

České vysoké učení technické v Praze  
Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská

Katedra inženýrství pevných látek  
Obor: Inženýrství pevných látek



## **Rentgenová difrakční analýza flavin-dependentních oxidáz**

## **X-ray diffraction analysis of flavin-dependent oxidases**

VÝZKUMNÝ ÚKOL

Vypracoval: Aleš Kravíc  
Vedoucí práce: Ing. Jan Dohnálek, Ph.D.  
Rok: 2020



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

## ZADÁNÍ VÝZKUMNÉHO ÚKOLU

**Student:** Bc. Aleš Kravíc  
**Studijní program:** Aplikace přírodních věd  
**Obor:** Inženýrství pevných látek  
**Akademický rok:** 2019/2020

**Název práce:** Rentgenová difrakční analýza flavin-dependentních oxidáz  
(česky)

**Název práce:** X-ray diffraction analysis of flavin-dependent oxidases  
(anglicky)

*Pokyny pro vypracování:*

Cílem práce je zvládnutí celkové metodiky proteinové krystalografie a její aplikace na flavoproteiny. 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. Současně budou připraveny mikrokrystaly pro ověření možnosti analýzy pomocí elektronové difrakce a pomocí difrakčních svazků pro budoucí studie s časovým rozlišením (Speciální svazky synchrotronových zdrojů, XFEL).

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 výzkumného úkolu:* 21. 10. 2019

*Termín odevzdání výzkumného úkolu:* 1. 8. 2020

Doba platnosti zadání je dva roky od data zadání.



.....  
vedoucí katedry

V Praze dne 21. 10. 2019

## **Prohlášení**

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

V Praze dne .....

.....

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 a z Centra molekulární struktury Biocev za technickou podporu, obětavost a užitečné připomínky.

Aleš Kravíc

*Název práce:*

## **Rentgenová difrakční analýza flavin-dependentních oxidáz**

*Autor:* Aleš Kravíc

*Studijní program:* Aplikace přírodních věd

*Obor:* Inženýrství pevných látek

*Druh práce:* Výzkumný úkol

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

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

*Konzultant:* 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

*Abstrakt:* FAD-dependentní oxidoreduktáza z termofilní vláknité houby *Chaetomium thermophilum* je monomerní termostabilní glykoprotein, který může najít uplatnění v odvětvích, kde je vyžadována práce při vyšších teplotách. Ve všech strukturách ChtFDO, které byly dosud vyřešeny pomocí metod proteinové krystalografie, byl pozorován pouze redukovaný stav FAD. Práce je zaměřena na zkoumání redukčních dějů v ChtFDO způsobených dávkou rentgenového záření. Vzorek ChtFDO byl použit pro vypěstování krystalu pro difrakční experiment, který byl proveden s nízkou expozicí pro docílení postupného přechodu mezi oxidovaným a redukovaným stavem proteinu. Naměřená difrakční data byla zpracována softwarem XDS a AIMLESS a následně rozdělena na šest sektorů po 1200 snímcích podle dávky záření a poté byly spočítány mapy elektronové hustoty. Výsledné mapy diferenčních elektronových hustot pro FAD odpovídají redukovanému stavu FAD ve všech sektorech. Z analýzy map vyplývá, že k redukcí došlo pravděpodobně již na začátku difrakčního experimentu. Postupný přechod z oxidovaného do redukovaného stavu FAD nebyl pozorován.

*Klíčová slova:* rentgenová strukturní analýza, oxidoreduktáza, zpracování difrakčních dat, oxidačně-redukční proces

*Title:*

## **X-ray diffraction analysis of flavin-dependent oxidases**

*Author:* Aleš Kravac

*Abstract:* FAD-dependent oxidoreductase from thermophilic filamentous *Chaetomium thermophilum* is monomeric thermostable glycoprotein, that can find application in industries, where work at higher temperatures is required. In all ChtFDO structures, which were solved so far using the methods of protein crystallography, only the reduced state of FAD was observed. This work is focused on investigation of reduction processes in ChtFDO caused by the X-ray dose. The ChtFDO sample was used for crystal preparation for diffraction experiment performed with low X-ray exposure to reach sequential transition between oxidized and reduced state of the protein. The collected diffraction data were processed by XDS and AIMLESS software and subsequently divided into six sectors after 1200 images according to the radiation dose and then the electron density maps were calculated. The resulting differential electron density maps for the FAD correspond to reduced state of FAD for all sectors. The analysis of the maps shows that the reduction occurred probably at the beginning of the diffraction experiment. The subsequential transition from the oxidized to the reduced state of FAD was not observed.

*Key words:* X-ray structure analysis, oxidoreductase, diffraction data processing, oxidation-reduction process

# Obsah

Úvod	9
<b>1 Teoretická část</b>	<b>10</b>
1.1 Oxidoreduktáza z <i>Chaetomium thermophilum</i>	10
1.1.1 <i>Chaetomium thermophilum</i>	10
1.1.2 Flavin-dependentní oxidoreduktázy	10
1.1.3 FAD-dependentní oxidoreduktáza z <i>Chaetomium thermophilum</i>	11
1.2 Krystalizace proteinů	12
1.3 Makromolekulární krystalografie	13
1.3.1 Rozptyl rentgenového záření	13
1.3.2 Difrakce na krystalové mřížce	13
1.3.3 Fázový problém	15
1.3.4 Pattersonova funkce	15
1.3.5 Zpracování difrakčních dat	15
1.3.6 Molekulární nahrazení	17
1.3.6.1 Rotační funkce	17
1.3.6.2 Translační funkce	17
1.3.7 Upřesňování struktury	18
1.4 Experimentální metody	19
1.4.1 Zdroje rentgenového záření	19
1.4.2 Detekce rentgenového záření	20
1.4.3 Difrakční experiment	21
<b>2 Výsledky</b>	<b>22</b>
2.1 Příprava krystalů	22
2.2 Rentgenová difrakce	23
2.3 Zpracování difrakčních dat	25
2.4 Molekulární nahrazení	25
2.5 Upřesňování dat	25
<b>3 Diskuze</b>	<b>29</b>
Diskuze	29
Závěr	33



# Úvod

Proteiny jsou makromolekuly skládající se z jednoho nebo více dlouhých řetězců aminokyslin. Jsou nezbytnou součástí všech živých organismů, ve kterých vykonávají nejrůznější funkce jako například funkce stavební, zásobní, či katalytické (enzymy). Obor zabývající se studiem prostorové struktury proteinů, která přispívá k pochopení vlastností a funkcí proteinů, se nazývá proteinová krystalografie.

Většina energie v živých organismech pochází z oxidačně-redukčních (tzv. redoxních) procesů, při kterých dochází k transportu elektronů a protonů ze substrátu k jejich akceptoru. Třída enzymů, které katalyzují redoxní reakce, se nazývá oxidoreduktázy. Oxidoreduktázy využívají kovalentně či nekovalentně navázanou malou molekulu např. flavinadeninukleotid (FAD) pro katalýzu redoxní reakce, při které molekula FAD přechází mezi redukovaným a oxidovaným stavem, který je spojený s její konformační změnou a schopností absorbovat určité vlnové délky. Oxidoreduktázy využívající FAD (nazývané FAD-dependentní oxidoreduktázy) katalyzují různé reakce v biologických procesech, jako jsou biodegradace, nebo biosyntéza.

Cílem této práce bylo seznámit se se základy proteinové krystalografie a aplikovat je na vzorek FAD-dependentní oxidoreduktázy z *Chaetomium thermophilum*, kde jsme se pomocí této metodiky zaměřili na studium konformačních změn flavinadeninukleotidu ve vzorku. Tento enzym má potenciální využití ve vysokoteplotních průmyslových odvětvích. Strukturní analýza oxidačně-redukčního procesu této oxidoreduktázy by mohla poskytnout nové informace, které by objasnili reakční mechanismus a specifitu enzymu, která nebyla doposud popsána.

# Kapitola 1

## Teoretická část

### 1.1 Oxidoreduktáza z *Chaetomium thermophilum*

#### 1.1.1 *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 využití v průmyslu a biotechnologických procesech, které vyžadují práci při vyšších teplotách [1].

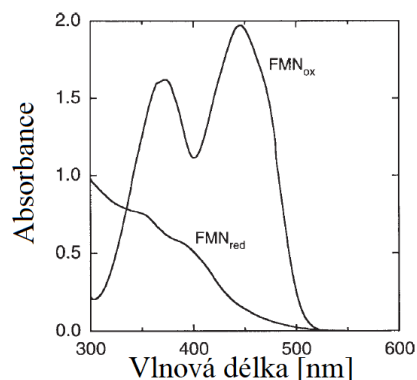
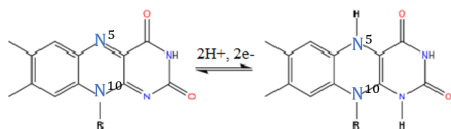
#### 1.1.2 Flavin-dependentní oxidoreduktázy

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 nízkomolekulovou látku nezbytnou pro funkci daného proteinu jako nikotinamidadeninindinukleotid (NAD<sup>+</sup>) nebo flavinadeninindinukleotid (FAD) v redoxní reakci [2].

Flavoproteiny jsou třída proteinů, obsahující FAD nebo flavinadeninmononukleotid (FMN), který je kovalentně či nekovalentně navázaný. Základ FAD tvoří heterocyklická isoalloxazinová struktura připojená k ribitolu, dvěma fosfátům, ribóze a adeninu. FAD se podílí na enzymatické reakci proteinu, při které přechází u oxidovaného stavu přijmutím dvou e<sup>-</sup> a dvou H<sup>+</sup> do redukovaného stavu (FADH<sub>2</sub>) a jejich odevzdáním zpět do oxidovaného stavu (Obr. 1.1) [2].

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<sup>5</sup> a N<sup>10</sup>. Dále je přechod mezi stavy doprovázen změnou schopnosti ab-

sorbovat vlnové délky v oblasti modrého a fialového světla (350 až 500 nm). Absorpční spektrum pro oxidovaný stav má typická maxima kolem 380-390 nm a 460 nm. Redukovaný stav tyto vlnové délky neabsorbuje (Obr. 1.2) [3].

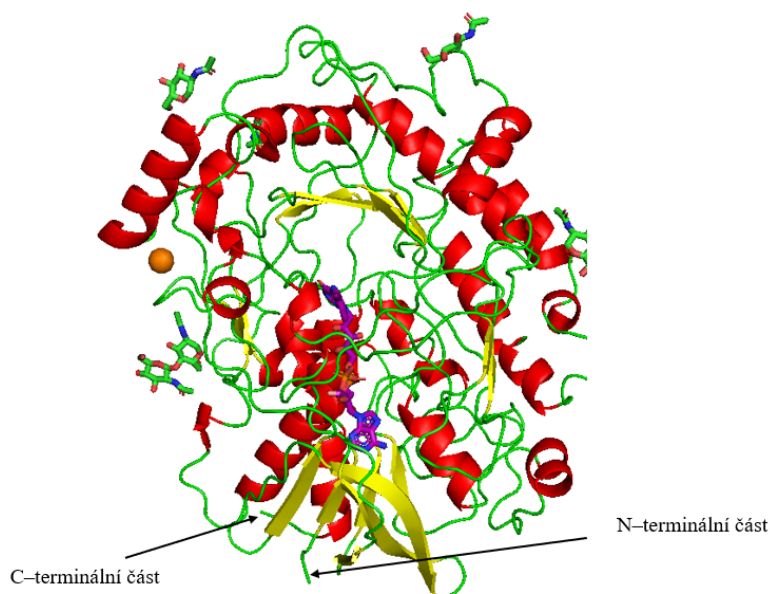


Obrázek 1.1: Redukce oxidovaného stavu isoalloxazinu (vlevo) do redukovaného stavu isoalloxazinu (vpravo)

Obrázek 1.2: Absorpční spektrum FMN a FAD v jeho oxidované a redukované formě

### 1.1.3 FAD-dependentní oxidoreduktáza z *Chaetomium thermophilum*

FAD-dependentní oxidoreduktáza z *Chaetomium thermophilum* (dále ChtFDO) je tvořena řetězcem 595 aminokyselin s relativní molekulovou hmotností 85 kDa, z čehož 17,5 kDa tvoří oligosacharidy. ChtFDO má 7 glykosylačních míst (místa s navázaným oligosacharidovým řetězcem) a nekovalentně vázaný kofaktor FAD. ChtFDO patří do rodiny glukóz-metanol-cholin oxidoreduktáz, jejíž enzymy obvykle katalyzují oxidaci primárních a sekundárních alkoholů, cukrů a sterolů a následnou redukci 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 [4].



Obrázek 1.3: Struktura molekuly ChtFDO (PDB: 6ZE2) v zobrazení sekundární struktury. Červeně jsou znázorněny  $\alpha$ -šroubovice, žlutě  $\beta$ -skládané listy. FAD ko-faktor (fialově) a navázané sacharidy (zeleně) jsou zobrazeny v tyčinkové reprezentaci. Ionť hořčíku (oranžově) je v kulové reprezentaci. Obrázek byl vytvořen pomocí softwaru PyMOL

## 1.2 Krystalizace proteinů

Makromolekulární krystalizace je experimentální proces založený na hledání vhodných podmínek pro nukleaci a následný růst krystalů. Je založena na rozmanité sadě zkušeností, myšlenek a principů. Neexistuje teorie ani ucelený základ, který by předpověděl, za jakých podmínek budou krystaly makromolekul růst. V důsledku toho je pěstování makromolekulárních krystalů empirická záležitost.

Princip krystalizace spočívá ve vytvoření přesyceného stavu v roztoku. Přesycení je nerovnovážný stav, kdy se část proteinu nachází nad hranicí rozpustnosti. Tohoto stavu se dá dosáhnout změnou určitých parametrů, např. změnou koncentrace proteinu, pH roztoku a dalších. Následná nukleace a vytvoření krystalů značí návrat rozpustné části zpět do nasyceného stavu.

Velmi rozšířená technika krystalizace proteinů je založena na difuzi par. Tato metoda využívá vypařování a difuzi těkavých látek krystalizační podmínky mezi rezervoárem, který obsahuje pufr, srážedlo a další látky pomáhající krystalizaci a kapkou, která obsahuje roztok rezervoáru naředěný roztokem proteinu. Podle konfigurace se tato metoda dělí na metodu visící kapky, sedící kapky nebo sendvičové kapky.

Při konfiguraci v podobě visící kapky je kapka obvykle o objemu 1–10  $\mu\text{l}$  nanasena

na krycí sklíčko, kterým se překryje jamka obsahující rezervoár o násobně vyšším objemu 0,5 - 1,0 ml. Odlišná koncentrace roztoků v kapce a v rezervoáru vede k difuzi těkavých látek z naředěné kapky do rezervoáru. Tento proces ustane při vyrovnání koncentrací složek v kapce a rezervoáru a způsobí vytvoření přesyceného stavu v roztoku a v kapce [5].

## 1.3 Makromolekulární krystalografie

Makromolekulární krystalografie je založena na difrakci – interakci vln záření s hmotou. Nejčastěji se používá rentgenové záření, jehož výhoda je v tom, že má vlnovou délku srovnatelnou s meziatomovými vzdálenostmi v krystalu. Méně často se v makromolekulární krystalografii používá záření elektronové nebo neutronové, která kladou nároky na velikost krystalu.

### 1.3.1 Rozptyl rentgenového záření

Při dopadu vlny rentgenového záření na nabitou částici (elektron nebo proton) dochází k rozptylu fotonů, při kterém buď nedochází k energetickým ztrátám – Thomsonův rozptyl nebo dochází k energetickým ztrátám – Comptonův rozptyl. Comptonův rozptyl probíhá vždy a je příčinou pozadí na difrakčním snímku.

V důsledku Thomsonova rozptylu rozkmitá dopadající rentgenové záření nabitě částice, které se stanou zdrojem sekundárního záření. Intenzita záření kmitajících nabitých částic ve vzdálenosti  $R$  je dána vztahem

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

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  $2\Theta$  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 rozptýleného záření nepřímo úměrná hmotnosti částice a hmotnost protonu je přibližně 1800-krát větší, než hmotnost elektronu, lze rozptyl na jádrech zanedbat [6].

### 1.3.2 Difrakce na krystalové mřížce

Nechť je krystalová mřížka popsána vektory  $\mathbf{a}$ ,  $\mathbf{b}$ ,  $\mathbf{c}$ . Tyto vektory pak určují polohu rozptylových center. V případě dopadu monochromatické rovinné vlny rentgenového záření na rozptylová centra krystalové mřížky dochází ke konstruktivní

interferenci rozptýlených vln při splnění Laueho podmínek

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

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. Při zavedení veličiny  $\mathbf{S} = \frac{\mathbf{k} - \mathbf{k}_0}{2\pi}$  nazývané rozptylový vektor a dosazení do rovnice 1.2 vyplyne, že difrakční podmínky splňují takové vektory  $\mathbf{S}$ , které jsou shodné 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. Difrakční záznam je tedy projekcí reciproké mřížky a indexy reflexí lze považovat za souřadnice v reciprokém prostoru.

Velikost vektoru  $\mathbf{H}_{hkl}$  je rovna převrácené hodnotě mezivrstevní vzdálenosti  $d_{hkl}$ . Z definice rozptylového vektoru pak tedy vyplývá

$$|\mathbf{H}_{hkl}| = \frac{1}{d_{hkl}} = |\mathbf{S}| = \frac{|\mathbf{k} - \mathbf{k}_0|}{2\pi} = \frac{|\mathbf{k}||\mathbf{n} - \mathbf{n}_0|}{2\pi} = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{|\mathbf{n} - \mathbf{n}_0|}{2\pi} = \frac{2\sin\Theta}{\lambda} \quad (1.3)$$

kde  $\mathbf{n}_0$  a  $\mathbf{n}$  jsou jednotkové směrové vektory vektorů  $\mathbf{k}_0$  a  $\mathbf{k}$ , které spolu svírají úhel  $2\Theta$ . Rovnice 1.3 se nazývá Braggova rovnice a zapisuje se ve tvaru

$$2d_{hkl}\sin\Theta = \lambda \quad (1.4)$$

Pokud je objekt, na který dopadá monochromatická vlna rentgenového záření, složený z  $n$  rozptylových center, jejichž schopnost rozptylovat rentgenového záření je popsána rozptylovou schopností  $f_j$ , a které jsou určeny polohovými vektory  $\mathbf{r}_j$ , lze definovat vztah

$$F(\mathbf{S}) = \sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_j} \quad (1.5)$$

který vyjadřuje celkovou amplitudu rozptylu daného objektu. Rozptylové centrum může být nabitá částice (elektron, proton), atom, molekula apod.

Pokud je prostředí rozptylových center spojitě, lze přejít od sčítání ve vztahu 1.5 k integraci přes objem objektu. Zavede se přitom veličina elektronová hustota  $\rho(\mathbf{r})$ , která vyjadřuje počet elektronů v rozptylujícím objemu  $dV$  a vztah 1.5 přejde na tvar

$$F(\mathbf{S}) = \int_V \rho(\mathbf{r}) e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} dV = \mathcal{F}[\rho(\mathbf{r})] \quad (1.6)$$

kde  $\mathcal{F}[\cdot]$  je operátor Fourierovy transformace [7].

### 1.3.3 Fázový problém

Krystalová struktura makromolekuly je charakterizovaná funkcí elektronové hustoty  $\rho(\mathbf{r})$ , která lze získat Fourierovou transformací strukturního faktoru

$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} |F(\mathbf{h})| e^{-2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{r} + i \alpha(\mathbf{h})} \quad (1.7)$$

kde  $\mathbf{r} = (x, y, z)$  jsou souřadnice v základní buňce,  $V$  je objem základní buňky,  $F(\mathbf{h})$  je strukturní faktor amplitudy reflexí  $\mathbf{h} = (h, k, l)$  a  $\alpha(\mathbf{h})$  jsou fázové úhly. Z difrakčního experimentu jsou změřeny intenzity rozptýleného rentgenového záření, které jsou úměrné kvadrátu absolutní hodnoty strukturní amplitudy  $I(\mathbf{h}) \sim |F(\mathbf{h})|^2$ , čímž je informace o fázových úhlech ztracena. Existuje několik metod pro výpočet těchto fází např. metoda molekulárního nahrazení, metoda izomorfního nahrazení nebo metoda anomálního rozptylu [8].

### 1.3.4 Pattersonova funkce

Pattersonova funkce je definována jako inverzní Fourierova transformace kvadrátu absolutní hodnoty strukturního faktoru [8]

$$P(\mathbf{u}) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} |F(\mathbf{h})|^2 e^{-2\pi i \mathbf{u} \cdot \mathbf{h}} \quad (1.8)$$

kde  $\mathbf{u} = (u, v, w)$  jsou relativní souřadnice v Pattersonově mapě. Pattersonovu funkci lze tedy vypočítat jen na základě znalosti velikosti intenzit  $I(\mathbf{h}) \sim |F(\mathbf{h})|^2$  z difrakčního experimentu. Lze navíc ukázat, že Pattersonova funkce  $P(\mathbf{u})$  je konvolucí elektronových hustot  $\rho(\mathbf{r})$  a  $\rho(-\mathbf{r})$ :

$$P(\mathbf{u}) = \rho(\mathbf{r}) * \rho(-\mathbf{r}) = \int_V \rho(\mathbf{r}) \rho(\mathbf{r} + \mathbf{u}) d\mathbf{r} \quad (1.9)$$

Ze vztahu 1.8 vyplývá několik vlastností Pattersonovy funkce:

- Maxima této funkce odpovídají všem možným meziatomovým vektorům spojujícím atomy v elementární buňce
- Její periodičita je stejná jako periodičita funkce elektronové hustoty

### 1.3.5 Zpracování difrakčních dat

Zpracování difrakčních snímků může být rozděleno na čtyři hlavní kroky [9]:

- Hledání reflexí a jejich indexace, přičemž se určí orientace krystalu, počáteční odhad mřížkových parametrů a také odhad symetrie krystalové mřížky

- Upřesňování parametrů, které vzniknou nepřesnostmi v mechanickém nastavení experimentu (vzdálenost detektoru od krystalu, divergence rentgenového svazku, orientace os detektoru a krystalu)
- Integrace neboli určení intenzit nalezených reflexí, která je velmi závislá na použitém detektoru. Tento krok je ovlivněn např. určením správných reflexí na snímcích, odečtením pozadí způsobeného nepružným rozptylem
- Škálování dat z integračního kroku, které z různých fyzikálních důvodů (radiační poškození krystalu, nekonzistentně ozářený objem krystalu v důsledku precese, anizotropní pohlcování rentgenového záření atd.) nejsou rovnoměrná

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 [10] (součást softwarového balíku CCP4 [11], škálování probíhá programem AIMLESS [12]), HKL2000 [13] a XDS [14] (který provádí integraci i škálování)

Jako indikátory kvality zpracovaných dat byla zavedena spousta statistik. Nejčastěji používanými statistikami v současnosti jsou  $R_{\text{merge}}$ ,  $R_{\text{meas}}$  a  $I/\sigma_I$ , které jsou definovány vztahy [15]:

$$R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{\mathbf{h}} \sum_{i=1}^{N_{\mathbf{h}}} |I_{i,\mathbf{h}} - \bar{I}_{\mathbf{h}}|}{\sum_{\mathbf{h}} \sum_{i=1}^{N_{\mathbf{h}}} I_{i,\mathbf{h}}} \quad (1.10)$$

$$R_{\text{meas}} = \frac{\sum_{\mathbf{h}} \sqrt{\frac{N_{\mathbf{h}}}{N_{\mathbf{h}}-1}} \sum_{i=1}^{N_{\mathbf{h}}} |I_{i,\mathbf{h}} - \bar{I}_{\mathbf{h}}|}{\sum_{\mathbf{h}} \sum_{i=1}^{N_{\mathbf{h}}} I_{i,\mathbf{h}}} \quad (1.11)$$

$$I/\sigma_I = \frac{1}{N} \sum_{\mathbf{h}} \frac{|I_{\mathbf{h}}|}{\sigma(I_{\mathbf{h}})} \quad (1.12)$$

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 jednotlivou intenzitu reflexe  $(h, k, l)$ ,  $\bar{I}_{\mathbf{h}}$  je průměrná intenzita reflexe  $(h, k, l)$  a  $\sigma(I_{\mathbf{h}})$  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  $I_i$  a  $J_i$

$$CC_{1/2} = \frac{\sum_{i=1}^{N/2} (I_i - \bar{I})(J_i - \bar{J})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{N/2} (I_i - \bar{I})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^{N/2} (J_i - \bar{J})^2}} \quad (1.13)$$



### 1.3.6 Molekulární nahrazení

Metoda molekulárního nahrazení je metoda řešení fázového problému využívající struktury známé molekuly, které je podobná zkoumané molekule. Tato metoda vychází z pozorování že proteiny, které mají podobnou sekvenci aminokyselin mají podobný způsob poskládání jejich polypeptidických řetězců. Metoda molekulárního nahrazení se hlavně používá při řešení nových struktur, které mají alespoň podstatnou část řetězce dostatečně podobnou řetězci některé ze známých molekul [8]. Navíc je metoda molekulárního nahrazení užitečná při určování struktur zmutovaných forem proteinů nebo struktur proteinů s ligandy.

Princip této metody spočívá v umístění známé molekuly do správných orientací a pozic základní buňky krystalu zkoumané molekuly. Proces se skládá z hledání šestice neznámých proměnných – třech rotačních a třech translačních

$$\mathbf{x}' = \mathbf{C}\mathbf{x} + \mathbf{t} \quad (1.14)$$

kde  $\mathbf{C}$  je rotační matice otáčející souřadnice  $\mathbf{x}$  do nové orientace  $\mathbf{x}'$  a  $\mathbf{t}$  je vektor translace.

V principu je možné hledat optimální hodnoty všech proměnných najednou, ale vzhledem k dimenzi problému je úloha výpočetně náročná. V praxi proto bývá obvyklé rozdělit úlohu na dvě části a nejprve hledat rotační matici bez znalosti translačního vektoru a translaci počítat až poté.

#### 1.3.6.1 Rotační funkce

První část metody molekulárního nahrazení spočívá v nalezení úhlových vztahů mezi daty ze zkoumané molekuly a známou modelovou molekulou (tzv. cross-rotační funkce).

Určení míry překryvu pattersonovských funkcí se definuje pomocí rotační funkce [8]  $R(\mathbf{C})$

$$R(\mathbf{C}) = \int_U P_O(\mathbf{u})P_M(\mathbf{C}\mathbf{u})d\mathbf{u} \quad (1.15)$$

kde  $U$  je objem Pattersonovy mapy,  $P_O(\mathbf{u})$  je Pattersonova funkce počítaná ze znalosti intenzit z difrakčního experimentu a  $P_M(\mathbf{C}\mathbf{u})$  je Pattersonova funkce modelu s otočenými souřadnicemi. Funkce nabývá maxima při největším překryvu Pattersonových funkcí, což odpovídá správné orientaci modelové molekuly.

#### 1.3.6.2 Translační funkce

Další část metody molekulárního nahrazení spočívá v určení pozice známé molekuly v známé mříži. Posun struktury způsobí v případě obecné prostorové grupy

změnu mezimolekulárních meziatomových vektorů, a tedy i změnu hodnot Pattersonovy funkce. Problém hledání správného posunu je tedy velmi podobný předchozí části této metody (viz. 1.3.6.1).

Míra překryvu je podobná rotační funkci a je definována translační funkcí  $T(\mathbf{t})$

$$T(\mathbf{t}) = \int_V P_O(\mathbf{u})P_{ij}(\mathbf{u}, \mathbf{t})d\mathbf{u} \quad (1.16)$$

kde  $V$  je objem základní buňky a  $P_{ij}(\mathbf{u})$  je Pattersonova funkce zkoumané a modelové molekuly

$$P_{ij}(\mathbf{u}) = \int_V \rho_i(\mathbf{r})\rho_j(\mathbf{r} + \mathbf{u})d\mathbf{r} \quad (1.17)$$

Vztah 1.16 lze dosazením vztahů 1.7 a 1.17 a odečtením Pattersonových vektorů upravit na tvar

$$T(\mathbf{t}) = \sum_{\mathbf{h}} \left( |F_O(\mathbf{h})|^2 - \sum_{n=1}^Z |F_{M,n}(\mathbf{h})|^2 \right) F_M(\mathbf{h})F_M^*(\mathbf{h}\mathbf{C}')e^{-2\pi i\mathbf{h}\cdot\mathbf{t}} \quad (1.18)$$

kde  $F_O(\mathbf{h})$  je strukturální faktor určen z intenzit naměřených při difrakčním experimentu,  $F_M(\mathbf{h})$  je strukturální faktor modelové molekuly,  $\mathbf{C}'$  je matice rotace a  $Z$  je počet molekul v základní buňce [8].

### 1.3.7 Upřesňování struktury

Po umístění modelové molekuly do určované struktury se určí první strukturální faktory. Tyto prvotní strukturální faktory mají obecně malou shodu s experimentálními strukturálními faktory. Indikátory shody mezi vypočítanými a experimentálními strukturálními faktory jsou reprezentovány např. pomocí  $R$ -faktoru mezi  $F_O$  a  $F_C$

$$R = \frac{\sum_{\mathbf{h}} \left| |F_O(\mathbf{h})| - k|F_C(\mathbf{h})| \right|}{\sum_{\mathbf{h}} |F_O(\mathbf{h})|} \quad (1.19)$$

kde  $F_O$  je strukturální faktor pozorovaný z experimentu,  $F_C$  je strukturální faktor vypočítaný na základě strukturálního modelu a  $k$  je škálovací faktor [15]. Kvůli velkému počtu upřesňovaných parametrů (souřadnice atomů a jejich teplotní faktory) se musí  $R$ -faktor ověřovat, aby nebyl ovlivněn upřesňovacím procesem. Z celého setu naměřených reflexí se vybere náhodně 5-10 % reflexí, které tvoří testovací soubor reflexí. Zbytek reflexí se pak nazývá pracovní soubor reflexí. Tyto dva soubory jsou nekorelované. Upřesňování se pak provádí jen vůči pracovnímu souboru

reflexí. Vzniknou tedy dva  $R$ -faktory:  $R_{\text{free}}$  (vztažený vůči testovacímu souboru reflexí) a  $R_{\text{work}}$  (vztažený vůči pracovnímu souboru reflexí) [16]. Další indikátor shody může být např. Pearsonův korelační koeficient  $CC$  mezi  $F_O$  a  $F_C$

$$CC = \frac{\sum_{\mathbf{h}} \left( |F_O(\mathbf{h})|^2 - \overline{|F_O(\mathbf{h})|^2} \right) \left( |F_C(\mathbf{h})|^2 - \overline{|F_C(\mathbf{h})|^2} \right)}{\sqrt{\sum_{\mathbf{h}} \left( |F_O(\mathbf{h})|^2 - \overline{|F_O(\mathbf{h})|^2} \right)^2 \sum_{\mathbf{h}} \left( |F_C(\mathbf{h})|^2 - \overline{|F_C(\mathbf{h})|^2} \right)^2}} \quad (1.20)$$

Obecně lze říct, že s rostoucí shodou mezi  $F_O$  a  $F_C$  hodnota  $R_{\text{work}}$  a  $R_{\text{free}}$  klesá a hodnoty korelačního koeficientu  $CC$  rostou. Pro náhodný strukturní model odpovídá  $R_{\text{work}}$  hodnotě 0,59, po upřesňujících procesech lze dosáhnout hodnoty  $R_{\text{work}}$  mezi 0,1 a 0,2. Výsledným kritériem vyřešení fázového problému je výsledná podoba elektronové hustoty (tzn. elektronová hustota je interpretovatelná jako proteinová struktura) a úspěšnost upřesnění struktury [8].

Upřesňování struktury spočívá v úpravách modelu. Upřesňovanými parametry jsou souřadnice každého atomu v základní buňce a jejich teplotní faktory. Těmto parametrům odpovídají v reciprokém prostoru absolutní hodnoty strukturního faktoru jednotlivých reflexí  $|F_C(\mathbf{h})|$  a jejich fáze  $\alpha(\mathbf{h})$ .

Upřesnění strukturního modelu lze provést v přímém i reciprokém prostoru. Obvykle se upřesňuje v prostoru reciprokém pomocí metody nejmenších čtverců nebo metody největší pravděpodobnosti. Metoda nejmenších čtverců minimalizuje funkci

$$Q = \sum_{\mathbf{h}} w_{\mathbf{h}} (|F_O(\mathbf{h})| - |F_C(\mathbf{h})|)^2 \quad (1.21)$$

kde  $w_{\mathbf{h}}$  je váhový faktor,  $|F_O(\mathbf{h})|$  je fixní parametr pro tuto metodu a varíují se vypočítané hodnoty  $|F_C(\mathbf{h})|$ . Tato metoda je omezená svým použitím: jsou potřeba naměřená data do vysokého rozlišení kolem 1 Å. Metoda nejmenších čtverců je implementována např. v softwarovém balíčku SHELX.

Metoda největší pravděpodobnosti (Maximum Likelihood Method) je zobecnění metody nejmenších čtverců s větším poloměrem konvergence. Díky této vlastnosti má metoda největší pravděpodobnosti menší tendenci konvergovat do lokálních minim. Tato metoda je implementována např. v programu REFMAC5 [17] nebo Phenix.refine [18].

## 1.4 Experimentální metody

### 1.4.1 Zdroje rentgenového záření

Zdroje rentgenového záření se obecně dělí na konvenční a synchrotronové. Mezi konvenční zdroje patří rentgenka, rotační rentgenka nebo zdroje s tekutou anodou. Princip generování rentgenového záření je u těchto zařízení podobný, rozdíl

mezi těmito zdroji je v odvodu tepla generovaného na anodě. Mezi katodu a anodu je vložen rozdíl potenciálů řádově  $10^4$  V a následně je katoda rozžhavana elektrickým proudem. To způsobí generování elektronů, které v důsledku napětí dopadají na anodu. Rentgenové záření vznikne právě při interakci elektronů s atomy anody.

Interakce elektronů s atomy anody může proběhnout dvěma způsoby. Při prvním způsobu jsou elektrony v elektrickém poli anody zbrzděny a energie elektronů se tedy neztratí najednou při jedné srážce, ale při více srážkách, což způsobí vznik spojitého spektra záření. Pokud mají elektrony dostatečnou energii, mohou uvolnit elektrony z vnitřních energetických hladin, jejichž místo obsadí elektron z vyšší energetické hladiny za vyzáření přebytečné energie v podobě fotonu. Při této interakci vzniká charakteristické spektrum záření, které je důsledkem diskrétních energetických hladin v atomech [7].

Zdroje s tekutou anodou fungují na stejném principu, jako rentgenka, avšak jako terč je použitý tekutý kov. Tento kov je slitinou např. galia, india a dalších příměsí. Tekutý kov obíhá v uzavřeném okruhu rychlostí až 75 m/s, což umožňuje chladit anodu účinněji než u rotační rentgenky, a tudíž dosáhnout větších intenzit záření. Hlavní výhodou zdroje s tekutou anodou je, že fokusační plocha na anodě je malá a soustředí se na ní vysoký tok elektronů. Výsledný svazek rentgenového záření se pak lépe zpracovává do intenzivních tenkých svazků.

Synchrotronové záření se generuje na synchrotronech – kruhových urychlovačích částic. Synchrotronové záření vzniká při pohybu nabitých částic (elektron či pozitron) relativistickými rychlostmi po kruhové dráze v magnetickém poli definovaném například sérií elektromagnetů. V důsledku pohybu po zakřivené trajektorii v magnetickém poli emitují nabitě částice záření v tečném směru k dráze částic. Výhoda tohoto záření tkví ve vysoké intenzitě v široké spektrální oblasti. Vlnová délka tohoto záření může být v infračerveném až rentgenovém oboru ( $10^3$  až  $10^{-2}$  nm). Rentgenová část synchrotronového záření dosahuje intenzit o 3 až 6 řádů vyšší než u běžných rentgenek [6].

## 1.4.2 Detekce rentgenového záření

V minulosti bylo pro detekci rentgenového záření vyvinuto spousta zařízení, která využívaly různé fyzikální principy (např. fotografické filmy, fluorescenční stínítka, ionizační komory). Pro účely proteinové krystalografie, kde je potřeba zaznamenat velké množství dat v průběhu co nejkratší doby se používají plošné polovodičové detektory typu CCD, CMOS, PAD nebo CPAD.

Princip CCD detektorů je založený na fotoefektu. Dopadající fotony rozptýleného rentgenového záření dopadají na stínítka, které vytvoří viditelné záření, jehož fotony následně uvolní záporně nabitě elektrony z atomů křemíku uvnitř CCD čipu. Kladně nabitá elektroda, která je umístěná pod každým pixelem zachycuje takto uvolněné elektrony. Po naměření celého snímku jsou nahromaděné elektrické náboje z jednotlivých pixelů v jednom řádku CCD čipu převedeny na elektrický proud, který je zkonvertován na digitální signál.

Na rozdíl od CCD čipů, kde je signál přenášen z pixelu na pixel a poté převe-

den na napětí, CMOS čipy transformují signál na napětí přímo uvnitř každého pixelu. U CMOS čipů není potřeba stínítka, rentgenové záření přímo dopadá na oddělné pixely polovodiče a čítač rovnou počítá pulsy nad kritickou hodnotou napětí (proudu), které se vygeneruje. Tyto detektory mají velkou citlivost a velkou rychlost vyčítání [19].

### 1.4.3 Difrakční experiment

Krystaly makromolekul jsou oproti krystalům nízkomolekulárních látek problematictější na měření difrakčních dat. Krystaly makromolekul mají větší bázi (10-krát až 1000-krát více atomů), které vedou k větším mřížkovým parametrům. Reciproká mříž je tedy velmi hustě obsazena. Při ozáření krystalu makromolekuly rentgenovým zářením jsou průměrné naměřené intenzity menší a jejich počet je větší než při ozařování krystalu nízkomolekulární látky.

Pro měření dat z krystalů se používá monokrystalový difraktometr. Skládá se ze zdroje rentgenového záření, goniometru, detektoru a dalších příslušenství (usměrňovač proudu par tekutého dusíku). 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. Primární svazek je ze zdroje usměrňován kolimátorem.

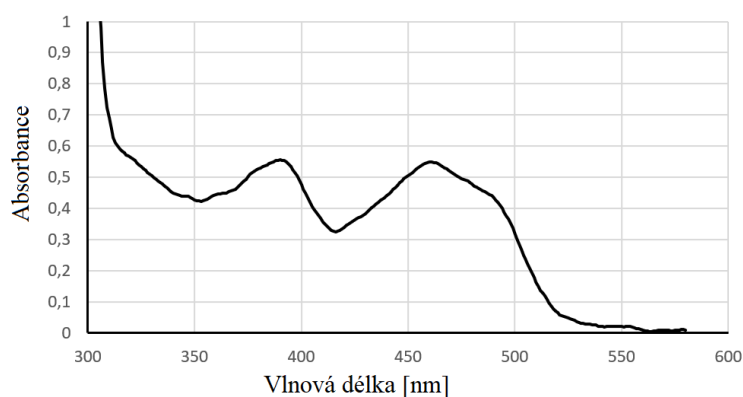
# Kapitola 2

## Výsledky

### 2.1 Příprava krystalů

Endoglykosydáza F1 (Endo F1) štěpící mezi dvěma N-acetyl-D-glukosaminovými (GlcNAc) skupinami byla použita k rozštěpení polysacharidových řetězců v ChtFDO. Reakční směs byla připravena podle instrukcí uvedených na webových stránkách firmy Sigma-Aldrich [20]. 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 Nanasep 10K s mezní hodnotou molekulární hmotnosti 10 kDa (Pall Corporation).

S 1,2  $\mu$ l deglykosylovaným vzorkem ChtFDO o koncentraci 9,2 mg/ml v pufru 25 mM Tris-HCl pH 7,5 a 100 mM NaCl byla provedena ultrafialovo-viditelná spektroskopie použitím spektrofotometru DeNovix DS-11. Měření proběhlo při pokojové teplotě a od výsledného spektra bylo odečteno spektrum pufru. Dvě maxima ve spektru při vlnových délkách 390 a 460 nm odpovídají oxidovanému stavu vzorku v roztoku (Obr. 2.1).

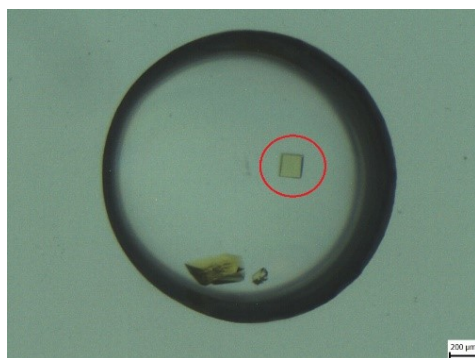


Obrázek 2.1: Absorbční spektrum deglykosylovaného vzorku ChtFDO o koncentraci 9,2 mg/ml v pufru 25 mM Tris-HCl pH 7,5 a 100 mM

Krystalizace ChtFDO byla realizována při teplotě 20 °C metodou difuze par v

uspořádání visící kapky. Byla nasazena deska s 24 jamkami a koncentrací proteinu 9,2 mg/ml.

Krystaly proteinu vyrostly ve dvou krystalizačních podmínkách - 0,15 M mravenčan hořčnatý, 0,1 M octan sodný pH 5,5, 18 % w/v polyethylenglykol (dále PEG) 5000 (Obr. 2.2) a 0,21 M mravenčan hořčnatý, 0,1 M octan sodný pH 5,5, 15 % w/v PEG 5000 (Obr. 2.3) [4].



Obrázek 2.2: Krystaly ChtFDO ve tvaru kvádrů vypěstované v podmínce 0,15 M mravenčan hořčnatý, 0,1 M octan sodný pH 5,5, 18 % w/v PEG 5000, protein o koncentraci 9,2 mg/ml. Označený krystal byl následně použitý pro difrakční experiment. Úsečka odpovídá délce 200  $\mu\text{m}$

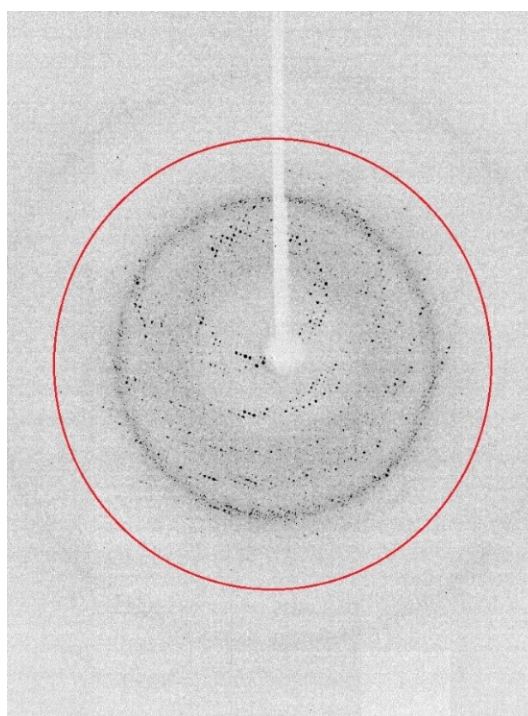


Obrázek 2.3: Krystaly ChtFDO ve tvaru kvádrů vypěstované v podmínce 0,21 M mravenčan hořčnatý, 0,1 M octan sodný pH 5,5, 15 % w/v PEG 5000, protein o koncentraci 9,2 mg/ml

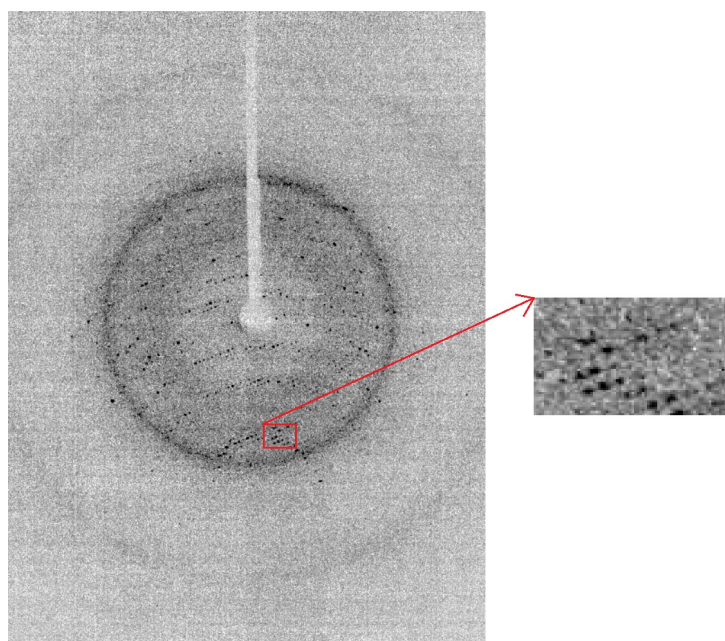
## 2.2 Rentgenová difrakce

Měření difrakčních dat proběhlo pomocí monokrystalového difraktometru v Centru molekulární struktury (CMS), které je součástí Biotechnologického ústavu AV ČR ve Vestci. K difrakci byl použit označený krystal ChtFDO z Obr 2.2. Sběr dat proběhl za teploty 100 K na difraktometru D8 Venture (Bruker) s použitím zdroje s tekutou anodou MetalJet D2 (Excillum) a CPAD detektorem Photon II. Byla použita  $\phi$  scan metoda sběru dat s oscilačním úhlem  $0,1^\circ$  a expoziční dobou 2 s na snímek. Vlnová délka použitého záření byla 0,13418 nm, vzdálenost krystalu od detektoru byla 80 cm.

Bylo získáno 6965 snímků. Difrakční maxima jsou viditelné do difrakčního limitu (rozlišení) 2,2 Å (Obr. 2.4).



Obrázek 2.4: Difrakční snímek změřený při úhlu  $\phi = 1^\circ$  krystalu ChtFDO vypěstovaného v krystalizační podmínce 0,15 M mravenčan hořčnatý, 0,1 M octan sodný pH 5,5, 18 % w/v PEG 5000, protein o koncentraci 9,2 mg/ml. Kružnice představuje rozlišení 2,2 Å



Obrázek 2.5: Difrakční snímek změřený při úhlu  $\phi = 240^\circ$  krystalu ChtFDO vypěstovaného v krystalizační podmínce 0,15 M mravenčan hořčnatý, 0,1 M octan sodný pH 5,5, 18 % w/v PEG 5000, protein o koncentraci 9,2 mg/ml. Na difrakčním snímku lze pozorovat difrakce od dvou krystalových mřížek



## 2.3 Zpracování difrakčních dat

Soubor difrakčních snímků byl zpracován v programu XDS a následně rozdělen na šest částí (sektor 1 - sektor 6) po 1200 snímcích. Každá tato část byla zpracovávána zvlášť softwarem AIMLESS. Všech šest souborů dat bylo zpracováno s difrakčním limitem 2,6 Å. Kritérium pro výběr tohoto difrakčního limitu byla celková kompletnost dat alespoň 90 % a hodnota korelačního koeficientu  $CC_{1/2}$  alespoň 0,3 ve slupce s nejvyšším rozlišením. Statistiky ze zpracování dat jsou uvedeny v Tabulkách 2.1 a 2.2. Sektory 3 a 6 mají nedostatečnou kompletnost a malé hodnoty parametru  $CC_{1/2}$  ve slupce s nejvyšším rozlišením. Pro upřesňování tedy nebudou dále použity.

## 2.4 Molekulární nahrazení

Určení přibližného počtu molekul v asymetrické jednotce je nezbytný předpoklad pro úspěšné molekulární nahrazení. Toto číslo se počítá pomocí procentuálního obsahu rozpouštědla v asymetrické jednotce, který je u proteinových krystalů 20-80 % [8]. Z analýzy obsahu buňky pomocí speciálního softwaru `matthews_coef` z programového balíku CCP4 bylo určeno, že asymetrická jednotka obsahuje jedinou molekulu ChtFDO a relativní objem rozpouštědla je 45 %. Molekulární nahrazení bylo provedeno pomocí softwaru PHASER za použití zpracovaných dat ze sektoru 1. Jako modelová struktura byla použita již vyřešená nepublikovaná struktura ChtFDO [4]. Finální hodnota parametru úspěšnosti molekulárního nahrazení LLG (Log-likelihood gain) byla 324, což znamená úspěšný průběh molekulárního nahrazení [22]. Výstupní model proteinu z molekulárního nahrazení byl upřesněn a doplněn molekulami vody, iontů a molekulami sacharidu GlcNAc (pozůstatek po deglykosylaci), které byly modelovány do maxim map diferenční ( $mF_O - DF_C$ ) elektronové hustoty.

## 2.5 Upřesňování dat

Pro upřesnění souřadnic atomů a jejich  $B$ -faktorů vůči datům jednotlivých sektorů byl použit software REFMAC5. Jako vstupní parametry byly použita experimentální data zpracovaná softwarem AIMLESS z 2.3 a upravený model z molekulárního nahrazení z 2.4. Při upřesňování nebyl použit parametr  $R_{\text{free}}$  kvůli nízkému poměru unikátních reflexí k počtu souřadnic atomů a  $B$ -faktorů. Počet cyklů upřesňování byl odhadnut na hodnotu 35, při které hodnoty  $R$ -faktorů všech sektorů konvergovaly. Statistiky z upřesňování struktur jsou uvedeny v Tabulce 2.3.

Tabulka 2.1: Statistické hodnoty zpracovaných difrakčních dat prvních tří sektorů. Hodnoty v závorkách odpovídají hodnotám ve sloupci s nejvyšším rozlišením

	Sektor 1	Sektor 2	Sektor 3
Čas expozice [s]	0 - 2 400	2 400 - 4 800	4 800 - 7 200
Difrakční limit [Å]	50,00 - 2,59 (2,71 - 2,59)	50,00 - 2,59 (2,71 - 2,59)	50,00 - 2,60 (2,71 - 2,60)
Prostorová grupa	$P 2_1 2_1 2_1$ a = 47,07; b = 110,30; c = 116,65 $\alpha = 90,00$ ; $\beta = 90,00$ ; $\gamma = 90,00$	$P 2_1 2_1 2_1$ a = 47,07; b = 110,30; c = 116,65 $\alpha = 90,00$ ; $\beta = 90,00$ ; $\gamma = 90,00$	$P 2_1 2_1 2_1$ a = 47,07; b = 110,30; c = 116,65 $\alpha = 90,00$ ; $\beta = 90,00$ ; $\gamma = 90,00$
Parametry základní buňky [Å, °]	63 818 (2 512)	71 011 (1 925)	58 038 (1 911)
Počet pozorovaných reflexí	17 438 (1 448)	17 164 (1 696)	16 656 (1 191)
Počet nezávislých reflexí	91,8 (64,1)	90,3 (74,7)	87,8 (53,8)
Kompletnost [%]	3,7 (1,7)	4,1 (2,6)	3,5 (1,6)
Redundance	0.472	0.472	0.472
Mozaicita [°]	0,933 (0,387)	0,929 (0,269)	0,870 (0,182)
$CC_{1/2}$	13,54	17,03	15,25
Wilsonův B-faktor [Å <sup>2</sup> ]	3,3 (0,8)	2,9 (0,8)	2,3 (0,6)
$I/\sigma_I$	0,383 (0,828)	0,432 (0,988)	0,599 (0,970)
$R_{\text{meas}}$	0,334 (0,638)	0,382 (0,817)	0,521 (0,731)
$R_{\text{merge}}$			

Tabulka 2.2: Statistické hodnoty zpracovaných difrakčních dat dalších třech sektorů. Hodnoty v závorkách odpovídají hodnotám ve sloupci s nejvyšším rozlišením

	Sektor 4	Sektor 5	Sektor 6
Čas expozice [s]	7 200 - 9 600	9 600 - 12 000	12 000 - 13 930
Difrakční limit [Å]	50,00 - 2,59 (2,71 - 2,59)	50,00 - 2,59 (2,72 - 2,59)	50,00 - 2,60 (2,72 - 2,60)
Prostorová grupa	$P 2_1 2_1 2_1$	$P 2_1 2_1 2_1$	$P 2_1 2_1 2_1$
Parametry základní buňky [Å, °]	a = 46.52; b = 109.49; c = 116.04 $\alpha$ = 90,00; $\beta$ = 90,00; $\gamma$ = 90,00	a = 46.52; b = 109.49; c = 116.04 $\alpha$ = 90,00; $\beta$ = 90,00; $\gamma$ = 90,00	a = 46.52; b = 109.49; c = 116.04 $\alpha$ = 90,00; $\beta$ = 90,00; $\gamma$ = 90,00
Počet pozorovaných reflexí	62 475 (2 371)	73 563 (4 891)	41 989 (1 076)
Počet nezávislých reflexí	17 267 (1 411)	17 206 (1 723)	14 607 (893)
Kompletnost [%]	91,0 (62,3)	90,4 (75,6)	80,3 (40,5)
Redundance	3,6 (1,7)	4,3 (2,8)	2,8 (1,2)
Mozaicita [°]	0.508	0.508	0.508
$CC_{1/2}$	0,918 (0,303)	0,933 (0,351)	0,812 (0,267)
Wilsonův B-faktor [Å <sup>2</sup> ]	13,30	18,40	18,07
$I/\sigma_I$	3,1 (0,7)	2,9 (0,8)	1,9 (0,5)
$R_{meas}$	0,412 (0,887)	0,438 (1,061)	0,640 (1,062)
$R_{merge}$	0,358 (0,681)	0,389 (0,892)	0,542 (0,767)

Tabulka 2.3: Statistiky dat po 35 cyklech upřesňování na jednotlivých sektorech

	Sektor 1		Sektor 2		Sektor 4		Sektor 5	
	Původní	Finální	Původní	Finální	Původní	Finální	Původní	Finální
R-faktor	0,252	0,243	0,284	0,265	0,263	0,256	0,284	0,258
Odchyłka od ideální vazebné délky [Å]	0,011	0,008	0,011	0,006	0,012	0,008	0,012	0,007
odchyłka od ideálního vazebného úhlu [°]	1,503	1,618	1,503	1,621	1,504	1,622	1,504	1,750

# Kapitola 3

## Diskuze

Před zahájením krystalizace bylo naměřeno absorpční spektrum deglykosylovaného vzorku ChtFDO o koncentraci 9,2 mg/ml v pufru 25 mM Tris-HCl pH 7,5 a 100 mM. Z tvaru absorpčního spektra bylo určeno, že se protein nachází v oxidovaném stavu v roztoku. Z procesu krystalizace následně vyrostly krystaly žluté barvy, které naznačují, že protein v krystalové formě do následného difrakčního experimentu vstupuje v oxidovaném stavu.

Difrakční experiment s krystalem ChtFDO byl proveden na domácím zdroji rentgenového záření. Tento experiment byl původně plánovaný jako synchrotronový projekt, který se ale nemohl v daném termínu uskutečnit vzhledem k okolnostem (omezení vyplývající z COVID-19 pandemie). Difrakční experiment na domácím zdroji záření byl původně plánován na získání 36 000 difrakčních snímků odpovídajících deseti 360° rotacím krystalu. Kvůli technickým komplikacím na stroji D8 Venture bylo získáno 6965 snímků, které odpovídají jedné 360° rotaci krystalu a 336,5° rotaci krystalu.

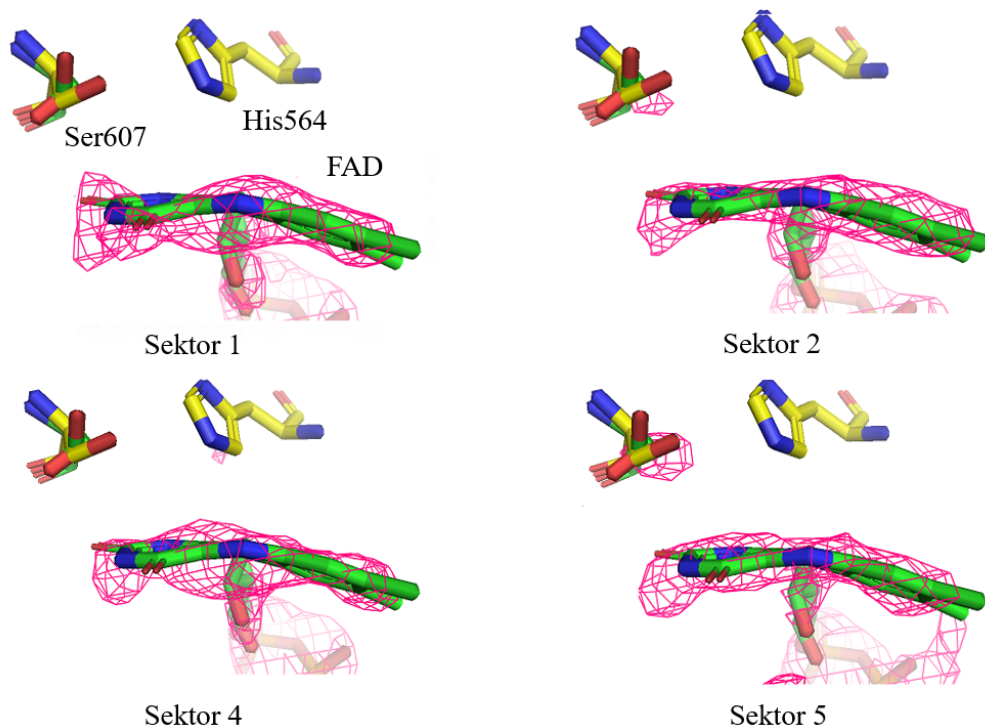
Difrakční data naměřená na domácím zdroji byla následně zpracována s difrakčním limitem 2,6 Å v programech XDS a AIMLESS. Difrakční data byla následně rozdělena na šest stejně velkých sektorů, které odpovídaly rotaci krystalu o 120° v difrakčním experimentu. Kvalita dat těchto sektorů (Tabulka 2.1 a 2.2) není vhodná pro určování struktury, ale záměrem experimentu bylo z co minimální expozice krystalu získat náhled na aktivní místo proteinu bez ovlivnění oxidačního stavu kofaktoru zářením. Data z těchto sektorů mají celkovou kompletnost alespoň 90 % (parametr pro volbu difrakčního limitu a rozdělení sektorů) a jejich hodnota  $I/\sigma_I$  je přijatelná (v nejhorších případech je v blízkosti 1,0, i v takových případech se ale ukazuje, že data s těmito hodnotami mohou přispívat při upřesňování).

Z analýzy zpracovaných dat uvedených v Tabulce 2.1 a 2.2 vyplývá, že kvalita dat je závislá na orientaci krystalu, což je zřejmé z porovnání sektorů 1 a 4, 2 a 5 a 3 a 6, které odpovídají stejné orientaci krystalu v difrakčním experimentu. Sektory 1, 2, 4 a 5 mají dostatečnou kvalitu dat pro následné upřesňování, sektory 3 a 6 mají nízkou kvalitu dat, pravděpodobně způsobenou překryvem dvou mříží v rozštěpeném krystalu.

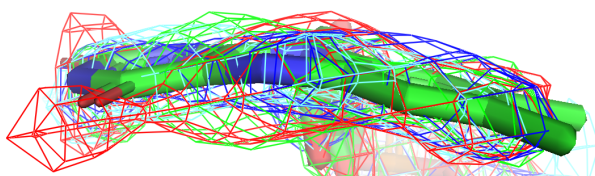
Model struktury byl upřesněn vůči zpracovaným datům ve čtyřech vybraných sektorech. Výsledné mapy diferenčních  $mF_O$ - $DF_C$  hustot v aktivním místě jsou zobrazeny na Obr. 3.1. Tyto mapy byly přeloženy upřesněnou a modelovou strukturou ChtFDO (PDB kód: 6ZE2, bude publikována) pomocí algoritmu SSM (Secondary-structure matching - Shoda sekundárních struktur). Diferenční hustoty v místě vazby kofaktoru FAD naznačují/odpovídají ohnutému isoalloxazinu, tedy redukovanému stavu FAD. Diferenční mapy pro FAD se velmi málo liší se zvyšující se expozicí krystalu, což může znamenat neměnnost stavu kofaktoru (Obr. 3.2). Při srovnání map přímých  $2mF_O$ - $DF_C$  hustot ze sektorů 1 a 5 lze pozorovat protažení hustoty směrem od ligandu, což může značit změny spojené s redukcí flavinu (Obr. 3.3.).

Z analýzy jednotlivých diferenčních map pro FAD vyplývá, že FAD byl pravděpodobně redukován již na začátku difrakčního experimentu. Oxidovaný stav FAD (planární isoalloxazin) nebyl pozorován. Mapy diferenčních hustot v aktivním místě ze všech sektorů naznačují, že úhel zlomení FAD v aktivním místě může být větší, než v modelové struktuře, což může být způsobeno delší přítomností krystalu v rentgenovém svazku. V upřesněné struktuře se objevuje jiná konformace rezidua Ser607, než u doposud pozorovaných struktur, což může mít souvislost s vazbou chloru v aktivním místě.

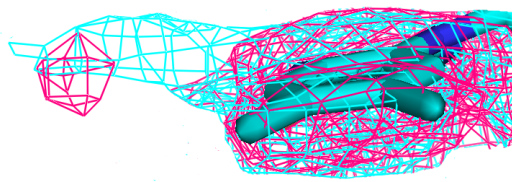
Pro docílení oxidovaného stavu FAD by bylo v budoucnu vhodné vyzkoušet kombinaci nízké expozice rentgenového záření a krystalizace ChtFDO v zásadité krystalizační podmínce. Není vyloučeno, že použitá kyselá krystalizační podmínka (pH 5,5) napomáhá rychlé redukci FAD již při nízké dávce záření. V budoucnu by bylo také vhodné pozorování většího ohnutí isoalloxazinu a jiné konformace Ser607 ověřit opakovaným měřením s kvalitnějšími krystaly a na synchrotronovém zdroji a především upřesnění struktury včetně FAD kofaktoru. Tyto ověření nebylo možné provést se současně dostupnými daty, vzhledem k jejich kvalitě, která umožňuje pouze náhled na experimentální diferenční mapu, nikoli dokončení upřesňování struktury se spolehlivým výsledkem.



Obrázek 3.1: Srovnání map diferenčních  $mF_O-DF_C$  hustot v aktivním místě při různých expozičních časech na úrovni  $3\sigma$ . Mapy diferenčních hustot byly upřesňovány bez modelovaného kofaktoru FAD. Rezidua s FAD jsou převzaty ze struktury s vysokým rozlišením (PDB: 6ZE2). Zeleně jsou znázorněna rezidua upřesněné struktury z kapitoly 2.5, tyrkysově jsou znázorněna rezidua a kofaktor ze struktury 6ZE2. Obrázky byly vytvořeny pomocí softwaru PyMOL [21]



Obrázek 3.2: Přeložení map diferenčních  $mF_O-DF_C$  hustot v aktivním místě na úrovni  $3\sigma$  přes sebe. Mapy diferenčních hustot byly upřesňovány bez modelovaného kofaktoru FAD. Červenou je znázorněna mapa diferenční  $mF_O-DF_C$  hustoty ze sektoru 1, modrou ze sektoru 2, zelenou ze sektoru 4 a tyrkysovou ze sektoru 5



Obrázek 3.3: Pohled podél kruhů isoalloxazinu na mapy přímých  $2mF_o-DF_c$  hustot v aktivním místě na úrovni  $1\sigma$ . Mapy diferenčních hustot byly upřesňovány bez modelovaného kofaktoru FAD. Červenou je zobrazena mapa přímé  $2mF_o-DF_c$  hustoty ze sektoru 1, tyrkysovou barvou ze sektoru 5



# Závěr

- FAD-dependentní oxidoreduktáza z *Chaetomium thermophilum* byla úspěšně zkrystalizována a vybraný krystal byl použit pro naměření difrakčních dat, které proběhlo na domácím zdroji rentgenového záření
- Krystal difraktoval do rozlišení 2,2 Å a vizuální inspekce snímků ukázala, že při určité orientaci krystalu difraktují dvě mříže
- Naměřená difrakční data byla zpracována softwary XDS a AIMLESS a byla roztríděna do šesti sektorů, které odpovídaly rotaci krystalu o 120° v difrakčním experimentu
- Sektory 3 a 6 měly nedostatečně kvalitní data pro budoucí zpracování, a proto byly vyřazeny
- Bylo provedeno úspěšné molekulární nahrazení, kde jako model byla použita struktura zatím nepublikované struktury CtFDO (PDB: 6ZE2) s odstraněným FAD
- Z analýzy map diferenčních  $mF_O-DF_C$  hustot v aktivním místě nebyly pozorovány efekty změny FAD z oxidovaného na redukovaný stav (diferenční hustoty naznačují redukovaný stav FAD ve všech sektorech.)
- Mapy diferenčních  $mF_O-DF_C$  hustot odpovídají většímu zakřivení isoalloxazinu, než v původních strukturách

# Literatura

- [1] Tuomela M.; Vikman M.; Hatakka A.; Itävaara M.: *Biodegradation of lignin in a compost environment: A review*. Bioresour. Technol. 2000, s. 169–183.
- [2] May S. W.; Padgett S. R.: *Oxidoreductase Enzymes in Biotechnology: Current Status and Future Potential*. Bio/Technology 1 1983, s. 677–686.
- [3] Romero E.; Gadda G.: *Alcohol oxidation by flavoenzymes*, *Biomol. Concepts* 5, 2014, s. 299–318.
- [4] Švecová L.: *FAD-dependent oxidoreductase from Chaetomium thermophilum: Structural data-based identification of substrate specificity*. Instruct Biennial Structural Biology konference, 2019, Alcalá de Henares, Španělsko.
- [5] Bergfors T. M.: *Protein Crystallization, Techniques, Strategies, and Tips*. Int. Univ. Line, 1999, ISBN 0-9636817-5-3.
- [6] Kraus I.: *Úvod do strukturní rentgenografie*. 1. Vydání. Praha: Academia, 1985. ISBN 21-014-85.
- [7] Marek J.; Trávníček Z.: *Monokrystalová rentgenová strukturní analýza*. 1. Vydání. Olomouc: univerzita Palackého v Olomouci, 2002, ISBN 80-224-0551-2.
- [8] Drenth J.: *Principles of protein X-ray crystallography*. New York: Springer-Verlag, 1994. ISBN 0-387-94091-X.
- [9] Powell H. R.: *X-ray data processing*. Bioscience Reports 37(5), 2017.
- [10] Battye T. G. G.; Kontogiannis L.; Johnson O.; Powell H. R.; Leslie A. G. W.: *iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction image processing with MOSFLM*. Act. cryst. 2011, D67, s. 271–281.
- [11] Sauter N. K.; Hattne J; Grosse-Kunstleve R. W.; Echols N.: *New Python-based methods for data processing*. Acta Cryst., 2013, D69, s.1274–1282.
- [12] Evans P. R.; Murshudov G. N.: *How good are my data and what is the resolution?*. Acta Cryst., 2013, D69, s. 1204–1214.
- [13] Otwinowski Z.; Minor W.: *Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode*, *Methods in Enzymology* 276(A), s. 307-326.

- [14] Kabsch W.: XDS. *Acta Cryst.*, 2010, D66, s. 125–132.
- [15] Diederichs K.; Karplus P.A.: *Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography*. *Nature Struct. Biol.* 4, 1997, s. 269-275.
- [16] Brünger A. T.: *Free R value: Cross-validation in crystallography*. *Methods in Enzymology* 277, 1997, s. 366-396.
- [17] Murshudov G. N. et al.: *REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures*. *Acta Cryst.*, 2011, D67, s. 355-367.
- [18] Liebschner D. et al.: *Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix*. *Acta Cryst.* D75, 2019, s.861-877.
- [19] webové stránky firmy OptiXs:  
<<https://www.optixs.cz/detektory-zareni-31k/ccd-a-cmos-detektory-14p>>  
[cit. 20.07.2020].
- [20] webové stránky firmy Sigma-Aldrich: [cit. 14.08.2020].  
<<https://www.sigmaaldrich.com/>>
- [21] Schrödinger, LLC. "The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0". 2017.
- [22] Oeffner R. D. et al.: *On the application of the expected log-likelihood gain to decision making in molecular replacement*. *Acta Cryst.* 74, 2018, s. 245-255.