

# Strukturní analýza proteinů pomocí rentgenové difrakce

J. Česal\*, M. Rozehnalová\*\*, J. Zemánková\*\*

\*SPŠ Otrokovice; \*\*Gymnázium, Brno-Řečkovice, Terezy Novákové 2  
jancesal@seznam.cz

## Abstrakt

Mezi základní složky v živé přírodě patří proteiny, a proto je dobré znát jejich prostorovou strukturu. Určováním struktury biologických makromolekul se zabývá proteinová krystalografie. V experimentu byly vypěstovány krystaly D-xylosa ketol-izomeráza. Následně byly vzorky zmrazeny v kapalném dusíku a změřena rentgenová difrakce. Z difrakčních dat získaných u krystalu lysozymu byla určena struktura tohoto proteinu metodou molekulárního nahrazení. To pomohlo autorům se seznámením se se základním postupem a problémy proteinové krystalografie.

## 1 Úvod

Proteiny jsou jedny ze základních látek v živých organismech. Jsou důležité svými funkcemi, jako je například transport látek, řízení chemických reakcí, komunikace buněk a stavba tkání pletiv. Proteiny jsou makromolekuly tvořené řetězcem aminokyselin. Pořadí aminokyselin určuje primární strukturu proteinu. Pro znalost funkce proteinu je potřeba znát i vyšší struktury. Jednou z metod jejich zjišťování je proteinová krystalografie.

Námi sledovaný protein se nazývá D-xylosa ketol-izomeráza (EC 5.3.1.5.) vyprodukovaný firmou Hampton Research. Enzym katalyzuje přeměnu glukózy na fruktózu. Metodou visící kapky byly získány krystaly sledovaného proteinu a následně byly změřeny rentgenovou difrakcí.

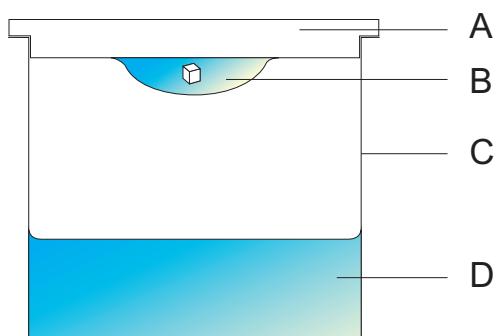
## 2 Příprava experimentu

### Krystalizace metodou visící kapky

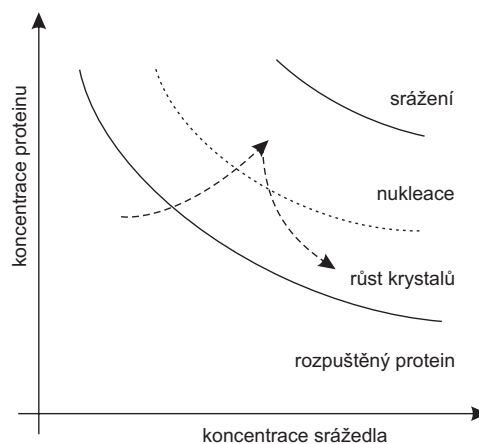
Pro krystalizaci proteinů se používají difúzní metody, jako je například metoda visící kapky. Experimentální uspořádání je zobrazeno na obr. 1. Na základě vyrovnání parciálních tlaků dochází k vyrovnání koncentrace srážedel prostřednictvím difúze vody z kapky do rezervoáru. Tím dochází ke koncentrování proteinu v kapce a k tvorbě krystalizačních jader. Další růst krystalu probíhá v metastabilním stavu (obr. 2).

V rezervoáru byl umístěn matečný roztok o objemu 500  $\mu$ l. Na víčko rezervoáru byl napipetován 1  $\mu$ l matečného roztoku a 1  $\mu$ l proteinu o koncentraci 33mg/ml. Složení krystalizačních podmínek je uvedeno v tabulce 1.

Byla provedena optimalizace koncentrací roztoků za cílem získat větší krystaly (obr. 3,4).



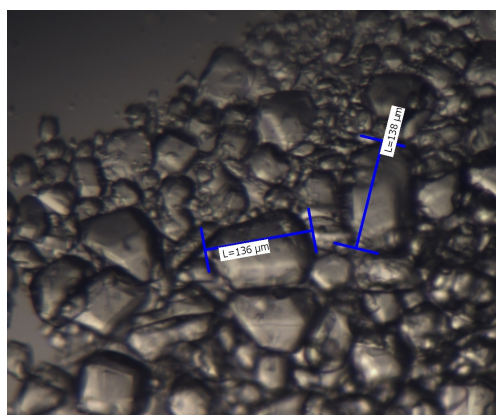
Obrázek 1: Uspořádání metody visící kapky. *A* - uzávěr; *B* - kapka krystalizační podmínky s krystalem; *C* - jamka; *D* - rezervoár s krystalizační podmínkou



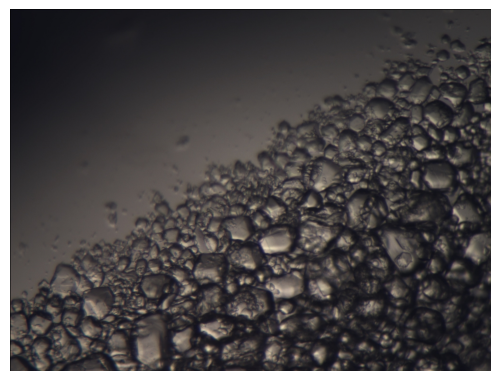
Obrázek 2: Fázový diagram krystalizace proteinu

Tabulka 1: Krystalizační podmínky použité pro krystalizaci D-xylosa ketol-izomerázy

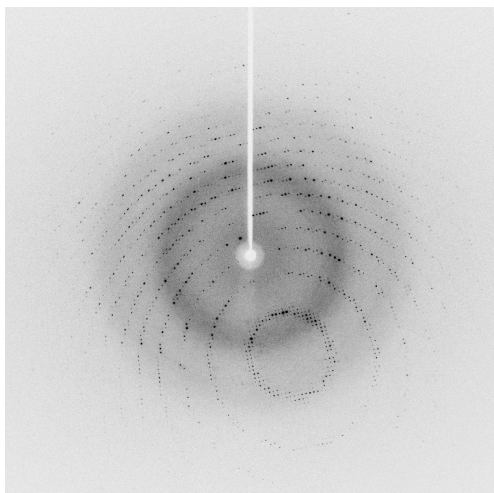
označení	sůl	pufr	polymer
1	2M síran amonný	-	-
2	0,6M síran amonný	0,1M Tris pH 7.6	15% polyetylen glykol 4000
3	1M mravenčan sodný	-	-



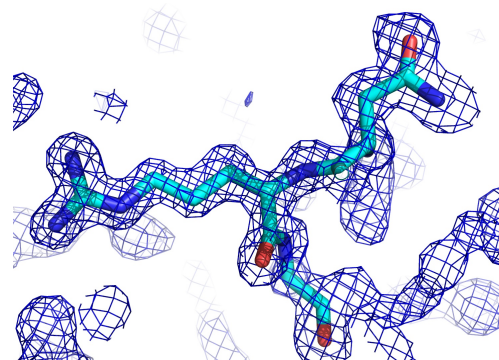
Obrázek 3: Krystaly z podmínky 0,6M síran amonný, koncentrace proteinu 15mg/ml



Obrázek 4: Krystaly z podmínky 0,3M síran amonný, koncentrace proteinu 15mg/ml.



Obrázek 5: Difrakční obrazec z krystalu lysozymu



Obrázek 6: Arginin 145 v mapě elektronové hustoty

## Příprava vzorků

Pro omezení radiačního poškození experiment probíhal při teplotě 120K. Objem vody v krystalu při změně skupenství z kapalného na hexagonální led vzrůstá, což může vést k poškození krystalu. Tomuto poškození je možno zamezit přidávkem kryoprotektantů např. glycerol. Krystaly jsou pomocí nylonové smyčky vyloveny z krystalizační kapky, několik vteřin máčeny v roztoku kryoprotektantu, opět vyloveny a prudce zmrazeny v kapalném dusíku.

## 3 Experiment

### Měření difrakčních dat

Při interakci rentgenového záření s krystalem dochází k rozptylu na jednotlivých elektronech. Směry, ve kterých nalezneme difrakční maxima popisuje Braggova rovnice:

$$2d \sin \theta = n\lambda,$$

kde  $d$  je mezirovinová vzdálenost,  $\theta$  je rozptylový úhel,  $n$  je násobnost reflexe a  $\lambda$  je vlnová délka použitého záření. Výsledný difrakční obrazec se skládá ze skupiny difrakčních maxim (obr. 5).

Měření probíhalo ve Fyzikálním ústavu AV ČR na čtyřkruhovém difraktometru GEMINI, zdrojem záření byla rentgenová lampa s měděnou anodou, speciální optikou a kolimátorem. Rozptýlené záření bylo detekováno plošným CCD detektorem Atlas.

Rentgenová difrakce byla měřena na 4 vypěstovaných krystalech s použitím rentgenového záření z molybdenové anody ( $\lambda = 7,0930 \text{ \AA}$ ). Bylo měřeno několik difrakčních maxim přibližně o hodnotě  $3 \text{ \AA}$ . Tato data jsou pro vyhodnocení nepoužitelná.

### Zpracování dat

Pro ilustraci řešení struktury byla použita dříve naměřená data krystalu lysozymu. Data byla měřena na synchrotonu BESSY II, svazek 14.1 v Berlíně. Bylo naměřeno 260 snímků v rozlišení  $1,3 \text{ \AA}$  (obr. 5).

Pomocí programu HKL 2000 byla na snímcích nalezena difrakční maxima, kterým byly přiřazeny difrakční indexy  $hkl$ . Následně byla určena vnitřní symetrie P4 (tetragonální symetrie) a data byla zintegrována. Měření difrakce lze určit pouze intenzitu záření, nikoliv jeho fáze. Pro řešení fázového problému byla použita metoda molekulárního nahrazení, která využívá znalosti již známých struktur. Tímto postupem byla získána mapa elektronové hustoty. Do mapy lze umístit model proteinu. Na obrázku č. 6 je příklad umístění argininu 145 v molekule lysozymu do mapy elektronové hustoty.

## 4 Shrnutí

V průběhu Týdne vědy na Jaderce byly vypěstovány krystaly D-xylosy ketol-izomerázy, které byly následně připraveny pro rentgenovou difrakci. Krystaly byly testovány na zdroji s molybdenovou anodou, a proto byla získána pouze slabá difrakční data. Dále byla určena struktura lysozymu z dříve naměřených dat. Struktura byla vyřešena úspěšně, avšak vyžaduje další upřesnění modelu.

## Poděkování

Experiment byl prováděn na Ústavu makromolekulární chemie a na Fyzikálním ústavu AV ČR v.v.i., kterým patří poděkování za možnost seznámit se s danou problematikou a provedení experimentu. Poděkování dále patří Fakultě jaderné a fyzikálně inženýrské ČVUT za organizaci Týdne vědy a především Ing. Janu Stránskému za vstřícný přístup, trpělivost a cenné rady při vypracovávání této práce.

## Reference

- [1] ALBERTS, Bruce, Dennis BRAY, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS, Martin RAFF, Keith ROBERTS a Peter WALTER. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 1998, 630 s. ISBN 80-902-9060-4.
- [2] DRENTH, Jan. *Principles of protein X-ray crystallography*. New York: Springer-Verlag, c1994, xiii, 305 p. ISBN 35-409-4091-X.
- [3] STRÁNSKÝ, Jan. *Krystalový polymorfismus rostlinné nukleázy*. Diplomová práce. Praha, 2012.