

3D atomární struktura bílkoviny za 24 hodin

B. Dolenská, J. Kutscherauer, M. Plachý

BIOCEV, Průmyslová 595, 252 50 Vestec

barcadolenska@gmail.com, jakub.kutscherauer@gbl.cz,
marek.plachy@outlook.com

Abstrakt

Práce se zabývá zjišťováním 3D atomární struktury bílkoviny pomocí rentgenové krystalografie. Struktura byla měřena u bílkoviny lysozymu, krystalizované pomocí metody založené na difuzi par. Následně byla srovnána kvalita krystalů vzniklých za různých podmínek.

1 Úvod

Zkoumání struktury biologických makromolekul je klíčové pro vývoj účinných léků bez vedlejších účinků nebo pro výzkum fungování lidského těla. Bílkoviny jsou jedním ze základních stavebních kamenů všech živých organismů, a proto jsme se zaměřili právě na ně. Nejčastěji využívanou metodou pro zjištění struktury dané molekuly je rentgenová krystalografie, které jsme se blíže věnovali v rámci našeho miniprojektu.

Hlavním výhodou rentgenové krystalografie oproti ostatním metodám je časová efektivita – celý proces výzkumu nám netrval déle než 24 hodin. V našem experimentu jsme se zabývali konkrétně lysozymem, který je známý pro své antibakteriální účinky. Nachází se například v lidských slzách, nebo ve vaječném bílku.

2 Materiály a metody

Proces měření struktury lze rozdělit na tři části: krystalizaci vzorku, měření difrakce rentgenového záření a výpočet modelu molekuly. Pro účely krystalizace jsme využili metody visící kapky, využívající principu difuze vodních par.

2.1. Příprava krystalizačního roztoku

Nejprve jsme si připravili 10 ml krystalizačního roztoku následujícího složení:

Tabulka 1: Složení krystalizačního roztoku

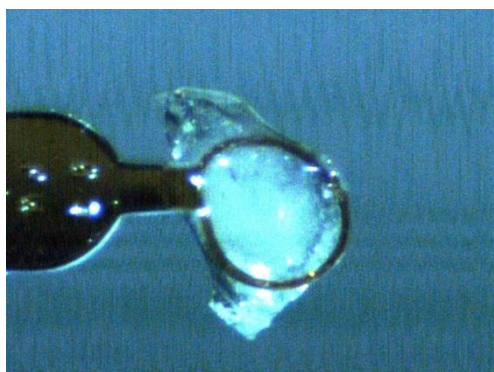
Složka	Koncentrace zásobního roztoku	Požadovaná koncentrace	Pipetovaný objem
PEG MME 3350 (¹)	50 hm. %	30 hm. %	6 ml
NaCl	$4 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	$1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	2.5 ml
NaOAc	$2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	$50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	250 μl

2.2. Příprava vzorků do krystalizační aparatury

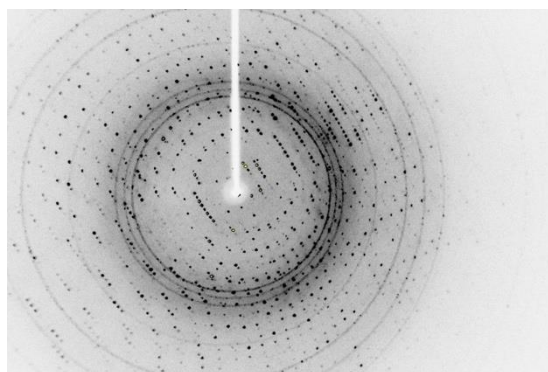
Pro přípravu jednoho vzorku jsme do krystalizační jamky odměřili 500 μl krystalizačního roztoku. Následně bylo do středu krycího sklíčka odpipetováno 0.5 μl lysozymu a 1 μl *de mi* H_2O . Následně jsme víčkem přiklopili krystalizační jamku a sledovali růst krystalů přes mikroskop.

2.3. Měření krystalu

Posléze jsme pod mikroskopem vybrali vhodný krystal (o velikosti přibližně 100 mikronů), který jsme vylovili na smyčce. Následně jsme smyčce umístili do rentgenového difraktometru Bruker D8 Venture (SC-XRD)². Průchodem rentgenového záření krystalem dochází k difrakci paprsků, jejichž dopady zaznamenává detektor a v počítači je z nich následně utvořen obraz.



Obrázek 1: Krystal v kaptonové smyčce



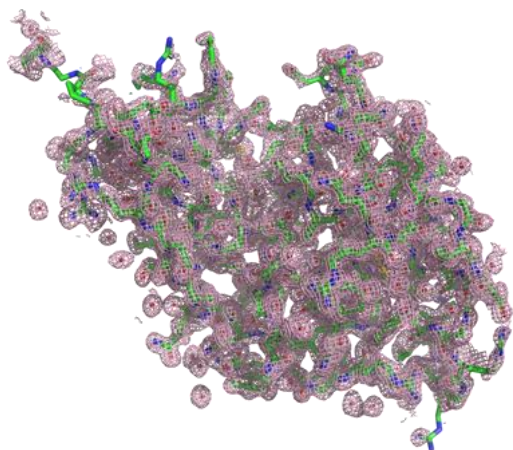
Obrázek 2: Difrakční diagram

¹ PEG MME 3350 = Polyethylen glykol monomethyl ether 3350 Da (průměrná molekulární hmotnost)

² SC-XRD = Single Crystal X-ray Diffraction = Monokrystalová (strukturní analýza) rentgenovou difrakcí

2.4. Výpočty a modelování (SW)

Z naměřených dat o dopadu záření jsme skrze počítačový program dopočítali hustotu rozložení elektronů, od kterých se rentgenové záření odráží. Díky této hustotě elektronů jsme následně odvodili umístění jednotlivých atomů a jejich vazby. Výsledkem této posloupnosti výpočtů je 3D model dané molekuly.



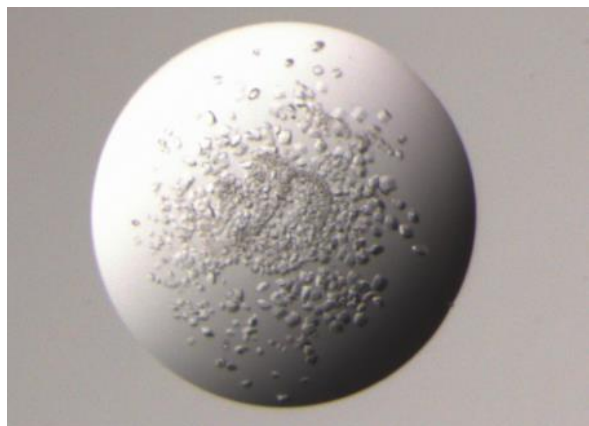
Obrázek 4: Molekulární kostra lysozymu vč. elektronové hustoty Obrázek 3: Stuhový model lysozymu (+ molekuly vody)

Tabulka 2: Porovnání difrakčních dat jednotlivých vzorků

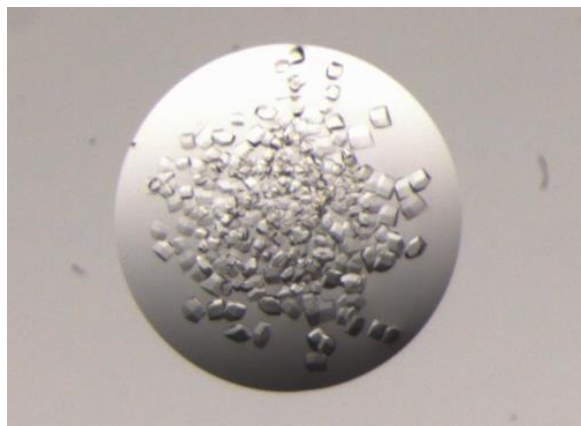
	Vzorek č. 1	Vzorek č. 2
Rozlišení	38.38-3	3.18-3
	0.144 (0.665)	0.665 (0.006)
Naměřených reflexí	33637 (5522)	5522 (48237)
Unikátních reflexí	2452 (386)	386 (32221)
I/sigma(I)	5.5 (1.1)	1.1 (43.8)
CC1/2	0.992 (0.588)	0.588 (1)
Kompletnost	99.7 (99.1)	99.1 (99.1)
Násobnost	13.7 (14.3)	14.3 (48.1)
Rwork	0.252	0.348
Rfree	0.227	0.297

3 Výsledky a diskuse

Při první krystalizaci jsme použili 100 mg lysozymu, nicméně v takovéto koncentraci jádra vznikala příliš rychle a vznikaly pouze drobné krystaly s defekty, se kterými nebylo možné pracovat (viz obr. vlevo). Z toho důvodu jsme zkusili snížit koncentraci lysozymu na 80 mg, díky čemuž se celý proces krystalizace zpomalil a výsledek byl výrazně lepší (viz obr. vpravo).



Obrázek 5: Krystaly vzorku č. 1



Obrázek 6: Krystaly vzorku č. 2

4 Shrnutí

Při práci se nám podařilo zhotovit řadu více či méně zdařilých vzorků. Díky experimentování s poměry používaných látek jsme se naučili rozpoznat správné měření a faktory ovlivňující jejich kvalitu.

Poděkování

Děkujeme panu Ing. Janu Stránskému, Ph. D. z Biotechnologického ústavu AV ČR za uvedení do problematiky a pomoc s přípravou sborníkového příspěvku. Dále pak organizátorům Týdne vědy na Jaderce 2023 za veškerý čas a úsilí, které projektu věnovali.

CIISB, Instruct-CZ Centre of Instruct-ERIC EU consortium, funded by MEYS CR infrastructure project LM2023042 and European Regional Development Fund-Project „UP CIISB“ (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/18_046/0015974), is gratefully acknowledged for the financial support of the measurements at the CF [name of the unit/CF].

Reference

- [1] I. Kutá Smatanová. *Krystalizace biologických makromolekul od teorie k praxi*. https://csacg.fzu.cz/func/viewpdf.php?file=2006_1Kuta.pdf. 2006.