

České vysoké učení technické v Praze
Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská

Katedra inženýrství pevných látek

Obor: Inženýrství pevných látek



**Využití rentgenové difrakční analýzy při
studiu oxidačních stavů
flavin-dependentních oxidáz**

**Application of X-ray diffraction analysis
in studies of oxidation states of
flavin-dependent oxidases**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vypracoval: Bc. Aleš Kravíc
Vedoucí práce: Ing. Jan Dohnálek, Ph.D.
Rok: 2021



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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Student: **Bc. Aleš Kravíc**

Studijní program: **Aplikace přírodních věd**

Obor: **Inženýrství pevných látek**

Akademický rok: **2020/2021**

Název práce: **Využití rentgenové difrakční analýzy při studiu oxidačních stavů flavin-dependentních oxidáz**
(česky)

Název práce: **Application of X-ray diffraction analysis in studies of oxidation states of flavin-dependent oxidases**
(anglicky)

Pokyny pro vypracování:

Cílem práce je zvládnutí celkové metodiky proteinové krystalografie a její využití pro studium oxidačních stavů flavoenzymů a jejich změn. Vybrané flavoenzymy budou připraveny pro krystalizaci, krystalizovány a v případě úspěchu při krystalizaci pak podrobeny rentgenové difrakční analýze za účelem analýzy změny stavu flavinu v oxidačně-redukčním cyklu, především z mechanistického pohledu, a to v závislosti na přítomnosti chemických redukčních činidel, na absorbované dávce rentgenového záření nebo na UV ozařování.

Při řešení postupujte podle následujících bodů.

I. Rešeršní/teoretická část

- 1) Metody proteinové krystalografie, zaměření na současné postupy
- 2) Experimentální možnosti pro studium strukturních změn v proteinech v závislosti na čase, dávce záření nebo na jiných parametrech
- 3) Stav znalostí o flavoproteinech z hlediska změny oxidačního stavu flavinu, se zaměřením na strukturně-spektroskopické studie
- 4) Metodika zpracování dat

II. Experimentální část

- 1) Popis experimentálního zařízení
- 2) Realizace experimentů, popis vzorků
- 3) Zpracování dat
- 4) Výsledky a jejich diskuze

Doporučená literatura:

- [1] J. Drenth: Principles of Protein X-Ray Crystallography, Springer, New York 2007.
- [2] J. Marek, Z. Trávníček: Monokrystalová rentgenová strukturní analýza, Univerzita Palackého v Olomouci (UPOL) 2002.
- [3] Y.T. Kao, C. Saxena, T.F. He, et al. J Am Chem Soc. **130** (2008) 13132-13139.
- [4] W.P. Dijkman, G. de Gonzalo, A. Mattevi, et al.: Appl. Microbiol. Biotechnol. **97** (2013) 5177-5188.
- [5] L. Sützl, G. Foley, E.M.J. Gillam, et al.: Biotechnol. Biofuels **12** (2019) 118 (e-collection).
- [6] S. Horell, S. V. Antonyuk, R. R. Eady, et al.: IUCrJ. **3** (2016) 271-281.
- [7] M.L. Grünbein, G. Nass Kovacs: Acta Crystallogr D Struct Biol. **75** (2019) 178-191.
- [8] P. Mehrabi, E. C. Schulz, M. Agthe, et al.: Nature Methods **16** (2019) 979-982.

Jméno a pracoviště vedoucího práce:

Ing. Jan Dohnálek, Ph.D, Laboratoř Struktury a funkce biomolekul, Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i., Biocev, Vestec.

Jméno a pracoviště konzultanta:

Ing. Leona Švecová, Laboratoř Struktury a funkce biomolekul, Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i., Biocev, Vestec; Katedra inženýrství pevných látek, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, České vysoké učení technické v Praze.

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

Datum zadání diplomové práce: 5. 10. 2020

Termín odevzdání diplomové práce: 3. 5. 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 diplomovou práci vypracoval samostatně a použil jsem pouze podklady (literaturu, projekty, SW atd.) uvedené v příloženém seznamu

V Praze dne

.....

Bc. Aleš Kravíc

Poděkování

Rád bych poděkoval Ing. Janu Dohnálkovi, Ph.D, Ing. Leoně Švecové a Doc. Ing. Petru Kolenkovi, Ph.D. za ochotu, trpělivost a skvělý přístup při vedení mé práce a také všem kolegům z Laboratoře struktury a funkce biomolekul Biotechnologického ústavu AV ČR.

Také bych rád poděkoval personálu synchrotronu BESSY II, BL 14 a kolegům z Centra molekulární struktury v centru BIOCEV za technickou podporu při měření, obětavou práci a užitečné připomínky.

Dále bych rád poděkoval své přítelkyni a rodině za nekonečnou podporu a trpělivost při psaní. Nakonec bych rád poděkoval Veronice Ferencziové, díky které jsem nikdy neměl problém s administrativou při studiu.

Bc. Aleš Kravíc

„Perhaps the real degree was the friends we made along the way.“ - *Můj dobrý kamarád*

Název práce:

Využití rentgenové difrakční analýzy při studiu oxidačních stavů flavin-dependentních oxidáz

Autor: Bc. Aleš Kravíc

Studijní program: Aplikace přírodních věd

Obor: Inženýrství pevných látek

Druh práce: Diplomová práce

Vedoucí práce: Ing. Jan Dohnálek, Ph.D.

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

Konzultanti: Ing. Leona Švecová

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

Doc. Ing. Petr Kolenko, Ph.D.

Katedra inženýrství pevných látek, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, České vysoké učení technické v Praze

Abstrakt: Práce je zaměřena na analýzu oxidačních stavů flavinu FAD-dependentní oxidoreduktázy z *Chaetomium thermophilum* v závislosti na přítomnosti chemického redukčního činidla a absorbované dávky záření. Ve všech strukturách *ChtFDO*, které byly dosud vyřešeny metodami proteinové krystalografie, byl pozorován pouze redukovaný stav flavinu. Je analyzován a diskutován ohyb isoalloxazinového kruhu flavinu v aktivním místě jednotlivých struktur. Strukturální analýza konformačních změn flavinu za definovaných podmínek ukazuje, že s velkou pravděpodobností je plně oxidovaný stav FAD v tomto enzymu strukturálně velmi blízký plně redukovanému stavu.

Klíčová slova: rentgenová strukturální analýza, oxidoreduktáza, oxidačně-redukční proces, flavoproteiny

Title:

Application of X-ray diffraction analysis in studies of oxidation states of flavin-dependent oxidases

Author: Bc. Aleš Kravíc

Abstract: This thesis is focused on the analysis of the oxidation states of flavin in FAD-dependent oxidoreductase from *Chaetomium thermophilum* as a dependency on the presence of a chemical reducing agent and absorbed radiation dose. In all *ChtFDO* structures solved so far by protein crystallography methods, only the reduced state of flavin was observed. The bending of the isoalloxazine ring of flavin in the active site of each structure is analyzed and discussed. Structural analysis of the conformational changes of flavin under defined conditions shows that, in all likelihood, the fully oxidized state of FAD in this enzyme is structurally very close to the fully reduced state.

Key words: X-ray structure analysis, oxidoreductase, oxidation-reduction process, flavoproteins

Obsah

1 Úvod	9
I Teoretická část	10
2 Makromolekulární krystalografie	11
2.1 Rozptyl rentgenového záření	11
2.2 Difrakce na krystalové mřížce	12
2.3 Strukturní faktor	12
2.4 Fázový problém	13
2.5 Pattersonova funkce	14
2.6 Molekulární nahrazení	14
2.6.1 Rotační funkce	15
2.6.2 Translační funkce	16
2.6.3 Vyhodnocení vyřešení fázového problému	16
2.7 Upřesňování struktury	17
3 Experimentální přístroje a metody	19
3.1 Zdroje rentgenového záření	19
3.1.1 Konvenční zdroje	19
3.1.2 Synchrotronové zdroje	20
3.2 Detekce rentgenového záření	20
3.3 Difrakční experiment	21
3.4 Zpracování difrakčních dat	21
3.5 Radiační poškození	23
3.6 Studium strukturních změn v proteinech	23
3.7 Krystalizace proteinů	24
3.7.1 Metoda difuze par	24
3.7.2 Krystalizace pod olejem	25
4 FAD-dependentní proteiny	26

4.1	Flaviny	26
4.2	Strukturně spektroskopické studie FAD ve flavoproteinech	27
4.3	Flavin-dependentní oxidoreduktáza z <i>Chaetomium thermophilum</i>	27
5	Cíle	30
II Experimentální část		31
6	Materiály a metody	32
6.1	Příprava vzorku <i>Cht</i> FDO pro krystalizaci	32
6.2	Testování redukčních činidel	32
6.3	Krystalizace <i>Cht</i> FDO	33
6.4	Difrakční experiment	33
6.5	Zpracování difrakčních dat a upřesňování strukturních modelů	34
6.5.1	Vytvoření referenčního modelu	35
6.5.2	Struktury pro analýzu změn na FAD	35
6.5.2.1	Datová sada redState_DTN	36
6.5.2.2	Datová sada lowDose_20T	36
6.5.2.3	Datová sada lowDose_5T	37
6.5.2.4	Datová sada lowDose_1T	37
7	Výsledky a diskuze	38
7.1	Deglykosylace vzorku	38
7.2	Testování redukčního činidla	39
7.3	Sběr datových sad	39
7.4	Analýza oxidačních stavů	40
8	Závěr	45

Kapitola 1

Úvod

Proteiny jsou nejdůležitější molekuly života. Jejich funkce závisí na 3D struktuře a na jejich specifických vzájemných interakcích, které jsou určeny jejich strukturou a vazebnými vlastnostmi. Zkoumání struktur makromolekul nám umožňuje pochopit biologické procesy života nebo objevit nové metody léčby různých nemocí. Rentgenová difrakční analýza je mocná metoda, která nám umožňuje určit struktury proteinů a tím poskytnout informace o jejich funkci.

Flavoenzymy jsou oxidoreduktázy, které katalyzují širokou škálu různých typů reakcí. Flavoenzymy byly rozsáhle studovány pro své katalytické vlastnosti a v současnosti nacházejí uplatnění v průmyslových biokatalytických aplikacích. Nové poznatky o flavoenzimech poukazují na jejich potenciální uplatnění ve farmaceutickém, chemickém a potravinářském průmyslu [1]. Flavoenzymy využívají kovalentně či nekovalentně navázaný kofaktor (např. flavinadenindinukleotid, FAD) pro katalýzu redoxních reakcí. Při těchto reakcích přechází molekula FAD mezi redukovaným a oxidovaným stavem, přičemž dochází k jeho konformačním změnám a změnám ve schopnosti absorbovat určité vlnové délky.

Cílem této práce bylo za použití metod proteinové krystalografie analyzovat oxidační stavy FAD-dependentní oxidoreduktázy z *Chaetomium thermophilum* a jejich změny. Pozornost je věnována především analýze stavu flavinu v závislosti na přítomnosti chemických redukčních činidel a na absorbované dávce rentgenového záření. Strukturní analýza oxidačně-redukčního procesu by mohla poskytnout nové informace o konformačních změnách flavinu, které by objasnily reakční mechanismus této oxidoreduktázy.

Část I

Teoretická část

Kapitola 2

Makromolekulární krystalografie

Difrakční metody využívající rentgenového záření, neutrony a elektrony jsou mocné nástroje poskytující informace o makromolekulární struktuře. Motivace k použití rentgenové krystalografie pro stanovení makromolekulární struktury je založena na skutečnosti, že pomocí této metody lze rychle a spolehlivě získat přesné molekulární modely velkých a složitých struktur. Kromě toho má rentgenové záření srovnatelnou vlnovou délku s meziatomovými vzdálenostmi v krystalu [2]. Elektronové nebo neutronové záření kladou nároky na velikosti krystalu, což komplikuje jejich manipulaci [3][4]. Přibližně 90 % všech strukturních modelů uložených v databázi 3D struktur makromolekul Protein Data Bank (PDB) je stanoveno pomocí rentgenové krystalografie [5].

2.1 Rozptyl rentgenového záření

Každá látka, na kterou dopadá rentgenové záření, vyzařuje krom částic a paprsků doprovázejících Comptonův efekt a tvoření elektron-pozitronových párů také elektromagnetické vlny s vlnovou délkou téměř stejnou, jako měly vlny primárního (dopadajícího) svazku. Pro vznik difrakčního obrazu je rozhodující právě tento typ interakce - pružný (Thomsonův) rozptyl, při kterém nedochází k energetickým ztrátám.

V důsledku dopadu rovinné vlny rentgenového záření na atomy zkoumaného vzorku jsou nabitě částice (elektrony a jádra) rozkmitány a stávají se zdroji sekundárních vln, které spolu následně interferují. Intenzita záření kmitajících nabitých částic ve vzdálenosti R je dána vztahem

$$I = I_0 \left(\frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 mc^2} \right)^2 \frac{1}{R^2} \frac{1 + \cos^2(2\Theta)}{2}, \quad (2.1)$$

kde I_0 je intenzita dopadajícího nepolarizovaného záření, e je náboj nabitě částice a m je hmotnost částice, $\frac{1 + \cos^2(2\Theta)}{2}$ je polarizační faktor a 2Θ je úhel, který svírají směry dopadajícího a rozptýleného záření. Člen $\frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 mc^2}$ se nazývá Thomsonův poloměr elektronu. Jelikož je intenzita záření kmitajících nabitých částic podle vztahu (2.1) nepřímo

uměrná kvadrátu hmotnosti částice a hmotnost protonu je přibližně 1800-krát větší, než hmotnost elektronu, lze rozptyl na jádrech zanedbat [6].

2.2 Difrakce na krystalové mřížce

Nechť jsou rozptylová centra v krystalové mřížce popsána vektory \mathbf{a} , \mathbf{b} , \mathbf{c} . V případě, že rovinná monochromatická vlna rentgenového záření dopadá na takto definovanou krystalovou mřížku, nastane konstruktivní interference rozptýlených sekundárních vln při splnění tzv. Laueho difrakčních podmínek

$$\begin{aligned} \mathbf{a} \cdot (\mathbf{k} - \mathbf{k}_0) &= 2\pi h \\ \mathbf{b} \cdot (\mathbf{k} - \mathbf{k}_0) &= 2\pi k \\ \mathbf{c} \cdot (\mathbf{k} - \mathbf{k}_0) &= 2\pi l, \end{aligned} \quad (2.2)$$

kde \mathbf{k}_0 je vlnový vektor dopadající vlny, \mathbf{k} je vlnový vektor rozptýlené vlny a hodnoty h , k , l jsou celá čísla nazývaná indexy reflexe.

Zavedením rozptylového vektoru definovaného vztahem $\mathbf{S} = \frac{\mathbf{k} - \mathbf{k}_0}{2\pi}$ se soustava rovnic (2.2) upraví na tvar

$$\begin{aligned} \mathbf{a} \cdot \mathbf{S} &= h \\ \mathbf{b} \cdot \mathbf{S} &= k \\ \mathbf{c} \cdot \mathbf{S} &= l. \end{aligned} \quad (2.3)$$

Z tohoto tvaru tvaru Laueho difrakčních podmínek lze odvodit, že konstruktivní interference sekundárních vln nastane, pokud je rozptylový vektor \mathbf{S} shodný s vektorem reciproké mřížky $\mathbf{H}_{hkl} = h\mathbf{a}^* + k\mathbf{b}^* + l\mathbf{c}^*$, kde \mathbf{a}^* , \mathbf{b}^* a \mathbf{c}^* jsou vektory reciprokého prostoru. Pro tyto vektory platí cyklicky záměnné rovnosti $\mathbf{a} \cdot \mathbf{a}^* = 1$, $\mathbf{a} \cdot \mathbf{b}^* = 0$, $\mathbf{a} \cdot \mathbf{c}^* = 0$ [7].

Z definice rozptylového vektoru a z faktu, že vektory \mathbf{k} a \mathbf{k}_0 svírají úhel 2θ , vyplývá pro velikost rozptylového vektoru

$$|\mathbf{S}| = \frac{|\mathbf{k} - \mathbf{k}_0|}{2\pi} = \frac{|\mathbf{k}||\mathbf{n} - \mathbf{n}_0|}{2\pi} = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{|\mathbf{n} - \mathbf{n}_0|}{2\pi} = \frac{2 \sin \theta}{\lambda}, \quad (2.4)$$

kde \mathbf{n}_0 a \mathbf{n} jsou jednotkové směrové vektory vektorů \mathbf{k}_0 a \mathbf{k} . Jelikož platí rovnost $|\mathbf{H}_{hkl}| = |\mathbf{S}|$ a zároveň je velikost vektoru \mathbf{H}_{hkl} rovna převrácené hodnotě mezivrstevní vzdálenosti d_{hkl} , lze difrakční podmínky zapsat jednoduše pomocí Braggovy rovnice

$$2 d_{hkl} \sin \theta = \lambda. \quad (2.5)$$

2.3 Strukturní faktor

Je-li objekt, na nějž dopadá monochromatická vlna rentgenového záření, složený z periodicky uspořádaných atomů v krystalové mřížce, jejíž základní buňku tvoří N atomů

s rozptylovou schopností f_j , pak vztah

$$F(\mathbf{S}) = \sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_j}, \quad (2.6)$$

kde $\mathbf{r}_j = x_j \mathbf{a} + y_j \mathbf{b} + z_j \mathbf{c}$ jsou souřadnice j -tého atomu v základní buňce, vyjadřuje amplitudu rozptylu daného objektu a veličina $F(\mathbf{S})$ se nazývá strukturní faktor. Při určování struktury krystalu hraje strukturní faktor velmi důležitou roli, protože jako jediná veličina obsahuje informaci o atomových pozicích [8].

Strukturní faktor je komplexní číslo ($F_{hkl} = |F_{hkl}| e^{i\alpha}$). Při splnění difrakční podmínky $\mathbf{S} = \mathbf{H}_{hkl}$ lze vztah 2.6 zapsat ve tvaru

$$F_{hkl} = A + iB = \sum_{j=1}^n f_j A_j + i \sum_{j=1}^n f_j B_j, \quad (2.7)$$

kde $A_j = \cos [2\pi(hx_j + ky_j + lz_j)]$ a $B_j = \sin [2\pi(hx_j + ky_j + lz_j)]$.

2.4 Fázový problém

Místo atomového rozptylové faktoru f_j lze zavést funkci elektronové hustoty $\rho(\mathbf{r})$, která vyjadřuje počet elektronů obsažených v malém rozptylujícím objemu dV , a vztah 2.7 přejde do tvaru

$$F(\mathbf{S}) = \int_V \rho(\mathbf{r}) e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} dV = \mathcal{F}[\rho(\mathbf{r})], \quad (2.8)$$

kde $\mathcal{F}[\cdot]$ je operátor Fourierovy transformace. Inverzní Fourierovou transformací lze tedy odvodit vztah pro funkci elektronové hustoty

$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} F_{hkl} e^{-2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{r}} = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} |F_{hkl}| e^{-2\pi i (\mathbf{h} \cdot \mathbf{r}) + i\alpha_{hkl}}, \quad (2.9)$$

kde $\mathbf{r} = (x, y, z)$ jsou souřadnice v základní buňce, V je objem základní buňky a $\mathbf{h} = (h, k, l)$ jsou indexy reflexí.

Ze vztahu 2.9 vyplývá, že pro výpočet elektronové hustoty $\rho(\mathbf{r})$ je třeba znát amplitudu a fázi každého strukturní faktoru F_{hkl} . Není ale experimentálně možné přímo změřit fázové úhly α_{hkl} strukturních faktorů. Při difrakčním experimentu jsou změřeny pouze intenzity rozptýleného rentgenového záření, které jsou úměrné kvadrátu absolutní hodnoty strukturní amplitudy $I_{hkl} \sim |F_{hkl}|^2$. Tím pádem nelze přímo z difrakčního experimentu určit strukturu proteinu. Tato závažná překážka ve strukturní analýze se nazývá *fázový problém* [9].

Prakticky celá rentgenová difrakční analýza je zaměřena na překonání tohoto problému a na zjištění chybějící fázové informace potřebné k vypočtení elektronové hustoty. V současnosti existuje několik metod pro výpočet těchto fází, např. metoda molekulárního nahrazení, metoda izomorfního nahrazení nebo metoda anomálního rozptylu [8].

2.5 Pattersonova funkce

Pattersonova funkce je definována jako inverzní Fourierova transformace kvadrátu absolutní hodnoty strukturního faktoru

$$P(\mathbf{u}) = \frac{1}{V^2} \sum_{\mathbf{h}} |F_{hkl}|^2 e^{-2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{u}}, \quad (2.10)$$

kde $\mathbf{u} = (u, v, w)$ jsou relativní souřadnice v Pattersonově mapě. Pattersonovu funkci lze tedy vypočítat pouze na základě znalosti intenzit $I(\mathbf{h}) \sim |F(\mathbf{h})|^2$ z difrakčního experimentu. Nicméně vzniká problém získání atomových souřadnic z této nové funkce.

Maxima Pattersonovy funkce odpovídají mapě polohových vektorů (relativních poloh) mezi každou dvojicí atomů ve struktuře. Hodnota funkce v těchto maximech je úměrná součinu atomových čísel daných atomů, což poskytuje výhodu pro detekci vektorů mezi těžkými atomy, tj. atomy s velkým počtem elektronů [8].

Alternativní definici Pattersonovy funkce lze zavést jako konvoluci elektronové hustoty samé se sebou

$$P(\mathbf{u}) = \rho(\mathbf{r}) * \rho(-\mathbf{r}) = \int_V \rho(\mathbf{r}) \rho(\mathbf{r} + \mathbf{u}) d\mathbf{r}, \quad (2.11)$$

kde V je objem základní buňky.

Z definic Pattersonovy funkce (2.10) a (2.11) vyplývá několik jejích vlastností

- Maxima Pattersonovy funkce jsou na pozicích meziatomových vektorů spojujících atomy v elementární buňce.
- Pattersonova funkce krystalu obsahujícího N atomů v elementární buňce bude mít N^2 maxim
- Periodicita Pattersonovy funkce je stejná jako funkce elektronové hustoty.

2.6 Molekulární nahrazení

Metoda molekulárního nahrazení je založena na použití známého molekulárního modelu k řešení neznámé krystalové struktury podobné molekuly. Molekulární nahrazení umožňuje řešení fázového problému poskytnutím počátečního odhadu fází neznámé

strukturu z již známé struktury, na rozdíl od dalších dvou metod řešení fázového problému (které využívají měření fází z izomorfních nebo anomálních rozdílů). Použití metody molekulárního nahrazení se stalo běžnější s rozšiřováním databáze známých struktur makromolekul (PDB databáze). Metoda molekulárního nahrazení se v současnosti používá k řešení až 70 % deponovaných makromolekulárních struktur [5]. Tato metoda je velmi rychlá a silně automatizovaná [2].

Princip této metody spočívá v umístění známé molekuly v různých orientacích a polohách do základní buňky krystalu zkoumané molekuly. Následně se zkoumá shoda předpovězené difrakce s pozorovanou difrakcí porovnáním Pattersonových funkcí a hledá se jejich maximální překryv. Určování modelové struktury se skládá ze dvou kroků - rotace a translace

$$\mathbf{x}' = \mathbf{C}\mathbf{x} + \mathbf{t}, \quad (2.12)$$

kde \mathbf{C} je rotační matice otáčející souřadnice \mathbf{x} do nové orientace \mathbf{x}' a \mathbf{t} je translační vektory.

Metoda molekulárního nahrazení je v současnosti implementována v tradičních programech (např. MOLREP [10] nebo Phaser [11]), ve kterých je vstupní známá molekula vkládána manuálně, nebo v moderních programech, které využívají vylepšené postupy pro vytváření modelů pro molekulární nahrazení (např. MorDa [12]).

2.6.1 Rotační funkce

Z vlastnosti Pattersonovy funkce vyplývá, že dvojici atomů ve stejné molekule v krystalové struktuře odpovídají Pattersonovy vektory soustředěné kolem počátku (self - Pattersonovy vektory). Určovaná a jí velmi podobná modelová molekula tak budou mít téměř identické Pattersonovy mapy v okolí počátku, lišit se budou jen v orientaci. Proto se jako první krok metody molekulárního nahrazení vypočítá shoda Pattersonových funkcí modelové a určované struktury v různých vzájemných orientacích.

Shoda Pattersonových funkcí určované a modelové struktury v závislosti na jejich vzájemné orientaci se zjišťuje z hodnoty rotační funkce $R(\mathbf{C})$

$$R(\mathbf{C}) = \int_U P_O(\mathbf{u})P_M(\mathbf{C}\mathbf{u})d\mathbf{u}, \quad (2.13)$$

kde U je objem Pattersonovy mapy, $P_O(\mathbf{u})$ je Pattersonova funkce vypočítaná z naměřených intenzit z difrakčního experimentu a $P_M(\mathbf{C}\mathbf{u})$ je Pattersonova funkce modelu s otočenými souřadnicemi. Při největším překrytí Pattersonových funkcí nabývá rotační funkce maxima, což odpovídá správné orientaci modelové struktury v určované struktuře [2].

2.6.2 Translační funkce

Pokud krystal obsahuje rotační operaci symetrie, pak Pattersonova funkce obsahuje i cross-Pattersonovy vektory, které odpovídají atomům různých molekul v symetrickém sdružení. Posun struktury tedy způsobí změnu cross-Pattersonových vektorů. Problém hledání správného posunu je tedy velmi podobný problému hledání správné orientace (viz. 2.6.1).

Protože se self-Pattersonovy vektory při změně polohy nemění, mohou být odečteny od Pattersonovy funkce vypočítané z naměřených intenzit z difrakčního experimentu i od Pattersonovy funkce modelu posunutého o vektor \mathbf{t} . Translační funkce $T(\mathbf{t})$ je tak dána vztahem

$$T(\mathbf{t}) = \int_U \left[P_O(\mathbf{u}) - \sum_{j=1}^N P_{jj}(\mathbf{u}) \right] \left[P_M(\mathbf{u}, \mathbf{t}) - \sum_{j=1}^N P_{jj}(\mathbf{u}) \right] d\mathbf{u}, \quad (2.14)$$

kde U je objem Pattersonovy mapy, $P_O(\mathbf{u})$ je Pattersonova funkce vypočítaná z naměřených intenzit z difrakčního experimentu, $P_M(\mathbf{u}, \mathbf{t})$ je Pattersonova funkce modelu s posunutými souřadnicemi, $P_{jj}(u)$ je Pattersonova funkce definovaná vztahem (2.11) a N je počet molekul v základní buňce [2].

2.6.3 Vyhodnocení vyřešení fázového problému

Po získání počátečních odhadů fází a určení prvních strukturních faktorů je interpretace vypočítané mapy elektronové hustoty nejkritičtější krokem při objasňování makromolekulární struktury z difrakčních dat. Shoda mezi vypočítanými a experimentálními strukturními faktory je monitorována např. pomocí R -faktoru mezi F_O a F_C [13]

$$R = \frac{\sum_{\mathbf{h}} \left| |F_O(\mathbf{h})| - k|F_C(\mathbf{h})| \right|}{\sum_{\mathbf{h}} |F_O(\mathbf{h})|}, \quad (2.15)$$

kde F_O je strukturní faktor vypočítaný z experimentu, F_C je strukturní faktor vypočítaný na základě strukturního modelu a k je škálovací faktor. Další indikátor shody může být např. Pearsonův korelační koeficient CC mezi F_O a F_C

$$CC = \frac{\sum_{\mathbf{h}} \left(|F_O(\mathbf{h})|^2 - \overline{|F_O(\mathbf{h})|^2} \right) \left(|F_C(\mathbf{h})|^2 - \overline{|F_C(\mathbf{h})|^2} \right)}{\sqrt{\sum_{\mathbf{h}} \left(|F_O(\mathbf{h})|^2 - \overline{|F_O(\mathbf{h})|^2} \right)^2 \sum_{\mathbf{h}} \left(|F_C(\mathbf{h})|^2 - \overline{|F_C(\mathbf{h})|^2} \right)^2}}. \quad (2.16)$$

S rostoucí shodou F_O a F_C hodnota R -faktoru klesá, zatímco hodnota Pearsonova korelačního koeficientu CC roste. Hodnota R -faktoru při úspěšném vyřešení fázového problému dosahuje hodnot až 0,5, přičemž hodnota R -faktoru náhodného strukturního modelu je 0,59 [14].

Obecně lze říct, že výsledným kritériem vyřešení fázového problému je výsledná podoba elektronové hustoty (elektronová hustota koresponduje se sekvencí proteinu) a úspěšnost upřesnění struktury.

2.7 Upřesňování struktury

První modely řešené struktury vytvořené na základě odhadnutých fází z kapitoly (2.6) často dávají pouze zlomek atomů z elementární buňky. Nicméně takto malý počet atomů obvykle obsahuje dostatečnou fázovou informaci k tomu, aby byly lokalizovány další atomy. Z tohoto prvotního modelu lze vypočítat elektronovou hustotu inverzní Fourierovou transformací strukturního faktoru podle vztahu (2.9) a sestavit model řešené struktury. Fáze takového modelu jsou často velmi nepřesné, je proto nutné strukturní model upřesnit.

Upřesňovanými parametry jsou souřadnice každého atomu v základní buňce (3 parametry) a jejich teplotní faktory (1 parametr pro izotropní nebo 6 parametrů pro anizotropní). Těmto parametrům odpovídají v recipročním prostoru absolutní hodnoty strukturního faktoru jednotlivých reflexí. Při upřesňování se řeší úloha definována absolutními hodnotami strukturního faktoru $|F_O(\mathbf{h})|$ získanými z difrakčního experimentu. Podmíněnost této úlohy je dána počtem neznámých parametrů (souřadnice atomů a jejich teplotní faktory) a počtem naměřených reflexí.

Upřesňování strukturního modelu probíhá buď v přímém nebo recipročním prostoru. Dvě nepoužívanější metody pro upřesňování v recipročním prostoru jsou metoda nejmenších čtverců a metoda největší pravděpodobnosti (Maximum Likelihood Method). V přímém prostoru se pak provádí nutné manuální úpravy strukturního modelu, např. v programu Coot [15].

Metoda nejmenších čtverců je založena na principu minimalizace funkce

$$Q = \sum_{\mathbf{h}} w_{\mathbf{h}} (|F_O(\mathbf{h})| - |F_C(\mathbf{h})|)^2, \quad (2.17)$$

kde $|F_O(\mathbf{h})|$ je fixní parametr pro tuto metodu, varírují se vypočítané hodnoty $|F_C(\mathbf{h})|$ a $w_{\mathbf{h}}$ je váhový faktor. Suma probíhá přes všechny naměřené reflexe. Metoda nejmenších čtverců je implementována např. v softwarovém balíčku SHELX [16].

Princip metody největší pravděpodobnosti je postaven na myšlence, že kvalita strukturního modelu je posuzována podle shody s naměřenými daty. Pokud je strukturní model ve shodě s pozorováním, pak - pokud by byl model správný - by byla vysoká shoda naměřených difrakčních dat s daným strukturním modelem. Úloha je tedy založena na principu minimalizace pravděpodobnostní funkce \mathcal{L}

$$\mathcal{L} = - \sum_{hkl} \log P(|F_O|; |F_C|), \quad (2.18)$$

kde $P(|F_O|; |F_C|)$ reprezentuje pravděpodobnost získání naměřeného strukturního faktoru $|F_O|$ podmíněného strukturním faktorem modelu $|F_C|$ [17]. Metoda největší prav-

děpodobnosti má menší tendenci konvergovat do lokálních minim a dokáže řešit špatně podmíněné úlohy lépe než metoda nejmenších čtverců. Tato metoda je implementována např. v programu REFMAC5 [18] nebo Phenix.refine [19].

Při upřesňování může dojít k ovlivnění fází kvůli slabé podmíněnosti (malý počet nezávislých reflexí k počtu neznámých parametrů), a metoda pak uvízne v lokálním minimu. Pro zajištění správného upřesňování se náhodně vybere 5–10 % pozorovaných reflexí, které tvoří testovací soubor reflexí. Zbytek reflexí pak tvoří pracovní soubor reflexí. Díky tomuto zavedení jsou oba soubory reflexí nekorelované a upřesňování se pak provádí pouze vůči pracovnímu souboru reflexí. Pro každý soubor reflexí tak vznikne vlastní R -faktor - R_{work} (odpovídající pracovnímu souboru reflexí) a R_{free} (odpovídající testovacímu souboru reflexí). Pokles R_{free} tedy značí, že upřesnění proběhlo úspěšně a úloha konverguje ke globálnímu minimu. Pokud nastane situace, že R_{work} klesá a zároveň R_{free} vzroste, pak proběhlo vylepšení modelu, ale úloha uvízla v lokálním minimu [20].

Kapitola 3

Experimentální přístroje a metody

3.1 Zdroje rentgenového záření

Zdroje rentgenového záření se obecně dělí na konvenční a synchrotronové. Při porovnávání zdrojů rentgenového záření se používá veličina briliance, která je definována jako počet vyzářených fotonů za sekundu jedním čtverečním milimetrem povrchu zdroje do prostorového úhlu jeden miliradián čtvereční v šířce spektrálního pásma o hodnotě 0,1 % střední vlnové délky [21]

$$[\text{briliance}] = \frac{\text{počet fotonů}}{\text{s} \cdot \text{mm}^2 \cdot \text{mrad}^2 \cdot 10^{-3} \bar{\lambda}}. \quad (3.1)$$

Pro difrakční experimenty je vhodné použít záření s co největší hodnotou briliance.

3.1.1 Konvenční zdroje

Do kategorie konvenčních zdrojů se řadí rentgenka, rotační rentgenka a zdroje s tekutou anodou [22]. Princip generování rentgenového záření je u těchto zařízení podobný, liší se však v odvodu tepla generovaného na anodě. Princip konvenčních zdrojů je založen na interakci elektronů generovaných rozžhavenou katodou s atomy anody. Mezi katodu a anodu je vložen rozdíl potenciálů řádově 10^4 V, které vytvoří napětí urychlující elektrony, které následně dopadají na anodu.

Po dopadu elektronů na atomy anody probíhají dvě interakce. Při první interakci dochází ke kolizi elektronů s atomy anody a uvolnění elektronů z jejich vnitřních energetických hladin. Toto místo pak obsadí elektron z vyšší energetické hladiny za vyzáření charakteristického záření. Spektrum charakteristického záření je důsledkem diskontinuálních energetických hladin v atomech a závisí na materiálu, ze kterého je anoda vyrobena. Při druhém mechanismu jsou elektrony v elektrickém poli jader anody zbrzdovány a energie elektronů se tedy neztratí najednou při jedné srážce, ale při více srážkách, což způsobí vznik spojitého spektra záření [6].

3.1.2 Synchrotronové zdroje

Synchrotronové záření se generuje na synchrotronu - kruhovém urychlovači elektronů nebo pozitronů. Synchrotronové záření vzniká při ohnutí dráhy nabitých částic pohybujících se rychlostí blízkou rychlosti světla uvnitř permanentních magnetů nebo elektromagnetů. V důsledku zakřivení dráhy částic a vlivem magnetického pole je vyzařováno elektromagnetické záření v tečném směru k trajektorii částic. Výhody synchrotronového záření jsou zejména vysoká briliance, polarizace (lineární v rovině orbitu, eliptická pod a nad touto rovinou), vysoká kolimace svazku (tj. malá divergence svazku) a možnost přizpůsobení vlnové délky svazku. Vlnová délka synchrotronového záření může být v infračervené až rentgenové oblasti spektra [21].

Nabitým částicím je nejdříve udělena počáteční rychlost v lineárním urychlovači, kde jejich kinetická energie dosáhne MeV hodnot. Částice pak vstupují do kruhového urychlovače („boosteru“), kde jsou urychleny na energie v řádu GeV, a nakonec jsou přesunuty do akumulárního prstence.

Akumulační prsteneček je složen z několika komponent - ohybových magnetů, které definují trajektorii částic. Mezi těmito magnety je dráha rovná a dochází na nich k emisi synchrotronového záření. Dále je akumulární prsteneček složen z kvadrupólových a hexapólových magnetů, které definují tvar a šířku svazku a speciálních vkládaných zařízení - undulátorů a wigglerů. Wiggler generuje silné magnetické pole a z relativistických důsledků je intenzita výsledného záření zesílena a dochází k posunutí vlnové délky k nižším hodnotám. Undulátor je zpravidla tvořen sérií permanentních magnetů a generuje slabší magnetické pole, tudíž příspěvky emitovaného záření na jednotlivých prvcích magnetického pole spolu koherentně interferují a jejich amplitudy se sčítají. Spektrum výsledného záření je tedy tvořeno ostrými a harmonicky umístěnými maximy [23].

Vygenerované synchrotronové záření je vyváděno speciální trubicí (tzv. „beamline“) na experimentální pracoviště, kde následně probíhají difrakční experimenty. Díky vysoké brilianci trvá naměření souboru dat z jednoho krystalu pár minut a reflexe mají větší intenzitu oproti záření generovaných z konvenčních zdrojů.

3.2 Detekce rentgenového záření

Zařízení pro detekci rentgenového záření prošla historicky celou řadou fyzikálních principů - od klasických fotografických filmů, fluorescenčních stínítek, proporcionálních detektorů, až po v současnosti nejvíce používané plošné polovodičové detektory typu CCD či CMOS [6].

Princip CCD detektorů je založený na fotoefektu. Fotony rozptýleného rentgenového záření dopadnou na fluorescenční stínítko, kde jsou transformovány na fotony viditelného záření. Fluorescenční záření je pak vedeno svazkem jednotlivých optických vláken na CCD čip, v němž dochází v důsledku fotoelektrického jevu k excitaci elektronů a akumulaci náboje úměrného počtu získaných fotonů. Na konci expozice, během níž se krystal otáčí o malý úhel $0,5^\circ$ až 3° , jsou akumulované elektrické náboje převedeny

na elektrický proud, který je zesílen a konvertován na digitální signál [24].

Na rozdíl od CCD čipů, kde je signál přenášen z pixelu na pixel a poté převeden na napětí, CMOS čipy transformují signál na napětí přímo uvnitř každého pixelu. Oproti CCD detektorům je každý pixel samostatný integrovaný obvod, kde odečtení, zesílení a konverze signálu probíhá paralelně. U CMOS dopadá rentgenové záření přes stínítko na pixely polovodiče a čítač rovnou počítá pulsy nad kritickou hodnotou napětí (proudu), které se vygeneruje. Polovodičové detektory typu CMOS mají velkou citlivost a velkou rychlost vyčítání [24].

3.3 Difrakční experiment

Krystaly makromolekul jsou oproti krystalům nízkomolekulárních látek problematictější na měření difrakčních dat. Krystaly makromolekul mají podstatně větší bázi (10-krát až 1000-krát více atomů než krystaly nízkomolekulárních látek), a tedy i jejich mřížkové parametry musí být větší. Reciproká mřížka krystalů makromolekul, která je závislá na parametrech mřížky přímé, je velmi hustě obsazena. Dalším problémem při měření reflexí u makromolekulárních krystalů tkví v tom, že část objemu krystalu tvoří kanály mezi molekulami vyplněné rozpouštědlem. Jelikož je rozpouštědlo oproti makromolekulám v krystalu neuspořádané, přispívá tím ke snížení intenzit reflexí a difuznímu rozptylu, který vede ke zvýšení pozadí na difrakčním snímku [2].

Pro měření dat z krystalů se používá monokrystalový difraktometr, který je složen ze zdroje rentgenového záření, goniometru, detektoru a dalších příslušenství - usměrňovače proudu par tekutého dusíku o teplotě 100-120 K, kolimátoru usměrňujícího svazek a lapače primárního svazku, který chrání detektor před primárním svazkem. Při difrakčním experimentu je krystal proteinu umístěn ve smyčce nebo síťce, která je magneticky uchycena ke goniometrické hlavičce. V laboratořích se uplatňují víceosé goniometry, na synchrotronech se používají jednoosé goniometry, u nichž je osa otáčení kolmá na primární svazek.

3.4 Zpracování difrakčních dat

Zpracování difrakčních snímků naměřených rotační metodou lze rozdělit do čtyř hlavních fází [25]:

- Hledání reflexí a jejich indexace
- Upřesňování parametrů
- Integrace (určení intenzit naměřených reflexí)
- Škálování dat a sloučení intenzit

Indexování se obvykle provádí pomocí automatizovaného postupu (tzv. „autoindexace“) a poskytuje orientaci krystalu, počáteční odhad mřížkových parametrů a také

odhad symetrie krystalové mřížky. Před zahájením automatického indexování musí být na difrakčních snímcích lokalizovány reflexe. U tohoto procesu je třeba zohlednit spoustu faktorů (pozadí na snímcích, intenzita reflexí proti intenzitě pozadí, tvar reflexí, počet pixelů pro každou reflexi).

Autoindexace poskytuje přibližnou sadu parametrů, která popisuje mřížkové parametry a geometrii difraktometru. Za předpokladu, že je symetrie zvolena správně, jsou chyby, které se objeví při následném zpracování, způsobeny nepřesnostmi v mechanickém nastavení (např. poloha paprsku, divergence rentgenového svazku, orientace os detektoru a krystalu). Pro upřesnění parametrů se používá metoda upřesňování poloh, která optimalizuje správnost pozorovaných a vypočítaných souřadnic reflexí na difrakčních snímcích nejčastěji metodou nejmenších čtverců.

Výpočet difrakčních intenzit se označuje jako „integrace“, protože je ekvivalentní výpočtu plochy nebo objemu pod křivkou. Výpočet intenzity reflexí je v podstatě jednoduchý proces - při absenci difrakčního pozadí lze sečíst hodnoty každého pixelu tvořícího reflexi na snímku. Problémy nastávají při lokalizaci reflexí, identifikaci pixelů náležejících dané reflexi a při odečtu pozadí.

Z různých fyzikálních důvodů (radiční poškození krystalu, nekonzistentně ozářený objem krystalu v důsledku precese, anizotropní pohlcování rentgenového záření atd.) nejsou data z integračního kroku rovnoměrná. Je třeba tato data seškálovat a následně sloučit. Při slučování se musí zohlednit dva aspekty - první je slučování parciálních reflexí, které tvoří jednu reflexi a které jsou rozloženy na po sobě jdoucích snímcích. Druhý aspekt je sloučení symetricky ekvivalentních reflexí u krystalových systémů s vyšší symetrií než je $P1$.

Ke zpracování difrakčních dat bylo vyvinuto několik specializovaných softwarů, které dokážou zpracovat data z různých detektorů. Tyto softwary mají v sobě zabudované automatické zpracovávání jednotlivých kroků, např. iMOSFLM [26], DIALS [27] nebo XDS (který provádí integraci i škálování) [28].

Jako indikátory kvality zpracovaných dat byla zavedeno mnoho statistik. Nejčastěji používanými statistikami v současnosti jsou R_{merge} , R_{meas} a I/σ_I , které jsou definovány vztahy [17]:

$$R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{\mathbf{h}} \sum_{i=1}^{N_{\mathbf{h}}} |I_{i,\mathbf{h}} - \bar{I}_{\mathbf{h}}|}{\sum_{\mathbf{h}} \sum_{i=1}^{N_{\mathbf{h}}} I_{i,\mathbf{h}}}, \quad (3.2)$$

$$R_{\text{meas}} = \frac{\sum_{\mathbf{h}} \sqrt{\frac{N_{\mathbf{h}}}{N_{\mathbf{h}}-1}} \sum_{i=1}^{N_{\mathbf{h}}} |I_{i,\mathbf{h}} - \bar{I}_{\mathbf{h}}|}{\sum_{\mathbf{h}} \sum_{i=1}^{N_{\mathbf{h}}} I_{i,\mathbf{h}}}, \quad (3.3)$$

$$I/\sigma_I = \frac{1}{N} \sum_{\mathbf{h}} \frac{|I_{\mathbf{h}}|}{\sigma(I_{\mathbf{h}})}, \quad (3.4)$$

kde N je počet naměřených reflexí, $N_{\mathbf{h}}$ je multiplicita reflexí roviny (h, k, l) , $I_{\mathbf{h}}$ je celková intenzita reflexe (h, k, l) , $I_{i,\mathbf{h}}$ je intenzita i -tého pozorování reflexe (h, k, l) , $\bar{I}_{\mathbf{h}}$ je

průměrná intenzita reflexe (h, k, l) a $\sigma(I_h)$ je rozptyl reflexe (h, k, l). Další důležitý indikátor kvality je Pearsonův korelační koeficient $CC_{1/2}$, který je definován pro dvě náhodně vybrané poloviny naměřených dat

$$CC_{1/2} = \frac{\sum_{i=1}^{N/2} (I_i - \bar{I})(J_i - \bar{J})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{N/2} (I_i - \bar{I})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^{N/2} (J_i - \bar{J})^2}}, \quad (3.5)$$

kde I_i a J_i jsou individuální intenzity reflexe a \bar{I} a \bar{J} je aritmetický průměr průměr první, resp. druhé poloviny naměřených intenzit.

3.5 Radiační poškození

Při dopadu rentgenového svazku na krystal může být záření rozptýleno periodicky uspořádanými elektrony atomů v krystalu nebo tyto atomy mohou být dopadajícími fotony ionizovány (fotoionizace). V případě fotoionizace se výsledné fotoelektrony solvatují a zahájí fotochemické procesy, které chemicky mění molekuly v krystalu. Solvatované elektrony mohou způsobit rozbití X-H (např. O-H) vazeb molekul, které následně vedou k tvorbě vysoce reaktivních látek (např. hydroxylové nebo volné radikály) [29].

Dopadající fotony rentgenového záření mají dostatek energie k fotoionizaci atomů v krystalu a jeho následné degradaci. Degradaci krystalu lze monitorovat například periodickým měřením referenčních difrakčních intenzit, které v čase klesají. Tento útlum je způsoben radiačním poškozením a závisí na toku a energii dopadajícího záření. Ke snížení vlivu volných radikálů se krystaly mrazí. Krystaly před zmrazením musí být kryoprotekovány, aby při mražení nedošlo k mechanickému poškození krystalu [30].

3.6 Studium strukturních změn v proteinech

Ozáření proteinového krystalu rentgenovým zářením vede k radiačnímu poškození, které vyvolává strukturní změny v proteinu. Protein je během sběru dat postupně degradován a výsledný 3D model může být velmi odlišný od nativní struktury. Informace o strukturních změnách v proteinu lze dosáhnout např. modifikací standardních rentgenových metod pro sběr dat (strategie sběru dat z více krystalů), sériovou synchrotronovou krystalografií nebo spektroskopii s časovým rozlišením na XFEL (X-Ray Free-Electron Laser - laserové zařízení pro volné elektrony [31]) [29].

Strategie sběru dat z více krystalů je založena na sérii difrakčních experimentů provedených na více krystalech. Výsledné datové sady se poté spojí a získají se kompletní datové sady. Každá datová sada koresponduje se skoro konstantní hodnotou absorbovaného rentgenového záření. Je tedy možné vytvořit 3D model proteinu pro různé úrovně reakcí vyvolaných radiačním poškozením. V kombinaci se spektroskopií je pak možné přiřadit oxidační stav každému modelu [29].

Sériové experimenty na synchrotronech se dají provést v různých uspořádáních, které se liší především způsobem dodání krystalů do svazku rentgenového záření. Datové sady mohou být měřeny na mikrofokálních rentgenových zdrojích za použití stovek mikrokystalů uchycených ve standardních smyčkách nebo mřížkách, nebo za použití tisíců krystalů, které jsou do svazku dodávány pomocí vstřikovačů, mikrofluidních systémů nebo speciálních pohyblivých pásek. Z každého krystalu pak vznikne pouze jeden difrakční snímek. V současnosti lze takto docílit časového rozlišení v řádech ms [32].

3.7 Krystalizace proteinů

Makromolekulární krystalizace je experimentální proces založený na hledání rozsahů jednotlivých chemicko-fyzikálních parametrů, které ovlivňují nukleaci krystalů a následný růst krystalů. V současnosti neexistuje ustálená teorie, která by předpověděla, za jakých podmínek se budou krystaly makromolekul tvořit. Proces krystalizace makromolekul je komplikován jejich strukturní komplexností a velkým počtem chemicko-fyzikálních parametrů, jako jsou teplota, pH, přítomnost fyzikálních polí, složení rozpouštědla a dalšími, které mohou krystalizaci ovlivnit.

Princip krystalizace spočívá ve vytvoření přesyceného stavu v roztoku. Přesycení je nerovnovážný stav, kdy se část proteinu nachází nad hranicí rozpustnosti. Tento stav poskytuje termodynamickou hnací sílu pro vytvoření krystalizačních jader. Přesyceného stavu se dá dosáhnout změnou určitých parametrů roztoku, např. změnou koncentrace proteinu či rozpouštědla, přidáním aditiv a dalších. Následný růst krystalu probíhá difuzí molekul proteinu na povrch jádra a jejich strukturovaným uspořádáním. K ukončení růstu dojde při nastolení rovnováhy mezi volnými molekulami proteinu v roztoku a molekulami proteinu v krystalu [33].

3.7.1 Metoda difuze par

Nejnámější technika pro krystalizaci makromolekul je metoda založena na difuzi par. Tato metoda využívá vypařování a difuzi těkavých látek krystalizační podmínky mezi rezervoárem, který obsahuje pufr, precipitant a další látky pomáhající krystalizaci, a kapkou, která obsahuje roztok rezervoáru naředěný roztokem proteinu. Podle uspořádání se tato metoda dělí na metodu visící kapky, sedící kapky nebo sendvičové kapky.

Při konfiguraci v podobě visící kapky je kapka obvykle o objemu 0,5 – 10 μl nanesena na krycí sklíčko, kterým se překryje jamka obsahující rezervoár o násobně vyšším objemu 0,5 - 1,0 ml. Z důvodu zachování termodynamické rovnováhy difunduje voda z kapky do rezervoáru. Tento proces způsobí vytvoření přesyceného stavu v kapce a probíhá do vyrovnání koncentrace složek v kapce a rezervoáru [34].

3.7.2 Krystalizace pod olejem

Méně používaná technika krystalizace pod olejem je založena na okamžitém vytvoření přesyceného stavu smícháním proteinu a precipitačního roztoku. Do jamky je nasazena kapka parafrinového oleje o objemu 5 - 10 μl , pod kterou je následně napipetován krystalizační roztok o objemu 0,5 - 1 μl . Parafrinový olej částečně zabraňuje vypařování roztoku. Díky okamžitému vytvoření přesyceného stavu nastává ekvilibrace roztoku velmi rychle, což ovlivňuje rychlost a i výslednou kvalitu krystalu [33].

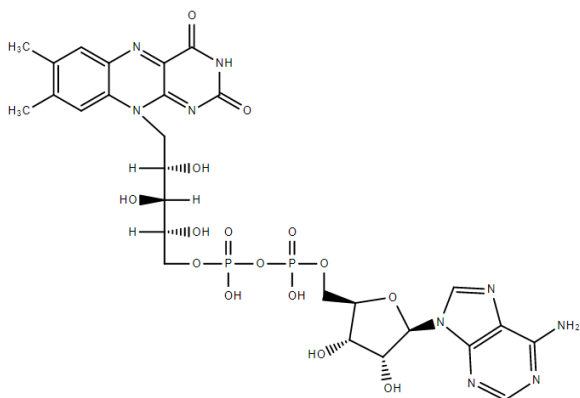
Kapitola 4

FAD-dependentní proteiny

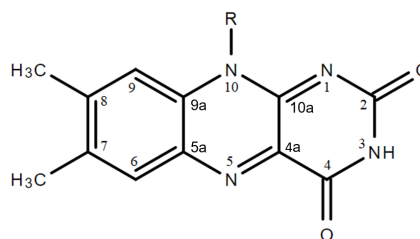
4.1 Flaviny

Oxidoreduktázy jsou enzymy, které katalyzují přenos elektronů a protonů z jedné molekuly (reduktant, elektronový donor) na jinou molekulu (oxidant, elektronový akceptor). Oxidoreduktázy většinou využívají při redoxní reakci kofaktor, neboli nízkomolekulární látku nezbytnou pro funkci daného proteinu např. FAD v redoxní reakci [35].

Flaviny patří k nejdůležitějším kofaktorům v enzymatických reakcích. Flavinadeninmononukleotid (FMN) a flavinadenindinukleotid (FAD, Obrázek 4.1) jsou nejčastěji se vyskytující flaviny ve flavoproteinech. Základ FAD tvoří heterocyklická isoalloxazinová struktura (Obrázek 4.2) připojená k ribitolu, dvěma fosfátům, ribóze a adeninu. Flavin může mít tři různé redoxní stavy: oxidovaná forma, jedno-elektronový redukovaný radikální semichinon a dvou-elektronový plně redukovaný hydrochinon [1].



Obrázek 4.1: Molekula flavinadenindinukleotidu



Obrázek 4.2: Struktura isoalloxazinového kruhu

4.2 Strukturně spektroskopické studie FAD ve flavoproteinech

Flavoproteiny jsou třída proteinů, obsahující FAD nebo FMN, který je kovalentně či nekovalentně navázaný. FAD se podílí na enzymatické reakci proteinu, při které přechází z oxidovaného stavu přijmutím dvou e^- a dvou H^+ do redukovaného stavu ($FADH_2$) a jejich odevzdáním zpět do oxidovaného stavu [36].

Přechod mezi oběma stavy je doprovázen prostorovou změnou struktury, konkrétně ohybem isoalloxazinu. V oxidovaném stavu je isoalloxazin planární, v redukovaném dochází k prostorovému ohybu isoalloxazinu podél osy procházející atomy N^5 a N^{10} (Obrázek 4.2). Dále je přechod mezi stavy doprovázen změnou schopnosti absorbovat vlnové délky v oblasti modrého a fialového světla (350 až 500 nm). Absorpční spektrum pro oxidovaný stav má dvě typická maxima kolem 380-390 nm a 460 nm [37].

Oxidovaný stav FAD ve flavoproteinech lze fotoredukovat na aniontový radikál FAD^{*-} prostřednictvím intraproteinového elektronového přesunu ze sousedních aromatických skupin (tryptofan nebo tyrosin) v řádech stovek femtosekund až několika pikosekund. Bez přítomných aromatických reziduí má excitovaný FAD dobu života několik nanosekund a v roztoku vykazuje excitovaný FAD intramolekulární elektronový přesun v řádu jednotek pikosekund. Na druhou stranu, excitované stavy plně redukovaných flavinů v roztoku vykazují dynamiku v řádu pikosekund, zatímco ve flavoproteinech mají dobu života několik nanosekund.

Dynamika excitovaných stavů flavinů přímo koreluje s flexibilitou isoalloxazinového kruhu. V planární konfiguraci má oxidační stav flavinu nanosekundovou dobu života, zatímco v ohnuté konfiguraci má redukovaný stav flavinu dobu života v řádech stovek pikosekund. Enzymy využívají konfiguraci flavinových kofaktorů k dosažení různých biologických funkcí [39].

Flavoproteiny se dělí do několika strukturně odlišných nadrodin. Jednou z nich je nadrodina glukóz-metanol-cholinových oxidoreduktáz, které působí na primární a sekundární alkoholy, karbohydráty a steroly. Mezi ně patří např. glukóza oxidáza nebo cholesterol oxidáza, které se používají pro stanovení hladiny glukózy a cholesterolu v krvi. Díky své jednoduché aktivaci jsou tyto enzymy vhodné pro průmyslové aplikace - od biokatalyzátorů pro syntézu farmaceutických léčiv po integraci v biosenzorech [38].

4.3 Flavin-dependentní oxidoreduktáza z *Chaetomium thermophilum*

Chaetomium thermophilum je termofilní vláknitá houba, která byla nalezena v kompostu, hnoji nebo v půdě, kde se podílí na degradaci celulózy. Optimální teplota pro její růst je 45-55 °C, toleruje ale i teploty do 60 °C, a proto se řadí do úzké skupiny eukaryot s vysokou tepelnou tolerancí. Teplotně stabilní proteiny z této houby mají velký potenciál pro využití v průmyslu a biotechnologických procesech, které vyžadují práci při vyšších teplotách [40].

FAD-dependentní oxidoreduktáza z *Chaetomium thermophilum* (dále *ChtFDO*) je tvořena řetězcem 595 aminokyselin s relativní molekulovou hmotností 85 kDa¹, z čehož 17,5 kDa tvoří oligosacharidy. *ChtFDO* má 7 glykosylačních míst (místa s navázaným oligosacharidovým řetězcem) a nekovalentně vázaný kofaktor FAD (Obrázky 4.3 a 4.4). *ChtFDO* patří do nadrodiny glukóz-metanol-cholin oxidoreduktáz (GMC oxidoreduktáz), jejíž enzymy obvykle katalyzují oxidaci primárních a sekundárních alkoholů, cukrů a sterolů a následnou redukci nejčastěji kyslíku na peroxid vodíku. Během této katalytické reakce je FAD redukován přijmutím elektronů a protonů ze substrátu a oxidován zpět po jejich odevzdání molekule kyslíku [37].

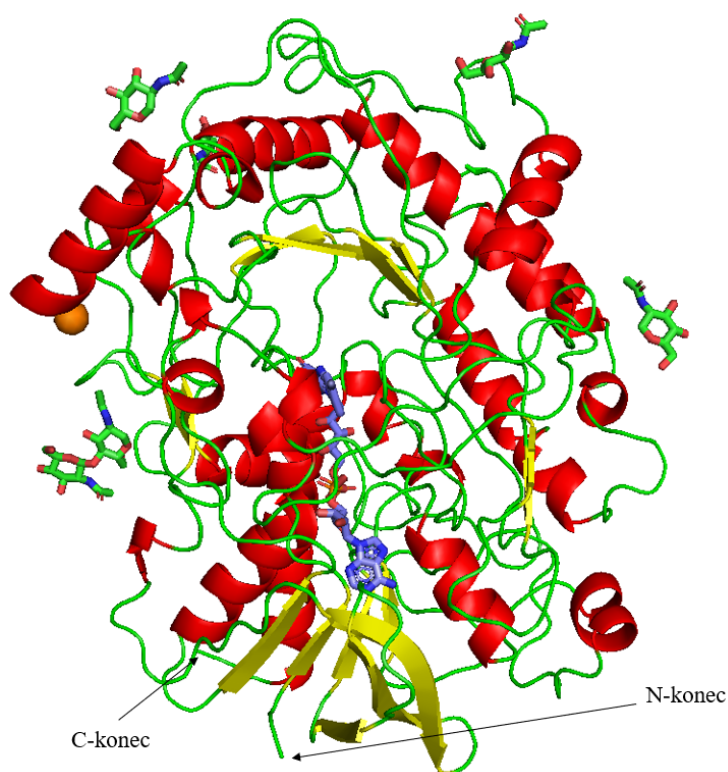
Aktivní místo *ChtFDO* se nachází uvnitř poměrně rozsáhlé kapsy a je tvořeno Asn562-His564, Ala133, Ser607, Tyr476 a isoalloxazinovým kruhem. His564 je pravděpodobně katalytickou bází, která zahajuje katalytickou reakci odebráním prvního protonu substrátu. Ostatní aminokyseliny aktivního místa se pravděpodobně účastní vazby a stabilizace substrátu. Tyto aminokyseliny ve struktuře *ChtFDO* (PDB kód: 6ZE2 [37]) mezi sebou vážou molekulu vody.

His564 spolu s Ser607 tvoří tzv. His-Ser pár. Ser607 byl ve všech známých strukturách *ChtFDO* modelován buď ve dvou alternativních konformacích označovaných jako „in“ (do kapsy, do aktivního místa) a „out“ (ven z aktivního místa), nebo v jedné konformaci „out“. Samotná konformace „in“ pozorována nebyla.

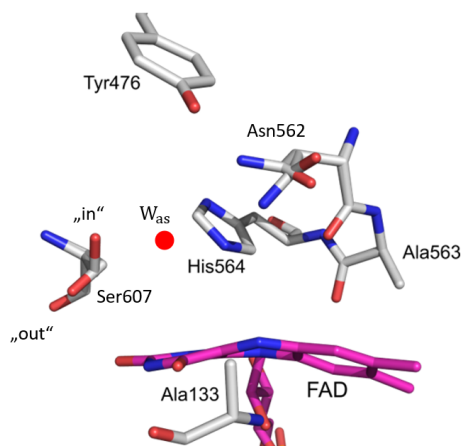
Kapsa s aktivním místem v *ChtFDO* je dále rozšířena směrem za Ser607 a pyrimidinovou část isoalloxazinu do boční kapsy. Tato kapsa ve strukturách *ChtFDO* váže molekulu vody, kyselinu mravenčí, nebo malé aromatické látky.

FAD byl ve všech strukturách *ChtFDO* pozorován ohnutý kolem osy procházející atomy FAD-N⁵ a FAD-N¹⁰. Všechna difrakční data pro tyto struktury byla měřena se 100 % transmisí a spektrofotometricky bylo prokázáno, že stav FAD v těchto strukturách odpovídá redukovanému stavu. Planárního stavu FAD se nepodařilo dosáhnout [37].

¹Dalton, atomová hmotnostní konstanta, která činí 1/12 klidové hmotnosti atomu C₆¹², 1 Da = 1,66×10⁻²⁷ kg



Obrázek 4.3: Struktura molekuly *ChtFDO* (PDB: 6ZE2 [37]) v zobrazení sekundární struktury. Červeně jsou znázorněny α -šroubovice, žlutě β -skládané listy. FAD kofaktor (uhlík fialově) a navázané sacharidy (uhlík zeleně) jsou zobrazeny v tyčinkové reprezentaci. Ion hořčíku (oranžově) je v kulové reprezentaci. Obrázek byl vytvořen pomocí softwaru PyMOL [41].



Obrázek 4.4: Aktivní místo molekuly *ChtFDO* (PDB: 6ZE2 [37]). Aktivní místo obsahuje aminokyselinový pár His – Ser (His564 a Ser607) s dvěma různými konformacemi Ser607 „in“ a „out“. Červenou tečkou je znázorněna voda W_{as} , která se váže v aktivním místě a označuje pravděpodobné místo oxidace substrátu. Obrázek byl vytvořen pomocí softwaru PyMOL [41].

Kapitola 5

Cíle

- Analýza vlivu redukčních činidel v roztoku vybraného flavoproteinu
- Vypěstování monokrystalů vhodných pro rentgenovou difrakční analýzu
- Sběr difrakčních dat z krystalů máčených ve vybraném redukčním činidle a z krystalů exponovaných nízké dávce rentgenového záření
- Zpracování difrakčních dat, vygenerování map elektronových hustot a analýza změny stavu flavinu

Část II

Experimentální část

Kapitola 6

Materiály a metody

6.1 Příprava vzorku *Cht*FDO pro krystalizaci

Endoglykosydáza F1 (Endo F1) štěpící mezi dvěma *N*-acetyl-D-glukosaminovými (GlcNAc) skupinami byla použita k rozštěpení polysacharidových řetězců v *Cht*FDO. Reakční směs byla připravena podle instrukcí uvedených na webových stránkách firmy Sigma-Aldrich. Směs byla inkubována po dobu 2 hodin ve 37 °C a přes noc ve 4 °C. Deglykosylovaný vzorek byl koncentrován v zásobním pufru (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl) na 9,2 mg/ml za použití centrifugačního filtru Nanosep 10K s mezní hodnotou molekulární hmotnosti 10 kDa (Pall Corporation).

Úspěšnost deglykosylace byla kontrolována pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS PAGE). Pro analýzu byl použit komerčně dodávaný polyakrylamidový gel (NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris gel (ThermoFisher Scientific)) a marker Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11–245 kDa) (New England Biolabs). Ke vzorkům (4 µg) byl přidán 2,5 µl LDS Sample buffer (ThermoFisher Scientific) a destilovaná voda do celkového objemu 12 µl. Vzorky byly následně denaturovány 5 minut v 95 °C a poté napipetovány do jednotlivých drah gelu. Elektroforetická separace probíhala 35 minut při konstantním napětí 200 V. Gel byl barven barvivem Instant blue (Expedeon).

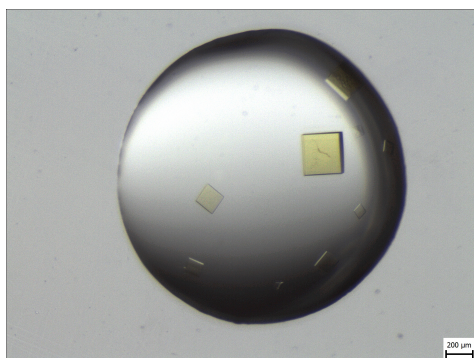
6.2 Testování redukčních činidel

Měření UV-Vis spekter proběhlo na spektrofotometru DeNovix DS-11. Byl použit deglykosylovaný vzorek *Cht*FDO o objemu 1,2 µl a koncentraci 7,4 mg/ml v pufru 25 mM Tris-HCl pH 7,5 a 100 mM NaCl. Měření proběhlo při pokojové teplotě a od výsledného spektra bylo odečteno spektrum pufru. Stav FAD byl měřen v přítomnosti čtyř redukčních činidel - 1 mM dithioničitan sodný (DTN), 1 mM dithiotreitol (DTT), 1 mM tris-(2-karboxyethyl)-fosfin hydrochlorid (TCEP) a 1 mM kyselina askorbová.

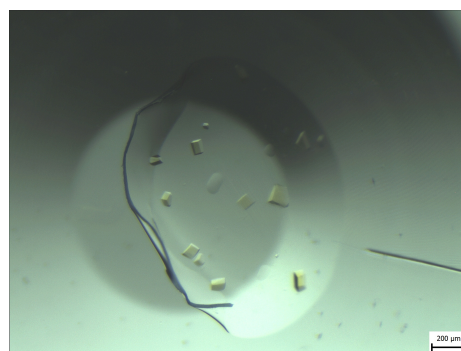
6.3 Krystalizace *ChtFDO*

Pro krystalizaci byl použit vzorek *ChtFDO* deglykosylovaný pomocí Endo F1. Pro difrakční experiment bylo připraveno celkem 19 krystalů získaných dvěma metodami - metodou visící kapky a krystalizací pod olejem (Obr. 6.1 a 6.2). Pro krystalizaci byla použita optimalizovaná krystalizační podmínka uvedená v [37]. Všechny krystalizační experimenty obsahovaly protein *ChtFDO* o koncentraci 9,2 mg/ml. Krystaly rostly v roztocích obsahujících 0,15-0,16 M mravenčan hořečnatý, 0,1 M octan sodný pH 5,5 a 7,5-15 % (w/v)¹ polyethylenglykol (dále PEG) 5000. Složení krystalizačních podmínek je uvedeno v Tabulce 6.1.

Krystaly rostly při teplotě 20 a 25 °C v rozmezí 7 dní až 12 měsíců v závislosti na zvolené metodě krystalizace. Před mrazením bylo 5 krystalů redukováno redukčním činidlem DTN. Ostatní krystaly byly máčeny v roztocích s různými kryoprotektanty (glycerol, chlorid sodný, perfluoropolyetherový olej a parafínový olej). Kryoprotektanty u vybraných krystalů jsou uvedeny v Tabulce 6.2.



Obrázek 6.1: Krystaly *ChtFDO* ve tvaru kvádrů vypěstované v podmínce 0,15 M mravenčan hořečnatý, 0,1 M octan sodný pH 5,5, 13,5 % (w/v) PEG 5000, protein o koncentraci 9,2 mg/ml. Krystaly vyrostly v uspořádání visící kapky. Úsečka odpovídá délce 200 μm .



Obrázek 6.2: Krystaly *ChtFDO* ve tvaru kvádrů vypěstované v podmínce 0,15 M mravenčan hořečnatý, 0,1 M octan sodný pH 5,5, 15 % (w/v) PEG 5000, protein o koncentraci 9,2 mg/ml. Krystaly vyrostly v uspořádání krystalizace pod olejem. Úsečka odpovídá délce 200 μm .

6.4 Difrakční experiment

Difrakční experimenty s krystaly *ChtFDO* byly provedeny se vzdáleným přístupem na zdroji synchrotronového záření (BESSY II, Helmholtz-Zentrum Berlin, Německo) s detektorem PILATUS 6M (Dectris). Teplota dusíkových par proudících na krystal byla 100 K, vlnová délka použitého záření byla 0,0918 nm. Kvalita krystalů byla nejdříve otestována pořízením dvou testovacích snímků s hodnotou ω lišící se o 90° se 100 % transmisí

¹w/v z anglického weight per volume - podíl hmotnosti rozpuštěné látky a objemu vzniklého roztoku

Tabulka 6.1: Krystalizační podmínky krystalů *ChfFDO*, na kterých byly naměřené vybrané datové sady.

	lowDose_10T	redState_DTN	lowDose_20T	lowDose_5T	lowDose_1T
Sůl	0,15 M	0,16 M	0,15 M	0,15 M	0,15 M
	mravenčan hořečnatý				
Pufr	0,1 M octan sodný pH 5,5				
Precipitant	9 % (w/v)	17 % (w/v)	7,5 % (w/v)	15 % (w/v)	9 % (w/v)
	PEG 5000				
Protein	9,2 mg/ml deglykosylovaný <i>ChfFDO</i>				

rentgenového svazku a expozicí 1 s na snímek. Následně proběhl sběr celé datové sady standardní rotační metodou. Strategie sběru dat byla navržena za pomoci programu iMOSFLM [26] (Tabulka 6.2).

U krystalu redukovaného redukčním činidlem byla transmise svazku 100 % (datová sada redState_DTN), neredukované krystaly byly měřeny s transmisí svazku od 1 % do 20 % (lowDose_1T až lowDose_20T). U jednoho krystalu byla difrakce měřena dvakrát - nejprve se naměřila datová sada s 10 % transmisí svazku ve středu krystalu, následně byl krystal přecentrován a byla naměřena druhá datová sada s 1 % transmisí svazku v okraji krystalu. Celkově se podařilo naměřit difrakční data u sedmi krystalů, tedy 8 sad difrakčních dat.

Tabulka 6.2: Parametry difrakčních experimentů vybraných datových sad. Datová sada označená hvězdičkou byla použita jako referenční.

Název datové sady	*lowDose_10T	redState_DTN	lowDose_20T	lowDose_5T	lowDose_1T
Transmise primárního svazku [%]	10	100	20	5	1
Redukční činidlo	-	DTN	-	-	-
Kryoprotektant	20 % glycerol	parafinový olej	2,5 M NaCl	2,5 M NaCl	20 % glycerol
Doba máčení [s]	120	30	120	120	120
Oscilační úhel [°]	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1
Expozice na snímek [s]	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Expozice na stupeň [s]	1,0	0,5	0,5	0,5	1,0
Počet snímků	7200	1800	3600	3600	7200
Vzdálenost krystal-detektor [mm]	423,79	373,30	373,32	347,66	423,79

6.5 Zpracování difrakčních dat a upřesňování strukturálních modelů

Pro zpracování difrakčních dat, upřesňování strukturálních modelů a vyhodnocování změn ve strukturách *ChfFDO* byla zvolena následující strategie:

- Výběr referenční datové sady pro vytvoření referenční struktury, ve které se upřesní zásadní detaily (namodelování vod, *N*-acetyl-D-glucosaminů (GlcNAc) a iontu hořčíku do diferenčních maxim mapy elektronové hustoty $mF_o - DF_c$)

- Výpočet diferenčních map pro vybrané datové sady (celá sada - 360°) a upřesnění zásadních detailů do úrovně 4σ v mF_o-DF_c diferenční mapě
- Vytvoření částečných datových sad s celkovým rozsahem ω od 90° po 150° pro analýzu změn na molekule FAD v závislosti na dávce záření
- Namodelování molekul FADH₂ do aktivního místa a upřesnění modelů bez a s namodelovanými molekulami FADH₂ vůči částečným datovým sadám
- Vygenerování výsledných map elektronové hustoty pro analýzu ohybu isoalloxazinu, porovnání map elektronových hustot v aktivním místě a geometrie molekuly FAD s předchozími výsledky

Při difrakčním experimentu bylo naměřeno celkově osm datových sad. Pro analýzu oxidačních stavů byly vybrány čtyři datové sady (redState_DTN, lowDose_20T, lowDose_5T, lowDose_1T) a jedna referenční datová sada (lowDose_10T).

Vybrané datové sady (Tabulka 6.2) byly zpracovány pomocí programů XDS [28] a AIMLESS [43]. Proces indexace, integrace a škálování naměřených reflexí proběhl bez problémů u všech vybraných datových sad (Tabulka A.2). Pro upřesnění souřadnic atomů a jejich B -faktorů vůči datům byl použitý software REFMAC5 [18]. Modelování jednotlivých molekul a iontů proběhlo manuálně v programu Coot [15].

6.5.1 Vytvoření referenčního modelu

Po zpracování prvních 3600 snímků (odpovídajících rotaci krystalu o 360°) datové sady lowDose_10T v programech XDS [28] a AIMLESS (statistiky zpracování uvedené v Tabulce A.1) [43] bylo vyloučeno prvních 20 snímků, na kterých byla hodnota R_{merge} vysoká. Pro sestavení prvotního modelu byla použita metoda molekulárního nahrazení (implementovaná v softwaru MOLREP [10] z programového balíku CCP4 [44]) se strukturou *ChfFDO* (PDB kód: 6ZE2 [37]). Finální hodnota parametru úspěšnosti molekulárního nahrazení Contrast (vypočítaného na základě poměru nejlepší a průměrné skórovací funkce, která je součinem korelačního koeficientu a překryvové funkce) byla 55,62, což znamená úspěšný průběh molekulárního nahrazení.

Vytvořený prvotní model byl dále upřesněn vůči naměřeným difrakčním datům, mF_o-DF_c diferenční mapa byla interpretována do hodnoty 4σ . Nebyly modelovány alternativy vedlejších řetězců aminokyselin, molekula FAD a ani jiné možné ligandy v aktivním místě. Statistiky z upřesňování modelu do stavu pro vyhodnocení změn na kofaktoru jsou uvedeny v Tabulce A.2. Do referenčního modelu bylo namodelováno 5 molekul *N*-acetyl-D-glucosaminu (GlcNAc), 299 molekul vod a jeden iont hořčíku.

6.5.2 Struktury pro analýzu změn na FAD

U všech datových sad vybraných pro analýzu oxidačních stavů byl zpracován počet snímků odpovídající rotaci krystalu o 360°. Difrakční limit pro jednotlivé sady byl zvolen tak, aby celková kompletnost byla větší než 90 %. Statistiky zpracování jsou uvedené

v Tabulce A.1. Pro jednotlivé datové sady, kromě datové sady lowDose_20T, byl jako vstupní model pro upřesňování souřadnic atomů a jejich B -faktorů použit referenční model (lowDose_10T). U datové sady lowDose_20T bylo provedeno molekulární nahrazení s referenčním modelem lowDose_10T, neboť vzorek *Chf*FDO vykrytalizoval v jiné grupě, než v ostatních případech.

Všechny takto upřesněné modely byly manuálně upraveny pomocí programu Coot [15] a mF_o-DF_c diferenční mapy byly interpretovány do hodnoty 4σ . U datasetů s nižším rozlišením byly odstraněny převážně molekuly vody. Naopak při vyšším rozlišení se objevila nová maxima v mapě elektronové hustoty a byly přidány molekuly vod nebo molekuly GlcNAc.

Pro analýzu změn v závislosti na dávce záření byly vytvořeny a zpracovány částečné datové sady, které reprezentovaly počáteční difrakční snímky s rozsahem ω od 90° po 150° . Všechny částečné datové sady byly zpracovány s celkovou kompletností dat od 91,1 do 99,2 % a hodnot korelačních koeficientů $CC_{1/2}$ od 0,438 do 0,508 ve slupce s nejvyšším rozlišením. Výběr difrakčních snímků a nastavení difrakčního limitu pro částečné datové sady byl proveden v programu AIMLESS [43]. Statistiky ze zpracování dat jsou uvedeny v Tabulce A.2.

Do upřesněných modelů vůči částečným datovým sadám byla namodelována do aktivního místa molekula FADH₂ popř. další ligandy a vody. Modely bez a s namodelovanou molekulou FADH₂, ligandy a vodami v aktivním místě byly upřesněny vůči částečným datovým sadám resp. vůči datové sadě redState_DTN. Pro molekulu FADH₂ byla vygenerována stereochemická data v programu AceDRG (povolen ohyb rovin isoalloxazinových kruhů okolo přímky dané atomy N⁵ a N¹⁰) [45]. Počet upřesňovacích cyklů v programu REFMAC5 byl nastaven na 30. Při této hodnotě cyklů hodnoty R -faktorů u všech modelů zkonvergovaly. Statistiky z upřesňování modelu do stavu pro vyhodnocení změn na kofaktoru jsou uvedeny v Tabulce 6.3.

6.5.2.1 Datová sada redState_DTN

U datové sady redState_DTN nebylo nutné vytvářet částečnou datovou sadu, neboť byly analyzovány změny způsobené chemickou redukcí. Difrakční limit datové sady byl $2,25 \text{ \AA}^2$. Z upřesňovaného modelu byly odstraněny molekuly vody, pro které nebyla pozorována elektronová hustota. Výsledný model obsahuje 5 molekul GlcNAc, 174 molekul vody a iont hořčíku. Do aktivního místa byla namodelována molekula FADH₂, molekula kyseliny mravenčí (FMT) a dvě molekuly vody.

6.5.2.2 Datová sada lowDose_20T

Pro vytvoření modelu vůči datové sadě lowDose_20T byla použita metoda molekulárního nahrazení (v programu MOLREP [10]) s referenčním modelem lowDose_10T kvůli jiné prostorové grupě, ve které protein *Chf*FDO vykrytalizoval. Finální hodnota parametru úspěšnosti Contrast byla 56,67, což znamená úspěšný průběh molekulárního

²Ångström, jednotka délky, $1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$

nahrazení. Difrakční limit datové sady byl 1,63 Å. V asymetrické jednotce byly namodelovány 2 molekuly *Chl*FDO. Následně byla interpretována mF_o-DF_c diferenční mapa do hodnoty 4σ jako u referenčního modelu. Výsledný model obsahuje 12 molekul GlcNAc, 1 438 molekul vody a iont hořčíku. Do obou aktivních míst byla namodelována molekula FADH₂, molekula kyseliny mravenčí (FMT) a dvě molekuly vody.

6.5.2.3 Datová sada lowDose_5T

Celková kompletnost datové sady lowDose_5T je nižší než 90 %, což je způsobeno vynecháním intenzivních difrakčních kruhů, které vznikly práškovou difrakcí na krystalech ledu. Difrakční limit datové sady byl 2,04 Å. Nově pozorovaná maxima v mapě elektronové hustoty byla interpretována na úrovni 4σ . Výsledný model obsahuje 5 molekul GlcNAc, 330 molekul vody a iont hořčíku. Do aktivního místa byla namodelována molekula FADH₂, molekula FMT a molekula vody.

6.5.2.4 Datová sada lowDose_1T

Nízká hodnota korelačního koeficientu $CC_{1/2}$ ve slupce s nejvyšším rozlišením datové sady lowDose_1T je způsobena nízkou transmisí svazku, která způsobila vysoký počet reflexí na difrakčních snímcích o malé intenzitě. Tato datová sada je měřena ze stejného krystalu, jako referenční datová sada lowDose_10T, která byla měřena první, následně byl krystal přecentrován a byla naměřena datová sada lowDose_1T. Difrakční limit datové sady byl 2,60 Å. Výsledný model obsahuje 5 molekul GlcNAc, 55 molekul vody a iont hořčíku. Do aktivního místa byla namodelována molekula FADH₂ a molekula vody.

Tabulka 6.3: Statistiky z upřesňování modelů na jednotlivých částečných datových sadách (90-150°) a na celé datové sadě v případě redState_DTN do stavu pro vyhodnocení změn na kofaktoru.

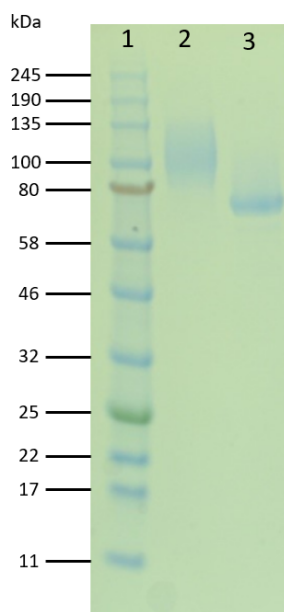
	redState_DTN		lowDose_20T		lowDose_5T		lowDose_1T	
	s FAD	bez FAD	s FAD	bez FAD	s FAD	bez FAD	s FAD	bez FAD
R_{work}	0,214	0,229	0,178	0,190	0,185	0,192	0,195	0,204
R_{free} (5 % reflexí)	0,285	0,289	0,205	0,217	0,236	0,240	0,313	0,333
Střední kvadratická odchylna od ideální vazebné délky [Å]	0,013	0,007	0,010	0,010	0,013	0,013	0,012	0,012
Střední kvadratická odchylna od ideálního vazebného úhlu [°]	1,981	1,554	1,622	1,629	1,939	1,929	2,110	2,116

Kapitola 7

Výsledky a diskuze

7.1 Deglykosylace vzorku

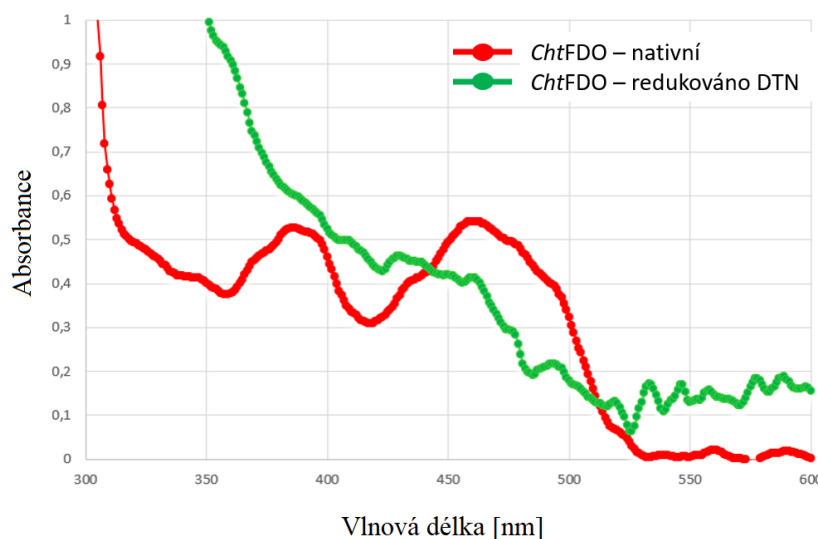
Úspěšnost deglykosylace proteinu *ChtFDO* pomocí Endo F1 byla ověřena pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu. Úspěšnost deglykosylace je zachycena na Obrázku 7.1. Glykosylovaný vzorek, nacházející se ve druhé dráze, má podle referenčních pásů větší hmotnost, než deglykosylovaný vzorek ve třetí dráze, což značí úspěšnost deglykosylace.



Obrázek 7.1: Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu nativního a deglykosylovaného vzorku *ChtFDO*. V první dráze je hmotnostní standard Colour Prestained Protein Standard (New England Biolabs) používaný pro odhad hmotnosti proteinu. Ve druhé dráze je glykosylovaný vzorek *ChtFDO* a ve třetí dráze deglykosylovaný vzorek *ChtFDO*.

7.2 Testování redukčního činidla

Naměřená absorpční spektra proteinu *ChtFDO* bez a v přítomnosti redukčního činidla DTN (1 mM) jsou zobrazena na Obrázku 7.2. Dvě maxima ve spektru při vlnových délkách 390 a 460 nm u vzorku bez přítomnosti redukčního činidla odpovídají oxidovanému stavu vzorku. Z použitých redukčních činidel (viz. Kapitola 6.2) byla redukce proteinu pozorována pouze u DTN, který byl použit pro následnou redukci proteinu v krystalech před difrakčním experimentem.



Obrázek 7.2: Absorpční spektrum deglykosylovaného vzorku *ChtFDO* o koncentraci 7,4 mg/ml bez a v přítomnosti redukčního činidla (1 mM DTN). Dvě maxima odpovídají oxidovanému stavu flavinu v roztoku.

7.3 Sběr datových sad

Celkem bylo připraveno 19 krystalů *ChtFDO* pro sběr difrakčních dat, 14 s cílem získat redukováný stav FAD, 5 s cílem získat oxidovaný stav FAD. Sběr difrakčních dat proběhl se vzdáleným přístupem na zdroji synchrotronového záření BESSY II ve dvou různých termínech.

Na základě dvou testovacích snímků s hodnotou ω lišící se o 90° bylo 12 krystalů vyhodnoceno jako nevhodných (málo intenzivní difrakce, zřejmě poškození krystalu, které se projevilo na difrakčním obrazci) pro sběr difrakčních dat. Mezi tyto krystaly byly zařazeny všechny krystaly připravené metodou krystalizace pod olejem. Tato metoda byla vyhodnocena jako nevhodná pro přípravu krystalů *ChtFDO* pro difrakční experiment. Zbýlých 7 krystalů bylo použito pro sběr celkem 8 sad difrakčních snímků s difrakčními limity od 1,63 Å do 2,60 Å, kde na jednom krystalu byly měřeny dvě sady difrakčních snímků. Mezi těmito měřeními byl krystal přecentrován a byla změněna transmise svazku.

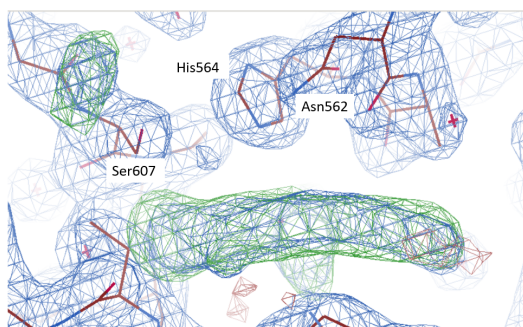
7.4 Analýza oxidačních stavů

Pro analýzu oxidačních stavů proteinu *ChfFDO* byla vybrána referenční datová sada, která posloužila k vytvoření referenčního modelu pro čtyři vybrané datové sady. Jedna vybraná datová sada (redState_DTN) byla měřena na krystalu, který byl před měřením redukován redukčním činidlem, další 3 vybrané datové sady byly měřeny na krystalech ozařovaných primárním svazkem s 1 % (lowDose_1T), 5 % (lowDose_5T) a 20 % (lowDose_20T) transmisí s cílem získat oxidovaný stav FAD. Datové sady byly zpracovány programy XDS [28], AIMLESS [43] a REFMAC5 [18]. Získané přímé $2mF_o-DF_c$ mapy na úrovni 1σ s namodelovanými malými molekulami v aktivním místě a mF_o-DF_c diferenční mapy na úrovni 3σ z vybraných datových sad jsou zobrazeny na Obrázku 7.3 (a) - (j).

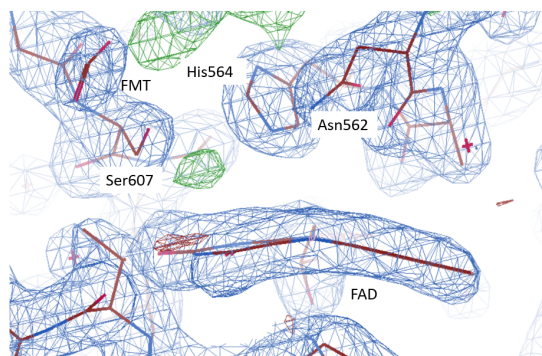
Na Obrázku 7.3 (a) a (b) je znázorněna struktura redState_DTN, která byla určena z dat měřených na krystalu máčeném v roztoku s redukčním činidlem DTN. Struktura byla určena z kompletní datové sady, která obsahovala 3600 snímků (statistika v Tabulce A.1). mF_o-DF_c diferenční mapa naznačovala ohyb flavinu. Po namodelování molekul FAD a FMT do struktury a následném upřesnění byl pozorován ohyb flavinu. Hodnota úhlů popisující ohyb flavinu je uvedena v Tabulce 7.1. Z přípravy krystalu a následného měření lze říct, že je FAD v této struktuře plně redukován.

Struktura určená z datové sady lowDose_20T obsahovala dvě molekuly *ChfFDO* v asymetrické jednotce, a tedy i dvě aktivní místa, která jsou zobrazena na Obrázku 7.3 (c) - (f). Struktura byla určena z částečné datové sady, která obsahovala 450 snímků odpovídajících oscilačnímu úhlu 90° (statistika ze zpracování dat je uvedena v Tabulce A.2). mF_o-DF_c diferenční mapa naznačovala ohyb flavinu pro obě aktivní místa, po namodelování molekul FMT, vody (W) a FAD a následném upřesnění byl pozorován ohyb flavinu. Hodnoty úhlů popisující ohyb flavinu jsou uvedeny v Tabulce 7.1, hodnoty ohybu pro obě aktivní místa jsou velmi podobné.

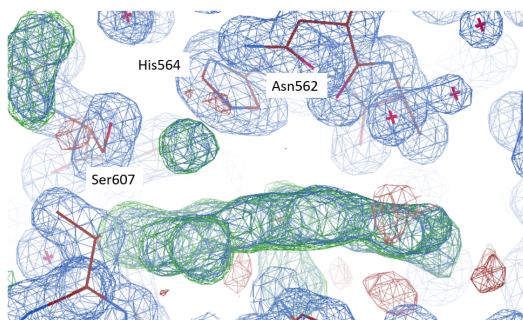
Další dvě struktury určené z krystalů ozářených primárním svazkem s nízkou transmisí (lowDose_5T a lowDose_1T) jsou zobrazeny na Obrázku 7.3 (g) - (j). Obě struktury byly určeny z částečných datových sad, které obsahovaly 600 snímků (odpovídajících oscilačnímu úhlu 120°) pro lowDose_5T a 1500 snímků (odpovídajících oscilačnímu úhlu 150°) pro lowDose_1T (statistiky ze zpracování jsou uvedeny v Tabulce A.2). U struktury lowDose_5T naznačovala mF_o-DF_c diferenční mapa ohyb flavinu, po namodelování molekul FMT, vody (W) a FAD a následném upřesnění byl pozorován ohyb flavinu. U struktury lowDose_1T lze pozorovat, že mF_o-DF_c diferenční mapa naznačovala částečně planární flavin. Po namodelování vody (W) a FAD byl pozorován ohyb flavinu. Hodnoty úhlů popisující ohyb flavinu jsou uvedeny v Tabulce 7.1.



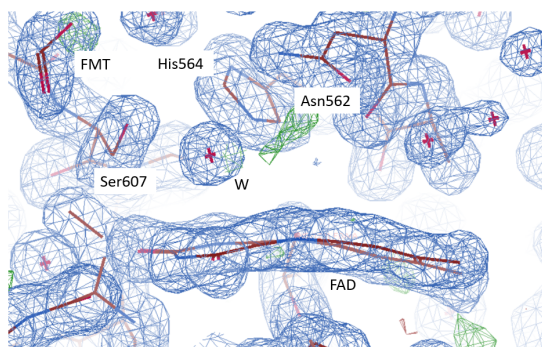
(a) $mF_o - DF_c$ diferenční mapa aktivního místa z datové sady redState_DTN



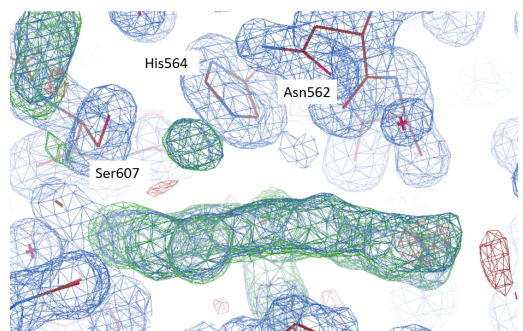
(b) Přímá $2mF_o - DF_c$ mapa aktivního místa s namodelovanými molekulami FAD a FMT z datové sady redState_DTN



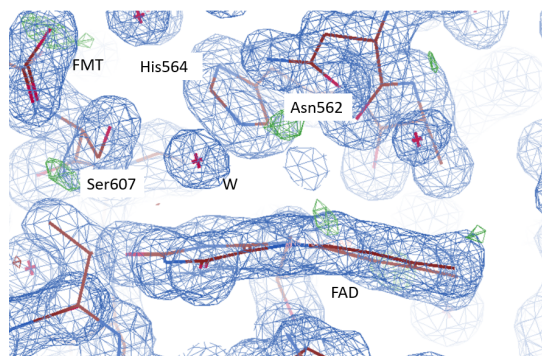
(c) $mF_o - DF_c$ diferenční mapa aktivního místa z datové sady lowDose_20T řetězec A



(d) Přímá $2mF_o - DF_c$ mapa aktivního místa s namodelovanými molekulami FAD, FMT a vody (W) z datové sady lowDose_20T řetězec A

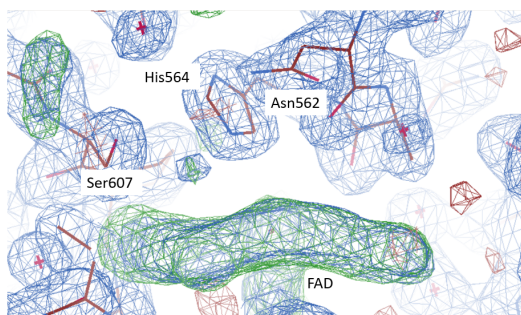


(e) $mF_o - DF_c$ diferenční mapa aktivního místa z datové sady lowDose_20T řetězec B

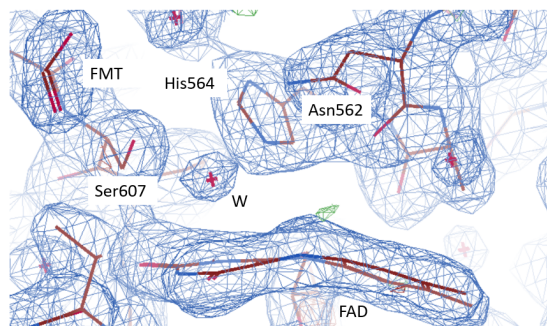


(f) Přímá $2mF_o - DF_c$ mapa aktivního místa s namodelovanými molekulami FAD, FMT a vody (W) z datové sady lowDose_20T řetězec B

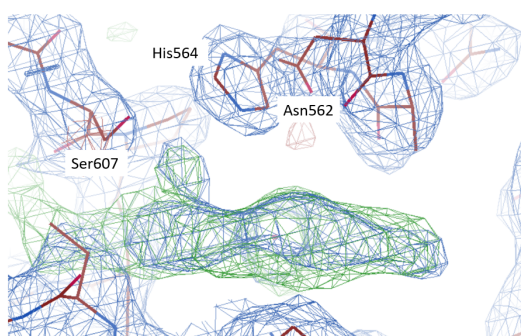
Obrázek 7.3



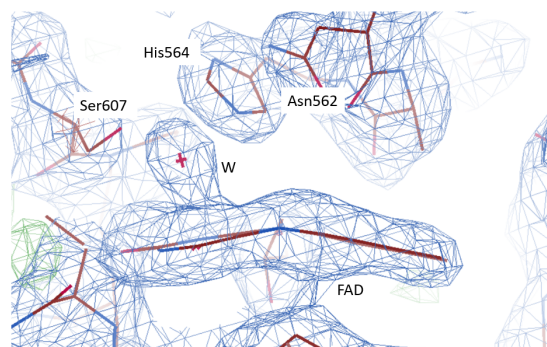
(g) mF_o-DF_c diferenční mapa aktivního místa z datové sady lowDose_5T



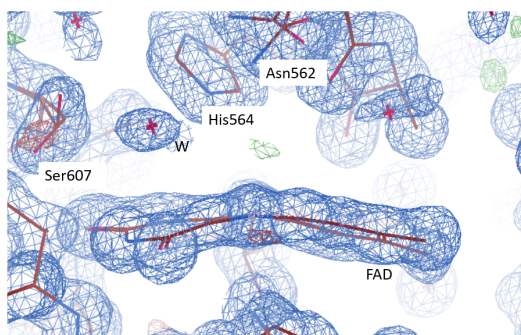
(h) Přímá $2mF_o-DF_c$ mapa aktivního místa s namodelovanými molekulami FAD, FMT a vody (W) z datové sady lowDose_5T



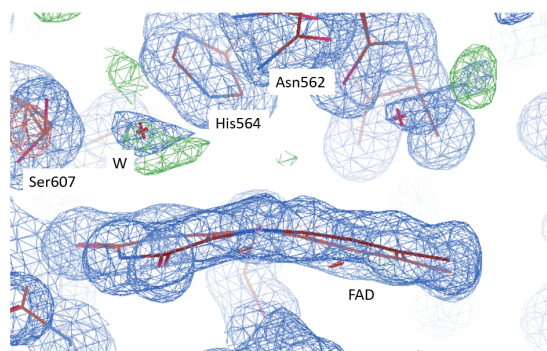
(i) mF_o-DF_c diferenční mapa aktivního místa z datové sady lowDose_1T



(j) Přímá $2mF_o-DF_c$ mapa aktivního místa s namodelovanými molekulami FAD a vody (W) z datové sady lowDose_1T



(k) Přímá $2mF_o-DF_c$ mapa aktivního místa ze struktury 6ZE2 [37], zobrazeno je aktivní místo v řetězci A



(l) Přímá $2mF_o-DF_c$ mapa aktivního místa ze struktury 6ZE2 [37], zobrazeno je aktivní místo v řetězci B

Obrázek 7.3: Aktivní místo struktur *ChtFDO*. Označena jsou klíčová residua Asn562, His564 a Ser607, která se účastní vazby a stabilizace substrátu v aktivním místě. Mapy elektronových hustot jsou znázorněny třemi barvami - modrá znázorňuje přímou $2mF_o-DF_c$ mapu, zelená znázorňuje kladnou mF_o-DF_c diferenční mapu a červená znázorňuje zápornou mF_o-DF_c diferenční mapu. (a), (c), (e), (g) a (i) Aktivní místo s mF_o-DF_c diferenčními mapami zobrazenými na úrovni 3σ a počítanými pro struktury *ChtFDO* bez namodelovaných FAD, FMT a molekul vody v aktivním místě. (b), (d), (g), (h) a (j) Přímé $2mF_o-DF_c$ mapy zobrazené na úrovni 1σ a počítané pro struktury s namodelovanými FAD, FMT a molekulami vody. (k) a (l) Pohledy na aktivní místa dvou molekul *ChtFDO* z dříve publikované struktury (PDB kód: 6ZE2 [37]) s přímou $2mF_o-DF_c$ mapou zobrazenou na úrovni 1σ . Obrázky jsou zobrazeny v programu COOT [15].

Tabulka 7.1: Úhly měřené mezi atomy N¹ - N¹⁰ - C⁹ a C⁴ - N⁵ - C⁶ isoalloxazinové části kofaktoru FAD ve třech strukturách *Cht*FDO měřených se sníženou transmisí, jedné struktury s chemicky redukováným FAD a publikované struktury *Cht*FDO (PDB kód: 6ZE2 [37]).

Datová sada	N ¹ - N ¹⁰ - C ⁹ [°]	C ⁴ - N ⁵ - C ⁶ [°]
lowDose_20T řetězec A	165,1	162,5
lowDose_20T řetězec B	165,3	163,3
lowDose_1T	160,3	158,0
lowDose_5T	160,8	157,6
redState_DTN	161,4	158,8
6ZE2 řetězec A	163,6	160,0
6ZE2 řetězec B	163,1	158,6

Ve všech upřesněných strukturách (Obrázek 7.3 (a)-(j)) je pozorován ohyb flavinu a konformace „in“ rezidua Ser607, která se účastní vazby vody v aktivním místě. Ze struktury získané z datové sady redState_DTN, která byla měřena z krystalu redukováného redukčním činidlem lze usoudit, že stav flavinu odpovídá plně redukovánému stavu, tzn. maximálnímu ohnutí isoalloxazinu [37]. Další struktury byly získány z částečných datových sad, které byly měřeny z krystalu ozářených primárním svazkem se sníženou transmisí za účelem pozorovat stav co nejbližší plně oxidovanému stavu flavinu.

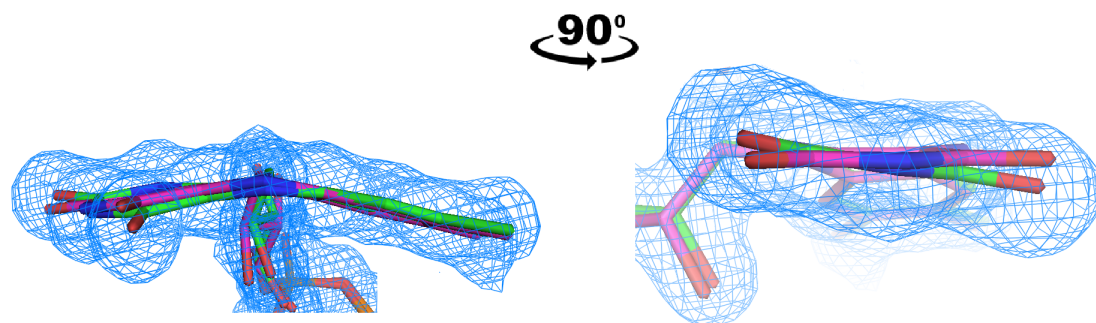
U makromolekulárních struktur nelze snadno určit spolehlivost stanovení hodnot sledovaných úhlů. Podle shody hodnot pro různé řetězce jedné struktury (Tabulka 7.1, lowDose_20T a 6ZE2) lze odhadnout chybu určení na 1° nebo méně. Pozorované rozdíly úhlů mezi jednotlivými datovými sadami tedy vypovídají o skutečných rozdílech v geometrii flavinu. Na Obrázku 7.4 je grafické srovnání upřesněných souřadnic FAD s extrémními hodnotami pozorovaných úhlů. Je zřejmé, že rozdíly v geometrii odpovídají elektronové hustotě.

Porovnání struktury redukováného stavu z datové sady redState_DTN a struktury z datové sady lowDose_1T (Obrázek 7.5) naznačuje, že geometrie FAD je velmi blízká pro plně redukováný stav a pro velmi nízkou expozici. Pokud nenastává redukce již při velmi malé dávce (lowDose_1T), pak by oxidovaný stav a plně redukováný stav byly zřejmě geometricky velmi podobné.

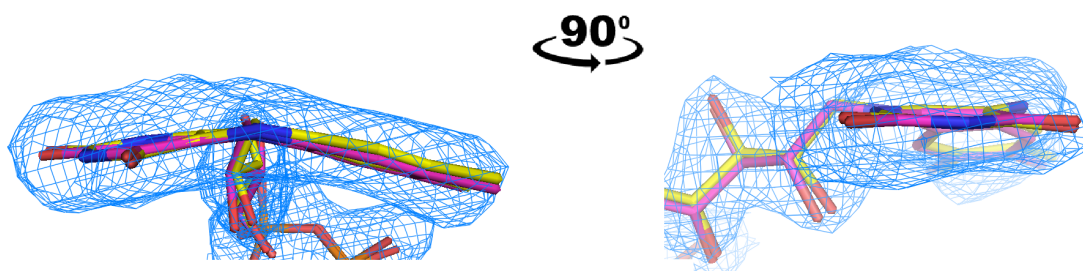
Úhel ohybu flavinu se v případech nejnižší expozice (předpoklad blízkosti oxidovanému stavu) a plné chemické redukce liší minimálně - na úrovni odhadované experimentální chyby (Tabulka 7.1). Tato skutečnost může znamenat, že planární stav anebo jemu blízký nelze naměřit ozářením krystalu nízkou dávkou záření. Existují dvě varianty pro vysvětlení tohoto jevu - redukce flavinu nastává tak rychle, že ji není možné pozorovat konvenčními metodami makromolekulární krystalografie nebo jsou si redukováný a oxidovaný stav flavinu geometricky velmi podobné.

Delší expozice odpovídající vyšší dávce záření, ale také kompletnějším a kvalitnějším datovým sadám, vykazují o něco větší hodnoty úhlů ohybu flavinu. Je možné, že v průběhu expozice má ohyb FAD v této struktury složitější průběh, než předpokládá náš experimentální model.

Uvedeným postupem bylo možné prokázat, že plně redukovaný stav FAD se geometricky příliš neliší od ostatních experimentálně pozorovaných stavů ve strukturách. I když pozorované rozdíly v úhlech ohybu jsou relativně malé a nelze snadno stanovit přesnost určení těchto hodnot, Obrázek 7.4 dostatečně ilustruje, že pozorované rozdíly jsou relevantní - jedná se o skutečné rozdíly odpovídající interpretaci elektronové hustoty v jednotlivých strukturách.



Obrázek 7.4: Přelození molekul FAD ze struktur upřesněných vůči datovým sadám lowDose_1T (růžově) a lowDose_20T řetězec B (zeleně). Přímá $2mF_o - DF_c$ mapa je z datové sady lowDose_20T řetězec B zobrazena na úrovni 1σ . Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL [41].



Obrázek 7.5: Přelození molekul FAD ze struktur upřesněných vůči datovým sadám lowDose_1T (růžově) a redState_DTN (žlutě). Přímá $2mF_o - DF_c$ mapa je z datové sady redState_DTN zobrazena na úrovni 1σ . Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL [41].

Použitý postup tedy vede k pozorování různých úhlů ohybu. Interpretace výsledků ale není snadná. Nejpravděpodobnějším vysvětlením je hypotéza, že oxidovaný a redukovaný stav FAD v *ChfFDO* jsou geometricky velmi podobné a protein tedy v tomto případě vnucuje kofaktoru geometrii výrazně zvýhodňující redukovaný stav [42]. Pro přesnější pozorování by bylo možné použít moderní metody makromolekulární krystalografie - sériovou synchrotronovou krystalografii nebo časové rozlišení za pokojové teploty na XFEL.

Kapitola 8

Závěr

- Podařilo se zkrystalizovat FAD-dependentní oxidoreduktázu z *Chaetomium thermophilum* pomocí nové krystalizační podmínky - metody krystalizace pod olejem. Krystaly, které vyrostly pomocí této metody, nebyly vhodné pro difrakci. Pro další experimenty byly využity krystaly, které vyrostly metodou visící kapky.
- Z difrakčních dat naměřených na synchrotronovém zdroji záření bylo předběžně určeno 5 krystalových struktur proteinu *ChtFDO*
 - 1 referenční
 - 1 chemicky redukováná
 - 3 se sníženou dávkou expozice – s účelem získat stav co nejbližší oxidovanému stavu flavinu.
- Struktury se liší v přítomnostech molekul vody a FMT v aktivním místě a v počtu namodelovaných GlcNAc, jinak nejsou pozorovány změny v proteinovém řetězci. Jedna ze struktur vykristalizovala v jiné prostorové grupě (lowDose_20T v prostorové grupě $P2_12_12_1$, ostatní v $P2_12_12$) a měla dvě molekuly *ChtFDO* v asymetrické jednotce.
- Ve všech určených strukturách byla pozorována pouze konformace „in“ rezidua Ser607, které se účastní vazby vody v aktivním místě. U žádné struktury nebyla pozorována konformace „out“ rezidua Ser607, která byla pozorována v předchozích strukturách z [37].
- Ve všech třech strukturách z krystalů ozářených nízkou dávkou záření byla pozorována různá míra ohnutí flavinu, blízko stavu ve struktuře s redukováným flavinem - lze odlišit různé geometrické stavy FAD, nicméně pozorované rozdíly jsou relativně malé. Z tohoto lze vyvodit dva závěry - buď redukce flavinu pod vlivem ozáření nastává velmi rychle a nelze pozorovat plně oxidovaný stav použitou metodikou nebo jsou si v případě *ChtFDO* oxidovaný a redukováný stav FAD velmi podobné. Současně je možná geometrická blízkost obou stavů a velmi rychlá redukce v rentgenovém svazku.

- Poprvé byla určena struktura *ChtFDO* s chemicky redukováným flavinem. Geometrické parametry flavinu v této struktuře jsou velmi blízké předchozím pozorováním v jiných strukturách a tato struktura poskytuje důležitý referenční bod pro studium oxidačního stavu kofaktoru.

Literatura

- [1] Joosten V.; van Berkel W. J.: *Flavoenzymes. Curr Opin Chem Biol.* 11(2), 2007, s. 195–202.
- [2] Drenth J.: *Principles of protein X-ray crystallography.* New York: Springer-Verlag, 1994. ISBN 0-387-94091-X.
- [3] Ng J. D.; Baird J. K.; Coates L.; Garcia-Ruiz J. M.; Hodge T. A.; Huang S.: *Large volume protein crystal growth for neutron macromolecular crystallography. Acta Crystallographica F71,* 2015, s. 358–370.
- [4] Clabbers M. T. B.; van Genderen E.; Wan W.; Wiegers E. L.; Gruene T.; Abrahams J. P.: *Protein structure determination by electron diffraction using a single three-dimensional nanocrystal. Acta Crystallographica D73,* 2017, s. 738–748.
- [5] Berman H.; Henrick K.; Nakamura H.: *Announcing the worldwide Protein Data Bank. Nature Structural & Molecular Biology* 10(980), 2003.
- [6] Kraus I.: *Úvod do strukturní rentgenografie.* 1. Vydání. Praha: Academia, 1985. ISBN 21-014-85.
- [7] Kraus I.: *Struktura a vlastnosti krystalů.* Praha: Academia, 1993. ISBN 80-200-0372-X.
- [8] Marek J.; Trávníček Z.: *Monokrystalová rentgenová strukturní analýza.* 1. Vydání. Olomouc: univerzita Palackého v Olomouci, 2002, ISBN 80-224-0551-2.
- [9] Valvoda V.; Polcarová M.; Lukáč. P.: *Základy strukturní analýzy.* Praha: Karolinum, 1992. ISBN 807066648X.
- [10] Vagin A.; Teplyakov A.: *Molecular replacement with MOLREP. Acta Crystallographica D66,* 2010, s. 22–25.
- [11] McCoy A. J.; Grosse-Kunstleve R. W.; Adams P. D.; Winn M. D.; Storoni L. C.; Read R. J.: *Phaser crystallographic software. Journal of applied crystallography* 40, 2007, s. 658–674.
- [12] Vagin A.; Lebedev A.: *MoRDa, an automatic molecular replacement pipeline. Acta Crystallographica A71,* 2015, s. 19–19.
- [13] McPherson A.: *Introduction to Macromolecular Crystallography.* 2. vydání. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2008.

- [14] Wilson A. J. C.: *Largest likely values for the reliability index*. *Acta Crystallographica* 3, 1950, s. 397–398.
- [15] Emsley P.; Cowtan K. D.: *Coot: model-building tools for molecular graphics*. *Acta Crystallographica* D60, 2004, s. 2126–2132.
- [16] Sheldrick G. M.: *A short history of SHELX*. *Acta Crystallographica* A64, 2008, s. 112–122.
- [17] Diederichs K.; Karplus P. A.: *Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography*. *Nature Structural Molecular Biology* 4, 1997, s. 269–275.
- [18] Murshudov G. N.; Skubák P.; Lebedev A. A.; Pannu N. S.; Steiner R. A.; Nicholls R. A.; Winn M. D.; Long F.; Vagin A. A.: *REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures*. *Acta Crystallographica* D67, 2011, s. 355–367.
- [19] Liebschner D.; Afonine P. V.; Baker M. L.; Bunkóczi G.; Chen V. B.; Croll T. I.; Hintze B.; Hung L.-W.; Jain S.; McCoy A. J.; Moriarty N. W.; Oeffner R. D.; Poon B. K.; Prisant M. G.; Read R. J.; Richardson J. S.; Richardson D. C.; Sammito M. D.; Sobolev O. V.; Stockwell D. H.; Terwilliger T. C.; Urzhumtsev A. G.; Videau L. L.; Williams C. J.; Adams P. D.: *Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix*. *Acta Crystallographica* D75, 2019, s. 861–877.
- [20] Brünger A. T.: *Free R value: Cross-validation in crystallography*. *Methods in Enzymology* 277, 1997, s. 366–396.
- [21] Mobilio S.; Boscherini F.; Meneghini C.: *Synchrotron radiation: Basics, methods and applications*. New York: Springer, 2015, s. 3–28.
- [22] Espes E.; Hansson B.; Hemberg O.; Otendal M.; Johansson G.; Takman P.; Tuohimaa T.: *Current status of the liquid-metal-jet X-ray source technology and SAXS applications*. *Acta Crystallographica* A72, 2016, s. 178–179.
- [23] Hrdý J.: *Wiggler, undulátory a další zdroje synchrotronového záření*. *Materials Structure* 15, 2008, k. 5–6.
- [24] webové stránky firmy OptiXs:
<<https://www.optixs.cz/detektory-zareni-31k/ccd-a-cmos-detektory-14p>> [cit. 06.07.2020].
- [25] Powell H. R.: *X-ray data processing*. *Bioscience Reports* 37(5), 2017.
- [26] Battye T. G. G.; Kontogiannis L.; Johnson O.; Powell H. R.; Leslie A. G. W.: *iMOS-FLM: a new graphical interface for diffraction-imageprocessing with MOSFLM*. *Acta Crystallographica* D67, 2011, s. 271–281.
- [27] Winter G.; Waterman D. G.; Parkhurst J. M.; Brewster A. S.; Gildea R. J.; Gerstel M.; Fuentes-Montero L.; Vollmar M.; Michels-Clark T.; Young I. D.; Sauterb N. K.; Evans G.: *DIALS: implementation and evaluation of a new integration package*. *Acta Crystallographica* D74, 2018, s. 85–97.

- [28] Kabsch W.: *XDS. Acta Crystallographica* D66, 2010, s. 125–132.
- [29] Carugo O.; Carugo K. D.: *When X-rays modify the protein structure: radiation damage at work. Trends in Biochemical Sciences* 30(4), 2005, s. 213-219.
- [30] Sliz P.; Harrison S.; Rosenbaum G.: *How does Radiation Damage in Protein Crystals Depend on X-Ray Dose? Structure* (London, England : 1993), 11, s. 13-9.
- [31] Altarelli M.; Brinkmann R.; Chergui M.: *XFEL: The European X-Ray Free-Electron Laser. Technical design report*, 2007.
- [32] Pearson A. R.; Mehrabi P.: *Serial synchrotron crystallography for time-resolved structural biology. Current Opinion in Structural Biology* 65, 2020, s. 168-174.
- [33] Bergfors T. M.: *Protein Crystallization, Techniques, Strategies, and Tips*. Int. Univ. Line, 1999, ISBN 0-9636817-5-3.
- [34] Krauss I. R.; Merlino A.; Vergara A.; Sica F.: *An overview of biological macromolecule crystallization. International Journal of Molecular Sciences* D14, 2013, s. 11643-11691.
- [35] May S. W.; Padgette S. R.: *Oxidoreductase Enzymes in Biotechnology: Current Status and Future Potential. Bio/Technology* 1, 1983, s. 677–686.
- [36] Romero E.; Gadda G.: *Alcohol oxidation by flavoenzymes, Biomol. Concepts* 5, 2014, s. 299–318.
- [37] Švecová L.; Østergaard L. H.; Skálová T.; Schnorr K. M.; Koval' T.; Kolenko P.; Stránský J.; Sedlák D.; Dušková J.; Trundová M.; Hašek J.; Dohnálek J.: *Crystallographic fragment screening-based study of a novel FAD-dependent oxidoreductase from Chaetomium thermophilum . Acta Crystallographica* D77, 2021, s. 980-981.
- [38] Sützl, L.; Foley, G.; Gillam E. M. J.; Bodén M.; Haltrich D.: *The GMC superfamily of oxidoreductases revisited: analysis and evolution of fungal GMC oxidoreductases. Biotechnol Biofuels* 12(118), 2019.
- [39] Kao Y-T.; Saxena C.; He T-F; Guo L.; Wang L.; Sancar A.; Zhong D.: *Ultrafast dynamics of flavins in five redox states. Journal of the American Chemical Society* 130(39), 2008.
- [40] Tuomela M.; Vikman M.; Hatakka A.; Itävaara M.: *Biodegradation of lignin in a compost environment: A review. Bioresource Technology*, 2000, s. 169–183.
- [41] Schrödinger, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8.2015.
- [42] Lyubimov A. Y.; Heard K.; Tang H.; Sampson N. S.; Vrieland A.: *Distortion of flavin geometry is linked to ligand binding in cholesterol oxidase. Protein Science* 16(12), 2007, s. 2647-2656.
- [43] Evans P. R.; Murshudov G. N.: *How good are my data and what is the resolution?. Acta Crystallographica* D69, 2013, s. 1204–1214.

- [44] Winn M. D.; Ballard C. C.; Cowtan K. D.; Dodson E. J.; Emsley P.; Evans P. R.; Keegan R. M.; Krissinel E. B.; Leslie A. G. W.; McCoy A.; McNicholas S. J.; Murshudov G. N.; Pannu N. S.; Potterton E. A.; Powell H. R.; Read R. J.; Vagin A. Wilson K. S.: *Overview of the CCP4 suite and current developments. Acta Crystallographica D67*, 2011, s. 235–242.
- [45] Long F.; Nicholls R. A.; Emsley P.; Gražulis S.; Merkys A.; Vaitkusa A.; Murshudov G. N.: *AceDRG: a stereochemical description generator for ligands. Acta Crystallographica D73*, 2017, s. 112–122.

Přílohy

Příloha A - Statistiky zpracovaných difrakčních dat

Tabulka A.1: Statistické hodnoty ze zpracování difrakčních dat (celých setů/360°). Datová sada označená hvězdičkou byla vybrána jako referenční. Hodnoty v závorkách odpovídají hodnotám ve slupce s nejvyšším rozlišením.

Název datové sady	refLowDose_10T*	refLowDose_20T	refLowDose_1T	refLowDose_5T	redState_DTN
Počet snímků	3580	1800	3600	1800	1800
Difrakční limit [Å]	49,56 – 2,08 (2,13 – 2,08)	47,32 – 1,63 (1,65 – 1,63)	50,00 – 2,60 (2,72 – 2,60)	46,90 – 2,04 (2,10 – 2,04)	46,49 – 2,25 (2,32 – 2,25)
Prostorová grupa	$P 2_1 2_1 2$	$P 2_1 2_1 2_1$	$P 2_1 2_1 2$	$P 2_1 2_1 2$	$P 2_1 2_1 2$
Parametry základní buňky [Å, °]	a = 109,85; b = 116,07; c = 46,38; $\alpha = 90,00$; $\beta = 90,00$; $\gamma = 90,00$	a = 93,70; b = 109,67; c = 115,58; $\alpha = 90,00$; $\beta = 90,00$; $\gamma = 90,00$	a = 109,91; b = 115,71; c = 46,31; $\alpha = 90,00$; $\beta = 90,00$; $\gamma = 90,00$	a = 109,77; b = 116,05; c = 46,90; $\alpha = 90,00$; $\beta = 90,00$; $\gamma = 90,00$	a = 109,76; b = 116,36; c = 46,49; $\alpha = 90,00$; $\beta = 90,00$; $\gamma = 90,00$
Počet měřených reflexí	941 222 (71 172)	1 822 586 (41 989)	392 370 (55 357)	429 415 (31 325)	184 743 (16 807)
Počet nezávis. reflexí	36 610 (2 773)	146 340 (5 714)	15 252 (2 138)	34 748 (2 662)	28 959 (2 596)
Kompletnost [%]	99,9 (99,5)	97,8 (78,6)	99,8 (98,6)	89,2 (90,5)	99,6 (99,6)
Průměrná redundance	25,7 (25,7)	12,5 (7,3)	25,7 (25,9)	12,4 (11,8)	6,4 (6,5)
Průměrná mozaicita [°]	0,22	0,19	0,17	0,18	0,38
$CC_{1/2}$	0,997 (0,756)	0,998 (0,635)	0,812 (0,267)	0,995 (0,420)	0,993 (0,519)
Wilsonův B-faktor [Å ²]	30,8	18,9	51,7	25,2	37,9
I/σ_I	11,6 (1,8)	11,1 (1,5)	8,0 (1,4)	6,6 (0,9)	5,6 (0,3)
R_{meas}	0,235 (2,267)	0,162 (1,374)	0,410 (2,684)	0,307 (2,700)	0,293 (6,522)
R_{merge}	0,227 (2,181)	0,149 (1,191)	0,395 (2,586)	0,282 (2,476)	0,247 (5,504)

Tabulka A.2: Statistické hodnoty ze zpracování 90° - 150° difrakčních dat. Hodnoty v závorkách odpovídají hodnotám ve slupce s nejvyšším rozlišením.

Název částečné datové sady	lowDose_20T	lowDose_1T	lowDose_5T
Počet snímků	450	1500	600
Úhlový rozsah [°]	90	150	120
Difrakční limit [Å]	47,32 – 1,70 (1,73 – 1,70)	46,31 – 2,80 (2,98 – 2,80)	43,13 – 2,26 (2,34 – 2,26)
Prostorová grupa	$P 2_1 2_1 2_1$	$P 2_1 2_1 2$	$P 2_1 2_1 2$
Parametry základní buňky [Å, °]	a = 93,70; b = 109,67; c = 115,58; $\alpha = 90,00$; $\beta = 90,00$; $\gamma = 90,00$	a = 109,91; b = 115,71; c = 46,31; $\alpha = 90,00$; $\beta = 90,00$; $\gamma = 90,00$	a = 109,77; b = 116,05; c = 46,90; $\alpha = 90,00$; $\beta = 90,00$; $\gamma = 90,00$
Počet měřených reflexí	423 326 (14 759)	163 458 (22 987)	109 804 (8 480)
Počet nezávis. reflexí	128 451 (5 802)	15 243 (2 130)	26 185 (2 350)
Kompletnost [%]	98,2 (90,7)	99,7 (98,2)	91,1 (90,5)
Průměrná redundance	3,3 (2,5)	10,7 (10,8)	4,2 (3,6)
Průměrná mozaicita [°]	0,19	0,17	0,18
$CC_{1/2}$	0,996 (0,500)	0,986 (0,508)	0,985 (0,438)
Wilsonův B-faktor [Å ²]	14,0	51,8	26,6
I/σ_I	4,7 (0,7)	4,9 (0,9)	4,5 (0,9)
R_{meas}	0,141 (1,107)	0,426 (2,689)	0,258 (1,386)
R_{merge}	0,105 (0,826)	0,388 (2,451)	0,203 (1,068)