

Bakalářská práce



České
vysoké
učení technické
v Praze

F4

Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská
Katedra inženýrství pevných látek

Užití *in situ* rentgenové difrakce na studie vazby ligandů

Viktorie Navarová

Školitel: doc. Ing. Petr Kolenko, Ph.D.

Školitel–specialista: Ing. Jan Dohnálek, Ph.D.

Červenec 2019

Poděkování

Děkuji doc. Ing. Petru Kolenkovi, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce a za přínosné připomínky k jejímu obsahu i k její formě. Děkuji také Centru molekulární struktury České infrastruktury pro integrativní strukturní biologii v Biotechnologickém ústavu AV ČR, v.v.i., projekt LM2015043 MŠMT, za umožnění experimentů a RNDr. Jiřímu Pavlíčkovi, Ph.D. za cenné rady v oblasti krystalizace proteinů a obsluhy difraktometru.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla veškerou použitou literaturu.

V Praze, dne 27. června 2019

Abstrakt

Na modelovém proteinu Endothiapepsinu izolovaném z houby *Cryphonectria parasitica* byly zkoumány možnosti *in situ* in-house metody testování vazby malých fragmentů (fragment screening). Pro *in situ* difrakční experimenty na difraktometru Bruker D8 Venture byla nejprve provedena analýza optimálních úhlových rozsahů otáčení s deskou. Při dvou *in situ* difrakčních experimentech byl měřen krystal ponechaný v krystalizační destičce a krystal namáčený v roztoku fragmentu ponechaný v krystalizační destičce. Dále byl standardní rotační metodou měřen krystal ve smyčce. Difrakční data ze tří experimentů byla zpracována programem XDS a vzájemně porovnána.

Klíčová slova: RTG difrakce, *in situ* difrakce, ligand, interakce

Školitel: doc. Ing. Petr Kolenko, Ph.D.
Katedra inženýrství pevných látek,
Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská,
ČVUT v Praze

Abstract

The possibilities of *in situ* in-house fragment screening method were studied on the model protein Endothiapepsin isolated from fungus *Cryphonectria parasitica*. At first the analysis of possible angular ranges of rotation with the crystallization plate for *in situ* experiments on diffractometer Bruker D8 Venture was conducted. During two *in situ* experiments a crystal inside the crystallization plate was measured, the first time without any fragment and then after soaking using a fragment solution. As a third experiment, the standard diffraction of a crystal in a loop was performed. Diffraction data from these three experiments were collected, processed by XDS software and mutually compared.

Keywords: RTG diffraction, *in situ* diffraction, ligand, interaction

Title translation: Application of *In situ* X-ray Diffraction on Ligand Binding Studies

Obsah

Úvod	1
1 Teoretická část	3
1.1 Krystalizace proteinů	3
1.2 Difrakce rentgenového záření	4
1.3 Standardní a <i>in situ</i> monokrystalová difrakce	6
1.4 Metoda testování vazby malých fragmentů (fragment screening)	8
1.5 Zpracování difrakčních dat	8
1.6 Protein Endothiapepsin	9
2 Cíle	11
3 Experimentální část	12
3.1 Optimalizace <i>in situ</i> měření	12
3.2 Krystalizace a namáčení (soaking) krystalů	13
3.3 Výsledky měření standardní difrakce krystalu	14
3.4 Výsledky měření <i>in situ</i> difrakce krystalu	16
4 Diskuse	20
Závěr	23
Literatura	24

Obrázky

1.1 Schéma k odvození Braggova zákona.	5
1.2 Schéma standardního difrakčního experimentu na čtyřkruhovém kappa goniometru.	7
1.3 Schéma <i>in situ</i> difrakčního experimentu.	7
1.4 Protein EPCP s navázaným fragmentem.	10
3.1 Vypěstované krystaly EPCP v krystalizačních kapkách.	14
3.2 Difrakční snímek souboru dat naměřených při standardní difrakci krystalu proteinu EPCP.	15
3.3 Difrakční snímky souboru dat naměřených při <i>in situ</i> difrakci krystalu proteinu EPCP bez fragmentu.	16
3.4 Difrakční snímky souboru dat naměřených při <i>in situ</i> difrakci namáčeného krystalu proteinu EPCP.	18

Tabulky

1.1 Parametry elementární buňky a symetrie krystalu proteinu EPCP. .	10
3.1 Optimalizace <i>in situ</i> difrakčního experimentu.	13
3.2 Statistické hodnoty pro standardní difrakci krystalu EPCP.	15
3.3 Statistické hodnoty pro <i>in situ</i> difrakci krystalu EPCP bez fragmentu.	17
3.4 Statistické hodnoty pro <i>in situ</i> difrakci namáčeného krystalu EPCP. .	19



Úvod

Znalost struktury biologických makromolekul a jejich komplexů umožňuje lépe pochopit procesy probíhající v živých organismech. Tyto vědomosti lze využít pro navrhování nových účinných léčiv i pro nejrůznější aplikace např. v průmyslu potravinářském, chemickém, textilním, aj. Strukturální analýzou makromolekul se zabývá obor strukturální biologie. Krystalografie makromolekul je jednou z důležitých metod strukturální biologie.

Pomocí monokrystalové difrakce se proteinové struktury určují už od 50. let 20. století. První vyřešenou proteinovou strukturou byl myoglobin [1]. Technologie, metodika a experimentální postupy se za poslední desetiletí velmi zdokonalila. V databázi struktur Protein Data Bank (PDB) je nyní přes 150 000 určených struktur biologických makromolekul a jejich počet se neustále zvyšuje. 90 % z nich bylo určeno pomocí rentgenové difrakce, zbylých 10 % bylo zjištěno metodami nukleární magnetické rezonance (NMR), elektronové mikroskopie, neutronové difrakce, kombinací rentgenové a neutronové difrakce, elektronové krystalografie a dalšími.

Jednou z moderních aplikací proteinové krystalografie je metoda testování vazby malých fragmentů (fragment screening) používaná pro zkoumání vazby ligand-protein. Ligandem je v tomto případě myšlena malá molekula (o molekulové hmotnosti mezi 150 a 300 Da), která vytváří vazbu s větší molekulou – proteinem [2]. Při metodě testování vazby malých fragmentů proteinu se náhodně zkouší stovky různých ligandů z knihoven fragmentů. Z interakcí ligand-protein lze vyvodit, které typy fragmentů je vhodné volit v následujících experimentech. Metoda testování vazby malých ligandů je často využívána k nalezení funkčního inhibitoru proteinu. Velkou výhodou rentgenové krystalografie je její schopnost odhalit při fragment screeningu i velice slabé vazby ligand-protein, a to občas i na překvapivých místech [2].

Naprostá většina proteinových struktur je v dnešní době určována z difrakčních dat naměřených na synchrotronu. Laboratorní zdroje rentgenového záření se využívají spíše k návrhu experimentů. Přesto jsou důležité, protože jsou jednoduše dostupné a pro kvalitní monokrystal lze naměřit použitelná data.

V Biotechnologickém a biomedicínském centru Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci (BIOCEV) je používán difraktometr Bruker D8 Venture se zdrojem MetalJet D2 vybaveným tekutou galiovou anodou, s detektorem Photon II a goniometrem Kappa. K dispozici je také přídavné motorizované rameno ISX Stage umožňující experimenty s krystaly umístěnými v krystalizační destičce.

Tato práce se zabývá rozvojem metodiky *in situ* (za pokojové teploty) in-house (na konvenčních zdrojích rentgenového záření) fragment screeningu, konkrétně zkoumáním metodických možností konvenčních zdrojů získat difrakční data s vysokou kompletností pro modelový protein Endothiaepsin. Výhodou přístupu *in situ* in-house fragment screeningu je dostupnost a rychlost provedení experimentu. Problémem ovšem je, že kvůli absenci chlazení vzorku dochází k jeho velkému radiačnímu poškození.

Kapitola 1

Teoretická část

1.1 Krystalizace proteinů

Krystalizace je experimentální proces hledání vhodných chemických podmínek pro růst krystalů a jejich následná optimalizace pro růst kvalitních monokrystalů. Princip krystalizačních metod biologických makromolekul je zvyšování úrovně nasycení roztoku použitím precipitačního činidla (např. PEG) a dále modifikace parametrů pH, teploty, koncentrace proteinu nebo typu rozpouštědla [3].

První fáze je nukleace, během níž se po překročení limitu nasycení začínají tvořit submikroskopická krystalická jádra, což jsou stabilní komplexy molekul proteinu. Ve druhé fázi krystaly rostou, tedy dochází k fázové změně z kapalného do krystalického stavu uspořádáním iontů či molekul na povrchu jader. Kvalitní monokrystaly vznikají z malého počtu stabilních krystalizačních jader, která rostou pomalu a bez poruch. Toho lze nejlépe dosáhnout pomalým nasycováním roztoku proteinu pouze lehce přes hranici nasycení [4].

Často používané techniky založené na difúzi par jsou metoda visící kapky (hanging drop) nebo sedící kapky (sitting drop). Do destičky je umístěna malá kapka (o objemu od 0,1 do 4,0 μ l) obsahující roztok proteinu, pufr, precipitant a rezervoár o násobně vyšším objemu (od 0,5 do 1,0 ml) je naplněn roztokem se stejnými komponentami kromě roztoku proteinu [5]. Odlišná koncentrace roztoků v kapce a v rezervoáru je příčinou difúze, během níž se odpařuje voda, která způsobí ustavení rovnováhy mezi kapkou a rezervoárem.

V některých případech se používají očkovací techniky (seeding), kdy se přímo do kapky dodají krystalizační zárodky stejného či příbuzného proteinu, o němž je známo, že krystalizuje. Při vlasovém očkování (streak seeding) se vlákno (vlas nebo koňská žíně) namočí do roztoku s rozdrčenými mikrokrystalky a poté se protáhne kapkou. Podél dráhy vlákna následně budou růst proteinové krystaly.

Krystaly makromolekul obsahují v průměru 50 % rozpouštědla a v krystalech jsou velké intersticiální prostory, kterými mohou difundovat malé

molekuly. Tyto krystaly mají kvůli vysoké neuspořádanosti a citlivosti na změny teploty a pH obecně slabé difrakční vlastnosti v porovnání s anorganickými krystaly. Při expozici rentgenovému záření dochází k radiačnímu poškození krystalů, proto je výhodné provádět difrakční experiment na intenzivních zdrojích rentgenového záření (synchrotronech), na nichž je celková doba trvání experimentu výrazně nižší [4].

1.2 Difrakce rentgenového záření

Dopad fotonu s vlnovou délkou z rentgenové oblasti na nabitou částici v látce způsobuje rozptyl pružný a nepružný. Pružný rozptyl se nazývá Thomsonův, zachovává se při něm energie záření (tedy i vlnová délka) a je důležitý pro vznik difrakčního obrazce. Nepružný (Comptonův) rozptyl je příčinou vzniku pozadí, které je při vyhodnocování dat nutné určit a odečíst [7].

Při pružném rozptylu rozkmitá dopadající foton nabitě částice a ty se stanou zdrojem sekundárního záření, které se z nich šíří ve tvaru kulových vln. Intenzita pružného rozptylu záření na elektronu s nábojem e a hmotností m je dána vztahem

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

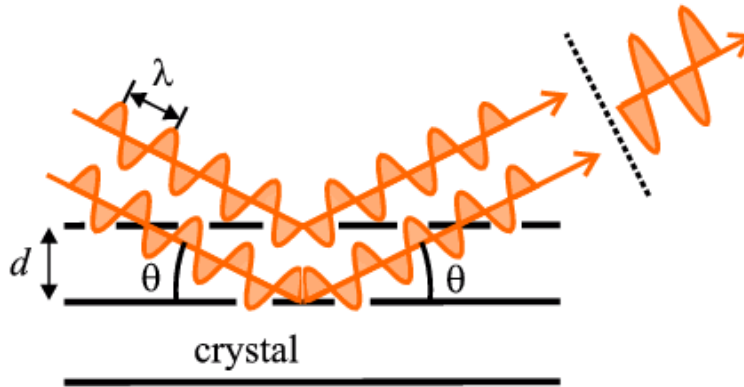
kde I_0 je intenzita primárního nepolarizovaného svazku, R je vzdálenost elektronu od atomového jádra, θ je úhel dopadu a člen $\frac{1 + \cos^2(\theta)}{2}$ se nazývá polarizační faktor [12]. Z rovnice (1.1) vyplývá, že dopadající záření je rozptylováno maximálně ve směru primárního svazku ($\theta = 0$) a minimálně do směrů kolmých na primární paprsek ($\theta = \pm \frac{\pi}{2}$).

Difrakce je interakce dopadajících paprsků s krystalem, resp. jeho trojrozměrnou periodickou krystalovou mřížkou. Vlnová délka rentgenového záření je srovnatelná s meziatomovými vzdálenostmi, proto je vhodné jeho použití pro monokrystalovou difrakci. Intenzita rozptýleného záření je složena z intenzit rozptylu na elektronech a na jádrech atomů. Nabitá jádra atomů mají mnohonásobně vyšší hmotnost než elektrony a z výrazu (1.1) proto plyne, že difraktují primární vlnu méně (řádově 10^4 méněkrát). Jejich příspěvek k celkové intenzitě je tedy zanedbatelný [8].

Elektrony jsou zdroji sekundárních vln, které spolu následně interferují. Z geometrické představy difrakce jako reflexe paprsků na atomových rovinách vyplývá podmínka pro jejich konstruktivní interferenci (viz Obrázek 1.1). Podmínka je vyjádřena tzv. Braggovou rovnicí

$$n\lambda = 2d \sin \theta, \quad (1.2)$$

kde n je přirozené číslo, λ je vlnová délka primárního svazku, d je vzdálenost mezi atomárními rovinami a θ je úhel svíraný mezi primárním svazkem a systémem odrážejících rovin. Ke konstruktivní interferenci tedy dochází v případě, že difraktované vlny mají v rovnoběžných rovinách stejnou fázi [6]. Číslo n se nazývá řádem reflexe.



Obrázek 1.1: Schéma k odvození Braggova zákona. Zleva dopadá primární svazek o vlnové délce λ . Paprsek je rozptýlen rovinami atomů, d je vzdálenost mezi nejbližšími atomárními rovinami. Úhel θ je úhel svíraný mezi primárním svazkem a systémem odrážejících rovin hkl . [9]

Geometrické podmínky difrakce lze interpretovat pomocí Ewaldovy konstrukce, která propojuje Braggovu rovnici (přímý prostor) a reciprokou mřížku (reciprokový prostor). Krystal je umístěn ve středu koule o poloměru λ^{-1} , počátek reciproké mřížky je průsečíkem povrchu Ewaldovy koule a směru primárního svazku. K reflexi paprsku dojde na každém systému rovin (hkl), jehož odpovídající uzel reciproké mřížky se nachází na povrchu koule. V tom případě je totiž splněna Braggova rovnice pro $n = 1$. Při difrakci na reálném krystalu s určitým tvarem a velikostí nejsou uzly body, nýbrž konečné oblasti reciprokého prostoru [8].

Krystal je možné považovat za systém n rozptylových center s rozptylovými schopnostmi f_j , poloha center je určena polohovými vektory $\mathbf{r}_j = x_j \cdot \mathbf{a} + y_j \cdot \mathbf{b} + z_j \cdot \mathbf{c}$. Pro popis amplitudy difraktované vlny se zavádí strukturální faktor krystalu definovaný vztahem

$$F(\mathbf{S}) = \sum_{j=1}^n f_j \cdot e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_j}, \quad (1.3)$$

kde $\mathbf{S} = \frac{(\mathbf{k} - \mathbf{k}_0)}{2\pi}$ je vektor rozptylu, \mathbf{k}_0 je vlnový vektor dopadající vlny a \mathbf{k} vlny rozptýlené. Pro pružný rozptyl platí $|\mathbf{S}| = \frac{2 \sin \theta}{\lambda}$. Při difrakci rentgenových paprsků jsou zdrojem sekundárního záření především elektrony. Namísto n diskrétních rozptylových center lze zavést spojitou funkci elektronové hustoty $\rho(\mathbf{r})$ definovanou jako výskyt elektronů v malém objemu dělený tímto objemem. Potom pro strukturální faktor $F(\mathbf{S})$ platí vztah

$$F(\mathbf{S}) = \int_V \rho(\mathbf{r}) e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_j} dv_r, \quad (1.4)$$

kde dv_r je element rozptylujícího objemu. Z tohoto výrazu plyne, že funkce $F(\mathbf{S})$ je Fourierovou transformací funkce $\rho(\mathbf{r})$. Inverzní Fourierovou transformací strukturního faktoru je možné získat funkci elektronové hustoty

$$\rho(\mathbf{r}) = \int_V F(\mathbf{S}) e^{-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_j} dv_s. \quad (1.5)$$

[8].

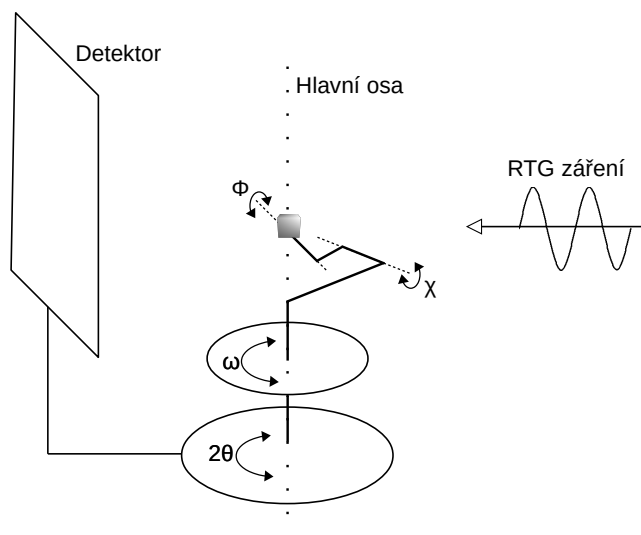
1.3 Standardní a *in situ* monokrystalová difrakce

Standardní difrakce na proteinových krystalech na konvenčních zdrojích rentgenového záření (in-house) je difrakce krystalu ve smyčce. Vzorek musí být vyloven z krystalizační kapky a poté být umístěn na goniometr, kde je chlazen parami tekutého dusíku (viz Obrázek 1.2). Ovšem při sebemenší manipulaci a změně prostředí krystalu dochází k mechanickému či chemickému poškozování vzorku. Chlazení zpomaluje přirozený biologický rozpad molekuly a zároveň omezuje radiační poškození vzorku. V tomto uspořádání je možné otáčet se smyčkou o 360° , nastavit libovolnou vzdálenost i úhel natočení detektoru vůči primárnímu paprsku.

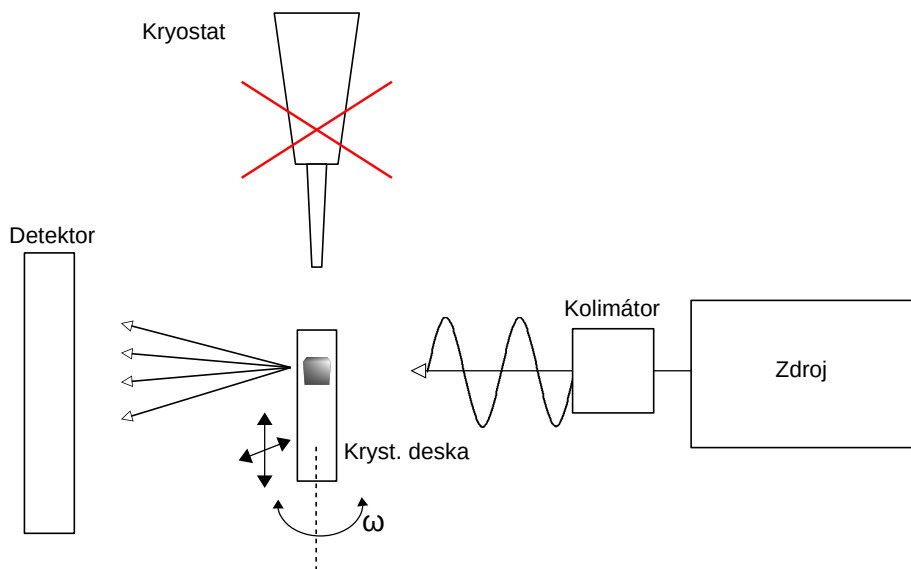
Difraktometr používaný v Biotechnologickém a biomedicínském centru Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci (BIOCEV) je difraktometr Bruker D8 Venture se zdrojem MetalJet D2 vybaveným tekutou galiovou anodou a s detektorem Photon II. K uchycení krystalu ve smyčce je využíván čtyřkruhový goniometr Kappa. Díky němu je možný pohyb vzorku kolem své osy (úhel Φ) a otočení až o 360° vůči primárnímu svazku (úhel ω). Detektor lze natáčet vůči primárnímu svazku (úhel 2θ) a měnit jeho vzdálenost od vzorku. Goniometr tudíž umožňuje mnoho různých nastavení standardního difrakčního experimentu. Standardní difrakcí lze naměřit data s vysokou kompletností.

Naopak při *in situ* difrakci je krystal ponechán v kapce, ve které vznikl, a do difraktometru se umístí celá destička pomocí přídatného motorizovaného ramena ISX Stage (viz Obrázek 1.3). Kryostat se v tomto případě nepoužívá. Chemické prostředí krystalu je zachováno, ale manipulace s destičkou, může vést k nechtěnému pohybu krystalu v kapce. Z tohoto důvodu může být výhodou volit krystal přirostlý k podkladu. Polohu destičky lze měnit pouze v rovině kolmé na primární paprsek, rotace desky je možná pouze kolem hlavní osy (úhel ω). Úhlový rozsah ω je ovšem omezený kvůli kolizím ramene a detektoru, resp. ramene a zdroje. Tento úhlový rozsah závisí na vzdálenosti a natočení detektoru byl zjištěn v provedených experimentech. V důsledku menšího rozsahu lze získat pouze nekompletní difrakční data.

Výhodou tohoto přístupu je plná automatizace sběru dat pro větší množství krystalů.



Obrázek 1.2: Schéma standardního difrakčního experimentu na čtyřkruhovém kappa goniometru. Zprava přichází primární svazek rentgenového záření, krystalem difraktovaný paprsek míří do plošného detektoru. Se vzorkem ve smyčce lze rotovat ve třech směrech (úhly Φ , χ a ω). Natáčet je možné i detektor vůči zdroji záření (úhel 2θ).



Obrázek 1.3: Schéma *in situ* difrakčního experimentu.

1.4 Metoda testování vazby malých fragmentů (fragment screening)

Standardní postup při metodě testování vazby malých fragmentů (fragment screening) je nechat protein v destičce vykrystalizovat a poté krystal proteinu po určitou dobu namáčet (soaking) v roztoku zvolených malých organických molekul (fragmentů) pouze jednoho typu za účelem navázání fragmentu k proteinu, většinou do jeho aktivního místa. Krystal je po namáčení vyjmut z kapky a probíhá difrakce monokrystalu ve smyčce. Fragmenty jsou vybírány z dostupných knihoven fragmentů, které obsahují stovky až tisíce molekul. Díky tomu je možné testovat velké množství náhodných fragmentů a rychleji najít takové, které s proteinem interagují.

Alternativní postup je *in situ* in-house fragment screening, který je zatím málo probádaný. Při něm je mikroskopem vybraný kvalitní krystal ponechán v krystalizační kapce a opatrně se odstraní ochranná fólie. Do kapky se přidá vypočtené množství roztoku jednoho typu fragmentu a vše se opět zakryje fólií, aby nedocházelo k vysychání kapky a zničení struktury krystalu. Správná doba namáčení krystalu v roztoku fragmentu je důležitá pro vytvoření vazby ligand-protein, mohou to být minuty až desítky hodin. Následně proběhne sběr *in situ* difrakčních dat.

1.5 Zpracování difrakčních dat

Vyhodnocení difrakčních dat specializovaným softwarem začíná výběrem reflexí s vysokou intenzitou a jejich indexací. Z jejich prostorového rozložení se určují mřížkové parametry elementární buňky. [14] [13]. Dalším krokem je integrace (určení intenzit) všech reflexí, před níž je nutné odečíst pozadí způsobené nepružným rozptylem. V této části procesu se ještě mohou zpřesnit parametry buňky. V závěru se reflexe škálují a z poloh a intenzit jednotlivých reflexí se určí Laueho grupa symetrie krystalu [13], [16].

Kvalitu zpracovaných dat lze charakterizovat těmito monitorovacími statistikami: $\langle I/\sigma \rangle$, ISa , R_{merge} , R_{meas} , $CC_{1/2}$. Ty jsou definovány vztahy:

$$\langle I/\sigma \rangle = \frac{1}{N} \sum_{hkl} \frac{|I_{hkl}|}{\sigma(I_{hkl})}, \quad (1.6)$$

kde N značí počet naměřených reflexí, I_{hkl} je intenzita reflexe (hkl) a $\sigma(I_{hkl})$ je její rozptyl (variance),

$$ISa = \sqrt{a \cdot b}, \quad (1.7)$$

kde a je míra příspěvku náhodné chyby a $a \cdot b$ je míra příspěvku systematické chyby k rozptylu $\sigma(I_{hkl})$, ISa je I/σ teoretické nekonečně silné reflexe [15],

$$R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_{i=1}^{N_{hkl}} |I_{i,hkl} - \overline{I_{hkl}}|}{\sum_{hkl} \sum_{i=1}^{N_{hkl}} I_{i,hkl}}, \quad (1.8)$$

$$R_{\text{meas}} = \frac{\sum_{hkl} \sqrt{\frac{N_{hkl}}{N_{hkl}-1}} \sum_{i=1}^{N_{hkl}} |I_{i,hkl} - \overline{I_{hkl}}|}{\sum_{hkl} \sum_{i=1}^{N_{hkl}} I_{i,hkl}}, \quad (1.9)$$

kde N_{hkl} je multiplicita reflexí roviny (hkl), $I_{i,hkl}$ značí jednotlivou reflexi (hkl), $\overline{I_{hkl}}$ je průměrná intenzita reflexe (hkl).

$$CC_{1/2} = \frac{\sum_{i=1}^{N/2} (I_i - \bar{I})(J_i - \bar{J})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{N/2} (I_i - \bar{I})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^{N/2} (J_i - \bar{J})^2}}, \quad (1.10)$$

kde I_i a J_i označují náhodně vybrané poloviny z naměřených dat, se nazývá Pearsonův korelační koeficient [7].

Obecně lze říci, že pro kvalitně zpracovaná difrakční data jsou hodnoty R_{merge} , R_{meas} nízké, zatímco $\langle I/\sigma \rangle$, ISA a $CC_{1/2}$ mají být co nejvyšší. Přesné hodnoty indikátorů rozdělující data na kvalitní a nekvalitní není možné stanovit, vždy záleží na konkrétní sadě naměřených dat.

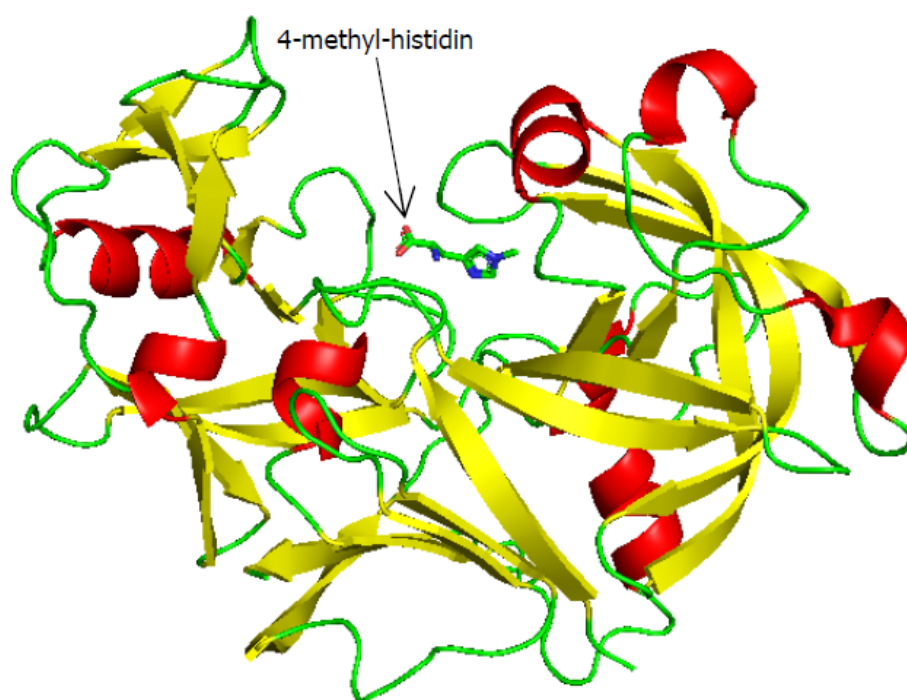
1.6 Protein Endothiapepsin

Endothiapepsin se řadí mezi hydrolázy se známou strukturou (viz Obrázek 1.4). Obsahuje 330 aminokyselin a jeho aktivní místo je tvořeno dvěma kyselinami asparagovými a jednou molekulou vody. Pro experimenty je nejčastěji používán Endothiapepsin izolovaný z parazitické houby *Cryphonectria parasitica* (dříve *Endothia parasitica*), která způsobuje onemocnění kůry stromů. Tento patogen způsobuje vysychání stromové kůry, v důsledku čehož strom uhne. Protein bude zkráceně nazýván EPCP.

Ve fragment screeningu je EPCP běžně využíván, protože má vysokou úspěšnost (10%) při vytváření vazby ligand-protein. EPCP je modelový protein pro aspartátové proteázy podobné pepsinu, které mají významnou roli v řadě onemocnění (např: malárie, Alzheimerova choroba, hypertenze) [2]. Pro tuto práci byl vhodný také z důvodu nízké krystalové symetrie. Symetrie a parametry krystalu EPCP jsou shrnuté v Tabulce 1.1.

Krystalová soustava	Monoklinická
Prostorová grupa	$P 2_1$
Mřížkové parametry základní buňky	
$a = 45,22 \text{ \AA}$	$\alpha = 90,00^\circ$
$b = 73,27 \text{ \AA}$	$\beta = 109,08^\circ$
$c = 52,79 \text{ \AA}$	$\gamma = 90,00^\circ$

Tabulka 1.1: Parametry elementární buňky a symetrie krystalu proteinu EPCP [2].



Obrázek 1.4: Protein EPCP s navázaným fragmentem zobrazený programem PyMOL se zabarvenými prvky sekundární struktury. V aktivním místě je navázan 4-methyl-histidin. V PDB databázi má struktura kód 4Y3J. [2]



Kapitola 2

Cíle

- Vypěstování kvalitních monokrystalů vhodných pro testování *in situ* fragment screeningu.
- Standardní difrakční měření krystalu enzymu.
- Optimalizace *in situ* difrakčního experimentu.
- Sběr difrakčních dat krystalu známého komplexu enzym-ligand pomocí *in situ* experimentu.
- Srovnání obou difrakčních přístupů.

Kapitola 3

Experimentální část

3.1 Optimalizace *in situ* měření

Při *in situ* difrakci na difraktometru Bruker D8 Venture se do difraktometru přidá rameno ISX Stage na upevnění krystalizační destičky. Software difraktometru obsahuje antikolizní systém, který se ovšem ukázal jako nedokonalý při používání módu ISX Stage. Proto bylo před započítím experimentů pro bezpečné používání ISX Stage důležité prozkoumat rotační limity krystalizační destičky vyplývající z geometrie experimentu. Z realizace experimentů vyplynuly dvě možné kolize: rameno-detektor a rameno-zdroj. Použita byla destička 3 drop Intelli-Plate 96, která je vysoká 14,2 mm. Pro nižší typy krystalizačních desek by se rozsahy mohly ještě mírně navýšit.

V experimentu bylo zkoumáno nastavení těchto tří parametrů: vzdálenost detektoru D_x od vzorku, úhel ω a úhel 2θ . Úhel 2θ je natočení detektoru vůči svazku primárního záření, rovina detektoru je na svazek kolmá při $2\theta = 0^\circ$. Úhel ω vyjadřuje natočení destičky vůči dopadajícímu paprsku, pro $\omega = 0^\circ$ je deska kolmo na zdroj a teoreticky s ní lze otáčet o 90° oběma směry. Právě rozpětí ω bylo podrobeno bližšímu zkoumání (viz Tabulka 3.1).

Při experimentu je třeba najít kompromis mezi vzdáleností detektoru D_x a úhlem otáčení destičky ω . Při menší vzdálenosti detektoru je vyšší rozlišení difraktogramu, ale kompletnost dat v důsledku omezeného ω je nižší. Toto nastavení je vhodné pro krystaly s vysokou vnitřní symetrií. Pro krystaly s nižší vnitřní symetrií je naopak potřeba získat co nejvyšší kompletnost dat. Toho lze dosáhnout zvýšením rozsahu ω , z něhož ovšem nutně vyplývá větší vzdálenost detektoru, a tedy i nižší výsledné rozlišení.

V průběhu pokusů se ukázalo, že roli hraje i nastavení konkrétní pozice na destičce. Pozice v levé části destičky (sloupce 1-6) mají rozsahy ω méně omezené oproti pozicím v pravé části (sloupce 6-12).

V první části byly zkoumány možnosti difraktometru pro úhel $2\theta = 0^\circ$. Při nastavení $\omega = 0^\circ$ je nejmenší možná vzdálenost detektoru 85 mm a lze tak dosáhnout rozlišení 2,52 Å. Úhel ω se ovšem nemůže nijak měnit. Naopak při

2θ (°)	D_x (mm)	Rozlišení* (Å)	Pozice na desce	ω_{max} (°)	ω_{min} (°)	Rozpětí ω (°)
0	85	2,52	libovolná	0	0	0
0	150	4,13	A1a	38	-57	95
			H1c	39	-57	96
			A12a	20	-44	64
			H12c	20	-45	65
0	102	2,92	A1a	19	-57	76
			H1c	19	-57	76
			A12a	19	-44	63
			H12c	19	-45	64
-10	150	2,70	A1a	28	-57	85
			H1c	28	-57	85
			A12a	10	-44	54
			H12c	10	-45	55
+10	150	2,70	A1a	45	-57	102
			H1c	45	-57	102
			A12a	27	-44	71
			H12c	27	-45	72

Tabulka 3.1: * Rozlišení na hraně detektoru.

Tabulka shrnující možné rozsahy úhlu ω natočení destičky vůči zdroji záření pro zvolená nastavení *in situ* difrakčního experimentu. Úhel 2θ je natočení detektoru vůči svazku primárního záření, D_x je vzdálenost detektoru od vzorku.

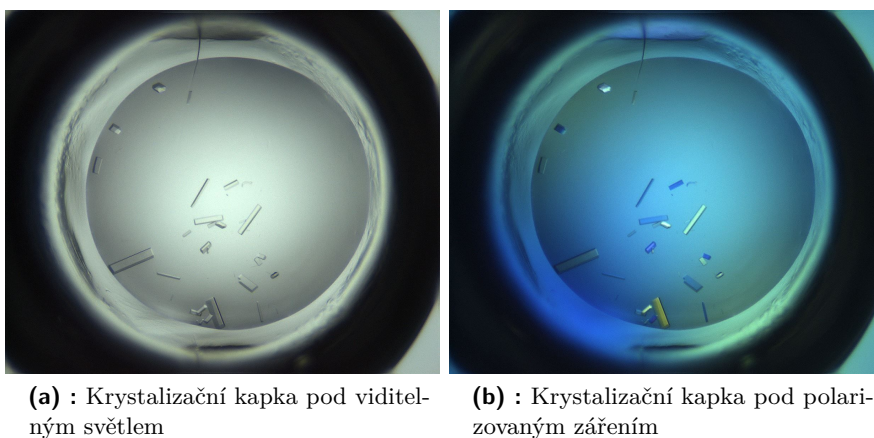
maximální vzdálenosti $D_x = 150$ mm je rozsah ω pro levou část desky 95° a pro pravou část desky 64° . Rozlišení je ale kvůli velké vzdálenosti detektoru pouze 4,13 Å. Při kompromisním nastavení byla zvolena $D_x = 102$ mm a dosažené rozpětí ω bylo 76° pro levou část desky a 63° pro pravou část. V tomto případě bylo teoretické rozlišení experimentu 2,92 Å.

Ve druhé části byl konstantní $D_x = 150$ mm a úhel 2θ byl proměnný. S konfigurací $2\theta = +10^\circ$ byl rozsah ω podstatně větší pro levou i pravou část desky než při nastavení $2\theta = -10^\circ$. V obou případech bylo rozlišení shodně 2,70 Å. Detektor v konfiguraci $2\theta = -10^\circ$ omezuje rameno ISX Stage v pohybu, proto by do budoucna mohla být upřednostňována spíše uspořádání s úhlem 2θ kladným. Při volbě $2\theta = +10^\circ$ byl rozsah úhlu ω 102° pro levé části destičky, což byla nejvyšší naměřená hodnota ze všech konfigurací, a 71° pro pravé části destičky, což pro pravou část desky byla nejvyšší naměřená hodnota ze všech konfigurací.

3.2 Krystalizace a namáčení (soaking) krystalů

Podmínky pro krystalizaci EPCP byly známy. Byla zvolena technika sedící kapky v kombinaci s vlasovým očkovaním. Krystalizace proteinu proběhla za pokojové teploty v precipitantu obsahujícím 100mM roztok octanu amonného (NH_4Ac), 29% PEG 4000 a 100mM roztok octanu sodného (NaAc) při pH 4,6 v destičce 3 drop Intelli-Plate 96. Objem rezervoáru byl 50 μl , do krystalizačních kapek bylo dáno 0,5 μl precipitantu a 0,5 μl proteinu EPCP. Krystalý vyrostly

už po 13 dnech od nasazení (viz Obrázek 3.1).



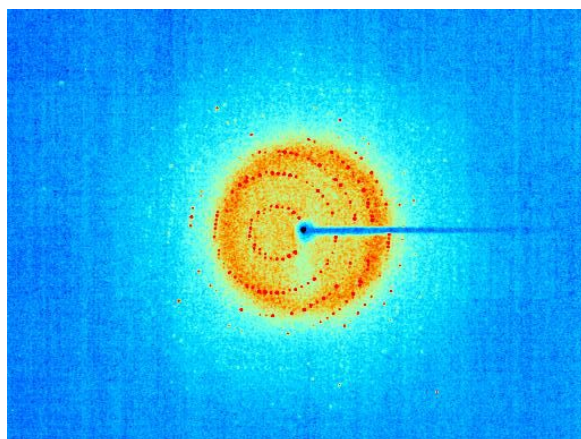
Obrázek 3.1: Vypěstované krystaly EPCP v krystalizačních kapkách po 13 dnech od počátku krystalizace.

Za účelem získání krystalů s navázaným ligandem bylo po úspěšné krystalizaci proteinu EPCP provedeno namáčení (soaking) několika vybraných krystalů v destičce 3 drop Intelli-Plate 96. Z knihovny fragmentů byl vybrán 3-amino-1H-isoindol hydrochlorid s relativní molární hmotností 168,62 g/mol. Z něj byl vytvořen 1M roztok a 100mM roztok. Namáčení probíhalo dvěma způsoby. První možností je k vypěstovaným krystalům přidat do kapky 1,5 μl 100mM roztoku a obsah pipetou zamíchat. Druhá možnost je přenést krystaly smyčkou z pozice kapky A do kapky B, v níž je 0,5 μl roztoku fragmentu o koncentraci 100 mM. Namáčení trvalo 100 minut za pokojové teploty a poté následovalo měření na difraktometru.

3.3 Výsledky měření standardní difrakce krystalu

Experimenty byly provedeny na difraktometru Bruker D8 Venture s galiovou anodou, s vlnovou délkou primárního svazku $\lambda = 0,13418$ nm. Při standardním difrakčním experimentu bylo zvoleno toto nastavení parametrů: $D_x = 50$ mm, $\chi = 90^\circ$, $\omega = 0^\circ$, $2\theta = 0^\circ$. Rotace v úhlu Φ byla 360° . Rotací o $\Phi = 0,5^\circ$ s expozičním časem 1 s bylo získáno 720 difrakčních snímků (viz Obrázek 3.2).

Data z difrakčního experimentu byla zpracována pomocí softwaru XDS (X-Ray Detector Software) s cílem určit prostorou grupu krystalu. Pro úspěšné provedení procesu je nezbytné zadat programu přesnou vlnovou délku a polohu rentgenového paprsku a vzdálenost detektoru od krystalu. Volbou malé vzdálenosti D_x bylo umožněno dosáhnout vysokého rozlišení 1,7 Å. Výsledné statistické hodnoty pro rozlišení 1,7 Å jsou shrnuty v Tabulce 3.2.



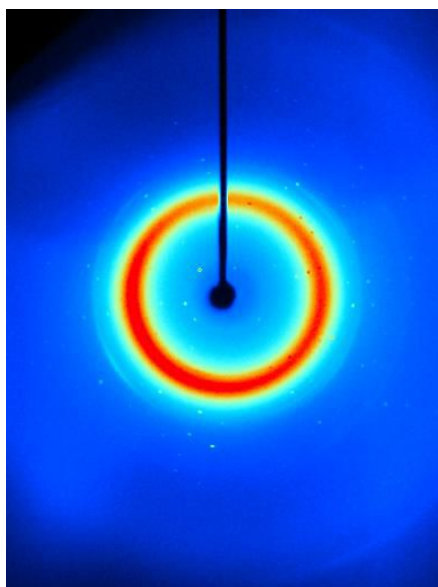
Obrázek 3.2: Difrakční snímek souboru dat naměřených při standardní difrakci krystalu proteinu EPCP.

Počet snímků	720
Celkový úhel otočení Φ ($^{\circ}$)	360
Difrakční limit (\AA)	50,00 - 1,70 (1,80 - 1,70)
Prostorová grupa	$P 2$
Parametry elementární buňky:	
a (\AA)	44,80
b (\AA)	72,09
c (\AA)	51,93
α ($^{\circ}$)	90,00
β ($^{\circ}$)	108,39
γ ($^{\circ}$)	90,00
Počet naměřených reflexí	205059 (13241)
Počet nezávislých reflexí	32840 (4679)
Kompletnost (%)	95 (84)
Multiplicita (Redundance)	6,2 (2,8)
Mozaicita ($^{\circ}$)	0,2
$CC_{1/2}$ (%)	99,7 (37,0)
Wilsonův B-faktor (\AA^2)	22
$\langle I/\sigma \rangle$	12,2 (1,0)
R_{meas} (%)	13,2 (90,8)
R_{merge} (%)	12,2 (75,7)

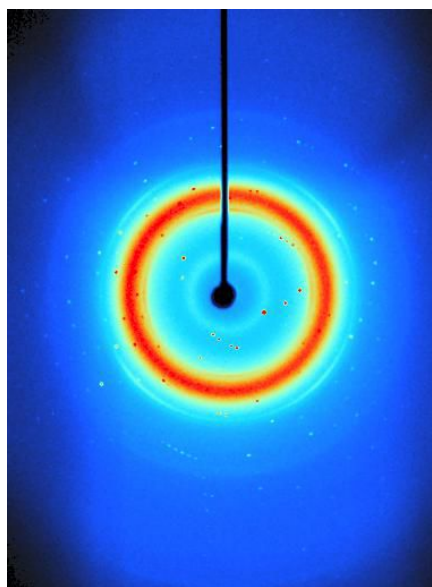
Tabulka 3.2: Statistické hodnoty pro standardní difrakci krystalu EPCP. Hodnoty v závorkách odpovídají hodnotám ve slupce s nejvyšším rozlišením.

3.4 Výsledky měření *in situ* difrakce krystalu

Experimenty byly provedeny na difraktometru Bruker D8 Venture s vlnovou délkou primárního svazku $\lambda = 0,13418$ nm. Data z experimentů byla zpracována pomocí softwaru XDS. Při prvním *in situ* difrakčním experimentu byl měřen krystal EPCP bez fragmentu v krystalizační kapce B4a. Bylo zvoleno toto nastavení experimentu: $D_x = 90$ mm, $2\theta = 0^\circ$. Rotace v úhlu ω byla od -40° do $+5^\circ$. Rotací o $\omega = 0,5^\circ$ s expozičním časem 10 s bylo získáno 90 snímků (viz Obrázek 3.3). Statistiky po zpracování dat jsou shrnuty v Tabulce 3.3.



(a) : Snímek pro $\omega = -35,5^\circ$.



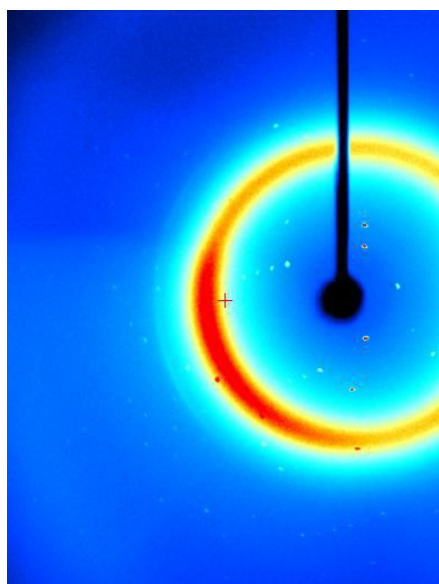
(b) : Snímek pro $\omega = 3,5^\circ$.

Obrázek 3.3: Difrakční snímky souboru dat naměřených při *in situ* difrakci krystalu proteinu EPCP bez fragmentu.

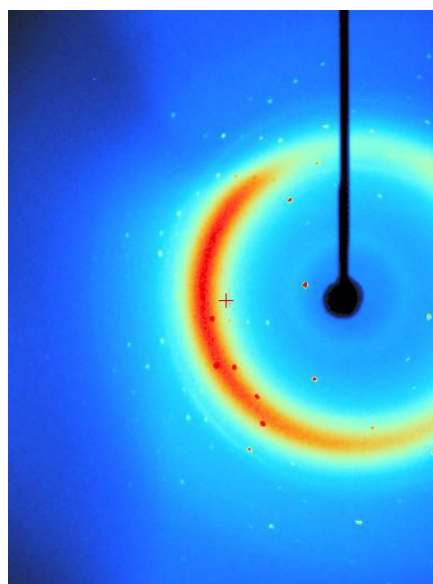
Při druhém *in situ* difrakčním experimentu byl měřen stejný krystal EPCP (v kapce B4a) po namáčení v roztoku fragmentu, tedy možná s navázaným ligandem. Nastavení experimentu bylo: $D_x = 135$ mm, $2\theta = 12^\circ$. Rotace v úhlu ω byla od -30° do $+30^\circ$. Rotací o $\omega = 0,5^\circ$ s expozičním časem 20 s bylo získáno 120 snímků (viz Obrázek 3.4). Výsledné statistické hodnoty pro rozlišení 2,2 Å, 2,1 Å a 2,0 Å jsou shrnuty v Tabulce 3.4.

Počet snímků	90
Celkový úhel otočení ω ($^\circ$)	45
Difrakční limit (\AA)	50,00 - 2,00 (2,13 - 2,00)
Prostorová grupa	<i>P</i> 2
Parametry elementární buňky:	
a (\AA)	46,05
b (\AA)	74,31
c (\AA)	53,79
α ($^\circ$)	90,00
β ($^\circ$)	109,95
γ ($^\circ$)	90,00
Počet naměřených reflexí	13572 (705)
Počet nezávislých reflexí	9732 (601)
Kompletnost (%)	42 (16)
Multiplicita (Redundance)	1,4 (1,2)
Mozaicita ($^\circ$)	0,2
$CC_{1/2}$ (%)	97,5 (85,8)
Wilsonův B-faktor (\AA^2)	31
$\langle I/\sigma \rangle$	3,5 (1,2)
R_{meas} (%)	14,2 (48,7)
R_{merge} (%)	10,2 (34,4)

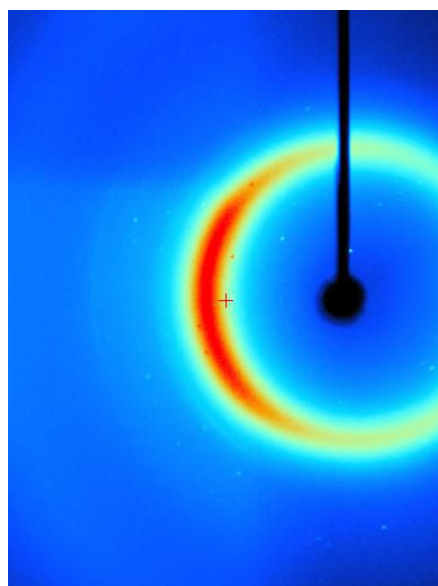
Tabulka 3.3: Statistické hodnoty pro *in situ* difrakci krystalu EPCP bez fragmentu. Hodnoty v závorkách odpovídají hodnotám ve slupce s nejvyšším rozlišením.



(a) : Snímek pro $\omega = -30^\circ$.



(b) : Snímek pro $\omega = 0^\circ$.



(c) : Snímek pro $\omega = +30^\circ$.

Obrázek 3.4: Difrakční snímky souboru dat naměřených při *in situ* difrakci namáčeného krystalu proteinu EPCP.

Počet snímků	120		
Celkový úhel otočení ω (°)	60		
Difrakční limit (Å)	50,00 - 2,20 (2,33 - 2,20)	50,00 - 2,10 (2,22 - 2,10)	50,00 - 2,00 (2,11 - 2,00)
Prostorová grupa	<i>P</i> 2	<i>P</i> 2	<i>P</i> 2
Parametry elementární buňky:			
a (Å)	45,94	45,95	45,95
b (Å)	73,99	74,01	74,00
c (Å)	53,60	53,62	53,62
α (°)	90,00	90,00	90,00
β (°)	109,91	109,91	109,91
γ (°)	90,00	90,00	90,00
Počet naměřených reflexí	10019 (791)	10477 (567)	10758 (331)
Počet nezávislých reflexí	8282 (682)	8692 (511)	8960 (316)
Kompletnost (%)	48 (25)	44 (16)	39 (9)
Multiplicita (Redundance)	1,2 (1,2)	1,2 (1,1)	1,2 (1,1)
Mozaicita (°)	0,2	0,2	0,2
$CC_{1/2}$ (%)	96,3 (76,6)	96,3 (55,3)	96,3 (69,3)
Wilsonův B-faktor (Å ²)	41	40	39
$\langle I/\sigma \rangle$	2,89 (0,62)	2,75 (0,46)	2,65 (0,37)
R_{meas} (%)	17,3 (52,5)	17,7 (58,6)	17,9 (77,1)
R_{merge} (%)	12,4 (37,1)	12,7 (41,4)	12,8 (54,5)

Tabulka 3.4: Statistické hodnoty pro *in situ* difrakci namáčeného krystalu EPCP. Hodnoty v závorkách odpovídají hodnotám ve slupce s nejvyšším rozlišením.

Kapitola 4

Diskuse

Kvalita difrakčních dat je posuzována celou řadou kritérií. Je vhodné, aby rozlišení dat bylo dostatečně vysoké, pro analýzu vazby ligand-protein přibližně hodnoty okolo 2,0 Å. Kompletnost dat je dobré mít také vysokou. Hodnoty ve slupce s nejvyšším rozlišením by měly být nejméně 1,0 pro $\langle I/\sigma \rangle$ a minimálně 30 % pro korelační faktor $CC_{1/2}$. Hodnoty R -faktorů (R_{meas} , R_{merge}) jsou při zpracování kvalitních difrakčních dat nízké. Pro jejich výpočet je zásadní počet a multiplicita naměřených reflexí. Pokud je množství reflexí nedostatečné, nejsou hodnoty R -faktorů dostatečně reprezentativní pro celou sadu dat.

Data z provedeného standardního difrakčního experimentu splňují prakticky všechna kvalitativní kritéria pro úspěšné pozorování ligandu, pokud je navázán. Difrakční limit dat byl zvolen tak, aby hodnota $\langle I/\sigma \rangle$ ve slupce s nejvyšším rozlišením byla alespoň rovna jedné. Při dosaženém vysokém rozlišení 1,7 Å je celková kompletnost dat 95 % (ve slupce s nejvyšším rozlišením 84 %). Díky zvolené rotaci krystalu o 360° v úhlu Φ je vysoká i multiplicita reflexí (6,2). Prostorová grupa krystalu $P 2$ je určena správně až na přítomnost šroubové osy 2₁. Parametry základní buňky se od referenčních hodnot v Tabulce 1.1 liší v řádu desetin Å nebo stupňů, s výjimkou velikosti b , která je menší o 1,1 Å. Průměrná hodnota $\langle I/\sigma \rangle$ je 12,2 (ve slupce s nejvyšším rozlišením 1,0), korelační faktor $CC_{1/2}$ je 99,7 % (i v nejvyšší slupce stále 37,0 %). Tyto čtyři hodnoty jsou relativně velmi vysoké. Díky přesnému měření a kvalitnímu zpracování jsou celkové hodnoty R -faktorů nízké, $R_{\text{meas}} = 13,2$ %, $R_{\text{merge}} = 12,2$ %. Mozaicita krystalu je 0,2°.

In situ in-house difrakce nabízí odlišný přístup ke zkoumání interakce ligand-protein. V této metodě není vzorek chlazený parami tekutého dusíku za použití kryoprotektantu, nemůže proto dojít k vytěsnění slabě vázaného ligandu z aktivního místa kryoprotektantem. Použití *in situ* difrakce je výhodné pro makromolekuly, které nelze mrazit s pomocí kryoprotektantu. Ovšem provádění experimentu s krystalizační deskou vede k vysokému pozadí difrakčních snímků. Pozadí je navíc v průběhu experimentu proměnné (viz Obrázek 3.4). Technologická omezení *in situ* experimentů jsou v současné době zkoumána.

Jedním z významných omezení je možnost natáčení destičky v průběhu *in situ* experimentů. Analýzou maximálního úhlového rozsahu pro jednotlivé pozice kapek v destičce 3 drop Intelli-Plate 96 pomocí ramena ISX Stage byly stanoveny bezpečné limity úhlu ω pro tři různá natočení detektoru. Zvolený modelový protein EPCP má nízkou krystalovou symetrii, a proto bylo důležité naměřit i pro krystaly v destičce data s co nejvyšší kompletností. Toho lze dosáhnout právě zvýšením rozpětí úhlu ω . Z optimalizačních pokusů (viz Tabulka 3.1) vyplynulo, že je výhodné provádět měření na krystalech v levé části destičky (ve sloupcích 1 až 6) a při nastavení detektoru do kladných úhlů 2θ . Naopak při zvolení záporného úhlu 2θ jsou možnosti rotace desky značně omezené kvůli předcházení kolizi ramena s detektorem. Nejvyšší úhlový rozsah (dokonce 102°) byl umožněn pro levou část desky při nastavení $2\theta = +10^\circ$ a $D_x = 150$ mm. Na rozpětí úhlu ω při této difrakční metodě má zásadní vliv typ použité destičky, její výška a velikost. Pro nižší destičky by mohlo být dosaženo ještě vyšších rozsahů pro úhel ω .

Byly realizovány dva *in situ* experimenty s krystalem EPCP v kapce B4a. Při měření krystalu před namáčením v roztoku fragmentu bylo s deskou otáčeno o 45° . Z difrakčních snímků (viz Obrázek 3.3) je jasně vidět, že pro desku natočenou kolmo vůči detektoru (úhly ω okolo 0°) je počet viditelných reflexí násobně vyšší než pro desku pod velkým úhlem. Poté bylo provedeno namáčení tohoto krystalu do roztoku fragmentu 3-amino-1H-isoindol hydrochloridu bez přenášení krystalu. Zvětšení objemu kapky mohlo přispět ke slabší difrakci namáčeného krystalu. V následujícím experimentu s krystalem po namáčení bylo kvůli snaze o vyšší kompletnost dat rotováno s deskou o 60° . Nebyl zvolen maximální možný rozsah úhlu ω . Na difrakčních snímcích (viz Obrázek 3.4) je vidět značné množství reflexí i pro větší natočení úhlu ω .

V důsledku pouze omezených možností rotace s deskou jsou počty reflexí i multiplicita nižší než při standardní difrakci. Ze stejného důvodu je výrazně nižší i kompletnost dat, pro krystal bez fragmentu 42 % (v nejvyšší slupce jen 16%) a pro namáčený krystal 39 % (v nejvyšší slupce jen 9 %). Přestože byly oba experimenty provedeny s krystalem na stejné pozici v destičce, je v důsledku jinak zvolené geometrie počet nezávislých reflexí ve slupce s nejvyšším rozlišením pro namáčený krystal dvakrát menší než pro krystal před namáčením. A to i přes vyšší celkový úhel otočení namáčeného krystalu (60°) než u krystalu bez fragmentu (45°). Kompletnost dat a počet reflexí jsou parametry závislé na přesném natočení krystalu v kapce, které mohlo pro namáčený krystal být nevýhodnější. Důvodem je ale spíše neideální natočení detektoru (viz Obrázek 3.4). Tato skutečnost naznačuje, že pro *in situ* měření s přirozeně omezeným úhlovým rozsahem ω by bylo vhodnější využívat kolmou geometrii detektoru vůči primárnímu svazku. Obě sady dat byly zpracovány s navrženou prostorovou grupou $P 2$.

Na základě hodnot indikátorů kvality zpracování difrakčních dat jsme stanovili difrakční limit pro data z *in situ* difrakce krystalu před namáčením 2,0

Å (nižší než pro standardní difrakci) a data z *in situ* difrakce krystalu po namáčení byla zpracována do stejného rozlišení, aby bylo možné porovnávat konkrétní hodnoty parametrů. Pro krystal bez fragmentu je celková průměrná $\langle I/\sigma \rangle$ 3,5 (v nejvyšší slupce 1,2). Ovšem pro namáčený krystal je $\langle I/\sigma \rangle$ velmi nízká už při rozlišení 2,20 Å (celkově 2,89, v nejvyšší slupce jen 0,69). Pro vyšší rozlišení 2,0 Å je $\langle I/\sigma \rangle$ ještě nižší, celková 2,65 a v nejvyšší slupce 0,37. Korelační faktory $CC_{1/2}$ jsou naopak v obou *in situ* sadách dat vysoké, protože jsou ovlivněny nižším počtem naměřených reflexí. *R*-faktory jsou pro nízká rozlišení přijatelně vysoké, ovšem s rostoucím rozlišením se jejich hodnoty přirozeně zvyšují. Pozoruhodné je, že mozaicita krystalů je shodně 0,2° pro všechny tři sady naměřených dat.

Náročnost přípravy vzorků pro standardní a *in situ* difrakci je srovnatelná. Při standardní difrakci krystalu ve smyčce je vzorek chlazený kryostatem, což může strukturu krystalu stabilizovat. Při *in situ* difrakci je naopak krystal ponechán ve svém přirozeném chemickém prostředí, ale dochází k rozsáhlejšímu radiačnímu poškození. Při této metodě je nutné do difraktometru přidat rameno ISX Stage pro umístění desky. Jeho softwarová obsluha je značně složitá. Další komplikace při užití difraktometru Bruker D8 Venture vznikají důsledkem toho, že po přidání ramena nefunguje antikolizní systém difraktometru bezchybně.

Vyřešení struktury proteinu EPCP namáčeného v roztoku fragmentu přesahuje rámec této bakalářské práce. Pro plné posouzení užitečnosti přístupu *in situ* in-house difrakce je vhodné například vypočítat mapy elektronové hustoty, které by prokazatelně potvrdily schopnost rozpoznat interakci protein-ligand. Určení struktur z takto naměřených difrakčních dat bude předmětem dalšího zkoumání.



Závěr

- Byla provedena krystalizace proteinu EPCP a vybrané kvalitní krystaly byly namáčeny v roztoku fragmentu 3-amino-1H-isoindol hydrochloridu.
- Při standardní difrakci krystalu ve smyčce byla nasbírána data s rozlišením 1,7 Å.
- Při *in situ* difrakčním experimentu krystalu bez přítomnosti fragmentu bylo s deskou otáčeno o 45° a po zpracování dat byl difrakční limit stanoven na 2,0 Å.
- Při *in situ* difrakčním experimentu krystalu namáčeného v roztoku fragmentu byla data zpracována do stejného rozlišení jako u krystalu bez fragmentu, tedy 2,0 Å. S deskou bylo otáčeno o 60°.
- *In situ* difrakční data jsou podle téměř všech indikátorů méně kvalitní v porovnání se standardními daty.
- Celková analýza sesbíraných dat byla do značné míry omezena nízkou symetrií krystalu zvoleného modelového proteinu - nízká kompletnost dat.
- Náročnost metodiky standardních a *in situ* difrakčních experimentů při metodě testování vazby malých fragmentů je srovnatelná.



Literatura

- [1] KENDREW J.C., BODO G., DINTZIS H.M., PARRISH R.G., WYCKOFF H. A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis. *Nature*. 1958, Volume 181, Issue 4610, p. 662-666. DOI: 10.1038/181662a0.
- [2] HUSCHMANN F.U., LINNIK J., SPARTA K., ÜHLEIN M., WANG X., METZ A., SCHIEBEL J., HEINE A., KLEBE G., WEISS M.S., MUELLER U. Structures of endothiapsin-fragment complexes from crystallographic fragment screening using a novel, diverse and affordable 96-compound fragment library. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 2016, 72, p. 346-55. DOI: 10.1107/S2053230X16004623.
- [3] MAREK J., TRÁVNÍČEK Z. Monokrystalová rentgenová strukturní analýza. Vyd. 1. Olomouc: Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta, 2002. Str. 124. ISBN: 80-244-0551-2.
- [4] KUTÁ SMATANOVÁ I. Krystalizace biologických makromolekul. Webová stránka. [citováno dne: 14.4.2019] Dostupné z: <https://www.xray.cz/kryst/difrakce/iva/krystalizace.htm>.
- [5] HAMPTON RESEARCH. Sitting Drop Vapor Diffusion Crystallization. 2017. Dostupné z: https://hamptonresearch.com/documents/growth_101/4.pdf. [citováno dne: 15.4.2019]
- [6] KITTEL CH. Úvod do fyziky pevných látek. Praha: Academia, 1985.
- [7] MALÝ M. Optimalizace parametru zpracování difrakčních dat oxidázy z *Microdochium nivale*. Praha: 2016. Bakalářská práce. ČVUT.
- [8] KRAUS I., FRANK H., KRATOCHVÍLOVÁ I. Úvod do fyziky pevných látek. Vyd. 2., přeprac. Praha: ČVUT, 2009. ISBN 978-80-01-04257-1.
- [9] BARNES P., CSOKA T., JACQUES S. Bragg's Law. London: Birkbeck College, University of London. Webová stránka. Dostupné z: <http://pd.chem.ucl.ac.uk/pdnn/powintro/braggs.htm> [citováno dne: 15.4.2019]
- [10] KRAUS I. Úvod do strukturní rentgenografie. Praha: Academia, 1985.

- [11] Experimental diffraction. Evaluating the diffraction pattern. Madrid: CBE, Instituto de Química-Física Rocasolano. Webová stránka. Dostupné z: http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte_06_2-en.html [citováno dne: 24.4.2019]
- [12] VALVODA V., POLCAROVÁ M., LUKÁČ P. Základy strukturní analýzy. Praha: Karolinum, 1992.
- [13] Krystalografická společnost. XII. Určování struktury krystalů. Webová stránka. Dostupné z: <https://www.xray.cz/krystalografie/str12a.htm> [citováno dne: 20.5.2019]
- [14] Xds. 18 December 2014. Webová stránka. University of Konstanz. Dostupné z: <https://strucbio.biologie.uni-konstanz.de/xdswiki/index.php/Xds> [citováno dne: 20.5.2019]
- [15] ISa. 11 April 2016. Webová stránka. University of Konstanz. Dostupné z: <https://strucbio.biologie.uni-konstanz.de/xdswiki/index.php/ISa> [citováno dne: 20.5.2019]
- [16] KABSCH, W. XDS. Acta Crystallographica. February 2010, volume 66, part 2, pages 125-132. ISSN: 2059-7983