

Korekce na radiační poškození při zpracování makromolekulárních difrakčních dat

Martin Malý ¹ Petr Kolenko ^{1,2} Jan Dohnálek ²

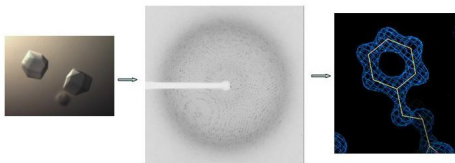
¹Katedra inženýrství pevných látek
FJFI ČVUT v Praze

²Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i.

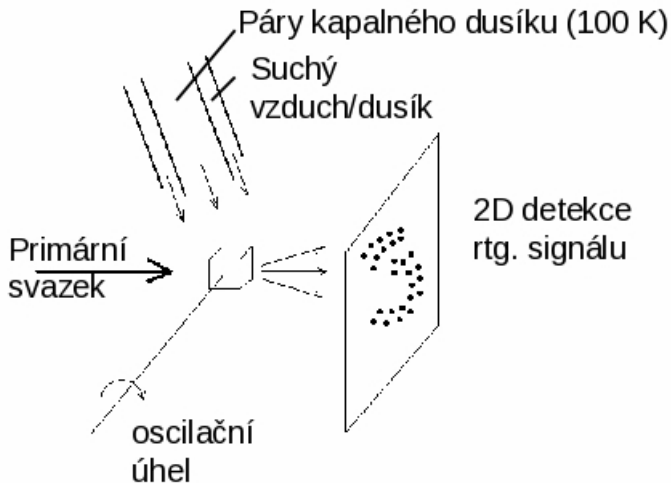
7. Česko-Slovenská studentská vědecká konference ve fyzice
23.5.–24.5. 2016

Proteinová krystalografie

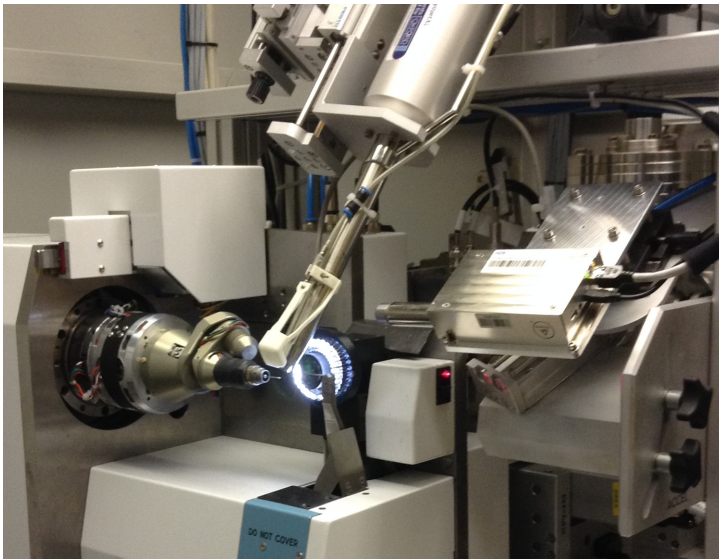
- Bílkoviny jsou základní stavební a funkční jednotka organismů.
- Znalost jejich struktury je důležitá pro pochopení principů jejich funkce. Také umožňuje racionálně navrhnout úpravy, které povedou ke změně či ovlivnění této funkce.
- Uplatnění:
 - Biotechnologie: výzkum biokatalyzátorů
 - Farmaceutický průmysl: boj proti rakovině, AIDS, Alzheimerově chorobě...
- Makromolekulární krystalografie je stěžejní disciplínou pro určení struktury.
- Proces: získání proteinu, krystalizace, difrakční experiment, **zpracování dat, určení struktury**



Uspořádání difrakčního experimentu – schéma

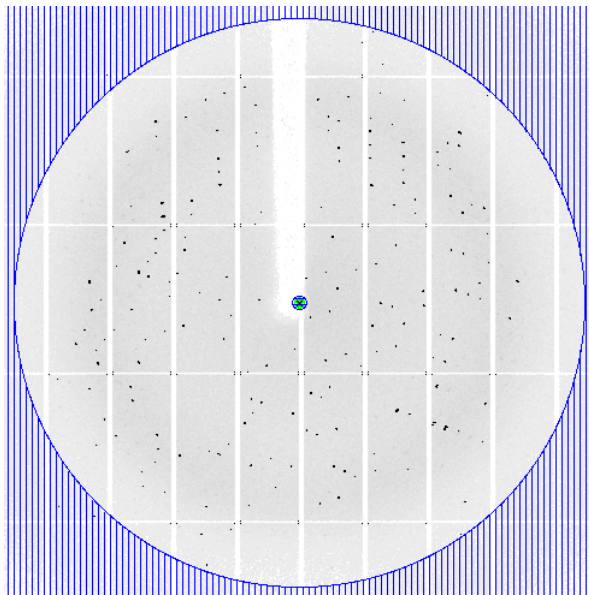


Reálné uspořádání difrakčního experimentu

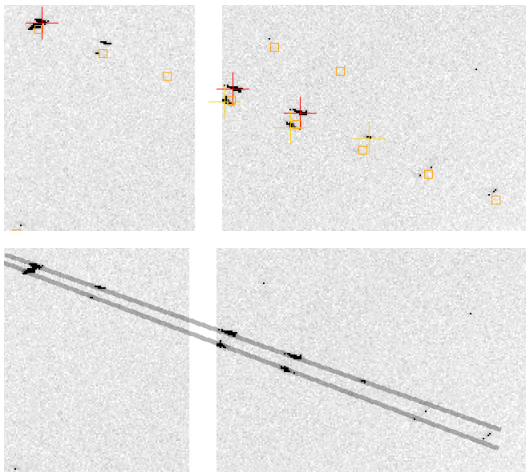


- Krystalizační podmínka: 0,01 M ZnS, 12 % (v/v) PEG550 MME, 0,1 M MES pH 6,5.
- Krystalizační destičky byly uchovávány při teplotě 298 K.
- Měření na synchrotronu Petra III v Hamburku
 - $\lambda = 0,9201 \text{ \AA}$
 - Vzdálenost vzorku od detektoru: 419,67 mm
 - Rotační metoda, 2000 snímků, $\Delta\phi = 0,1^\circ$, expozice 0,15 s
 - Celkem rotace o 200° , expozice 300 s
- Vizuální inspekce: reflexe spatřeny při rozlišení 2,25 \AA .
- Na 3. snímku: řady rozštěpených reflexí. Vzorek je tedy tvořen dvěma krystaly, které pravděpodobně vznikly naštěpením jednoho.

Difrakční snímek č. 3



Řady rozštěpených reflexí na 3. difrakčním snímku



- Zpracování bylo provedeno softwarovým balíkem XDS.
- Indexace reflexí a určení grupy symetrie proběhly bez problémů. Během integrace a seškálování reflexí také nenastaly žádné potíže.
- V průběhu experimentu docházelo k radiačnímu poškození krystalu.
- Reflexe ze snímků 1 550–2 000: znatelný pokles hodnot indikátoru kvality I/σ .
- Optimalizace zpracování:
 - Použita pouze data ze snímků 1–1 550.
 - Změněn difrakční limit nejvyššího použitého rozlišení z 1,95 Å na 2,00 Å.

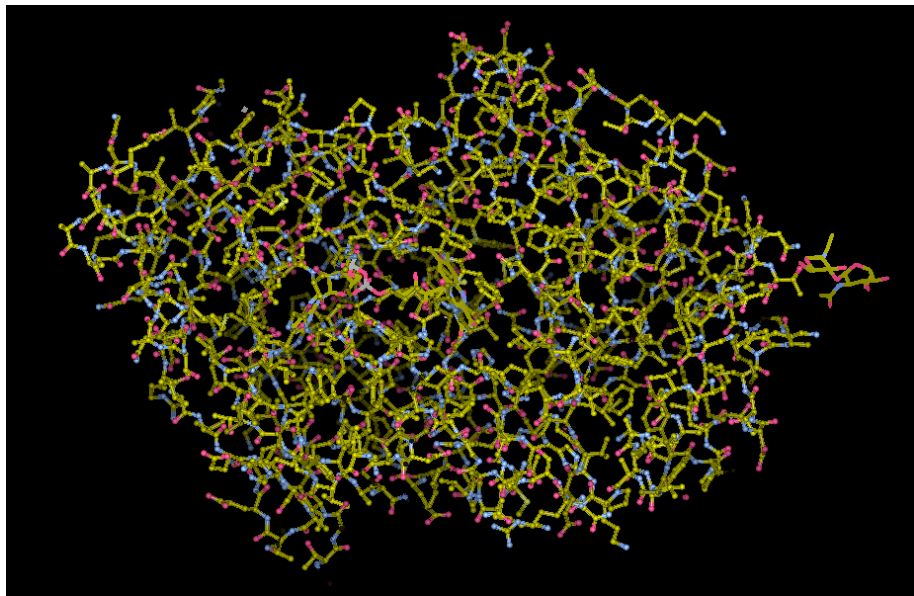
Srovnání zpracování před a po optimalizaci.

Použité snímky	1–2 000	1–1 550
Difrakční limit [Å]	50,00–1,95 (2,07–1,95)	50,00–2,00 (2,12–2,00)
Prostorová grupa	C 1 2 1	C 1 2 1
Parametry elem. buňky [Å]	$a = 132,75$ $b = 56,97$ $c = 86,84$ $\alpha = \gamma = 90,00^\circ$ $\beta = 95,66^\circ$	$a = 132,77$ $b = 56,99$ $c = 86,88$ $\alpha = \gamma = 90,00^\circ$ $\beta = 95,66^\circ$
Počet reflexí	157 808 (22 970)	118 941 (17 525)
Počet nezávislých reflexí	46 312 (7 066)	42 072 (6 477)
Kompletnost [%]	97 (93)	95 (91)
Redundance	3,4 (3,3)	2,8 (2,7)
Mozaicita [°]	0,3	0,3
CC_{1/2}	0,994 (0,320)	0,995 (0,571)
Wilsonův B-faktor [Å²]	37	36
I/σ	8,0 (1,5)	9,0 (2,0)
R_{meas}	0,150 (1,404)	0,113 (0,898)
R_{merge}	0,127 (1,176)	0,093 (0,738)

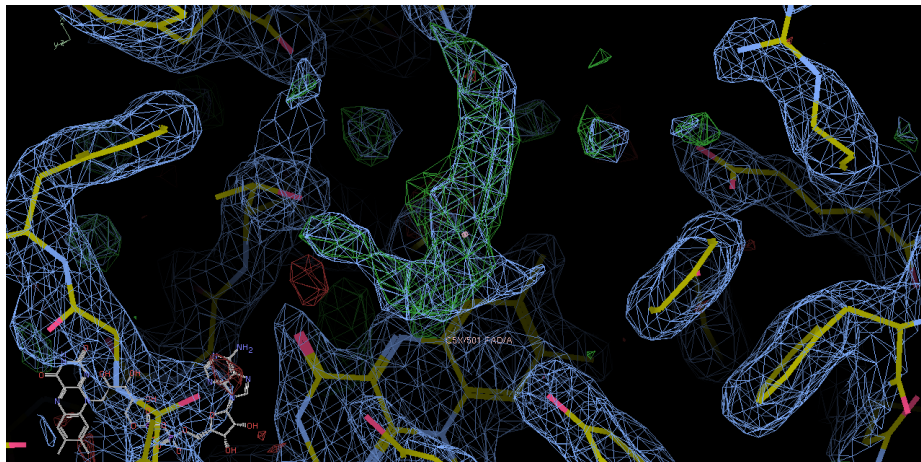
- Korekce radiačního poškození krystalu v průběhu měření:
 - Interpolace experimentálních dat k hypotetické nulové absorbované dávce záření při doporučeném snímku 350.
 - Použita již optimálně zpracovaná data programem XDS.

Software	XDS	XDS & XSCALE
Difrakční limit [Å]	50,00–2,00 (2,12–2,00)	
$CC_{1/2}$	0,995 (0,571)	0,996 (0,613)
I/σ	9,0 (2,0)	11,3 (2,4)
R_{meas}	0,113 (0,898)	0,099 (0,847)
R_{merge}	0,093 (0,738)	0,082 (0,697)

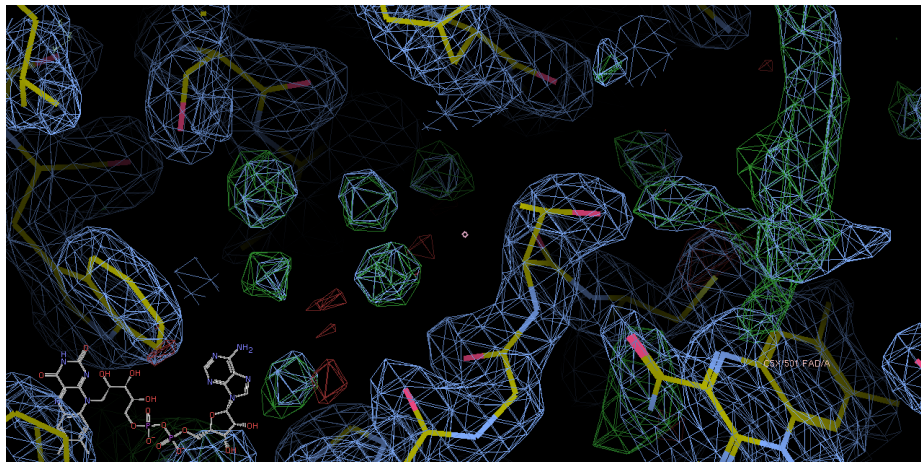
Řešení struktury – Molrep, REFMAC5



Elektronová hustota – ligand



Elektronová hustota – molekuly vody



- Úspěšná krystalizace, difrakční experiment na synchrotronu
- Radiační poškození krystalu, rozštěpené reflexe
- Optimalizované zpracování programem XDS
 - Vynechány snímky z konce měření
 - Změněn difrakční limit
- Interpolace pomocí XSCALE
- Získána elektronová hustota a struktura komplexu protein:ligand

Rád bych poděkoval Ing. Petru Kolenkovi, PhD. za spolupráci a vynikající vedení mé práce.

Děkuji za pozornost!

