



The neutron structure of hen egg white lysozyme at pH 7.0 determined to 2.0 Å resolution at LADI experimental station showed that neither of the catalytic residues Glu 35 and Asp 52 was protonated at pH 7.0, while earlier neutron studies had shown that Glu 35 is protonated at pH 5.0 [8].

The position of deuterium atoms of the bound water in concanavalin A was determined at 2.4 Å resolution by Laue diffraction. The authors were mainly interested in water bound in the saccharide binding site and in the metal binding site [9].

The hydrogen bonding network of cellulose II was determined by neutron fibre diffraction [10].

The hydration of DNA in A conformation was determined by neutron fiber diffraction [11]. Two chains of water molecules were found in major groove, one chain linked the oxygen atoms of the phosphate backbone and a water feature was found in the centre of the molecule which was not resolved in the direction of the axis of DNA and which is supposed to be sequence-dependent.

1. E. Pebay-Peyroula & D. Myles: Neutron crystallography of biological molecules. In: Structure and Dynamics of Biomolecules: Neutron and Synchrotron Radiation for

Condensed Matter Studies, HERCULES volume IV, Oxford University Press, 2000.

2. R. Scherm, *Ann. Phys.*, 7 (1972) 349-370.
3. [Http://webster.ncnr.nist.gov/resources/n-lengths/list.html](http://webster.ncnr.nist.gov/resources/n-lengths/list.html)
4. [Http://www.ill.fr/YellowBook/LADI/](http://www.ill.fr/YellowBook/LADI/).
5. N. Ganev, S. Vratislav, *Materials Structure* 9 (2002) 1a, 5-6 and to be published in *Experimental methods in X-ray and neutron structure analysis*
6. <http://www.ill.fr/YellowBook/LADI/ladimanual/Lmain.html>
7. L. Coates, P.T. Erskine, S.P. Wood, D.A. Myles & J.B. Cooper, *Biochemistry* 40 (2001) 13149-13157.
8. N. Niimura, Y. Minezaki, T. Nonaka, J.C. Castagna, F. Cipriani, P. Hoghoj, M.S. Lehmann & C. Wilkinson, *Nature Struct. Biol.*, 4 (1997) 909-917.
9. J. Habash, J. Raftery, R. Nuttall, H. J. Price, C. Wilkinson, A.J. Kalb (Gilboa) & J.R. Helliwell, *Acta Cryst. D*, 56 (2000) 541-550.
10. P. Langan, Y. Nishiyama & H. Chanzy, *J. Am. Chem. Soc.*, 121 (1999) 9940-9946.
11. M.W. Shotton, L.H. Pope, T. Forsyth, P. Langan, R.C. Denny, U. Giesen, M.T. Dauvergne, & W. Fuller, *Biophys Chem.*, 69 (1997) 85-96.

Protein crystallography with synchrotron radiation PROTEINOVÁ KRYSTALOGRAFIE NA ZDROJÍCH SYNCHROTRONOVÉHO ZÁŘENÍ

Jindřich Hašek

Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Heyrovského nám.2, 162 06 Praha 6

Keywords

protein crystallography, synchrotron radiation, molecular structure

Abstract

The use of synchrotron radiation allowing a rapid determination of complex structures of macromolecular assemblies has recently induced immense progress in molecular biology. Nowadays, about 80 sources of synchrotron radiation offer almost hundred experimental beamlines suitable for protein crystallography. The paper gives some basic information about measurement of protein crystals at the synchrotron sources and describes the beamlines often visited by Czech protein crystallographers.

V posledních dvaceti letech jsme byli svědky obrovského rozvoje molekulární biologie, který nastal poté co se podařilo zvládnout metodiku experimentálního stanovení molekulární struktury biologických makromolekul pomocí difrakce rtg záření. Znalost struktury nesmírně složitých komplexů má pro pochopení procesů odehrávajících se v biologických systémech základní význam a proto se „proteinová krystalografie“ stala nezbytnou součástí molekulární biologie a biotechnologických aplikací potřebných při návrhu léčiv. Proteinová krystalografie dovede v sou-

časné době popsat nejen molekulární strukturu a dynamiku, ale umožňuje i velmi přesný odhad slabých mezimolekulárních interakcí v makromolekulárních systémech (hydrofobní síly, hydratace, vodíkové můstky), které rozhodují o jejich struktuře a funkci. Velkou výhodou proteinové krystalografie je, že určuje strukturu proteinu a jeho interakce s okolím v jeho přirozeném vodném prostředí, umožňuje pozorovat změny struktury a adhezi mezi proteiny při změnách pH, atd. V návaznosti na zlepšující se dostupnost zdrojů synchrotronového záření, propojení s metodami molekulárního modelování a s NMR technikami, představuje rtg strukturní analýza v současné době nejsilnější a nejrychlejší nástroj studia struktury a funkce biologických systémů na molekulární úrovni.

Synchrotronové záření, u kterého je možné dosáhnout velice krátkých pulsů záření s obrovskou koncentrací energie záření na velice malé ploše (řádově desítky mikronů), podstatně rozšiřuje možnosti tradiční rtg strukturní analýzy. Nově zaváděné metody experimentálního stanovení struktury excitovaných systémů pomocí synchrotronového záření umožňují sledovat průběh některých chemických a biochemických reakcí s časovým rozlišením změn struktury až 100 pikosekund. Ve světě existuje mnoho desítek synchrotronů a některé z nich mají větší množství svazků záření využívaných pro proteinovou

Tabulka 1

Arménie	1	Indie	2	Německo	6	Tajwan	1
Australie	1	Itálie	2	Rusko	7	Thajsko	1
Brazílie	2	Japonsko	17	Singapur	1	Ukrajina	2
Čína	4	Jižní Korea	2	Španělsko	1	USA	12
Dánsko	2	Jordánsko	1	Švédsko	3	Velká Británie	2
Francie	4	Kanada	1	Švýcarsko	1		

krystalografii. Tabulka 1 ukazuje počty synchrotronů v různých zemích.

Přestože v ČR obdobné zařízení nemáme, účast ČR v EMBL a smlouvy s mezinárodními středisky pro využití synchrotronového záření (ESRF v Grenoble a Elettra v Trieste) umožňují našim vědcům plnohodnotné provádění vlastních experimentů. V tomto příspěvku je uveden stručný popis experimentálního vybavení center orientovaných na řešení problémů z molekulární biologie v ESRF, na zdroji synchrotronového záření Elettra a některých dalších vybraných laboratořích v Evropě a USA.

1. Vybraná evropská zařízení využívající synchrotronového záření

1.1 European Synchrotron Radiation Facility - ESRF

ID2 – Biocrystallography

Undulátor s proměnnou vlnovou délkou nebo undulátor s vlnovou délkou 1 Å. Uhlíkové filtry absorbují vlnové délky nad 2.5 Å. Monochromatisace pomocí kryogenicky chlazeného dvoukrystalového monolitického Si(111) monochromátoru. Koncentrace svazku pomocí „Rh-coated double focusing toroidal mirror“ s fixní geometrií zvyšující tok fotonů v místě vzorku 15 krát. Jsou použitelné pouze pro vlnové délky nad 0.73 Å. Pětikruhový difraktometr - φ , χ , ω , a dva 2θ kruhy s rameny osazenými dvěma detektory umožňuje orientaci vzorku a měření Friedelových párů na stejném snímku. Difraktometr je řízen softwarem SPEC umožňujícím současnou práci obou detektorů. Eulerova geometrie s plnými kruhy.

ID9 – Laueho metoda (White Beam Station)

Mnohafunkční zařízení. Široké spektrum vlnových délek umožňuje současnou registraci velkého počtu reflexí a usnadňuje tak provádění experimentů s krátkým časovým rozlišením (time resolved Laue diffraction).

Exposiční doba může být od mikrosekund až do 100 ps při použití jednoho shluku elektronů na oběžné dráze synchrotronu. Femtosekundový laser laditelný v rozsahu 450–800 nm s délkou pulsu od 100 fs do 100 ps, 30 μ J na jeden puls. Běží s frekvencí 900 Hz.

BM13–14 – Britsko-Španělské konsorcium

ID13 – Mikrofokální proteinová krystalografie

Mikrodifraktometr umístěný zde dává velmi malý průměr (5/10/30 μ m) primárního svazku vysoce koncentrovaného záření a má vynikající optiku pro justování mikrokrystallků.

ID14 – Makromolekulární krystalografie

Na čtrnáctém segmentu jsou dva svazky záření (A, B) využívající wigglerů, každý se dvěma experimentálními boudami (hutch 1,2,3,4).

ID14 Exper.Hutch 1

Standardní měření proteinů. CCD detektor MAR 165 mm. Chlazení vzorku na 100 K pomocí Oxford Cryostream.

ID14 Exper.Hutch 2

Standardní měření proteinů. Kolimace svazku záření dvěma páry stěrbin, kontrola intenzity primárního svazku pomocí ionizační komory. Vzorek může rotovat kolem jedné osy (φ), registrace záření CCD detektorem firmy X-Ray Research s průměrem 165 mm. Doba přečtení 3.5 vteřiny. Chlazení vzorku na 100 K pomocí Oxford Cryostream.

ID14 Exper.Hutch 3

Zařízení uváděné letos do provozu.

ID14 Exper.Hutch 4

Zařízení vhodné pro anomální difrakci. SAD and MAD experimenty.

Beamline ID23

Bude dokončena v příštím roce a bude dedikována automatickému měření proteinových krystalů. Dva undulátory budou sloužit dvěma koncovým stanicím ID23-1 a ID23-2.

Stanice **ID23-1** bude s laditelnou vlnovou délkou (6 - 20 keV) pro experimenty s anomální difrakcí (MAD). Druhá stanice **ID23-2** bude mít pevnou vlnovou délku odpovídající 14 keV.

ID29 – Anomální difrakce (SAD, MAD)

Zařízení určené pro řešení obtížně řešitelných makromolekulárních struktur pomocí anomálního rozptylu (Single and Multiple-wavelength Anomalous Diffraction – SAD, MAD experimenty).

BM30A – Proteinová difrakce

Standardní měření difrakce proteinů. Svazek záření 0.3 x 0.3 mm, MAR 345 Image detektor, MAR CCD 165 mm, cold room.



1.2 EMBL Grenoble Outstation – Podpora experimentů v ESRF

EMBL Grenoble Outstation spolupracuje s European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) pokud jde o práci na svazcích záření *ID9 (time resolved crystallography)*, *ID13 (microfocus)*, *ID14 (four protein crystallography end-stations)*, *BM14 (MAD)* and *ID29 (MAD)*. Dává navíc k dispozici výpočetní techniku, grafiku a laboratoře pro molekulární biologii a biochemii.

Grenoble Outstation of EMBL získala od Evropské unie grant „Improving Human Potential Programme (Access to Research Infrastructures)“ na léta 2000-2003, na podporu biologických experimentů v ESRF platný i pro asociované státy k EU, tedy i pro ČR.

1.3 Středisko synchrotronového záření ELETTRA v Trieste

V současné době je zde jedna laboratoř pro makromolekulární krystalografii. Je na společném svazku se zařízením pro malouhlový rozptyl. Je vybavena detektorem (Image Plate MAR 345), zařízením pro rotační metodu a rychlé zchlazení vzorku (flash cooling). Ve stavbě je další samostatný svazek pro proteinovou krystalografii.

1.4 MAX Lab v Lundu, Švédsko

I911-1, I911-2, I911-4 až I911-5

Makromolekulární krystalografie, pevné vlnové délky 1.1 Å, 1.03 Å, 0.91Å a 0.97 Å.

I911-3

Makromolekulární krystalografie - MAD, proměnlivá vlnová délka 0.7 Å až 1.8 Å

1.5 HASYLAB, Hamburg, Německo

Proteinová krystalografie v HASYLAB

BW6, BW7.1(EMBL), BW7.2(EMBL), D1.1(EMBL X31), K1.2(EMBL X12)

2. Svazky synchrotronového záření využívané pro proteinovou krystalografii v USA

Následující seznam obsahuje nejdůležitější centra synchrotronového záření ve Spojených státech zabývající se proteinovou krystalografií. Experimentální stanice určené pro proteinovou krystalografii jsou uvedeny svými symboly ((bližší informace lze nalézt na WWW stránkách uvedených na konci článku):

ALS: The Advanced Light Source, Lawrence Berkeley National Lab., Univ. of California at Berkeley

Proteinová difrakce: 4.2.2 5.0.1 5.0.2 5.0.3 8.2.1 8.2.2 8.3.1 12.3.1

APS: The Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory

Proteinová difrakce: 5ID-B 14-BM-C 14-BM-D 14-ID-B 17-BM 17-ID 19-BM 19-ID 22-BM 22-ID 31-BM 31-ID 32-ID-B

CAMD: The Center for Advanced Microstructures and Devices, Louisiana State University

Proteinová difrakce: GPCCC

CHES: Cornell High Energy Synchrotron Source, Cornell University

Proteinová difrakce: A1 F1 F2

SSRL: Stanford Synchrotron Radiation Laboratory,

Proteinová difrakce: BL1-5 BL7-1 BL9-1 BL9-2 BL11-1 BL11-3

NSLS: National Synchrotron Light Source, Brookhaven National Laboratory

pe pro naše uživatele relativně nejdostupnější a proto následuje seznam specializací jednotlivých laboratoř v SNLS

Beamline X4A

Difrakční měření anomálně difraktujících vzorků - Multiwavelength Anomalous Diffraction (MAD)

Beamline X8C

Pro anomální difrakci na Se - Selenium Multiwavelength Anomalous Diffraction (Se-MAD)

Beamline X9B

EXAFS, SAS malouhlový rozptyl a měření anomálního signálu v reálném čase (time resolved X-ray anomal scattering)

Beamline X12B

Universální difraktometr, MAD, zasilatelská služba pro měření proteinů „na dálku“

Beamline X12C

Makromolekulární rtg. krystalografie, MAD, software pro „high-throughput“ makromolekulární krystalografii

Beamline X26C

Vysoká intenzita kolimovaného svazku (monochromatické i polychromatické záření)

Beamline X26C

Časově rozlišený „x-ray footprinting“ DNA, RNA a proteinů

3. Poznámky k měření proteinů na zdroji synchrotronového záření

3.1 Volba zdroje záření a způsobu práce

Pro běžný difrakční experiment vyhovuje každý zdroj synchrotronového záření, který je schopen dosáhnout vlnové délky mezi 4 do 0.2 Å. Pro běžné měření integrovaných intenzit též není vyžadován speciální způsob vstříku elektronů do oběžné dráhy. Kvůli vyšší intenzitě záření se obvykle pracuje s mnoha shluky elektronů rovnoměrně rozložených po oběžné dráze. Svazek záření získaný na ohybovém magnetu a nebo na wiggleru je monochromatizován a kolimován zrcadly do kruhového ohniska s pokud možno roznoměrně rozdělenou hustotou záření.

Při experimentech s vysokým časovým rozlišením je třeba práce s jedním shlukem elektronů na oběžné dráze a obrovskou koncentrací záření na vzorek.

3.2 Volba goniometru a detektoru

Pro běžná měření je často používán jednoduchý goniometr pro rotační metodu. Pokud je třeba přesné měření, je třeba



používat malé oscilační intervaly ve srovnání s mosaicitou a víceúhlový difraktometr. Plošné detektory (image plates) vyžadují poměrně dlouhou dobu čtení. Proto pro rychlá měření dáváme přednost CCD detektorům. Laueho metoda je vhodná pouze v případě potřeby extrémně krátkých expozic u experimentů vyžadujících registraci okamžitého stavu systému (time resolved experiments).

3.3 Bleskové chlazení vzorků

Zařízení obvykle umožňuje nastavení teploty laminárního proudu plynného dusíku na vzorek s teplotou 80-375 K se stabilitou 0.1 K. Spotřeba dusíku bývá kolem 0.6 litru na hodinu.

3.4 Radiační poškození vzorku

Uvádí se, že při ozáření 2×10^7 Gray, které na zdrojích synchrotronového záření lze snadno dosáhnout, dochází zpravidla již k poškození některých částí proteinů a to zejména k porušení disulfidových můstků a k dekarboxylaci koncových skupin organických kyselin. Dochází často k částečným posunům a rotacím molekul nebo jejich částí. Přímou při měření pak můžeme pozorovat zvětšování efektivního rozměru základní buňky nebo pokles intenzity reflexí u kontrolních měření. Při zpracování takto ovlivněných dat pozorujeme horší *R* faktor a některé oblasti struktury bývají neuspořádané (disorderované).

Na zdrojích synchrotronového záření je nebezpečí radiačního poškození vysoké. Snažíme se proto o minimalizaci doby expozice, měříme nejprve nezávislou část reciprokého prostoru a teprve potom se zvyšuje "redundance" měření.

Zejména při měření anomálního rozptylu mohou být změny intenzit reflexí způsobené radiačním poškozením větší než měřený efekt a proto se snažíme měřit Friedelovy páry na tomtéž snímku nebo alespoň v krátkém časovém odstupu za sebou. Porovnání shody kontrolních snímků a objemu základní buňky by mělo být pravidlem.

4. Zdroje informací - literatura

Synchrotronová centra

Zdroje záření pro krystalografie

www.iucr.org/cww-top/data.index.html

Synchrotron sources of the world

www-als.lbl.gov/als/synchrotron_sources.html

www-ssrl.slac.stanford.edu/sr_sources.html

Organizace uživatelů synchrotronového záření ve strukturní biologii v USA

<http://biosync.sdsc.edu/>

ESRF Grenoble, Francie

www.esrf.fr/exp_facilities/BLHB.htm

ELETTRA Trieste, Itálie

www.elettra.trieste.it/experiments/beamlines/index.html

MAX-LAB v Lundu, Švédsko

www.maxlab.lu.se

LURE laboratoř specializovaná na Kr a Xe proteinovou krystalografii

www.lure.u-psud.fr/sections/Xenon/XENON_ENG.HTM

Daresbury synchrotron radiation source

www.srs.ac.uk/srs/

NSLS Brookhaven (www.nsls.bnl.gov)

<http://nslsweb.nsls.bnl.gov/nsls/beamlines/>

SSRL Berkeley (Advanced Light Source)

www-ssrl.slac.stanford.edu/welcome.html

Advanced Photon Source at Argonne Nat. Lab

<http://biosync.sdsc.edu/als/als.html>

BESSY Berlin

http://www.bessy.de/lab_profile

HASYLAB Hamburg

<http://www-hasylab.desy.de>

Informace

Adresy makromolekulárních krystalografií v Evropě

www.weizmann.ac.il/esf_xtal/

Databáze pro krystalografii

www.iucr.org/cww-top/data.index.html

Krystalografický software

www.iucr.org/sincris-top/logiciel/index.html

Dodavatelé zařízení pro rtg a neutronovou krystalografii – detektory, difraktometry, atd.

www.iucr.org/cww-top/data.index.html

Měření vzorků s anomální difrakcí pro SAD, MAD

Stanice ID29 v ESRF

www.esrf.fr/exp_facilities/ID29/ID29.html

Radiační poškození vzorku

Ravelli RB, McSweeney SM: *Structure* **8**, 315, 2000.

www.biomednet.com/library/abstract/JSTR.st8305

Weik M. et al., *PNAS* Vol. **97**, 623-628, 2000.

www.pnas.org/cgi/content/full/97/2/623

Raimond B.G. et al. *Structure*, Vol **8**, 315-328, 2000.

Použité zkratky

SAD Single Anomalous Diffraction

MAD Multiple Anomalous Diffraction

ID Insertion Device

ESRF

European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble)