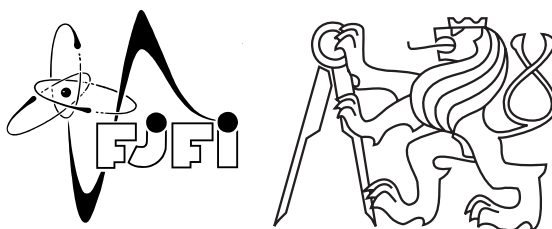


ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE  
FAKULTA JADERNÁ A FYZIKÁLNĚ INŽENÝRSKÁ

Katedra inženýrství pevných látek

Obor: Inženýrství pevných látek



**Krystalografické testování vazby ligandů  
S1-P1 nukleasy.**

**Crystallographic fragment screening of  
S1-P1 nuclease.**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Vypracoval: Karolína Špeldová

Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Koval', Ph.D.

Rok: 2021



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

**ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

<i>Student:</i>	<b>Karolína Špeldová</b>
<i>Studijní program:</i>	<b>Aplikace přírodních věd</b>
<i>Obor:</i>	<b>Inženýrství pevných látek</b>
<i>Akademický rok:</i>	<b>2020/2021</b>
<i>Název práce: (česky)</i>	<b>Krystalografické testování vazby ligandů S1-P1 nukleasy.</b>
<i>Název práce: (anglicky)</i>	<b>Crystallographic fragment screening of S1-P1 nuclease.</b>

*Pokyny pro vypracování:*

Bakalářská práce je zaměřena na studium tvorby komplexů nukleasy z rodiny S1-P1 s vybranými nízkomolekulárními ligandy pomocí krystalografie. Vybraná nukleasa bude krystalizovaná. Získané krystaly budou namáčeny v roztocích ligandů a užity pro účely strukturní analýzy. Získaná strukturní data budou zpracována a vyhodnocena pomocí moderních výpočetních metod. Experimenty budou realizovány na zařízení Bruker D8 Venture v Centru molekulární struktury Biotechnologického ústavu AV ČR, v.v.i.

Při řešení postupujte podle následujících bodů.

I. Rešeršní/teoretická část

- 1) Krystalizace biologických makromolekul a difrakce na monokrystalu.
- 2) Studium komplexů proteinů s nízkomolekulárními ligandy s použitím krystalografie.
- 3) Nukleasy se zaměřením na rodinu S1-P1.

II. Experimentální část

- 1) Krystalizace nukleasy z rodiny S1-P1.
- 2) Příprava krystalů komplexů nukleasy s vybranými nízkomolekulárními ligandy.
- 3) Difrakční experimenty a vyhodnocení difrakčních dat.
- 4) Výsledky a jejich diskuze

*Doporučená literatura:*

- [1] B. Rupp: Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology, Garland Science, New York 2010.
- [2] T. Koval, J. Dohnálek: Biotechnology Advances **36** (2018) 603-612.
- [3] S.E. Thomas, P. Collins, R.H. James, et al.: Phil. Trans. R. Soc. A **377** (2019) 20180422.
- [4] F.U. Huschmann, J. Linnik, K. Sparta, et al.: Acta Cryst. F **72** (2016) 346-355.

*Jméno a pracoviště vedoucího práce:*

Mgr. Tomáš Koval', PhD., Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i.

*Jméno a pracoviště konzultanta:*

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

*Datum zadání bakalářské práce:* 5. 10. 2020

*Termín odevzdání bakalářské práce:* 7. 7. 2021

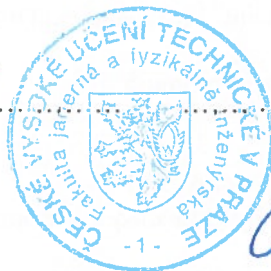
Doba platnosti zadání je dva roky od data zadání.



.....  
garant



.....  
vedoucí katedry

  
.....  
děkan

V Praze dne 5. 10. 2020

## **Prohlášení**

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

V Praze dne .....

.....  
Karolína Špeldová



## Poděkování

Velice ráda bych poděkovala Mgr. Tomášovi Kovařovi, Ph.D. za jeho skvělý přístup, cenné odborné rady, ochotu při jejich nekonečném opakování a především za trpělivost při vedení mé bakalářské práce. Děkuji také doc. Ing. Petru Kolenkovi, Ph.D. a Ing. Janu Dohnálkovi, Ph.D. za odborné rady při konzultování mé práce. Také bych ráda poděkovala všem kolegům z Laboratoře Struktury a funkce biomolekul Biotechnologického ústavu AV ČR za milý přístup a užitečné připomínky k mé práci.

Karolína Špeldová

*Název práce:*

**Krystalografické testování vazby ligandů S1-P1 nukleasy.**

*Autor:* Karolína Špeldová

*Studijní program:* Aplikace přírodních věd

*Obor:* Inženýrství pevných látek

*Druh práce:* Bakalářská práce

*Vedoucí práce:* Mgr. Tomáš Kovař, Ph.D.

Laboratoř Struktury a funkce biomolekul, Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i., Biocev, Vestec

*Konzultant:* doc. Ing. Petr Kolenko, Ph.D.

Katedra inženýrství pevných látek, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, ČVUT v Praze

*Abstrakt:* Nukleasy jsou hydrolasy štěpící fosfodiesterové vazby nukleových kyselin. Ke studiu vazeb komplexů nukleasy z rodiny S1-P1 s ligandy byla využita metoda testování vazeb fragmentů. Tato metoda má široké využití například při objevování nových léků. Nukleasy z rodiny S1-P1 se vyskytují v rostlinách, houbách, bakteriích či trypanosomách. Komplexy byly vytvořeny namáčením krystalů nukleasy do roztoku ligandů a vitrifikovány. Takto vzniklé krystaly komplexů byly podrobeny rentgenové strukturní analýze na zdroji synchrotronového záření BESSY II v Berlíně. Pomocí molekulárního nahrazení byly po zpracování získaných difrakčních dat určeny struktury těchto komplexů. Bylo ukázáno navázání některých ligandů do aktivního místa nukleasy z rodiny S1-P1.

*Klíčová slova:* testování vazeb ligandů, nukleasa, proteinová krystalografie, rentgenová strukturní analýza

*Title:*

**Crystallographic fragment screening of S1-P1 nuclease.**

*Author:* Karolína Špeldová

*Abstract:* Nucleases are hydrolases that cleave the phosphodiester bonds of nucleic acids. A nuclease of the S1-P1 family has been used to fragment screening. This method has wide applications, for example, in drug discovery. Members of the S1-P1 nuclease family are found in plants, fungi, bacteria and trypanosomes. The complexes were formed by soaking nuclease crystals into a ligand solution and then vitrified. The crystals of the complexes were subjected to X-ray structure analysis on a synchrotron radiation source BESSY II in Berlin. The structures of these complexes were determined by molecular replacement after processing the obtained diffraction data. Binding of some ligands into the active site of the S1-P1 nuclease was shown.

*Key words:* fragment screening, nuclease, protein crystallography, X-ray structural analysis

# Obsah

Úvod	10
<b>I Teoretická část</b>	<b>11</b>
<b>1 Makromolekulární krystalografie</b>	<b>12</b>
1.1 Krystalizace biologických makromolekul . . . . .	12
1.1.1 Krystalizace proteinů . . . . .	12
1.1.2 Příprava vzorku pro krystalizaci . . . . .	14
1.1.3 Metody krystalizace . . . . .	15
1.1.4 Vitifikace . . . . .	16
1.2 Difrakce záření na krystalové mřížce . . . . .	16
1.2.1 Krystalová mřížka . . . . .	17
1.2.2 Rentgenová krystalografie . . . . .	17
<b>2 Experimentální přístroje a metody</b>	<b>21</b>
2.1 Techniky měření rentgenové strukturní analýzy . . . . .	21
2.1.1 Zdroje rentgenového záření . . . . .	21
2.1.2 Detekce rentgenového záření . . . . .	23
2.2 Difrakční data . . . . .	24
2.2.1 Uspořádání experimentu a sběr dat . . . . .	24
2.2.2 Zpracování difrakčních dat . . . . .	25
2.2.3 Kvalita zpracování difrakčních dat . . . . .	26
2.2.4 Řešení fázového problému . . . . .	27
<b>3 Studium struktury proteinů a jejich komplexů pomocí rentgenové krystalografie</b>	<b>28</b>

3.1	Proteiny . . . . .	28
3.1.1	Struktura a funkce proteinů . . . . .	29
3.1.2	Rodina nukleas S1-P1 . . . . .	29
3.2	Studium komplexů proteinů s nízkomolekulárními ligandy s použitím krystalografie . . . . .	31
3.2.1	Příprava krystalu komplexu protein-ligand . . . . .	31
<b>II Praktická část</b>		<b>33</b>
4	<b>Materiály a metody</b>	<b>34</b>
4.1	Kvalita vzorku nukleasy . . . . .	34
4.2	Krystalizace vzorku a tvorba komplexů protein-ligand . . . . .	35
4.3	Difrakční experiment . . . . .	37
4.4	Fázový problém . . . . .	38
5	<b>Výsledky</b>	<b>39</b>
6	<b>Diskuze</b>	<b>42</b>
6.1	Vazby ligandů . . . . .	42
<b>Závěr</b>		<b>44</b>
<b>Seznam použitých zdrojů</b>		<b>45</b>

# Úvod

Proteiny jsou biologické makromolekuly vyskytující se ve všech živých organismech, v nichž zastávají různé funkce (například stavební či katalytické - enzymy). Strukturální analýzou proteinů získáváme znalosti o vztahu jejich struktury a funkce v organismu.

Před více než 180 lety byl v kapce krve umístěné mezi dvěma sklíčky pozorován první krystal biologické makromolekuly. Jednalo se o krystal hemoglobinu, který vznikl díky postupnému odpařování koncentrovaného roztoku krve a hemoglobinu mezi sklíčky [1]. Tento jev byl jedním z prvních zkoumaných jevů proteinové krystalografie. Další zkoumání a široké rozvíjení oboru proteinové krystalografie i oboru strukturální biologie umožnilo využívání rentgenového záření a jeho difrakce na krystalech proteinů i jiných biologických molekul.

Nukleasy jsou hydrolasy štěpící fosfodiesterové vazby nukleových kyselin. V organismech se podílí například na replikaci či opravě DNA. Nukleasy z rodiny S1-P1 se vyskytují v rostlinách, houbách, bakteriích či trypanosomách.

Krystalografická analýza monokrystalů proteinů a jejich komplexů s ligandy umožňuje určení struktur těchto komplexů a následné studium vazeb mezi proteiny a jinými molekulami. Studium struktur komplexů proteinů s ligandy je možné zmapovat vazebná místa proteinů. Tato metoda je využívána například pro nalezení možných inhibitorů, čehož se hojně využívá zejména ve farmaceutickém průmyslu při hledání nových léčiv.

Tato práce je zaměřená na seznámení se s oborem proteinové krystalografie a následném testování vazeb v komplexu ligandu a nukleasy z rodiny nukleas S1-P1. Testování vazeb a mapování aktivního místa nukleasy má potenciální využití při hledání vhodných inhibitorů této nukleasy. Diskutována je pravděpodobnost navázání ligandu do aktivního místa a jeho následná změna oproti stavu bez přítomnosti ligandu v aktivním místě.

# Část I

## Teoretická část

# Kapitola 1

## Makromolekulární krystalografie

### 1.1 Krystalizace biologických makromolekul

Biologické makromolekuly, mezi které patří sacharidy, lipidy, nukleové kyseliny a proteiny, jsou nedílnou součástí buněk živých organismů. Pro určení struktur nukleových kyselin, proteinů nebo jejich komplexů se v současnosti nejvíce využívá rentgenové strukturní analýzy, jejíž podstatou je difrakce rentgenového záření na krystalech, které musí být předem připraveny v dostatečné velikosti a kvalitě. Krystalizace biologických makromolekul je velice složitý proces, který vyžaduje nalezení ideálních podmínek a parametrů vhodných pro vznik krystalu a následného získání kvalitních monokrystalů, které budou vhodné pro rentgenovou strukturní analýzu. Přesto, že jsou známy základní principy procesu krystalizace, neexistuje žádný obecný návod, díky kterému by bylo možné dosáhnout krystalizace a kvalitních výsledků u všech biologických makromolekul. Dosažení vhodných výsledků při difrakci závisí na mnoha faktorech, a to už od přípravy samotného vzorku, který chceme zkrystalizovat.

#### 1.1.1 Krystalizace proteinů

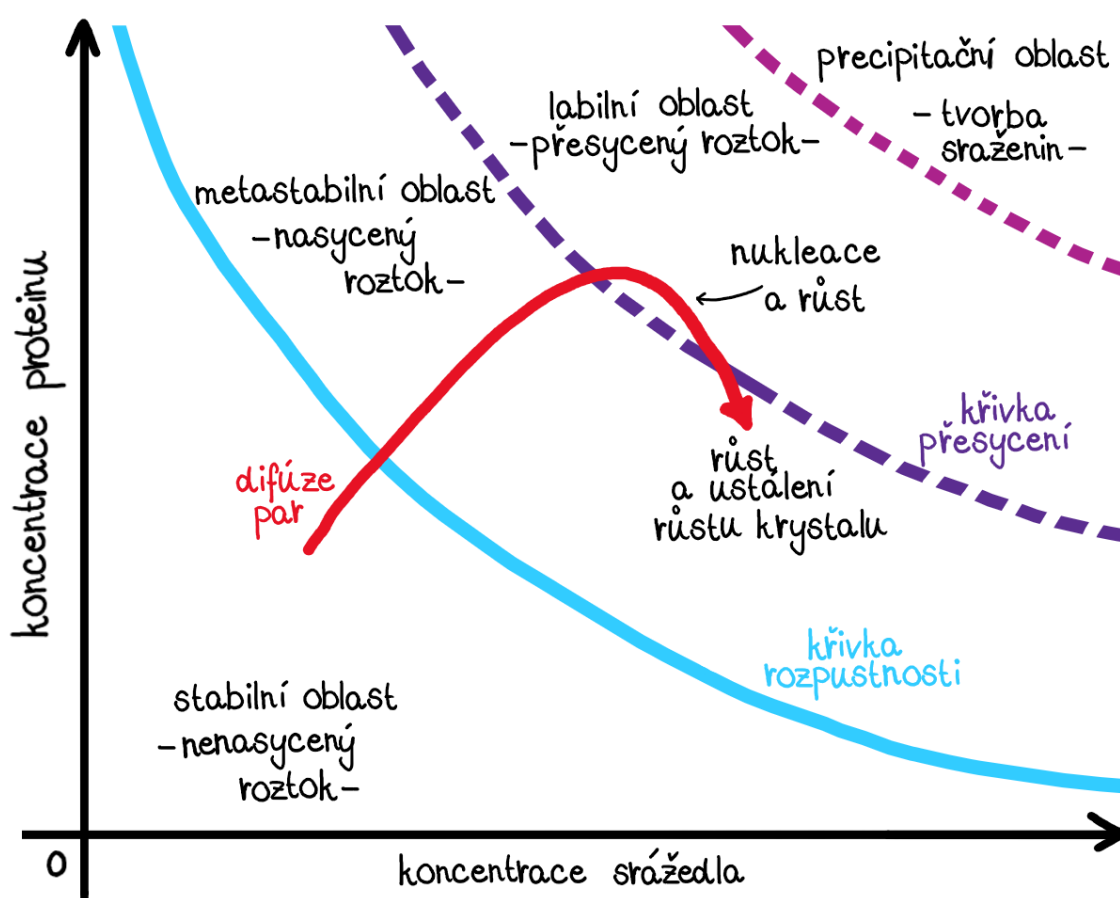
Krystalizace biologických molekul, tedy i proteinů, probíhá ve dvou důležitých a vzájemně neoddelitelných krocích, které závisí na chemických a termodynamických vlastnostech daných proteinů (např. rozpustnost). Tyto kroky nazýváme nukleace a růst.

Při nukleaci dochází k fázovému přechodu, při kterém molekuly přechází ze zcela neuspořádaného stavu do stavu uspořádaného. Molekuly se v nasyceném roztoku začínou shlukovat a vytvářet tak stabilní krystalizační zárodky. Tyto zárodky nazýváme kritická jádra, která musí dosáhnout takzvané kritické velikosti, aby se staly stabilními krystalovými jádry. V růstové fázi dochází k interakci vhodně orientovaných molekul s povrchem krystalu a jejich uspořádání na povrchu, následnému zvětšení velikosti krystalů, překročení kritické velikosti krystalů, stabilizaci uvolněné energie a vzniku uspořádané periodické struktury uvnitř krystalů. Růstová fáze krystalů proteinů se řídí mechanismy dislokačního růstu a růstu dvourozměrnou (i



méně známou trojrozměrnou) nukleací. Růst je ovlivněn chemicko-fyzikálními změnami, jakými jsou například teplotní změny, změna pH a pufru, přítomnost ligandů nebo koncentrace proteinu a precipitačního činidla. Jestliže nastane rovnováha mezi vytvořenými krystaly a volnými molekulami proteinu v roztoku, růstová fáze končí [1, 2].

Tvorba proteinových krystalů se neobejde bez dosažení takzvaného přesyceného stavu, což znázorňuje fázový diagram uvedený na obrázku 1.1 Změnou chemických vlastností roztoku, například změnou pH nebo koncentrace určitých složek roztoku, dosáhneme stavu přesycení, což je nerovnovážný stav, při němž určité množství proteinu v roztoku překračuje mez rozpustnosti. Jakmile se stabilní jádro objeví v přesyceném roztoku, z krystalizačních zárodků vznikne krystal, který bude volně pokračovat v růstu dokud systém neobnoví rovnováhu, čímž přejde roztok zpět do nasyceného stavu a nebude probíhat nukleační ani růstová fáze [1, 3].



**Obrázek 1.1:** Fázový diagram růstu krystalů [1] - červeně znázorněn průběh krystalizace při použití metody difúze par. Přechod ze stabilního stavu do stavu labilního - tvorba zárodků v nukleační části přesyceného roztoku, návrat zpět do metastabilního stavu - zárodky rostou v krystaly. Při velmi vysokém přesycení se protein dostane do precipitační oblasti, ve které vzniká amorfni sraženina.

## 1.1.2 Příprava vzorku pro krystalizaci

Proteiny jsou velice citlivé i na velmi nepatrné změny. Každá změna počátečních podmínek se tak podepíše v budoucím chování i vlastnostech vzorku při krystalizaci a difrakci. Při přípravě vzorku, respektive roztoku proteinu je naším cílem reprodukovatelně pěstovat monokrystaly, které budou vhodné pro rentgenovou difrakční analýzu.

### Čistota vzorku

Samotná přítomnost našeho proteinu ve vzorku není dostačující, důležité je, aby byl protein ve vzorku přítomný jako jediná makromolekula, tedy aby byl vzorek co nejčistší. Kontrola čistoty vzorku se provádí například pomocí SDS-PAGE (neboli *Sodium Dodecyl Sulfát Polyakrylamidová Gelová Elektroforéza*), což je metoda využívající se k hmotnostní separaci proteinu pomocí elektroforézy. Na gel (ve kterém je nanášeno malé množství denaturovaného roztoku proteinu a SDS) mezi dvěma deskami se aplikuje elektrické pole, které způsobí pohyb jednotlivých molekul vzorku v gelu od negativní elektrody (katody) směrem ke kladné elektrodě (anodě). Rychlost pohybu molekul v gelu se liší podle jejich hmotnosti. Malé molekuly se v gelu pohybují snáz, a tak urazí větší vzdálenost od katody.

### Koncentrace vzorku

Při přípravě vzorku je dalším důležitým faktorem pro krystalizaci koncentrace proteinu. U proteinů o hmotnosti v rozmezí 10 – 30 kDa je obvykle vyžadována koncentrace okolo 10 mg.ml<sup>-1</sup>, u menších proteinů je ideální vyšší koncentrace 20 – 50 mg.ml<sup>-1</sup>, naopak u větších proteinů je ideální nižší koncentrace okolo 2 – 5 mg.ml<sup>-1</sup>. Koncentraci proteinu lze (díky schopnosti proteinů absorbovat světlo při specifické vlnové délce) odhadnout například měřením absorbance UV záření pomocí spektrofotometru. Metoda měření absorbance při vlnové délce 280 nm vyžaduje v purifikovaném proteinu přítomnost aminokyselinových zbytků tyrosinu a tryptofanu nebo disulfidových můstků. Molární koncentraci proteinu lze poté z absorbance určit pomocí *Beer-Lambertova zákona*

$$A = \varepsilon Cd, \quad (1.1)$$

kde  $A$  značí absorbanci,  $\varepsilon$  molární absorpční koeficient,  $C$  molární koncentraci a  $d$  značí tloušťku vrstvy, na které dochází k zeslabování záření.

### Monodisperzita vzorku

Monodisperzita, neboli existence proteinu ve vzorku jako jediného oligomerního druhu (například pouze monomer nebo dimer), se dá zkoumat pomocí metody dynamického rozptylu světla (DLS). Na částicích s Brownovým pohybem se zkoumá

rozptyl monofrekvenčního záření. Kolísání intenzity rozptýleného světla závisí na velikosti částic pohybujících se ve vzorku. Díky této fluktuaci můžeme měřit distribuci velikosti malých částic v roztoku proteinového vzorku.

### 1.1.3 Metody krystalizace

V současné době existuje mnoho metod, které můžeme pro krystalizaci proteinů využívat. Každá metoda má své výhody i nevýhody a tedy ani u krystalizačních metod neexistuje jedna, která by byla nejhodnější pro každý protein.

Mezi krystalizační metody, které způsobují koncentrační změny, patří například koncentrační dialýza. Podstatou koncentrační dialýzy je difuze krystalizačního činidla přes polopropustnou membránu do rezervoáru s proteinem. Změnou koncentrace vznikne nasycené prostředí, ve kterém začíná nukleace. Další metodou je krystalizace pod olejem (*microbatch*), u které je kapka krystalizační směsi (protein, precipitační roztok a případná aditiva) pipetou nanesena do jamky pod olej, přes který dochází k pomalému odpařování vody a tím dochází ke zvyšování koncentrace proteinu a srážedla. Difuze přes rozhraní (*counter-diffusion*) spočívá v umístění proteinového roztoku do kapiláry, která se z jedné strany dotýká roztoku srážedla a z druhé je utěsněna. Roztoky jsou odděleny gelem, ale mohou být i v přímém kontaktu. Roztoky proti sobě difundují, uvnitř kapiláry vznikají koncentrační gradienty jednotlivých složek a tvoří se proteinové krystaly [1, 4].

#### Difuze par

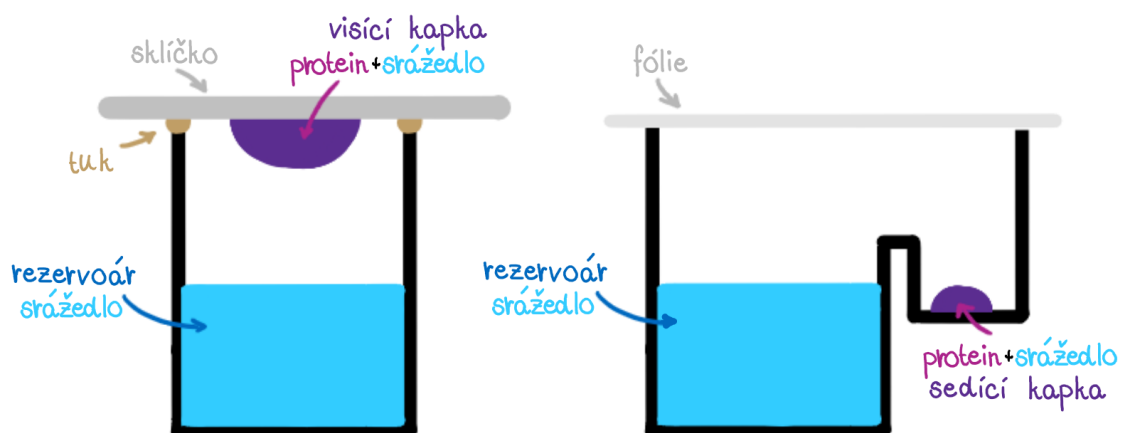
Podle *Protein Data Bank* je v rentgenové strukturní analýze v současnosti nej-používanější krystalizační metodou difuze par. Tato metoda je oblíbená nejen kvůli poměrně snadné přípravě a automatizaci (nasazování kapek robotem), ale i kvůli minimalizaci použitého množství proteinu, pufru a dalších příměsí [5].

Při této metodě je v uzavřeném systému rezervoár spolu s kapkou krystalizační směsi. Rezervoár je naplněn směsí pufru a srážedla, kapku tvoří směs roztoku z rezervoáru a proteinu. Podstatou je difuze vodních par, postupné zvyšování koncentrace všech rozpuštěných složek v kapce a následná nukleace a růst krystalu. Dvěma nejběžnějšími technikami při krystalizaci proteinu pomocí difuze par jsou techniky visící kapky (*hanging drop*) a sedící kapky (*sitting drop*) (schéma na obrázku 1.2), ovšem existuje i technika sendvičové kapky.

Visící kapka se připraví pomocí sklíčka, na které se pipetou nanese krystalizační směs proteinu a pufru se srážedlem, sklíčko se vakuovým tukem či vazelínou připevní k jamce v krystalizační destičce a vznikne tak uzavřený systém, ve kterém se difundují vodní páry z kapky do rezervoáru, zatímco v kapce vznikne přesycené prostředí ideální pro vznik krystalu.

Sedící kapka směsi proteinu a pufru se srážedlem se usadí do malé jamky vedle rezervoáru a celý prostor se utěsní (například sklíčkem nebo folií), čímž znovu vznikne uzavřený systém. Obě metody mají mnoho výhod i nevýhod, ovšem sedící

kapky vyžadují méně manipulace než s visícími kapkami, čímž je značně ulehčená automatizace, respektive nasazování kapek pomocí robota, která spotřebuje méně vzorku a nasazování trvá kratší čas.



**Obrázek 1.2:** Metoda difuze par v uspořádání visící (vlevo) a sedící kapky (vpravo).

#### 1.1.4 Vitrifikace

Jestliže jsou v kapce pod mikroskopem pozorovány krystaly proteinu, je třeba tyto krystaly vylovit pomocí speciálních mikrosmyček, protože se časem začínou postupně degradovat. Smyčka, kterou krystal z roztoku vylovíme, se později při difrakčním experimentu připevní na goniometrickou hlavičku, nebo se vloží do tekutého dusíku. V případě prudkého zmrazení krystalu, vložením krystalu do tekutého dusíku o teplotě blízké se  $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se jedná o proces vitrifikace, při kterém se prudkým snížením teploty nevytváří ledové krystaly, které vzorek poškozují. Tvorbě ledu se dá předcházet i namočením krystalu do roztoku s kryoprotektanty, například často používaným glycerolem. Smyčky s krystaly se poté dlouhodobě uchovávají ve vialkách uložených v Dewarových nádobách naplněných tekutým dusíkem.

## 1.2 Difrakce záření na krystalové mřížce

Difrakce elektromagnetického záření, neboli interakce elektromagnetického záření s hmotou, je jedním z hlavních metod při zkoumání mikrostruktury materiálů. Analýza difrakčního obrazu umožňuje stanovit rozmístění atomů nebo iontů v materiálu. Krystalografické metody můžeme rozdělit podle typu záření na elektronové, neutronové či rentgenové. V makromolekulární krystalografii (tedy zkoumání stavby proteinů, DNA a jiných biologických molekul) se ke zkoumání struktur používají všechny tři typy záření. Nejčastěji je využíváno rentgenové záření, jehož vlnová délka je řádově mezi  $10^{-10}\text{ m}$  a  $10^{-8}\text{ m}$ . Vlnová délka se shoduje s meziatomovou vzdáleností, která je v krystalech proteinů rovna přibližně  $10^{-10}\text{ m}$ , tedy  $1\text{ \AA}$ .

## 1.2.1 Krystalová mřížka

Krystalovou mřížkou rozumíme abstraktní pojem vyjadřující translační periodicitu identických bodů uvnitř struktury krystalu. Sedm typů krystalových soustav od sebe můžeme odlišit především prvky symetrie. Základními buňkami se rozumí nejmenší části krystalové struktury, které jsou jednoznačně určeny třemi mřížkovými vektory a úhly mezi nimi. Základní buňky se dělí dle umístění částic uvnitř buňky na primitivní a bazálně, plošně nebo prostorově centrované. Uspořádáním základních buněk se v prostoru definuje 14 Bravaisových mřížek, které se liší bodovou symetrií nebo centrováním. Kombinací všech možných transformací krystalové struktury definujeme prostorovou grupu, která charakterizuje vnitřní souměrnost krystalové struktury stejně tak, jako bodová grupa charakterizuje vnější symetrii tvaru krystalu. Prostorových grup je v 3D prostoru 230.

## 1.2.2 Rentgenová krystalografie

### Rozptyl na částici

Při dopadu rentgenových paprsků na částici vždy dochází ke Comptonově jevu, tedy nepružnému rozptylu záření, při kterém se vyzáří určité množství energie. Následkem Comptonova jevu je vytvoření pozadí pro difrakční obrazec. Dochází též k pružnému rozptylu, tedy *Thomsonově jevu*, při kterém nedochází k energetickým změnám a vyzářované vlny mají neměnný fázový rozdíl i vlnovou délku. Thomsonův rozptyl je při rozptylu na mřížce příčinou interferenčního jevu v různých směrech a následným vznikem difrakčního obrazce.

Rozptýlení rovinné vlny rentgenového záření dochází především na elektronech atomů, valenční elektron se rozkmitá a jako nabitý dipól se stane zdrojem rozptýleného (sekundárního) záření. Nový zdroj bude mít s dopadajícím (primárním) zářením identickou frekvenci. Intenzita rozptýleného záření na volné částici, jejíž hmotnost je rovna  $m$ , má náboj  $e$  a její vzdálenost od rozptylovače je rovna  $r$ , je dána *Thomsonovým vztahem*

$$I = I_0 \left( \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 mc^2} \right)^2 \frac{1}{r^2} \frac{1 + \cos^2(\theta)}{2}, \quad (1.2)$$

pokud není primární svazek s intenzitou  $I_0$  polarizovaný.  $2\theta$  značí úhel, který svírají směry dopadajícího a difraktovaného paprsku (úhel rozptylu),  $\epsilon_0$  permitivitu vakua a  $c$  rychlost světla. Výraz  $\frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 mc^2} = 2,82 \cdot 10^{-15}$  m je *Thomsonův* (klasický) *poloměr* a výraz  $\frac{1 + \cos^2(\theta)}{2}$  označuje polarizační faktor. Rozptýlené záření je tedy vždy polarizované.

Příspěvek kladných jader, resp. jejich sekundární vyzařování kvůli jejich hmotnosti, tudíž i nízké míře vyzařování, zanedbáme. Také zanedbáme vzájemnou interakci dopadajících a vyzářených vln. Můžeme zanedbat i lom na povrchu krystalu a rychlost šíření vln uvnitř krystalu přirovnat rychlosti světla, protože se index lomu rentgenového záření ve všech prostředích téměř rovná jedné [6, 7].

## Difrakce na krystalu

Předpokládejme rovinnou monochromatickou vlnu dopadající na uzlové řady pravidelně uspořádané krystalové mřížky, která má vlnovou délku  $\lambda$  a vlnový vektor  $\vec{k}_0$ . Dále předpokládejme pružný Thomsonův rozptyl, při kterém bude mít rozptýlená vlna stejnou vlnovou délku, ale jiný směr, tedy i odlišný vlnový vektor  $\vec{k}$  (přitom bude platit  $|\vec{k}_0| = |\vec{k}|$ ). Označme  $\vec{a}, \vec{b}, \vec{c}$  vektory krystalové mřížky. Ke vzájemnému zesílení záření dojde, pokud budou splněny takzvané *Laueho rovnice*, které mají následující tvar

$$\begin{aligned}\vec{a} \cdot (\vec{k} - \vec{k}_0) &= 2\pi h, \\ \vec{b} \cdot (\vec{k} - \vec{k}_0) &= 2\pi k, \\ \vec{c} \cdot (\vec{k} - \vec{k}_0) &= 2\pi l,\end{aligned}\tag{1.3}$$

kde čísla  $h, k, l$  charakterizují řád reflexe a nazývají se indexy reflexe nebo také *Laueho indexy*. Po dosazení rozptylového vektoru  $\vec{S} = \frac{\vec{k} - \vec{k}_0}{2\pi}$  se Laueho rovnice zjednoduší na tvar

$$\begin{aligned}\vec{a} \cdot \vec{S} &= h, \\ \vec{b} \cdot \vec{S} &= k, \\ \vec{c} \cdot \vec{S} &= l.\end{aligned}\tag{1.4}$$

Uvažujme vektor reciproké mřížky  $\vec{H}_{hkl} = h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^*$ , kde  $\vec{a}^*, \vec{b}^*, \vec{c}^*$  jsou vektory reciproké mřížky. Po vynásobení vektoru reciproké mřížky  $\vec{H}_{hkl}$  postupně vektory přímé mřížky  $\vec{a}, \vec{b}, \vec{c}$  můžeme dosadit za  $h, k, l$  do rovnice 1.4, přičemž dospějeme k závěru, že při difrakci na krystalu platí pro směry rozptýlených svazků následující vztah

$$\vec{S} = h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^* = \frac{\vec{k} - \vec{k}_0}{2\pi} = \vec{H}_{hkl},\tag{1.5}$$

tedy že vektory  $\vec{H}_{hkl}$  udávají směry svazků rozptýlených krystalem. Na krystalu vzniká diskrétní soubor směrů difraktovaných svazků, které splňují Laueho rovnice a které lze chápat i jako odrazy na krystalových rovinách ( $hkl$ ), neboť platí vztah

$$|\vec{H}_{hkl}| = \frac{1}{d_{hkl}} = |\vec{S}| = \frac{2 \sin \theta}{\lambda},\tag{1.6}$$

ze kterého jednoduše vyjádříme *Braggovu rovnici*

$$\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta.\tag{1.7}$$

Laueho podmínky jsou splněny tehdy, je-li difrakční vektor totožný s nějakým z vektorů reciproké mřížky. Difrakční obraz lze získat zobrazením reciproké mřížky pomocí Ewaldovy konstrukce při splnění Laueho podmínek. Graficky vyjádřený vztah mezi rozptylovým vektorem a vektorem reciproké mřížky pomocí *Ewaldovy konstrukce* na obrázku 1.3 [6].



kde  $\mathfrak{F}[\cdot]$  je operátorem Fourierovy transformace. Funkce elektronové hustoty představuje rozložení elektronů v molekulách, a proto je ji pro vytvoření strukturního modelu nezbytné určit. Lze ji vypočítat jako inverzní Fourierovu transformaci strukturního faktoru

$$\rho(\vec{r}) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |\vec{F}_{hkl}| \exp \left[ -2\pi i \vec{h} \cdot \vec{r} + i\alpha_{hkl} \right], \quad (1.11)$$

kde  $V$  je objem základní buňky a  $\vec{F}_{hkl}$  strukturní faktor amplitudy reflexí  $\vec{h} = (h, k, l)$ . Fázové úhly  $\alpha_{hkl}$  nelze z difrakčního experimentu přímo určit. Z experimentu lze určit pouze intenzity rozptýleného rentgenového záření, pomocí nichž lze určit pouze  $|\vec{F}_{hkl}|$  a nikoliv  $\alpha_{hkl}$ . Tato komplikace se nazývá fázový problém a k jeho vyřešení existuje několik metod, pomocí kterých je možné určit krystalovou strukturu.



# Kapitola 2

## Experimentální přístroje a metody

### 2.1 Techniky měření rentgenové strukturní analýzy

#### 2.1.1 Zdroje rentgenového záření

Pro výzkum struktury krystalických látek jsou jako zdroj rentgenového záření využívány jak zařízení, která si finančně i velikostně mohou dovolit běžné vědecké laboratoře (například rentgenky a zdroje s tekutou anodou), tak i extrémně silné zdroje záření, jakými jsou synchrotrony, díky kterým vznikly nové experimentální techniky pro rentgenovou difrakci.

#### Rentgenky

Rentgenky jsou specifické elektronky, uvnitř kterých jsou vakuově zataveny katoda s anodou, obvykle vyrobenou z wolframu, molybdenu či mědi. Mezi katodou a anodou jsou velmi vysokým napětím urychlovány elektrony, jejichž zpomalení v anodě způsobí emisi brzdného záření.

Vysokoenergetické elektrony dopadající na anodu, vyrážejí elektrony i z vnitřních slupek elektronového obalu atomů anodového materiálu, jejichž místo později nahradí volné elektrony nebo elektrony z vyšší energetické hladiny. Vzhledem k vysoké vazebné energii elektronů vnitřních slupek se vyzáří přebytečná energie ve formě fotonu s kratší vlnovou délkou, než je vlnová délka pro viditelné záření. Tím vzniká rentgenové záření charakteristické pro daný materiál anody.

Nevýhodou rentgenek je především nemožnost měnit vlnové délky emitovaného rentgenového záření. Jestliže požadujeme záření o jiných vlnových délkách, než které produkuje stávající rentgenka, musíme k tomu použít rentgenku s anodou z jiného materiálu.

Omezením příkonu rentgenek se snižuje množství nežádoucí produkce tepla při srážce elektronů s anodou, která zahřívá místo dopadu elektronů, čímž se zároveň sníží intenzita vyzařování rentgenového záření. Využitím rotující anody, jejíž úhlová

frekvence je řádově několik tisíc otáček za minutu, se zvýší intenzita emitovaného záření. Otáčení způsobuje mírnější zahřívání místa, na které dopadají elektrony, a díky tomu je možné přivádět větší proud na katodu, a poskytnout tak násobně větší intenzitu než u klasické rentgenky. Nevýhodou je častější a náročnější údržba i kolísání intenzity emitovaného záření, což je velice nevhodné pro některá specifická měření (například měření anomálního rozptylu) [6, 7, 8].

## Zdroje s tekutou anodou

Poměrně novou technologií jsou zdroje rentgenového záření s tekutou anodou, které v porovnání s rotujícími rentgenkami vyzařují při podobných charakteristických vlnových délkách mnohonásobně vyšší intenzitou rentgenového záření. V krystalografii vyšší intenzita záření umožňuje rychlejší měření na menších vzorcích.

Princip těchto zdrojů zůstává stejný jako u klasických rentgenek, jedinou změnou je anodový terč, který je vyroben z tekutého kovu (například slitina galia, india či cínu), který musí cirkulovat dokola rychlostí až  $75 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  pomocí čerpadla. Tato cirkulace, která má zároveň chladicí účinky na anodě, umožňuje dosažení vyšších intenzit záření [9, 10].

## Synchrotrony

Synchrotronového záření vzniká pohybem relativistické nabitě částice po zakřivené dráze. Takové záření bylo prvně pozorováno ve 40. letech 20. století, ovšem teoretický popis vznikl již v 19. století Liénardem a Schottem, kteří řešením Maxwellových rovnic pro pohybující se náboj ukázali, že zdrojem elektromagnetického záření může být právě i elektron pohybující se po zakřivené dráze [11].

Elektricky nabitá částice je nejprve zrychlena malým lineárním urychlovačem (*linear accelerator*), po dosažení určité rychlosti a energie (několik jednotek MeV) je injektována do kruhového urychlovače (*boosteru*), jehož poloměr má délku až několik metrů. V kruhovém urychlovači se částice dále urychluje k rychlosti blížící se rychlosti světla. Takto urychlené částice s dostatečně vysokou rychlostí a energií (několik jednotek GeV) jsou injektovány do akumulárního prstence (*storage ring*).

V akumulárních prstencích je daleko vyšší vakuum než v boosteru, díky čemuž mohou částice na oběžné dráze cirkulovat až několik hodin bez výrazné ztráty energie. Elektrony se zde pohybují ve shlucích (*bunches*), proto se synchrotronové záření jeví jako pulsující. Pohyb částice v akumulárním prstenci je zajištěn ohybovými magnety, které jsou umístěny kolem prstence a které z prstence vytváří spíše mnohoúhelník se zaoblenými vrcholy než dokonalý kruh, protože mimo ohybové magnety je trajektorie částice lineární. Díky změně trajektorie nabitých částic je v ohybových magnetech ve směru tečny k magnetům generováno rentgenové záření. Aby se zabránilo ztrátě energie částic při emitaci záření, dostávají částice v pravidelných intervalech doplňkovou energii ve formě vysokofrekvenčního elektromagnetického pole. Toto doplnění energie je zajištěno radiofrekvenčními systémy (*RF elements*). Emitované rentgenové záření je z akumulárního prstence na jednotlivá pracoviště vyváděno

evakuovanou trubicí. Synchrotronové záření má mnohonásobně větší intenzitu než rentgenky, i proto je synchrotronové měření velice vhodné pro rentgenovou difrakci na monokrystalech, paprsek může být velice úzký, analýza probíhá rychleji a data u vzorků velice malých rozměrů (řádově v  $\mu\text{m}^3$ ) mají větší rozlišení než u zdrojů v laboratořích. Velkou výhodou synchrotronového záření je také možnost úpravy vlnové délky, což je využíváno například při řešení fázového problému.

**Rentgenové lasery na volných elektronech (XFELs)** jsou zdroje záření, které vyzařují koherentní rentgenové záření s velmi vysokou intenzitou. Rentgenové paprsky jsou generovány spontánní emisí volných elektronů s relativistickými rychlostmi, které letí skrz magnetické pole undulátoru, jež sinusoidně zakřivuje jejich trajektorii. Emitaci rentgenového záření elektrony je způsobeno uvolněním energie po změně zrychlení. V dostatečně dlouhém undulátoru se elektrony uspořádají dle vyzařovaného záření, což vede k následnému vytvoření záblesků v podobě pulsů. Intenzita takového záření je až miliarda krát vyšší než u běžných zdrojů záření a umožňuje emisi záření o kratších vlnových délkách. Záření o vlnové délce  $10^{-10}$  m = 1 Å je vyzařováno v pulsech trvajících jen několik femtosekund ( $10^{-15}$  s) [7, 8].

### 2.1.2 Detekce rentgenového záření

Pro detekci rentgenového záření se dříve využívaly fotografické filmy, vzácným plynem naplněné ionizační komory či fluorescenční stínítka. Dnes se při rentgenové strukturní analýze krystalů malých molekul využívají plošné detektory s polovodičovými prvky CCD nebo CMOS.

**CCD** (*Charge-coupled device*) je elektronická součástka využívající se nejen při detekci záření, ale například i v digitálních fotoaparátech či čtečkách čárových kódů. Princip tohoto zařízení je založen na fotoelektrickém jevu. Před detektorem je umístěno stínítko, na které dopadají fotony rozptýleného rentgenového záření. Tyto fotony se na fluorescenčním stínítku přemění na fotony viditelného světla, které po dopadu na polovodičový detektor způsobí excitaci elektronů. Uvolněné elektrony jsou zachyceny katodou a v polovodiči zůstanou kladně nabitě díry. Každá katoda představuje jeden pixel vznikajícího snímku. Takto zachycené náboje jsou v CCD čipu převedeny na elektrický proud, tedy na analogový signál, který je převeden na digitální signál, který se dále zpracovává.

**CMOS APS** (*Complementary metal oxide semiconductor Active pixel sensor*) je využívaný senzor i v digitálních fotoaparátech. Princip CMOS detektorů je stejný jako CCD, liší se pouze tím, že převaděč elektrického proudu na analogický signál probíhá na jednotlivých pixelech, které jsou v CMOS snímačích jako samostatné integrované obvody. Tento typ detektorů má větší rychlost snímání, některé nepotřebují stínítko před detektorem a snímají rovnou fotony rentgenového záření.

## 2.2 Difrakční data

### 2.2.1 Uspořádání experimentu a sběr dat

Pro získání difrakčního obrazce se vitrifikované krystaly umístí na difraktometr. Obvykle se všechna difrakční měření provádí v kryogenních podmínkách, které při experimentu chrání krystaly před dehydratací a snižují rozsah radiačního poškození.

Difrakční data lze měřit v různých experimentálních uspořádáních. V současnosti je nejvíce využívanou metodou pro získání difrakčních dat oscilační nebo rotační metoda. Data jsou získána expozicí po sobě jdoucích oscilačních či rotačních snímků, které zaznamenává rentgenový detektor. Parametry rentgenového záření (nastavitelná vlnová délka, intenzita záření, šířka paprsků) jsou obvykle lepší u synchrotronového záření než u běžných zdrojů dostupných v běžných laboratořích, proto se pro rentgenovou krystalografii proteinů často upřednostňuje právě synchrotronové záření.

Uspořádání difrakčního experimentu může být následující:

- Zdroj záření a sestava elementů vylepšující vlastnosti paprsku - dvě křemíková zrcadla a mezi nimi umístěn dvojitý křemíkový monochromátor.
- Goniometr, na kterém je upevněn vzorek. U synchrotronového záření lze často otočit pouze kolem jedné osy daného vzorku, což je při využití oscilační metody dostačující. Goniometr může být až čtyřkruhový, krystalem poté lze otáčet ve více osách.
- Detektor, který snímá dopadající difraktované záření.

Mezi parametry, které je nutno při difrakčním experimentu hlídat, patří pozice a orientace krystalu, oscilační úhel, čas expozice (na jeden snímek, případně na jeden stupeň otočení), pozice a velikost lapače primárního svazku, teplota krystalu a vzdálenost detektoru od krystalu, která by v průběhu měření měla být téměř neměnná. Při měření rotační metodou je naměřeno několik set až několik tisíc difrakčních snímků.

Nejstarší metodou pro sběr difrakčních dat je Laueho metoda, při které je využíváno polychromatické záření se spojitým spektrem vlnových délek, které ozařuje nehybný krystal. Laueho metoda se v dnešní době využívá velmi zřídka, lze ji využít například při určování symetrie krystalu či určení Laueho grupy (bodové grupy vzájemně se lišící pouze středem inverze a prvků symetrie spojené s tímto středem).

Laueho metoda s monochromatickým zářením se využívá k **práškové difrakci**. Prášková difrakce využívá toho, že mikrokristaly v práškovém vzorku (naneseném na tyčinku či napěchovaném do kapiláry) jsou natočeny v různých směrech. Výsledný difrakční obrazec nebude složen z diskretních výrazných maxim, ale bude tvořen spojitými kruhy, kde každý kruh bude odpovídat difrakci na určité rovině ( $hkl$ ).

Ke studiu krystalových struktur je v dnešní době využíváno především monochromatické záření s plošným detektorem a pohyblivým vzorkem. Z hlediska měření

difrakčních dat jsou makromolekulární krystaly oproti krystalům malých molekul strukturně složitější. Mřížkové parametry jsou daleko větší kvůli větší bázi krystalové mřížky, reciproká mřížka je naopak díky závislosti na parametrech přímé buňky velice hustě obsazená. Z konstrukce Ewaldovy sféry je zřejmé, že při natočení krystalu pouze do jedné orientace lze pozorovat jen malý zlomek všech reflexí. Při difrakčním experimentu je pro kompletnost dat žádoucí získat co nejvíce možných reflexí z různého natočení krystalu. K naměření celého setu difrakcí je využíváno různých metod, při nichž jsou kompletní data nasbírána ve velkém množství snímků.

## Rotační metoda

Pro měření difrakce na krystalech makromolekul se využívá rotační metoda. Rotační metoda spočívá v rotaci krystalu kolem své osy o úhel dostatečný ke sběru kompletních dat. Krystal upevněný na goniometrické hlavičce je ozářen monochromatickým zářením. Při ozařování krystal rotuje kolem osy kolmé na rentgenové paprsky o malý omezený úhel  $\Delta\phi$ , aby se zaznamenávané reflexe vzniklé při otočení nepřekrývaly. Reflexe jsou zaznamenávány pomocí detektoru s polovodičovými prvky CCD nebo CMOS.

### 2.2.2 Zpracování difrakčních dat

Již při samotném měření difrakčních dat nám pomáhají programy (například program XDS [12]) s výpočtem statistických charakteristik difrakce, podle jejichž hodnot se rozhodujeme ke stanovení ideálních podmínek pro daný experiment, například nastavení počátečního úhlu měření, nebo rychlému vyhodnocení, zda má naměření dat daného vzorku vůbec smysl.

K vyhodnocování a zpracování velkého množství dat naměřených rotační metodou existuje v dnešní době mnoho dalších programů, které celý proces vyhodnocování značně usnadňují, mezi tyto programy patří již zmíněný program XDS [12]. Nesmíme zapomenout na fakt, že pro správné zpracování dat je důležité mít téměř neměnnou vzdálenost krystalu od detektoru, správně určit polohu primárního svazku a jeho vlnovou délku.

Při zpracování dat nejprve jednotlivým reflexím přiřazujeme Millerovy indexy. Ty jsou určeny polohou jednotlivých reflexí z několika vhodně zvolených snímků. Indexací jednotlivých reflexí se dá určit orientace krystalu a odhadnout mřížkové parametry (především určením mřížkových vektorů z rozdílů pozic jednotlivých reflexí) a všechny symetrie mřížky. Ze symetrie základní buňky lze přidělit krystalu Laueho grupu. Po stanovení Laueho grupy následuje integrace intenzit reflexí, neboli určení intenzit nalezených reflexí vzniklých na detektoru. Integrací se ze silných reflexí vytvoří 3D obraz, pomocí kterého se později zpracovávají i reflexe slabších intenzit. Následuje škálování dříve vytvořeného integračního kroku a nakonec určení prostorové grupy, která nezávisí pouze na poloze, ale i na intenzitě reflexí.

## X-Ray Detector Software

X-Ray Detector Software, zkráceně XDS, je program pro zpracování dat získaných rotační metodou [12]. Prostředím tohoto programu je pouze textový řádek, ovšem některé grafické nástavby zobrazují průběh funkcí a difrakční snímky. Zpracování dat v tomto programu je rozděleno do 8 kroků, pro než se vždy vytvoří nový soubor tak, že při úpravě některých parametrů můžeme nezměněné soubory použít znovu bez nutnosti opakování daného kroku. Po nahrání prvního difrakčního snímku a vymezení oblasti, na které nejsou žádné reflexe (například stín od goniometru a lapač primárního svazku), spustíme inicializační procesy, po kterých následuje integrace a škálování [12].

### Aimless

Program *Aimless* [13] je součástí programovacího balíku *CCP4* (*Collaborative Computational Project, Number 4* [14]), který nahradil dřívější program *SCALA* [15]. Tento program se používá bezprostředně po indexaci reflexí, jejich integraci a následném určení pravděpodobné prostorové grupy v programu *XDS*. Program *Aimless* provádí konečné škálování všech reflexí [13].

### 2.2.3 Kvalita zpracování difrakčních dat

Mezi indikátory kvality již zpracovaných dat patří často používané statistické charakteristiky difrakce, jakými jsou například  $R_{\text{merge}}$  a  $R_{\text{meas}}$  a poměr  $I/\sigma$ . Ty můžeme vyjádřit následujícími vztahy

$$R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_{i=1}^{N_{hkl}} |I_{i,(hkl)} - \overline{I_{(hkl)}}|}{\sum_{hkl} \sum_{i=1}^{N_{hkl}} I_{i,(hkl)}}, \quad (2.1)$$

$$R_{\text{meas}} = \frac{\sum_{hkl} \sqrt{\frac{N_{hkl}}{N_{hkl}-1}} \sum_{i=1}^{N_{hkl}} |I_{i,(hkl)} - \overline{I_{(hkl)}}|}{\sum_{hkl} \sum_{i=1}^{N_{hkl}} I_{i,(hkl)}}, \quad (2.2)$$

$$I/\sigma = \frac{1}{N} \sum_{hkl} \frac{|I_{(hkl)}|}{\sigma(I_{(hkl)})}, \quad (2.3)$$

kde  $\overline{I_{(hkl)}}$  označuje průměr intenzit  $I_{i,(hkl)}$  s indexy  $(hkl)$ ,  $N$  počet naměřených reflexí,  $N_{hkl}$  multiplicitu reflexí a  $\sigma(I_{(hkl)})$  vyznačuje rozptyl intenzity reflexe s indexem  $(hkl)$ .

Dalším důležitým kvalitativním faktorem je *Pearsonův korelační koeficient*  $CC_{1/2}$ , který je definován vztahem

$$CC_{1/2} = \frac{\sum_{i=1}^{N/2} (I_i - \bar{I})(J_i - \bar{J})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{N/2} (I_i - \bar{I})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^{N/2} (J_i - \bar{J})^2}}, \quad (2.4)$$

kde  $I_i$  a  $J_i$  jsou dvě náhodně vybrané poloviny naměřených dat.

## 2.2.4 Řešení fázového problému

Fázový problém a jeho vyřešení je velice důležitým úkolem pro získání struktury. K řešení fázového problému je zavedeno několik různých postupů. Izomorfní nahrazení spočívá v navázání těžkých atomů na povrch molekuly proteinu v krystalu. Analýzou rozdílných intenzit modifikovaných a nemodifikovaných krystalů lze odhadnout správné fáze jednotlivých reflexí pro výpočet mapy elektronových hustot. Fázový problém můžeme řešit i pomocí anomálního rozptylu záření na některých atomech (například kovových iontech) a narušení platnosti Friedelova zákona.

### Molekulární nahrazení

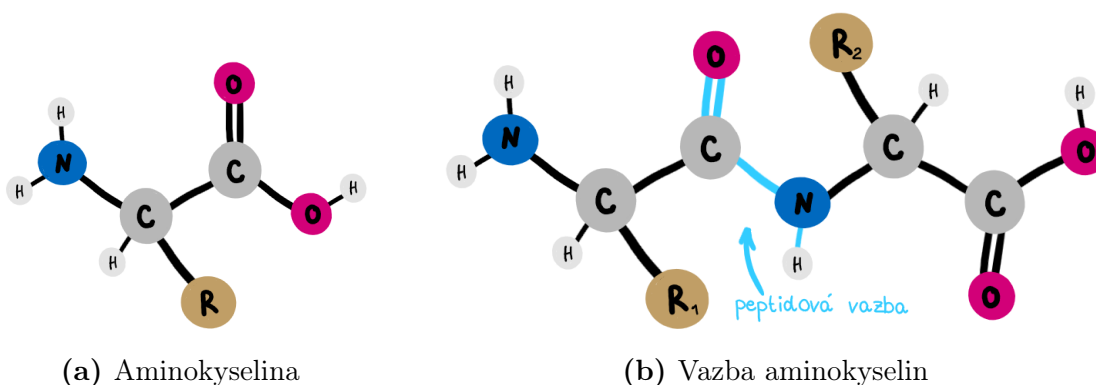
Fázový problém můžeme vyřešit i pomocí molekulárního nahrazení. Metoda molekulárního nahrazení závisí na znalosti struktury známé molekuly, která je podobná zkoumané molekule. Podobností struktur je myšlena například co největší shoda v sekvenci aminokyselin. Po vhodném umístění struktury známé molekuly do základní buňky zkoumané molekuly je možné získat prvotní odhady neznámých fází reflexí. Molekulární nahrazení může být využito například při řešení struktur komplexů proteinů s ligandy.

# Kapitola 3

## Studium struktury proteinů a jejich komplexů pomocí rentgenové krystalografie

### 3.1 Proteiny

Proteiny jsou biologické makromolekuly, jejichž základní stavební jednotkou jsou aminokyseliny. Na stavbě proteinů se ovšem podílí pouze 20 základních aminokyselin z celkového počtu zhruba 500 aminokyselin vyskytujících se v přírodě. Aminokyseliny se skládají z aminové ( $-NH_2$ ) a karboxylové funkční skupiny ( $-COOH$ ) a postranního řetězce. Aminokyseliny jsou mezi sebou vázány peptidovou vazbou ( $-CO-NH-$ ), viz obrázek 3.1.



**Obrázek 3.1:** (a) Schéma aminokyseliny.  $R$  je postranní řetězec aminokyseliny,  $-NH_2$  amino skupina,  $-COOH$  karboxylová skupina. (b) Peptidová vazba vzniklá spojením dvou aminokyselin.  $R_1$  a  $R_2$  jsou postranní řetězce aminokyselin



### 3.1.1 Struktura a funkce proteinů

Primární strukturou proteinů rozumíme sekvenci aminokyselin v polypeptidovém řetězci. Primární struktura tedy uvádí pouze pořadí peptidových vazeb od *N*-konce do *C*-konce. Sekundární struktura určuje geometrické uspořádání mezi několika blízkými aminokyselinami. Strukturálním motivem sekundární struktury může být například  $\alpha$ -šroubovice, skládaný  $\beta$ -list nebo volné smyčky, které slouží jako spojovací články mezi ostatními strukturálními motivy. Terciální struktura značí prostorové uspořádání prvků sekundární struktury a smyček do takzvaných domén, což jsou strukturální jednotky s odděleným hydrofobním jádrem, vodíkovými vazbami i disulfidovými můstky. Kvartérní struktura je tvořena několika proteinovými molekulami v prostoru, které tvoří proteinový komplex.

Proteiny jsou základní jednotkou všech známých organismů, v nichž zastávají různé funkce - stavební, transportní, skladovací, zajišťující pohyb, řídicí (hormony), regulační, ochranné a obranné (imunoglobuliny) a katalytické (enzymy). Vzhledem k tomu, že struktura proteinů určuje jejich funkci, zkoumání struktury až na atomární úroveň (například právě pomocí rentgenové difrakční analýzy) je velmi důležité například při vývoji nových léků.

Enzymy jsou proteinové katalyzátory chemických reakcí v živých organismech. Široké spektrum reakcí je možné klasifikovat do sedmi tříd podle typu reakce a substrátu, který se reakcí přemění na produkt, například oxidoreduktasy, transferasy nebo hydrolasy.

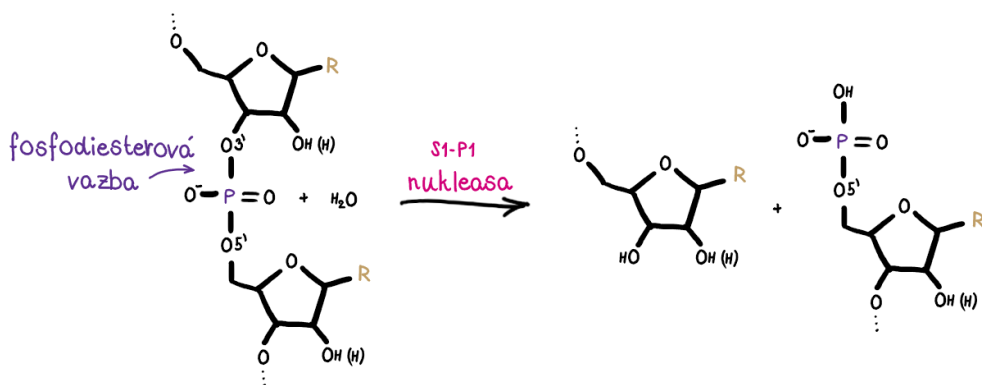
### 3.1.2 Rodina nukleas S1-P1

Nukleasy jsou hydrolasy štěpící fosfodiesterové vazby nukleových kyselin (štěpení znázorněno na obrázku 3.2). V organismech se podílí například na replikaci, rekombinaci či opravě poškozené DNA. Lze je klasifikovat podle několika kritérií, například dle typu nukleové kyseliny, kterou štěpí, na RNasy a DNasy. Mnohé však štěpí jak RNA, tak i DNA, tyto nukleasy se označují jako nespecifické vzhledem k cukrum, příkladem takových nukleas mohou být nukleasy z rodiny S1-P1. Další možnou klasifikací nukleas je dle počtu kovových iontů, které se nacházejí v aktivním místě a které se aktivně podílí na katalytické reakci [16].

Nukleasy z rodiny S1-P1 se vyskytují v rostlinách, houbách, bakteriích a trypanosomách. U rostlin mají nukleasy funkci při buněčné smrti a při vývoji pletiv. U hub zastávají důležitou roli při získávání nukleotidů či nukleosidů z prostředí. Nukleasy z trypanosom jsou zkoumány především pro jejich souvislost s vývojem vakcín a léčiv proti nebezpečnému kožnímu onemocnění leishmanióze [17].

Primární struktura funkčních nukleas S1-P1 obsahuje vždy tryptofan, jehož postranní řetězec je v hydrofobním jádru proteinu a hlavní řetězec je zapojen do aktivního centra. Sekundární struktura je tvořena převážně  $\alpha$  helixy.

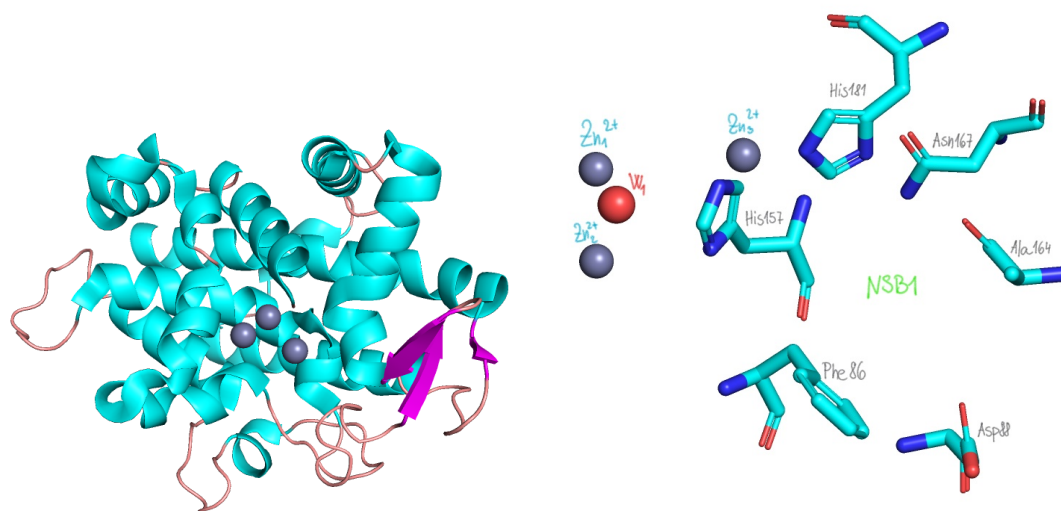
Nukleasy z rodiny S1-P1 jsou závislé na dvojmocných kovech, kterými jsou například zinek, vápník, hořčík nebo mangan. Obvykle se v aktivním centru nachází tři atomy zinku, které formují takzvaný zinkový klastr. Zinkový klastr spolu se dvěma



**Obrázek 3.2:** Schéma štěpení fosfodiesterové vazby v nukleové kyselině. R značí jednu z bází nukleových kyselin (A, G, C, T/U).

či více disulfidovými můstky stabilizuje motiv sbalení.

Zinkový klastr tvoří u nukleas z rodiny S1-P1 pouze jednu část aktivního místa. Některá aminokyselinová rezidua formují další část aktivního místa (NBS1) a tvoří "kapsu", která je zodpovědná za navázání báze a cukerných skupin substrátu. V prázdném aktivním místě (pokud v tomto místě není navázán ligand) jsou mezi zinky přítomny 4 molekuly vody. Molekula vody s označením  $W_1$  se nachází mezi dvěma ionty zinku  $Zn_1$  a  $Zn_2$  a slouží k nukleofilnímu štěpení (předává molekulám elektron k tvorbě elektronového páru) [18].



(a) Struktura nukleasy z rodiny S1-P1. Šedě zbarvený zinkový klastr, modré  $\alpha$ -šroubovice a fialový  $\beta$ -skládaný list, které mezi sebou spojují lososově zbarvené smyčky.

(b) Aktivní místo nukleasy z rodiny S1-P1, kde je šedě vyznačený zinkový klastr, aminokyseliny tvořící část aktivního místa pro vazbu báze a cukerných skupin substrátu (NBS1) jsou zobrazeny v tyčinkovém modelu, uhlíky jsou zbarveny tyrkysově.

**Obrázek 3.3:** Strukturní model nukleasy z rodiny nukleas S1-P1 a její aktivní centrum (PDB kód 3SNG) [18]. Obrázky byly vytvořeny v programu PyMOL [19].

Díky hojnému výskytu hydrofobních aminokyselin jsou nukleasy z rodiny S1-P1 navíc i poměrně termostabilní a stabilní i za přítomnosti organických rozpouštědel.

Postupným zkoumáním nukleas z rodiny S1-P1 bylo objeveno, že štěpí nejčastěji mononukleotidy a jednořetězcové nukleové kyseliny, tedy ssDNA a RNA, některé nukleasy jsou ovšem schopny štěpit i dvouřetězcové nukleové kyseliny [17].

## 3.2 Studium komplexů proteinů s nízkomolekulárními ligandy s použitím krystalografie

Studium vazeb komplexů proteinů s nízkomolekulárními ligandy (nazývané též *fragment screening*) má v dnešní době široké využití hlavně při vývoji a objevování nových léků. Fragmenty byly již dříve využity k nalezení nových inhibitorů proteinů. Obecně jsou fragmenty rozpustné a chemicky stabilní malé organické molekuly s molekulovými hmotnostmi v rozmezí 150 – 300 Da. Jsou využívány k mapování vazebných míst proteinů, se kterými často vytváří slabou vazbu. Rentgenová krystalografie je vhodným nástrojem na zkoumání těchto slabých vazeb mezi proteinem a malou organickou molekulou [20].

Ke screeningovým experimentům jsou používány knihovny fragmentů často sestavené z 96 ligandů (ovšem knihovny ligandů mohou obsahovat až tisíce různých molekul), které mají odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti, například vysokou rozpustnost ve vodě, žádnou reaktivní skupinu, odlišný počet určitých atomů a podobně) a díky kterým je poměrně snadné rychle nalézt takové fragmenty, které s proteinem vytvoří vazbu [21].

### 3.2.1 Příprava krystalu komplexu protein-ligand

K vytvoření komplexů proteinů s ligandem jsou běžně využívány metody kokrystalizace (*cocrystallization*) a namáčení (*soaking*).

- První metoda, **kokrystalizace**, spočívá ve smíchání proteinového roztoku s molekulou ligandu a následné krystalizaci smíchaného roztoku. Tato metoda je časově náročná a často ani po dlouhé době nevede k úspěšné krystalizaci.
- Princip druhé metody, metody **namáčení**, spočívá v namočení předem připravených krystalů proteinu do roztoku obsahující ligand, který má s proteinem vytvořit komplex. Krystaly proteinu jsou tvořeny průměrně z 50 % vodními kanály (v rozmezí 30 % – 85 %), kterými snadno projdou malé molekuly. Ligandy s dostatečně velkou vazebnou afinitou se při namáčení mohou navázat na protein, což se později projeví změnou elektronové hustoty určené pomocí rentgenové difrakční analýzy takto připravených krystalů.

Vzhledem k časové náročnosti a vysokým nákladům je častější způsob tvorby komplexů právě metoda namáčení. Ovšem ani tato metoda není bezproblémová, protože

velice záleží na době namáčení krystalu proteinu v roztoku s ligandem. Některé ligandy vytváří s proteinem komplex již po několika desítkách sekund od namočení, jiným vytvoření vazby a zaplnění vazebné kapsy proteinu trvá několik hodin až dnů. Pro úspěšné vytvoření komplexu tedy nezáleží pouze na kvalitě krystalu a vazebné afinitě ligandu, ale také na teplotě a chemických vlastnostech roztoku, do kterého je krystal namočen [20, 22, 23].

Po vytvoření komplexu, ať už za použití metody kokrystalizace nebo metody namáčení, je krystal připraven pro rentgenovou difrakci, která může následovat ihned, nebo se krystal vitrifikuje pro pozdější použití.

## Část II

### Praktická část

# Kapitola 4

## Materiály a metody

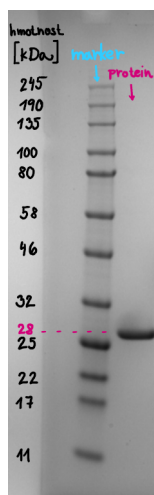
### 4.1 Kvalita vzorku nukleasy

Vzorek nukleasy ze *Stenotrophomonas maltophilia* (Smn1) byl produkován v Laboratoři struktury a funkce biomolekul v Biotechnologickém ústavu AV ČR ve Vestci [24].

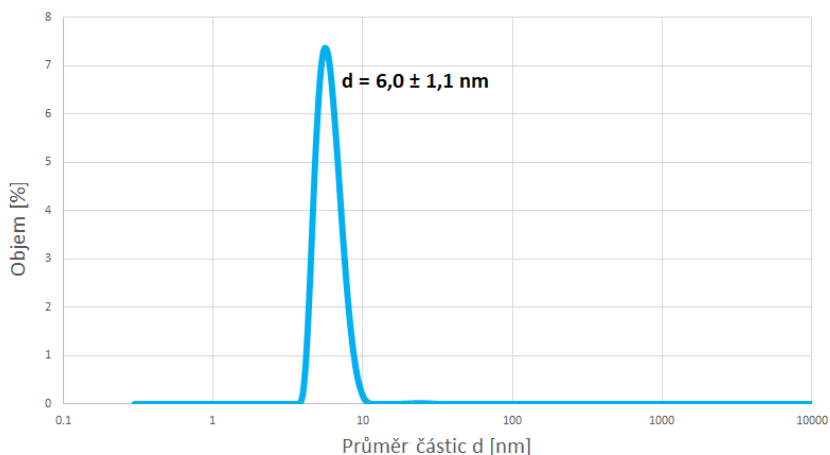
Analýza čistoty vzorku Smn1 byla provedena metodou SDS-PAGE. Elektroforéza probíhala v elektroforetickém zařízení XCell SureLock™ Mini-Cell. Byl použit polyakrylamidový gel NuPAGE™ 4-12 % Bis-Tris Gel, 1 mm (Thermo Fisher Scientific) a nanášecí pufr NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (20x) (Thermo Fisher Scientific). Jako standard molekulových hmotností (*marker*) byl použit Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11-245 kDa, New England Biolabs #P7712). Elektroforetická hmotnostní separace probíhala při konstantním napětí 200 V po dobu 35 min. Metodou byla zjištěna přibližná hmotnost nukleasy 28 kDa a potvrzena její dostatečná čistota pro účely krystalizace (viz obrázek 4.1a).

Vzorek nukleasy Smn1 byl následně koncentrován pomocí centrifugačního filtru Nanosep® 10K (Pall Corporation), jehož mezní hodnota molekulární hmotnosti je 10 kDa. Koncentrace vzorku nukleasy Smn1 byla následně zjištěna pomocí spektrofotometru DS-11 UV-Vis (DeNovix) při vlnové délce 280 nm. Výsledná koncentrace vzorku v pufru složeného z 50 mM Tris, pH 7,0 a 150 mM NaCl byla 13,1 mg.ml<sup>-1</sup>.

Velikost disperzních částic ve vzorku nukleasy byla naměřena metodou DLS. Před měřením byl vzorek v pufru složeného z 50 mM Tris, pH 7,0 a 150 mM NaCl přefiltrován přes separační centrifugační filtr Ultrafree MC (Millipore) s velikostí pórů 0,22 μm. Filtrace proběhla kvůli odstranění větších částic (například částic prachu či jiných nečistot). K měření byl využit přístroj Zetasizer Ultra, vzorek nukleasy o koncentraci 1 mg.ml<sup>-1</sup> byl měřen v kyvetě ZEN2112. Teplota při měření vzorku byla nastavena na 20 °C. Na obrázku 4.1b lze pozorovat graf objemové distribuce velikosti částic kolem jedné hodnoty průměru částic, z čehož plyne monodisperzita zkoumaného vzorku, tedy že se ve vzorku vyskytuje pouze jeden oligomerní druh (monomer či dimer).



(a) SDS-PAGE



(b) DLS

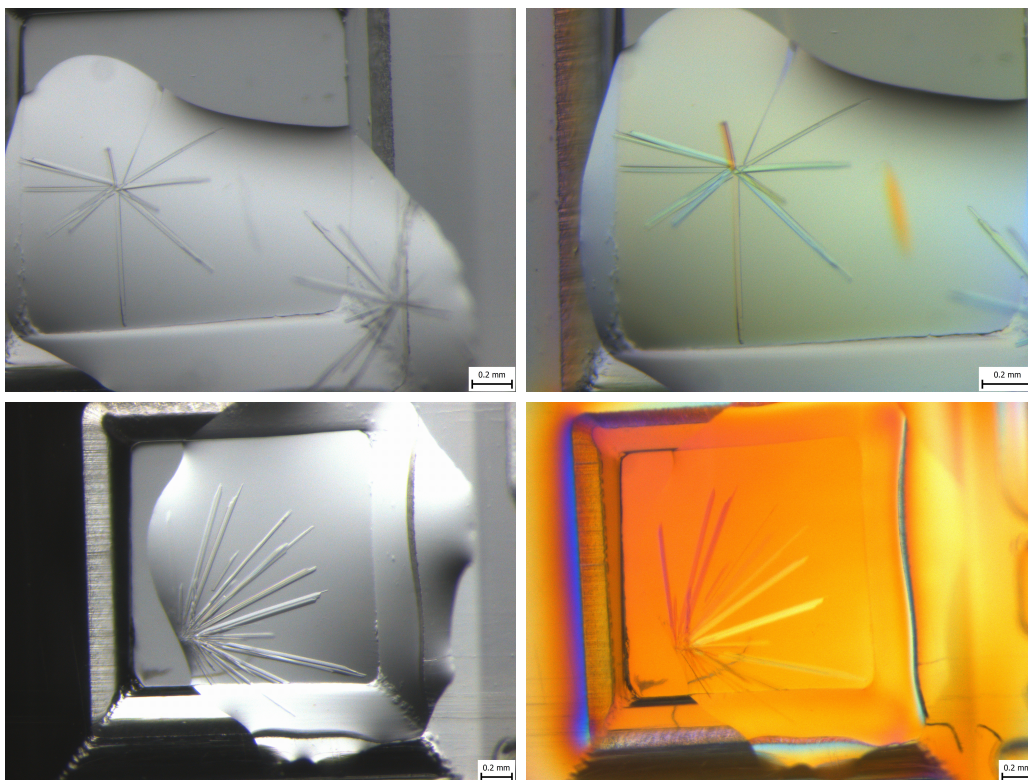
**Obrázek 4.1:** Výsledky kontroly čistoty a monodisperzity vzorku. (a): Čistota zkontrolována pomocí SDS-PAGE. První sloupec znázorňuje standard molekulových hmotností (*marker*), druhý sloupec znázorňuje čistou nukleasu s přibližnou hmotností 28 kDa. (b): Objemová distribuce velikosti částic určená pomocí DLS.

## 4.2 Krystalizace vzorku a tvorba komplexů protein-ligand

Pro krystalizaci nukleasy byly připraveny čtyři krystalizační podmínky sepsané v tabulce 4.1. Krystalizace nukleasy Snn1 byla realizována na krystalizační destičce CrystalQuick™ 96 Well, Greiner 609171 (Hampton Research) pomocí metody difuze par při teplotě 18 °C v uspořádání sedící kapky. Do rezervoáru bylo vždy nanášeno 70  $\mu\text{l}$  krystalizační podmínky. Kapka směsi nukleasy a krystalizační podmínky byla tvořena v poměru 1:1 o celkovém objemu 1  $\mu\text{l}$ , další v poměrech 1:2 a 2:1 o celkovém objemu 1,5  $\mu\text{l}$ , následně byla krystalizační destička utěsněna fólií Crystal Clear Sealing Film (HR3-609). Krystalizace nukleasy o koncentraci 13,1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (měřené v pufru složeného z 50 mM Tris, pH 7,0 a 150 mM NaCl) byla nejčastěji pozorována v krystalizační podmínce III z tabulky 4.1 v kapkách, které byly tvořeny krystalizační směsí v poměru 1:1. Růst krystalů byl pozorován již po třech dnech a dále pokračoval až tři další týdny.

**Tabulka 4.1:** Složení čtyř krystalizačních podmínek, které byly připraveny pro krystalizaci nukleasy Snn1. Procento hmotnosti roztoku polymeru v celkovém objemu roztoku podmínky značeno w/v (*weight/volume*).

Číslo podmínky	Sůl	Pufř	Polymer
I	0,2 M $\text{Li}_2\text{SO}_4$	0,1 M BIS-TRIS, pH 5,5	25 % w/v PEG 3350
II	0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1 M BIS-TRIS, pH 5,5	25 % w/v PEG 3350
III	0,2 M $\text{Li}_2\text{SO}_4$	0,1 M MES, pH 6,5	30 % w/v PEG 8000
IV	0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1 M MES, pH 6,5	30 % w/v PEG 8000

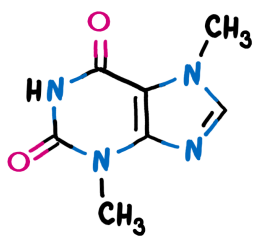
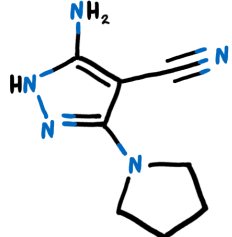
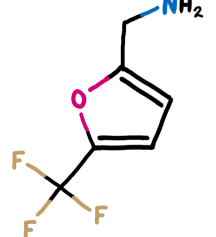


**Obrázek 4.2:** Krystaly nukleasy Smn1 získané metodou difuze par v uspořádání sedící kapky, které krystalizovaly v krystalizační podmínce III (0,2 M  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , 0,1 M MES, pH 6,5, 30 % w/v PEG 8000) při teplotě 18 °C. Kapky byly tvořeny směsí 0,5  $\mu\text{l}$  nukleasy a 0,5  $\mu\text{l}$  krystalizační podmínky. V levém sloupci jsou krystaly pod viditelným zářením, v pravém v polarizovaném světle, díky kterému je vidět přítomnost krystalu chirální molekuly (proteinu) a ne například soli, která není chirální a nemá schopnost stáčet rovinu polarizovaného světla.

Nukleasa Smn1 často tvoří srostlice ve tvaru hvězd, přičemž délka jehliček je v rozmezí 100-500  $\mu\text{m}$ . Ideální jsou nesrostlé krystaly nebo oddělené jednotlivé jehličky ze srostlých hvězd. K následnému testování vazby protein-ligand byly vybrány tři krystaly z podmínky III (viz obrázek 4.2). Jednotlivé krystaly byly namáčeny v roztoku ligandu vybraného z destičky Xtal Frag Screen (Jena Bioscience), která obsahuje 96 různých fragmentů vhodných pro testování vazeb komplexů protein-ligand. Do rezervoáru daného ligandu bylo naneseno 30  $\mu\text{l}$  krystalizační podmínky III. Roztok ligandu byl pak vytvořen nanesením 0,5  $\mu\text{l}$  na suchý fragment, do kterého se namočily jednotlivé krystaly nukleasy Smn1. Použité krystaly s ligandy, včetně jejich PDB kódů a struktur, jsou uvedeny v tabulce 4.2.



**Tabulka 4.2:** Krystaly nukleasy Smn1 a ligandy, ze kterých byly vytvořeny komplexy vhodné pro testování vazeb mezi nukleasou a ligandy. Komplexy byly vytvořeny namáčením jednotlivých krystalů nukleasy Smn1 do roztoků ligandů. Komplexy jsou pojmenovány podle kódového označení molekuly ligandů v PDB formátu.

Název krystalu	SmnKa21	SmnKa39	SmnKa40
Kódové označení ligandu	37T	46X	47M
Doba namáčení	3,5 h	5 h	5 h
Struktura ligandu			
Název ligandu	theobromin	3-amino-5-(pyrrolidin-1-yl)-1H-pyrazole-4-carbonitrile	1-[5-(trifluoromethyl)furan-2-yl]methanamine
Název komplexu	Smn1 <sub>37T</sub>	Smn1 <sub>46X</sub>	Smn1 <sub>47M</sub>

### 4.3 Difrakční experiment

Vybrané krystaly, které byly namočené do roztoků s ligandy, byly nabrány smyčkami Dual Thickness MicroLoops LD (MiTeGen) a vloženy do roztoku krystalizační podmínky III a 25 % w/v glycerolu, který krystaly chrání před tvorbou ledu při následné vitifikaci. Krystaly byly následně podrobeny rentgenové strukturní analýze. Difrakční experimenty všech tří vybraných krystalů (komplexy z tabulky 4.2) byly provedeny na synchrotronovém zdroji záření BESSY II (Helmholtz-Zentrum, Berlín) [25]. Měření rotační metodou proběhlo za teploty 100 K o vlnové délce záření 0,9184 Å. Difrakční obrazce byly snímány CMOS detektorem PILATUS 6M. Bylo naměřeno celkem 3600 difrakčních snímků pro každý krystal. Expoziční čas byl 0,1 s a oscilační úhel 0,1° na snímek.

Difrakční data byla zpracována pomocí programů XDS [12] a Aimless [13]. Celková kompletnost dat, hodnota korelačního koeficientu  $CC_{1/2}$  a další charakteristické statistiky difrakčních dat jsou uvedeny v tabulce 4.3.

**Tabulka 4.3:** Charakteristické statistiky difrakčních dat třech krystalů komplexů  $\text{Smn1}_{37T}$ ,  $\text{Smn1}_{46X}$  a  $\text{Smn1}_{47M}$ . Hodnoty uvedené v závorkách jsou pro slupku s nejvyšším rozlišením.

Název komplexu Statistiky difrakčních dat	$\text{Smn1}_{37T}$	$\text{Smn1}_{46X}$	$\text{Smn1}_{47M}$
Vzdálenost detektoru [mm]	346,778	211,753	181,820
Počet použitých snímků	1799	3598	2898
Difrakční limit [Å]	42,6 – 1,75 (1,78 – 1,75)	42,90 – 1,39 (1,42 – 1,39)	36,70 – 1,30 (1,32 – 1,30)
Parametry elementární buňky:	44,28	44,42	44,19
$a, b, c$ [Å]	72,71	72,71	72,79
$\alpha, \beta, \gamma$ [°]	81,40	81,55	81,17
	90,00	90,00	90,00
	105,64	105,24	105,62
	90,00	90,00	90,00
Prostorová grupa	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$
Počet reflexí	169 961 (9 508)	659 436 (29 979)	573 658 (22 474)
Počet nezávislých reflexí	49 654 (2 731)	97 893 (4 625)	116 833 (5435)
Kompletnost dat [%]	98,9 (98,9)	98,3 (94,4)	96,3 (91,7)
$R_{meas}$	0,111 (0,981)	0,077 (1,007)	0,076 (0,925)
$CC_{1/2}$	0,997 (0,737)	0,999 (0,817)	0,998 (0,692)
$I/\sigma$ [I]	8,7 (1,6)	15,5 (2,2)	12,5 (1,9)
Redundance	3,4 (3,5)	6,7 (6,5)	4,9 (4,1)

## 4.4 Fázový problém

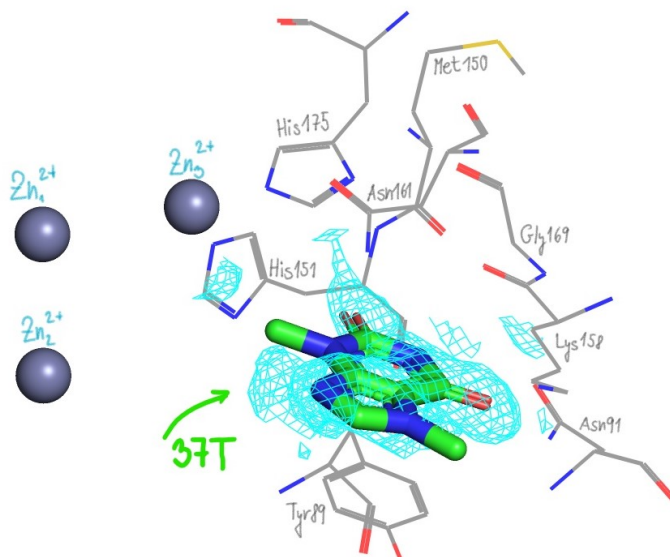
Díky již vyřešené nepublikované struktuře nukleasy  $\text{Smn1}$  bez navázaných ligandů bylo možné vyřešit fázový problém pomocí metody molekulárního nahrazení. Molekulární nahrazení bylo provedeno pomocí programu Phaser [26]. Následně byla zkontrolována korespondence získaných map elektronové hustoty se sekvencí aminokyselin modelu. Tato kontrola byla provedena pomocí programu Coot [27]. Jestliže mapa elektronové hustoty v aktivním místě nukleasy naznačovala možné navázání ligandu, strukturní model byl o tento ligand doplněn.

# Kapitola 5

## Výsledky

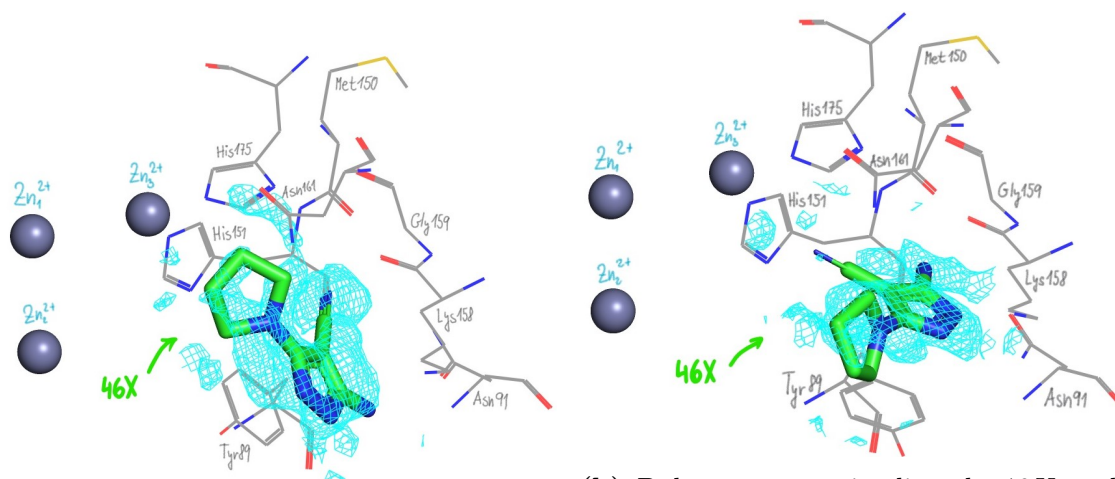
Pomocí rentgenové strukturní analýzy byly získány tři nové struktury nukleasy Snn1. Zjistili jsme, že některé ligandy mají schopnost navázat se do aktivního místa nukleasy Snn1. Dva ligandy vytvořily s nukleasou Snn1 komplex a navázaly se, třetí studovaný ligand se s nejvyšší pravděpodobností do aktivního místa nenavázal.

Difrakční limit struktury komplexu Snn1<sub>37T</sub> byl určen do 1,75 Å. Ve struktuře Snn1<sub>37T</sub> byl v aktivním místě podle mapy elektronové hustoty nalezen ligand theobrominu (jehož PDB kódové označení je 37T). Ligand byl do strukturního modelu Snn1<sub>37T</sub> manuálně domodelován v programu Coot [27], následně byla jeho přítomnost a shoda s mapou elektronové hustoty zobrazena pomocí programu PyMOL [19].



**Obrázek 5.1:** Molekula theobromin (PDB kódové označení 37T) navázaná v aktivním místě nukleasy Snn1. Modrošedé koule reprezentují zinkový klastr, pozice ligandu je znázorněna pomocí tyčinkového modelu (uhlíky zobrazeny zeleně), aminokyseliny kolem ligandu jsou znázorněny pomocí čárového modelu (uhlíky zobrazeny šedě). 2mF<sub>o</sub>-DF<sub>c</sub> mapa elektronové hustoty je vykreslena na hladině 0,8  $\sigma$  a znázorněna tyrkysovou sítí. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL [19].

Struktura komplexu Snn1<sub>46X</sub> byla určena s difrakčním limitem do 1,39 Å. Strukturní model komplexu Snn1<sub>46X</sub> byl složen ze dvou molekul, kde v každé molekule byla dle mapy elektronové hustoty pozorována pravděpodobná přítomnost ligandu 3-amino-5-(pyrrolidin-1-yl)-1H-pyrazole-4-carbonitrile s PDB kódovým označením 46X s částečnou okupancí v aktivním místě. Pravděpodobné umístění ligandu do obou molekul strukturního modelu bylo manuálně domodelováno v programu Coot [27], následně byla ukázána přítomnost ligandů v obou molekulách a jejich odlišné umístění i výrazná změna pozice některých aminokyselin tvořících aktivní místo.

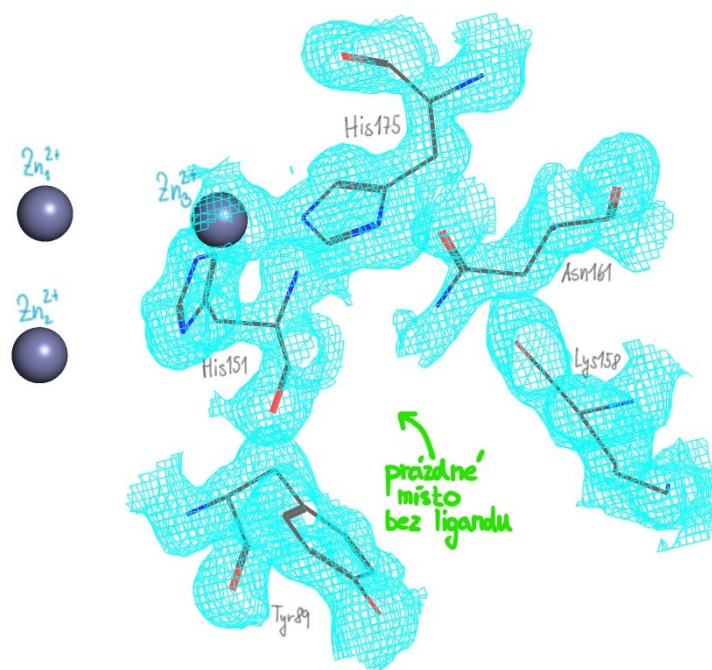


(a) Pozice ligandu 46X v aktivním místě v jedné ze dvou molekul přítomné v asymetrické jednotce krystalu nukleasy Snn1.

(b) Další možná pozice ligandu 46X v aktivním místě ve druhé ze dvou molekul přítomné v asymetrické jednotce krystalu nukleasy Snn1.

**Obrázek 5.2:** Molekula 3-amino-5-(pyrrolidin-1-yl)-1H-pyrazole-4-carbonitrile s PDB kódovým označením 46X navázaná v aktivním místě nukleasy Snn1. Modrošedé koule reprezentují zinkový klastr, pozice ligandu je znázorněna pomocí tyčinkového modelu (uhlíky zobrazeny zeleně), aminokyseliny kolem ligandu jsou znázorněny pomocí čárového modelu (uhlíky zobrazeny šedě).  $2mF_o-DFc$  mapa elektronové hustoty je vykreslena na hladině  $0,8 \sigma$  a znázorněna tyrkysovou sítí. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL [19].

Struktura Smn1<sub>47M</sub> byla určena s difrakčním limitem do 1,30 Å. Přítomnost ligandu 1-[5-(trifluoromethyl)furan-2-yl]methanamine (PDB kódové označení je 47M) v aktivním místě se nepotvrdila. Pomocí programu PyMOL [19] byla znázorněna absence mapy elektronové hustoty uvnitř aktivního místa.



**Obrázek 5.3:** Prázdné aktivní místo bez navázaného ligandu 1-[5-(trifluoromethyl)furan-2-yl]methanamine (PDB kódové označení 47M). Modrošedé koule reprezentují zinkový klastr, aminokyseliny tvořící aktivní místo jsou znázorněny pomocí čárového modelu, ve kterém jsou šedě znázorněny uhlíky. 2mF<sub>o</sub>-DF<sub>c</sub> mapa elektronové hustoty je vykreslena na hladině 0,8  $\sigma$  a znázorněna tyrkysovou sítí. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL [19].

# Kapitola 6

## Diskuze

### 6.1 Vazby ligandů

V prvním určeném strukturním modelu komplexu  $\text{Smn1}_{37T}$  lze pozorovat navázání molekuly theobrominu s PDB kódem  $37T$  v místě "kapsy", ve které je v případě čisté nukleasy bez ligandů často přítomna molekula vody. Navázání ligandu do aktivního místa lze pozorovat na obrázku 5.1. Ligand byl do strukturního modelu vložen tak, aby byl co nejpřesněji pokryt mapou elektronové hustoty. Pozice ligandu v aktivním místě by se mohla nepatrně změnit upřesňováním strukturního modelu, díky kterému by se výrazně zlepšila mapa elektronové hustoty, ze které by byla pozice ligandu lépe zřetelná.

Ve druhém určeném strukturním modelu komplexu  $\text{Smn1}_{46X}$  byly pozorovány dvě různé pozice navázání ligandu 3-amino-5-(pyrrolidin-1-yl)-1H-pyrazole-4-carbonitrile s PDB kódem  $46X$  do aktivního místa. Tyto dvě pozice ve dvou molekulách nukleasy  $\text{Smn1}$  přítomných v asymetrické jednotce lze pozorovat na obrázku 5.2. Ligand má v obou případech téměř stejné postavení vůči aminokyselině  $\text{Tyr89}$ , která tvoří spodní část místa pro vazbu báze nukleové kyseliny. Navázaný ligand spolu s postranním řetězcem  $\text{Tyr89}$  v obou případech zaujímá vůči ostatním aminokyselinám tvořícím aktivní místo jinou pozici. Přestože byla v případě této struktury naměřena poměrně kvalitní data, výsledné mapy elektronových hustot v místě navázání ligandu nejsou příliš zřetelné, a tak se může reálná pozice ligandu v obou pozicích lišit. Vzhledem k chemickým vazbám mezi kladně a záporně nabitými atomy je toto umístění ligandů do strukturního modelu pravděpodobné. Podobně jako v případě prvního komplexu by bylo velice vhodné tento strukturní model upřesnit a zlepšit tak kvalitu mapy elektronové hustoty, která by následně pomohla přesněji určit pozici ligandu.

V posledním získaném strukturním modelu komplexu  $\text{Smn1}_{47M}$  bylo pomocí mapy elektronové hustoty pozorováno prázdné aktivní místo (viz obrázek 5.3). Navázání ligandu 1-[5-(trifluoromethyl)furan-2-yl]methanamine s PDB kódem  $47M$  do aktivního místa je tedy velice nepravděpodobné. Mapa elektronové hustoty daného ligandu nebyla nalezena ani na jiném místě strukturního modelu komplexu  $\text{Smn1}_{47M}$ . V tomto případě by další upřesňování strukturního modelu pravděpodobně nepomohlo k nalezení navázaného ligandu. Z testování vazby ligandu  $47M$  a nukleasy

Smn1 tedy plynou tři možné výsledky:

- vazba mezi ligandem a nukleasou není díky vzájemným chemickým vlastnostem možná
- navázání ligandu by se uskutečnilo, pokud by se změnil chemické vlastnosti krystalizační podmínky
- navázání ligandu by se uskutečnilo v případě, že by se prodloužila doba namáčení krystalu nukleasy v roztoku ligandu za stejných počátečních podmínek (chemické vlastnosti všech roztoků i krystalizační podmínky by zůstaly stejné), nebo by se změnila koncentrace roztoku ligandu

Dalším krokem při testování vazeb komplexů nukleasy Smn1 by jistě bylo rozšířit pozorování dalších ligandů s jinými chemickými vlastnostmi a určit, jaké skupiny molekul jsou schopny navázat se do aktivního místa, zda-li problém vazby vyřeší pouze změna doby namáčení a jestli je celkový mechanismus reprodukovatelný. Následně by bylo vhodné všechny získané strukturní modely upřesnit tak, aby jednotlivé komplexy byly vhodné k podrobné analýze způsobů vazby různých ligandů a dále k využití například pro vytvoření nových inhibitorů této nukleasy.

# Závěr

- Byla provedena kontrola kvality vzorku nukleasy ze *Stenotrophomonas maltophilia* (Smn1), která byla produkována v Laboratoři struktury a funkce biomolekul v Biotechnologickém ústavu AV ČR ve Věstci. Metodou SDS-PAGE byla potvrzena čistota a zjištěna přibližná hmotnost nukleasy 28 kDa. Následně byl vzorek koncentrován na hodnotu koncentrace 13,1 mg.ml<sup>-1</sup> a byla provedena kontrola monodisperzity metodou DLS pro objemovou distribuci částic ve vzorku.
- Byly vybrány vhodné krystalizační podmínky, se kterými se podařilo zkrystalizovat vzorek nukleasy Smn1.
- Byly vybrány tři krystaly pro testování vazeb komplexu nukleasy Smn1 a ligandů. Tyto krystaly byly namáčeny do tří různých roztoků ligandů a následně vitrifikovány.
- Na synchrotronovém zdroji záření BESSY II v Berlíně [25] byla nasbírána difrakční data.
- Po zpracování těchto dat v programu XDS [12] bylo provedeno molekulární nahrazení s modelem nepublikované struktury Smn1 bez přítomnosti ligandů.
- Dále byly získány tři nové struktury nukleasy Smn1. V případě dvou byly struktury podle mapy elektronové hustoty doplněny o příslušný ligand:
  - struktura komplexu Smn1<sub>37T</sub> s molekulou theobromin v aktivním místě s difrakčním limitem do 1,75 Å,
  - struktura komplexu Smn1<sub>46X</sub> s molekulou 3-amino-5-(pyrrolidin-1-yl)-1H-pyrazole-4-carbonitrile s dvěma různými pozicemi v aktivním místě dvou molekul s difrakčním limitem do 1,39 Å,
  - struktura komplexu Smn1<sub>47M</sub> bez navázané molekuly 1-[5-(trifluoromethyl)furan-2-yl]methanamine s difrakčním limitem do 1,30 Å.



# Seznam použitých zdrojů

- [1] MCPHERSON, Alexander a Jose A. GAVIRA. *Introduction to protein crystallization*. Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications. 2014, 70(1), 2-20. ISSN 2053-230X. DOI: 10.1107/S2053230X13033141.
- [2] SEAR, Richard P. *Nucleation: theory and applications to protein solutions and colloidal suspensions*. Journal of Physics: Condensed Matter. 2007, 19(3). ISSN 0953-8984. DOI: 10.1088/0953-8984/19/3/033101.
- [3] KUTÁ SMATANOVÁ, Ivana. *Krystalizace biologických makromolekul*. Krystalografická společnost [online]. [cit. 2021-04-07]. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kryst/difrakce/iva/krystalizace.htm>.
- [4] BERGFORS, Terese. *Protein crystallization: techniques, strategies, and tips: a laboratory manual*. 2. La Jolla, Kalifornie: Int. Univ. Line, 2001. ISBN 0963681753.
- [5] BERMAN H. M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne. (2000) *The Protein Data Bank Nucleic Acids Research*, 28: 235-242. Dostupné z: <http://www.rcsb.org/>.
- [6] KRAUS, Ivo. *Úvod do strukturní rentgenografie*. CZ: Academia, 1985. ISBN 21-014-85.
- [7] MALÝ, Martin. *Optimalizace parametrů zpracování difrakčních dat oxidázy z *Microdochium nivale**. Praha, 2016. Bakalářská práce. České vysoké učení technické v Praze, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská. Vedoucí práce Petr Kolenko.
- [8] GONZÁLEZ, A. *1.5 X-Ray Crystallography: Data Collection Strategies and Resources*. Comprehensive Biophysics. Elsevier, 2012, 2012, , 64-91. ISBN 9780080957180. DOI: 10.1016/B978-0-12-374920-8.00106-5
- [9] HEMBERG, O., M. OTENDAL a H. M. HERTZ. *Liquid-metal-jet anode electron-impact x-ray source*. Applied Physics Letters. 2003, 83(7), 1483-1485. ISSN 0003-6951. DOI: 10.1063/1.1602157
- [10] STOCK, Stuart R., et al. *Liquid-metal-jet x-ray tube technology and tomography applications*. 11. 9. 2014, , 92120J-. DOI: 10.1117/12.2061612

- [11] BLEWETT, John P. *Synchrotron Radiation – Early History*. *Journal of Synchrotron Radiation*. 1998, 5(3), 135-139. ISSN 0909-0495. DOI: 10.1107/S0909049597043306
- [12] KABSCH, W. *XDS*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*. 2010, 66(2), 125-132. ISSN 0907-4449. DOI: 10.1107/S0907444909047337
- [13] EVANS, Philip R. a Garib N. MURSHUDOV. *How good are my data and what is the resolution?* *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*. 2013, 69(7), 1204-1214. ISSN 0907-4449. DOI: 10.1107/S0907444913000061
- [14] WINN, Martyn D., Charles C. BALLARD, et al. *Overview of the CCP 4 suite and current developments*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*. 2011, 67(4), 235-242. ISSN 0907-4449. DOI: 10.1107/S0907444910045749
- [15] EVANS, Philip. *Scaling and assessment of data quality*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*. 2006, 62(1), 72-82. ISSN 0907-4449. DOI: 10.1107/S0907444905036693
- [16] YANG, Wei. *Nucleases: diversity of structure, function and mechanism*. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 2011, 44(1), 1-93. ISSN 0033-5835. DOI: 10.1017/S0033583510000181
- [17] KOVAĽ, Tomáš a Jan DOHNÁLEK. *Characteristics and application of S1–P1 nucleases in biotechnology and medicine*. *Biotechnology Advances*. 2018, 36(3), 603-612. ISSN 07349750. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.007
- [18] KOVAĽ, Tomáš, et al. *Structural and Catalytic Properties of S1 Nuclease from *Aspergillus oryzae* Responsible for Substrate Recognition, Cleavage, Non-Specificity, and Inhibition*. *PLOS ONE*. 2016, 11(12). ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0168832
- [19] Schrödinger, LLC. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.4*. 2020
- [20] JACQUEMARD, Célien a Esther KELLENBERGER. *A bright future for fragment-based drug discovery: what does it hold? Expert Opinion on Drug Discovery*. 2019, 14(5), 413-416. ISSN 1746-0441. DOI: 10.1080/17460441.2019.1583643
- [21] THOMAS, Sherine E. a Patrick COLLINS, et al. *Structure-guided fragment-based drug discovery at the synchrotron: screening binding sites and correlations with hotspot mapping*. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 2019, 377(2147). ISSN 1364-503X. DOI: 10.1098/rsta.2018.0422
- [22] WIENEN-SCHMIDT, Barbara, et al. *Two Methods, One Goal: Structural Differences between Cocrystallization and Crystal Soaking to Discover Ligand Binding Poses*. *ChemMedChem*. 2021, 16(1), 292-300. ISSN 1860-7179. DOI: 10.1002/cmhc.202000565

- [23] HUSCHMANN, Franziska U., et al. *Structures of endothiaepsin–fragment complexes from crystallographic fragment screening using a novel, diverse and affordable 96-compound fragment library*. Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications. 2016, 72(5), 346-355. ISSN 2053-230X. DOI: 10.1107/S2053230X16004623
- [24] HUSTÁKOVÁ, Blanka. *Struktura a funkce S1-P1 nukleas z oportunních patogenů*. Praha, 2019. Bakalářská práce. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie. Vedoucí práce Petra Lipovová.
- [25] GERLACH, M., MUELLER, U., WEISS, M. S. *The MX Beamlines BL14.1-3 at BESSY II*. Journal of large-scale research facilities JLSRF. 2016, 2. ISSN 2364-091X. DOI: 10.17815/jlsrf-2-64
- [26] MCCOY, Airlie J., et al. *Phaser crystallographic software*. Journal of Applied Crystallography. 2007, 40(4), 658-674. ISSN 0021-8898. DOI: 10.1107/S0021889807021206
- [27] EMSLEY, Paul a Kevin COWTAN. *Coot: model-building tools for molecular graphics*. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography. 2004, 60(12), 2126-2132. ISSN 0907-4449. DOI: 10.1107/S0907444904019158