

1. H. Hope, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **19** (1990) 107.
2. K. D. Watenpugh, *Curr. Opin. Str. Biol.* **1** (1991) 1012.
3. D. W. Rodgers, *Structure* **2** (1994) 1135.
4. C. Nave, *Radiat. Phys. Chem.* **45** (1995) 483.
5. D.J. Haas, M.G. Rosmann, *Acta Cryst.* **B51** (1970) 998.
6. T. Y. Teng, *J. Appl. Cryst.* **23** (1990) 387.
7. H. Hartmann, F. Parak, W. Steigemann, G. A. Petsko, D. Ringe-Ponzi, H. Frauenfelder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79** (1982) 4967.
8. U. F. Thomanek, F. Parak, R. L. Mossbauer, H. Formanek, P. Schwager, W. Hope, *Acta Cryst.* **A29** (1973) 263.
9. D. V. Rodgers, in *International Tables for Crystallography Vol. F* (2001) 202.
10. E. F. Garman, E. P. Mitchell, *J. Appl. Cryst.* **29** (1996) 584.
11. T.-Y. Teng, *J. Appl. Cryst.* **31** (1998) 252.

X-ray protein diffractometer and basis of the rotation method PROTEINOVÝ DIFRAKTOMETR – MĚŘENÍ ROTAČNÍ METODOU

Jiří Brynda

Department of Gene Manipulation, Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nam. 2, 166 37 Prague 6, Czech Republic

Keywords:

protein diffractometer, rotation method, macromolecular crystallography

Abstract

X-ray data collection is central experiment in a crystal structure analysis. Recent advances such as cryogenic cooling and two-dimensional detectors have made data collection technically easier, but it remains fundamental scientific procedure underpinning the whole structural analysis. A brief discussion of the most important aspects of the data collection is given. Reviews on X-ray data collection techniques in macromolecular crystallography can be found in: *International Tables for Crystallography, Volume F*, 177 - 195

Úvod

Měření difrakčních dat je základní experiment v krystalové strukturní analýze. Pro struktury malých molekul jsou běžně měřena data do atomového rozlišení (většinou do 0.8 Å), takže fázový problém může být řešen přímo a pozice atomů mohou být rafinovány plně anizotropním modelem.

Krystaly makromolekul jsou z hlediska měření difrakčních dat mnohem problematictější. První problém vyplývá z velikosti elementární buňky, díky které jsou průměrné intenzity reflexí mnohem nižší a jejich počet vyšší (tabulka 1). Za druhé, část objemu krystalu tvoří kanály vyplněné neuspořádaným rozpouštědlem, takže dále snižují intenzitu reflexí na vysokém rozlišení a ve většině případů omezují rozlišení na mnohem nižší než atomové. Za třetí, opět především díky obsahu rozpouštědla, jsou krystaly citlivé na radiační poškození. Nedávný technický pokrok v měřících metodách, jako např. používání synchrotronového záření, měření zmražených krystalů a vysoce účinné plošné detektory, usnadnil měření, ale to stále zůstává základem celé strukturní analýzy. Proto je nezbytné tomuto klíčovému kroku věnovat maximální pozornost.

Tabulka 1. Velikost elementární buňky a počet reflexí.

Sloučenina	Mřířový parametr [Å]	Objem buňky [Å ³]	Počet reflexí	Prům. intenzita
Organická sl.	10	1000	2000	1
Supermolekula	30	27000	30000	1/27000
Protein	100	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁻⁶
Virus	400	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁻⁸

1. Součásti proteinového difraktometru

Pro sběr dat z makromolekulárního monokrystalu při konkrétní vlnové délce potřebujete difraktometr složený z následujících součástí:

- (1) zdroj RTG záření
- (2) optickou soustavu pro fokusaci RTG záření na vzorek
- (3) monochromátor pro selekci jedné vlnové délky záření
- (4) kolimátor pro úpravu rozměrů RTG záření
- (5) „závěrku“ (shuter) pro kontrolu expozice vzorku
- (6) goniostat spojený s držákem vzorku

Dále je velice vhodné mít k dispozici:

- (1) zařízení pro měření zmražených krystalů
- (2) účinný plošný detektor
- (3) software pro měření, ukládání a zobrazování exponovaných dat
- (4) software pro zpracování dat, tj. získání intenzit jednotlivých Braggovských difrakcí a jejich chyb.

2. Zdroj RTG záření - rotační anoda

Ve strukturní analýze makromolekul je prakticky vždy používána Cu anoda s fixní vlnovou délkou 1.542 Å (pokud není zdrojem synchrotronové záření). Rotační anoda má proti klasické rentgence výhodu vyšší intenzity RTG záření. Systémy jsou dnes běžně vybaveny grafitovým monochromátorem, nebo fokusačními zrcadly,



nebo vícevrstvou optikou (Osmic), které zajišťují fokusaci a monochmatizaci RTG záření. Velice důležitá je volba apertury kolimátoru, ta by měla odpovídat velikosti krystalu, avšak pro velké krystalu s velkou elementární buňkou je lépe použít kolimátor s menší aperturou než velikost krystalu pro lepší prostorové rozlišení reflexí.

3. Goniostat a detektor

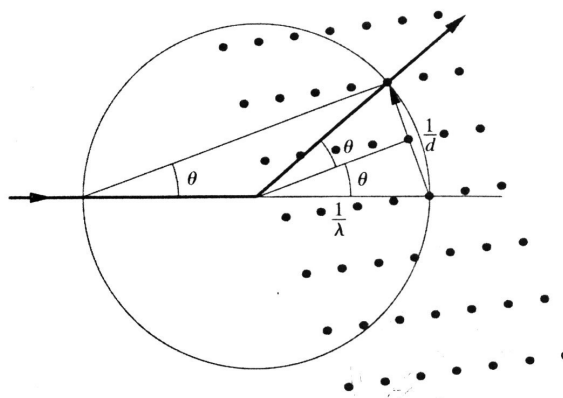
Difrakční podmínka je pro konkrétní reflexi splněna pokud odpovídající bod reciproké mřížky protíná plochu Ewaldovy sféry. Pokud je ozařován stacionární krystal RTG zářením, pak pouze některé reflexe splňují difrakční podmínku. Proto pokud chceme změřit větší množství dat (pokud možno všechny měřitelné, tj. kompletní soubor dat), musíme změnit buď velikost Ewaldovy sféry nebo orientaci krystalu. První možnost, s využitím polychromatického, „bílého“ RTG záření je základ Laueho metody. Pokud používáme monochromatické záření vybrané vlnové délky, pak musíme geometrii krystalu během expozice měnit tak, aby byly difrakční podmínky splněny pro více reflexí. Proteinové difraktometry prakticky vždy požívají rotaci krystalu a plošný detektor.

Prvním plošnými detektory byly fotografické filmy automaticky snímané optickými denzitometry. Takto digitalizované difrakční obrazce byly přeneseny na disk. Hlavní nevýhody použití fotografických filmů byla pracnost, časová náročnost, vysoké pozadí a malý dynamický rozsah. Postupně byly vyvinuty další plošné detektory: drátové proporcionální čítače, „Imaging plates“ a konečně CCD detektory (charge-coupled devices). Prakticky všechny současné plošné detektory jsou dnes používány v kombinaci s goniostatem, který zajišťuje rotaci krystalu okolo jedné osy během expozice. Zbylé přístroje využívají kappa geometrie (ω , κ , φ) kolíčky goniometru pro nastavení krystalu do další počáteční polohy, ale během měření taktéž rotují krystal kolem jedné osy.

4. Základy rotační metody

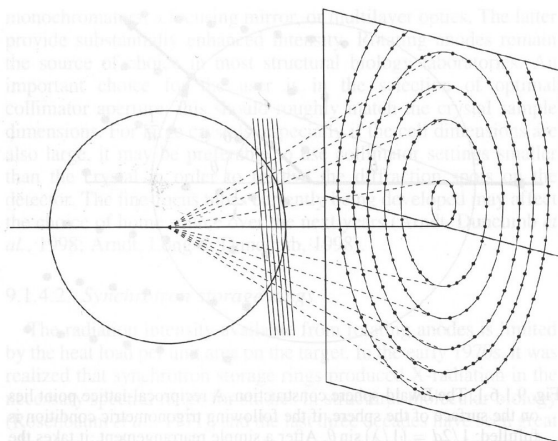
Při použití Ewaldovy konstrukce (obr. 1), která je geometrickou interpretací Braggova zákona, je monochromatické záření reprezentováno povrchem koule o poloměru $1/\lambda$ a krystal reciprokou mřížkou. Reciproká mřížka sestává z bodů ležících na konci vektorů kolmých k difrakčním rovinám a jejich délka je úměrná převrácené hodnotě mezirovinné vzdálenosti $1/d$. Při rotační metodě je krystal otáčen o daný úhel definovaný jako úhel φ .

Pro krystal v jedné orientaci bude pouze malá část reflexí splňovat difrakční podmínku. Počet reflexí bude velice malý pro malé molekuly (v některých orientacích i nulový). Krystaly makromolekul mají však větší elementární buňky (a, b, c v řádu 100 \AA), pokud srovnáváme s vlnovou délkou použitého záření, což v geometrické interpretaci znamená, že reciproká mřížka je velice hustě zaplněna vzhledem k velikosti Ewaldovy sféry. Z toho vyplývá, že mnoho reflexí difraktuje současně do různých směrů, jelikož mnoho bodů reciproké mřížky leží současně na povrchu Ewaldovy sféry. To také vysvětluje výhodu velkých plošných detektorů pro měření krystalů s velkou elementární buňkou.



Obr.1. Ewaldova konstrukce. Bod reciproké mřížky leží na povrchu Ewaldovy sféry pokud je splněna následující trigonometrická podmínka: $1/2d = (1/\lambda) \sin \theta$. Po jednoduché úpravě dostaneme Braggovu rovnici: $\lambda = 2d \sin \theta$. Takže pokud bod s indexy hkl reciproké mřížky leží na povrchu Ewaldovy sféry, je splněna difrakční podmínka a dojde k difrakci v daném směru.

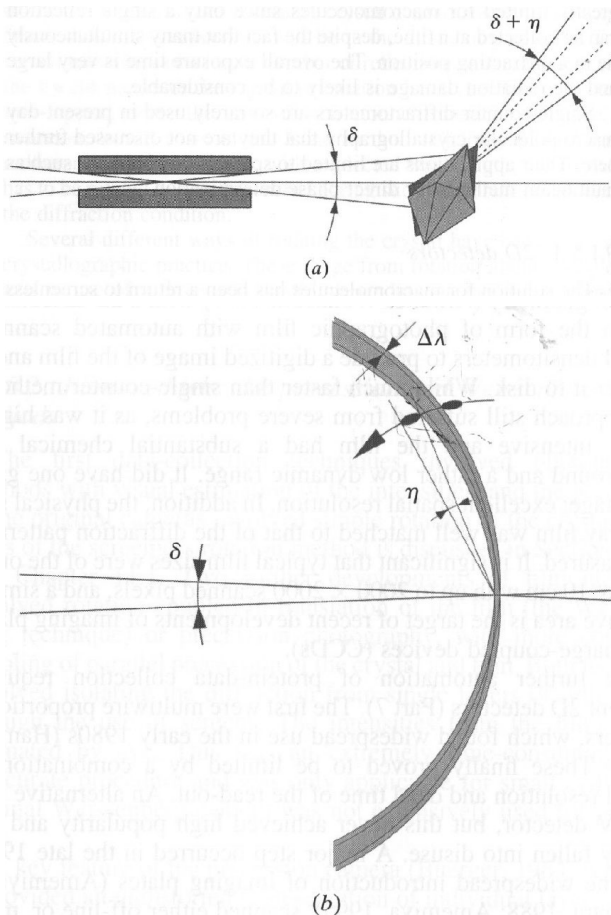
Body reciproké mřížky leží v rovinách, takže protínají Ewaldovu sféru v kružnicích. Odpovídající difraktované reflexe z centra Ewaldovy sféry tak tvoří kužely a jelikož při většině experimentů je detektor umístěn kolmo na směr primárního svazku záření, tvoří reflexe rovin elipsy (viz obr. 2). Pokud některá osa krystalu leží téměř paralelně s primárním zářením, elipsy vytvářejí soustředné kruhy s centrem ve středu detektoru. Všechny reflexe ležící na jedné kružnici (elipse) mají jeden index společný a pro necentrovane buňky postupně vzrůstá o jednotku. Vzdálenosti mezi kruhy závisí na převrácené hodnotě parametru rovnoběžného s primárním zářením.



Obr. 2 Rovina reflexí, která je přibližně kolmá k záření dá vzniknout elipse reflexí na detektoru.

4.1. Mosaicita krystalu a divergence záření

Při Ewaldově konstrukci předpokládáme ideální zdroj záření s totálně paralelním zářením a ideální krystal se všemi elementárními buňkami stejně orientovanými, takže výsledkem by byly bodové, nekonečně ostré Braggovské difrakce. Reálné experimentální podmínky se od tohoto ideálu liší ve třech aspektech. Za prvé, dopadající záření není nikdy dokonale paralelní, za druhé, reálné záření není striktně monochromatické a za třetí, reálné krystaly jsou tvořeny malými mosaikovými bloky, které nejsou vzájem-

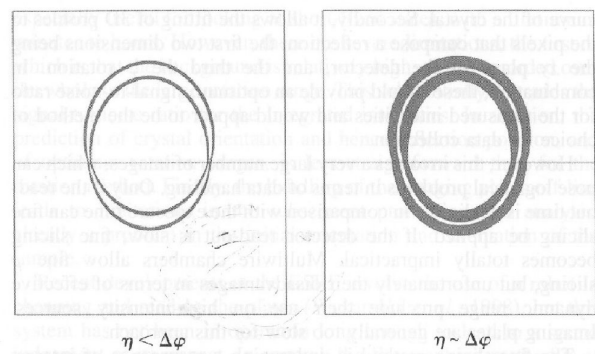


Obr. 3 Schematické znázornění divergence záření δ a mosaicity krystalu η . (a) V přímém prostoru, (b) v recipročném prostoru, kde je Ewaldova sféra rozšířena díky konečné šířce pásu použité vlnové délky $\Delta\lambda$.

ně přesně stejně orientované. Pokud měříme krystaly makromolekul při laboratorní teplotě je rozpětí vzájemné orientace mosaikových bloků (mosaicita) většinou do 0.05° , ale pokud krystaly měříme zmrzlé mříže mosaicita vzrůstá až na 1° i více. Všechny tyto efekty (schematicky znázorněné na obr. 3) rozšiřují difrakce na větší rozsah rotace krystalu.

4.2. Rotační snímky a „lunes“

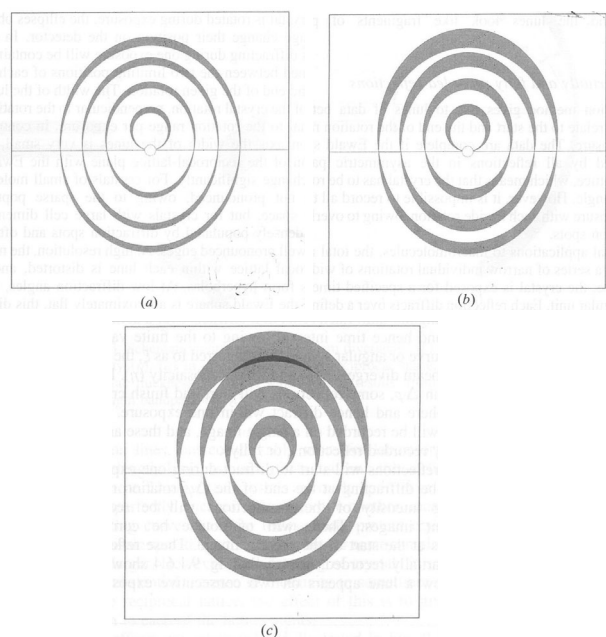
Pokud chceme změřit další reflexe, které v dané orientaci neleží na povrchu Ewaldovy sféry, při použití monochromatického záření, musíme krystalem otáčet aby pro další reflexe byly splněny difrakční podmínky. Pokud je krystal otáčen okolo jedné osy během po sobě následujících expozicích, jedná se o rotační metodu. V praxi je rotační osa skoro vždy kolmá k dopadajícímu záření, tak aby byla zachována symetrie mezi oběma polovinami kompletního snímku. Toto je nejčastěji používaná metoda při měření difrakčních dat krystalů makromolekul. Pokud je krystal rotován během expozice, elipsy popsané pro fixní pozici krystalu mění svojí pozici. Výsledkem je, že snímek vzniklý během expozice obsahuje všechny difrakce mezi dvěma limitními pozicemi elips na začátku a konci dané rotace, které tvoří tzv. „půlměsíce“ (lunes).



Obr. 4. Vzhled „lunes“: (a) krystal s malou mosaicitou, (b) krystal s velkou mosaicitou.

4.3. Částečně a úplně změřené difrakce

Při rotační metodě vznikají „lunes“ jež obsahují difrakce mezi elipsami vzniklými mezi místy, která byla na Ewaldově sféře prořata danou rovinou recipročné mřížky mezi začátkem a koncem rotačního intervalu $\Delta\varphi$. Pokud byla Ewaldova sféra prořata daným bodem recipročné mřížky kompletně, je změřena úplně a naopak, pokud bod recipročného prostoru prošel jen z části Ewaldovou sférou, dokončí průchod při další rotaci a daná reflexe je na jednotlivých rotačních snímcích registrována po částech. Vzhledem k velké hustotě recipročné mřížky je nemožné změřit všechny reflexe naráz během jedné velké rotace, jelikož by docházelo k překrývání difrakcí. Na šířku „lunes“ má zásadní vliv mosaicita krystalu (vliv divergence a mosaicity nelze jednoduše separovat, navíc divergence je prakticky konstantou pro daný zdroj a je většinou zanedbatelná ve srovnání s mosaicitou). Pokud je mosaicita malá jsou „lunes“ úzké, naopak velká mosaicita značně rozšiřuje plochu „lunes“ (viz obr. 4).



Obr. 5. Šířka „lunes“ je úměrná $\Delta\varphi$ (rotačnímu úhlu na jednu expozici). Velikost $\Delta\varphi$ (rotační úhel na jednu expozici) roste od (a) do (c), ať u (c) dochází k překryvu.



4.4. Velikost rotačního intervalu

Zásadním parametrem rotační metody je velikost rotačního intervalu na jednotlivou expozici. V praxi existují dva základní přístupy: velké a malé rotační intervaly (v originále wide and fine slicing φ). Obě metody mají své výhody i limitace. Jemné vzorkování minimalizuje pozadí, umožňuje přesné fitování difrakčního profilu ve φ . Hrubé vzorkování je vhodné pokud doba čtení z detektoru je relativně dlouhá a dále většina reflexí je změřena jako úplně změřené. Na obr.5 můžete vidět vliv velikosti rotačního intervalu na šířku „lunes“.

4.5. Vzdálenost krystal detektor

Dalším zásadním parametrem rotační metody je vzdálenost od krystalu k detektoru (d). Na všech difraktometrech pro měření makromolekulárních krystalů je tato vzdálenost

měniná, většinou je minimální vzdálenost limitována možnou srážkou detektoru s goniometrem nebo chlazením a maximální vzdálenost je dána konstrukční volbou výrobce. Čím kratší je d , do tím většího rozlišení je možno měřit. Jelikož je však rozlišení téměř vždy limitováno difrakční kvalitou vzorku, je vhodné nastavit vzdálenost tak, aby byla vhodně využita celá plocha detektoru (jak praví klasici proteinové krystalografie: „Je důležité měřit intenzity, nikoli indexy“.). S d souvisí i prostorové rozlišení jednotlivých difrakcí. Další faky je fokusace svazku záření, pokud je záření fokusováno na určitou vzdálenost, pak jsou difrakce nejlépe prokresleny v této vzdálenosti.

Literatura

International Tables for Crystallography, Volume F, 177 - 195.

NEUTRON CRYSTALLOGRAPHY OF BIOLOGICAL MOLECULES

Eva Buchtelová

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, 128 43 Prague, Czech Republic

Keywords

neutron diffraction, protein, biological macromolecules, single-crystal diffraction, hydrogen, neutron detector, deuterium

Abstract

In biocrystallography, neutron diffraction is used mainly to determine the position of hydrogen atoms, the position and orientation of solvent water bound to the biomolecules and the position and low-resolution structure of other molecules rich in hydrogen, if this information cannot be obtained otherwise. The low flux of neutron beams limits this method to exceptionally large crystals or to non-crystalline material. This report focuses on single-crystal structure determination. Experimental setup at LADI instrument at ILL including a high-resolution position sensitive detector for Laue diffraction is described. Deuterisation of the sample as a way to increase the signal-to-noise ratio and the possibilities it creates for selective labeling are discussed.

Advantages of neutron diffraction - why to use neutrons

Neutron diffraction is used much less than X-ray diffraction for protein structure determination. This is because the flux of neutron beams is much lower than the flux of X-ray beams, and also because of low availability of neutron sources. Nevertheless some problems can be solved only by diffraction of neutrons [1]. The main advantage of neutrons is their relatively high elastic scattering by hydrogen. Hydrogen atoms can be seen in maps obtained with neutrons even if they are not visible with X-rays. Neutron diffraction is therefore used to determine the positions of important hydrogen atoms, such as atoms involved in enzymatic reactions or in important hydrogen bonds and to

study hydration of biomolecules. Neutron diffraction can tell us whether a particular acidic group is dissociated or has a hydrogen atom bound to it, it can discriminate between water and hydroxyl anion in the active site of an enzyme, it can determine the orientation of a water molecule. Even if only low resolution data can be obtained, neutron diffraction can give us information on the position of solvent or other hydrogen containing molecule. In such cases labelling of the molecule of interest by replacing its hydrogen atoms by deuterium is used.

In contrast to X-rays, neutrons are not scattered by electrons but by the nuclei of atoms in biological materials. The interactions of neutrons with nuclei depend on strong nuclear forces and the scattering amplitudes vary from element to element in a non systematic way, which means atoms of similar atomic mass can be distinguished which would seem the same with X-rays. Even different isotopes or nuclei with different spin have different scattering amplitudes.

The scattering amplitude of hydrogen is of the same order of magnitude as the amplitudes of other atoms predominating in biological molecules (Table 1.), so the scattering by hydrogen is not overridden by heavier atoms. The scattering from hydrogen can be increased even more by replacing hydrogen ^1H by deuterium (^2H , often written as D). The deuterium amplitude is almost twice as high as that of hydrogen ^1H . Moreover incoherent scattering, which creates background in the diffraction image, is lower for deuterium than for hydrogen. The deuterium amplitude is positive, while the hydrogen ^1H amplitude is negative. When hydrogen atom is bound to a heavier atom, the neighbouring positive and negative densities can partially cancel out. This does not happen with deuterium. The difference between hydrogen and deuterium scattering can be used for labelling only some atoms and/or computing difference in