	97.4%	14.1%	14.7%	13740	8.73	17.1%	96.5*	-4	0.768	1866
2.45	15871	5565	5733	97.1%	22.8%	23.7%	15144	6.02	27.7%	92.7*	-3	0.754	2037
2.26	17135	6049	6184	97.8%	33.1%	33.9%	16304	4.46	40.1%	86.3*	-5	0.761	2248
2.12	16578	6349	6623	95.9%	47.5%	48.1%	15334	3.05	58.2%	76.1*	-14	0.722	1680
2.00	17525	6477	7094	91.3%	73.8%	76.9%	16309	1.98	89.8%	56.7*	-15	0.650	2163
total	118941	42072	44099	95.4%	9.3%	9.5%	112935	8.97	11.3%	99.5*	-8	0.736	15024

NUMBER OF REFLECTIONS IN SELECTED SUBSET OF IMAGES	121639
NUMBER OF REJECTED MISFITS	2698
NUMBER OF SYSTEMATIC ABSENT REFLECTIONS	0
NUMBER OF ACCEPTED OBSERVATIONS	118941
NUMBER OF UNIQUE ACCEPTED REFLECTIONS	42072

A.3 Interpolace dat pomocí XSCALE

Vybraná část výstupního souboru XSCALE.LP po interpolaci dat k hypotetické nulové absorbované dávce záření, která byla provedena programem XSCALE na zpracovaná data softwarem XDS.

SUBSET OF INTENSITY DATA WITH SIGNAL/NOISE ≥ -3.0 AS FUNCTION OF RESOLUTION													
RESOLUTION	NUMBER OF REFLECTIONS			COMPLETENESS	R-FACTOR	R-FACTOR	COMPARED	I/SIGMA	R-meas	CC(1/2)	Anomal	SigAno	Nano
LIMIT	OBSERVED	UNIQUE	POSSIBLE	OF DATA	observed	expected					Corr		
20.00	72	36	55	65.5%	3.7%	3.1%	61	25.22	4.9%	99.4*	69	1.388	4
10.00	860	304	335	90.7%	2.4%	3.0%	821	34.34	2.9%	99.9*	18	0.895	107
6.00	3668	1204	1317	91.4%	2.9%	3.2%	3576	32.06	3.6%	99.7*	26*	0.947	531
3.00	32507	10934	11461	95.4%	4.2%	4.3%	31372	23.32	5.1%	99.7*	10*	0.883	4349
2.12	64121	23044	23761	97.0%	21.4%	21.4%	60627	6.66	26.0%	95.1*	5	0.843	7845
2.00	17654	6526	7021	92.9%	69.7%	70.2%	16427	2.44	84.7%	61.3*	-4	0.728	2181
total	118882	42048	43950	95.7%	8.2%	8.3%	112884	11.28	9.9%	99.6*	6	0.842	15017