



SL8

## GALACTONOLACTONE INHIBITING THE ACTIVE SITE OF $\beta$ -GALACTOSIDASE FROM *ARTHROBACTER* SP. C2-2. CRYSTAL STRUCTURE AT 2.2 Å RESOLUTION

Andrea Štěpánková<sup>1,2</sup>, Tereza Skálová<sup>2</sup>, Jan Dohnálek<sup>2</sup>, Jindřich Hašek<sup>2</sup>, Petra Lipovová<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Solid State Physics, FNSPE, CTU, Trojanova 13, 120 00, Prague 2, stepanko@imc.cas.cz

<sup>2</sup>Institute of Macromolecular Chemistry AS CR, v.v.i., Heyrovského nám. 2, 162 00, Prague 6

<sup>3</sup>Dept. of Biochemistry, ICT, Technická 5, 166 28, Prague 6

The three-dimensional structure of enzyme beta-galactosidase from an Antarctic bacterium *Arthrobacter* sp. C2-2 with bound inhibitor has been determined at a resolution of 2.2 Å.

The enzyme  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23) belongs to the enzyme class called glycosylases which catalyze the hydrolysis of the terminal beta-D-galactosyl of beta-D-galactosides. It is attractive for research and industry because of its wide range of biotechnological applications (to treat lactose intolerance, to prevent crystallization in sweet products, to increase its sweetening power, to simplify fermentation during production of soured milk products, to modify the freezing point of ice creams, etc.).

The psychrotrophic bacterium *Arthrobacter* sp. C2-2 was isolated in the Antarctic area and this enzyme is active at low temperature, which is interesting property for food processing applications. Unlike, more known  $\beta$ -galactosidase from *Escherichia coli*, which form tetramers, the  $\beta$ -galactosidase from *Arthrobacter* sp. C2-2 forms hexamers with molecular weight of 660 kDa. Each monomer consists of five domains and contains 1023 residues. The active site is localized in the TIM barrel domain in the center of each monomer. The active site contains the pair of catalytic residues Glu442 and Glu521. The molecule of galactonolactone was found locked in the deep binding mode near the catalytic residues Glu442 and Glu521. Undoubtedly, the position of inhibitor closely simulates the transition state of galactose before the second of enzymatic reaction (i.e. the release of product or the transglycosylation reaction).

X-ray diffraction data were collected at the source of synchrotron radiation ESRF in Grenoble. The data were processed using HKL-2000. The crystal belongs to space group P2<sub>1</sub> with unit cell parameters  $a = 140.3$  Å,  $b = 205.5$  Å,  $c = 140.5$  Å,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 102.5^\circ$ . The structure is refined by REFMAC.

X-ray diffraction data were collected at the source of synchrotron radiation ESRF in Grenoble. The data were processed using HKL-2000. The crystal belongs to space group P2<sub>1</sub> with unit cell parameters  $a = 140.3$  Å,  $b = 205.5$  Å,  $c = 140.5$  Å,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 102.5^\circ$ . The structure is refined by REFMAC.

1. Skálová, T., Dohnálek, J., Spiwok, V., Lipovová, P., Vondráčková, E., Petroková, H., Dušková, J., Strnad, H., Králová, B., Hašek, J. (2005). Cold-active  $\beta$ -galactosidase from *Arthrobacter* sp. C2-2 forms compact 660 kDa hexamers: Crystal structure at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **353**, 282-294.
2. Otwinovsky, Z., Minor, W., (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307-326.
3. Murshudov, G.N., Vagin, A. A., Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the Maximum-Likelihood method. *Acta Cryst.* **D53**, 240-255.

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (project 204/02/0843/A), by the Grant Agency of the Academy of sciences of the Czech Republic (project KJB500500512) and by the Academy of Sciences of the Czech Republic (project AVOZ4050913).

SL10

## STUDIUM MAGNETISMU A MAGNETICKÝCH STRUKTUR POMOCÍ SYNCHROTRONOVÉHO ZÁŘENÍ

S. Daniš

Katedra fyziky kondenzovaných látek, Matematicko-fyzikální fakulta UK, Ke Karlovu 5, 121 16 Praha 2  
danis@mag.mff.cuni.cz

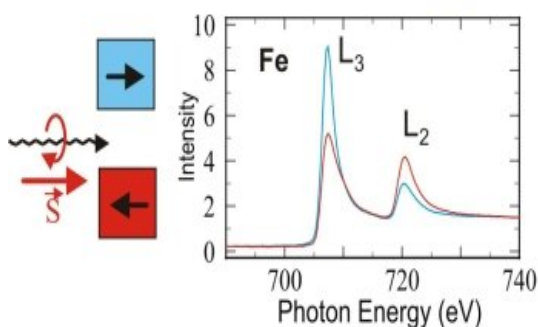
Až do roku 1972, kdy pánové F. de Bergevin a M. Brunel [1] poprvé experimentálně pozorovali magnetický příspěvek rozptylu rtg. záření, bylo určení magnetické struktury látek doménou rozptylu neutronů. Neutrony mají pro studium magnetismu, resp. magnetických struktur velmi vhodné vlastnosti - zejména vlastní magnetický moment (spin). Energie neutronů používaných pro rozptylové experimenty (~1 100 meV) je srovnatelná s energií

excitací v pevných látkách, např. fononů, magnonů, excitonů a pod. Jsou tedy velmi vhodné i pro inelastické experimenty. Dnes už máme více možností jak studovat magnetické vlastnosti látek. Jaké požadavky máme na záření, vlnění, vhodná pro studium magnetismu?

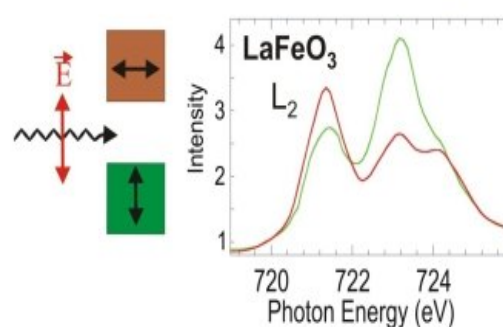
Požadujeme:

- vhodnou vlnovou délku
- citlivost k magnetickému uspořádání

### Circular Dichroism - Ferromagnets



### Linear Dichroism - Antiferromagnets



**Obrázek 1.** Magnetický kruhový (nalevo) a lineární (napravo) dichroismus. Díky výběrovým pravidlům přeskoků mezi elektronovými hladinami dostáváme různý signál pro různé polarizace dopadajícího záření. Použitá energie rtg. záření odpovídá energii absorpční hrany zvolené slupky a prvku, v našem případě L-hrana železa.

- vysokou brilianci/intenzitu
- velké laterální i hloubkové rozlišení
- citlivost k chemickým prvkům, popř.  $e^-$  slupkám

Tyto požadavky splňují tato vlnění:

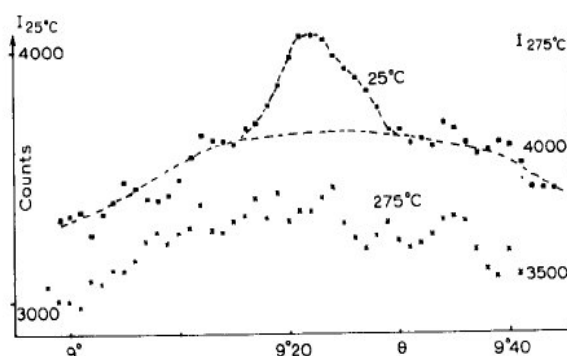
1. neutronové svazky
2. rtg. (synchrotronové) záření
3. polarizované atomy (vhodné pouze povrchy z důvodů velmi malé pronikavosti).

Podívejme se nyní na neutrony a rtg. záření podrobněji.

Neutrony interagují s jádrem atomu, závislost rozptylové délky na atomovém čísle není monotónní, difrakční kontrast lze ovlivnit záměnou izotopu daného prvku. Neutrony jsou citlivé k celkovému magnetickému momentu, separace orbitální a spinové složky je obtížná. Nevýhodou je i nízká intenzita neutronových svazků ve srovnání s rtg. zářením.

Rtg. záření se rozptyluje na elektronových obalech atomů (jako všechna elmg. záření), závislost atomového rozptylového faktoru na atomovém čísle je monotónní. V synchrotronu dokážeme vyrobit rtg. záření s vysokou briliancí, které umožňuje pozorovat velmi slabý rozptyl způsobený magnetickým uspořádáním, resp. polarizací spinů elektronů v magneticky uspořádaných látkách. Změnou polarizace fotonů lze rozlišit orbitální a spinový příspěvek magnetického momentu. Rtg. záření je citlivé k jednotlivým elektronovým slupkám (v anomálním režimu), můžeme tak identifikovat i elektronové hladiny, resp. slupky, zodpovědné za magnetické vlastnosti dané látky.

Rentgenové záření můžeme použít ke studiu magnetických vlastností ve dvou hlavních metodách - spektroskopických a difrakčních. Do spektroskopických metod náleží metody využívající tzv. dichroismus, tj. různou odezvu vzorku při použití různě polarizovaného záření. Nejčastěji se využívá XMCD (X-ray Magnetic Circular Dichroism) a XMLD (X-ray Magnetic Linear Dichroism). První metoda používá kruhově polarizované rtg. záření a je vhodná pro studium feromagneticky uspořádaných látek. Antiferomagneticky uspořádané látky lze studovat metodou XMLD, která využívá záření polarizované lineárně. Obě metody jsou založeny na interakci polarizovaného rtg.



**Obrázek 2.** Okolí difrakce  $(1/2, 1/2, 1/2)$  NiO. Neélova teplota NiO je asi  $T_N = 225^\circ\text{C}$  - pod touto teplotou je NiO antiferomagnetický. Nad touto teplotou není oxid nikelnatý magneticky uspořádán. Převzato z [1].

záření s elektronovými hladinami, které jsou ovlivněny magnetickým uspořádáním.

Na obrázku 1 jsou zobrazeny průběhy měřeného signálu při měření XMCD/XMLD. Protože jsou elektrony v daných slupkách spinově polarizované (pokud je slupka zodpovědná za magnetické vlastnosti) a je tedy různá populace elektronů polarizovaných a . Protože výběrová pravidla přeskoků mezi  $e^-$  hladinami závisí i na polarizaci dopadajícího záření, naměříme při změně polarizace jiný signál.

Spektroskopické metody dokáží odhalit, které atomy přispívají k magnetickým vlastnostem dané látky. Nejsou však citlivé k dalekodosahovému uspořádání magnetických momentů, tzv. magnetické struktury. Magnetickou strukturu lze studovat pomocí "klasické" rtg. difrakce, avšak za specifických podmínek. Příspěvek magnetického atomového rozptylu je asi  $10^3$  slabší než příspěvek od rozptylu Thomsonova. Opět si "vypomůžeme", jako v případě spektroskopických metod, rezonančním rozptylem. V případě látek obsahující atomy s velkými magnetickými momenty, můžeme magnetický signál naměřit i v laboratoři, viz obr.2.

1. F. de Bergevin, M. Brunel, *Physics Letters* **39A**, (1972), 141.