

# 3D atomární struktura proteinu

Miriam Surňáková, Tomáš Suchánek, Tomáš Velecký

20. května 2014

## Abstrakt

Znalost struktury proteinů je důležitá pro jejich porozumění a následného využití jejich vlastností. Používanou metodou je proteinová krystalografie. Byly vypěstovány krystaly lysozymu a byla naměřena difrakce rentgenového záření na těchto krystalech. Použitím matematických metod pak je vypočtena atomová struktura molekul. Na základě znalosti poloh jednotlivých atomů je možné studovat mechanismus reakce, která je enzymem katalyzována.

## 1 Úvod

Proteiny jsou základním stavebním kamenem všech živých organismů a vykonávají mnoho pro život nepostradatelných funkcí. Abychom pochopili jejich vlastnosti, principy, jak fungují, a procesy, které v nich probíhají, je třeba znát jejich strukturu.

Cílem miniprojektu je seznámit se s postupem při řešení struktury makromolekuly, a to konkrétně s metodami krystalizace, s kryoprotekcí a mražením krystalů, sběrem difrakčních dat na zdroji rentgenového záření a zpracováním naměřených dat. Jako modelový protein byl použit lysozym. Jedná se o enzym, který byl poprvé popsán v roce 1922 Alexandrem Flemmingem. Vyskytuje se ve slinách, slzách, vaječném bílku, nosním hlenu, krevní plazmě a mateřském mléce. Je schopný narušovat bakteriální stěnu, díky čemuž má silné antibakteriální účinky. Enzym se skládá ze 129 aminokyselin, jeho prostorová struktura je publikovaná v databázi RCSB Protein Data Bank s PDB kódem 1LYS [4].

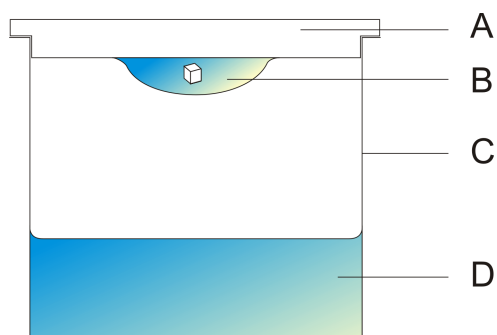
## 2 Metody

Základní metodou zjišťování struktury proteinu je difrakce rentgenového záření na krystalech a následné počítačové zpracování.

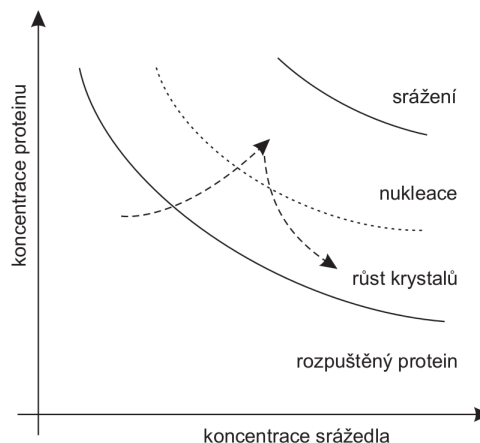
### 2.1 Krystalizace proteinu

Nejpoužívanější metody krystalizace proteinu jsou založeny na difúzi. Většinou se používá buď difúze par, nebo dialýza, která se od difúze par liší použitím polopropustné membrány. Metoda využívající jevu difúze par lze provést v uspořádání visící, sedící nebo sendvičové kapky.

Pro náš experiment jsme použili metodu visící kapky (obr. 1). Experimentální uspořádání metodou visící kapky se skládá z rezervoáru (jamky) a víčka. V rezervoáru je roztok pufru, srážedla a aditiv. Pufr je např. octan sodný. Srážedlo (precipitant) tlačí molekuly



Obrázek 1: Znázornění uspořádání visící kapky: A – víčko, B – kapka, C – rezervoár, D – matečný roztok



Obrázek 2: Fázový diagram. Šipky ukazují ideální průběh krystalizačního experimentu.

proteinu k sobě, jako srážedla se používají soli. Kapka se umísťuje na víčko a obsahuje protein a roztok z rezervoáru.

Roztok v rezervoáru je koncentrovanější než roztok v kapce (obr. 2). Z tohoto důvodu dochází k vypařování vody z kapky jako jediné těkavé látky. Tím se zvyšuje koncentrace roztoku v kapce a díky srážedlu se molekuly proteinu dostanou blíže k sobě. V kapce začínají vznikat nukleační jádra (nukleace) nebo precipitáty (sraženiny).

K jádrům se začnou nabalovat další molekuly proteinu. Tím se sníží globální koncentrace proteinu a přestanou vznikat nukleační jádra. Krystaly však mohou růst dále – tato fáze se nazývá růst krystalů.

Systém musí být nepropustně uzavřen, aby se z něj nemohly odpařovat žádné látky. (Mohlo by dojít k vysušení kapky s proteinem, mohly by se změnit podmínky krystalizace, ...) K tomuto účelu se používá silikonový tuk nebo jednoduché gumové těsnění.

## 2.2 Příprava krystalů pro difrakční experiment

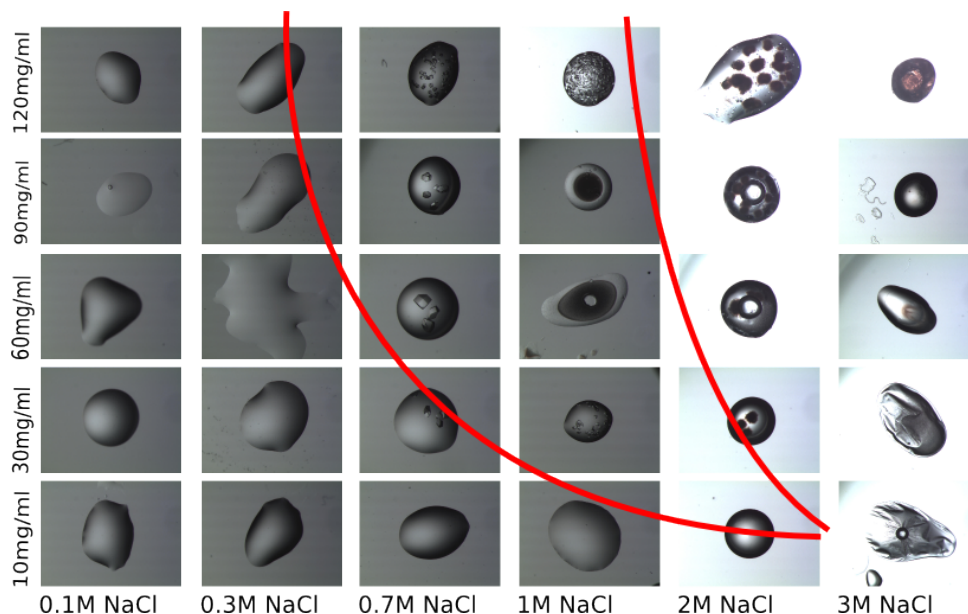
Biologické makromolekuly podléhají radiacnímu poškození, proto je třeba krystaly zmrazit v tekutém dusíku (cca 77 K).

Krystaly se nejprve vyjmou z krystalizační kapky pomocí nylonové smyčky (o průměru 100–500  $\mu\text{m}$ ), poté se máčí v roztoku s kryoprotektantem (např. methanol, glycerol, ...) bránícím v růstu hexagonálních krystalů ledu, které by mohly roztrhat krystal proteinu nebo by snížily kvalitu difrakčního obrazu. Teprve potom se krystaly mrazí.

## 2.3 Difrakční experiment

Krystal je opakovaně vystaven monochromatickému svazku rentgenového záření, přičemž se mění orientace krystalu. Změny orientace je dosaženo tak, že je krystal během experimentu otáčí na goniostatu. Difraktované rentgenové záření je zachycen detektorem. Výsledkem je soubor difrakčních snímků, které se mění podle rotujícího krystalu na hlavičce goniometru.

Struktura bílkoviny se dále určuje pomocí specializovaných programů založených na Fourierově transformaci.



Obrázek 3: Experimentální ověření fázového diagramu koncentrace proteinu a srážedla

### 3 Experiment

Cílem práce bylo vypěstovat krystaly lysozymu, získat difrakční data a na základě nich vytvořit prostorovou strukturu proteinu. Další prací bylo ověření fázového diagramu krystalizace proteinu.

#### 3.1 Krystalizace

Celkem bylo vytvořeno 30 krystalizačních podmínek s různými koncentracemi proteinu a srážedla, cílem bylo zjistit vliv těchto parametrů na krystalizaci. Výsledek koresponduje s fázovým diagramem.

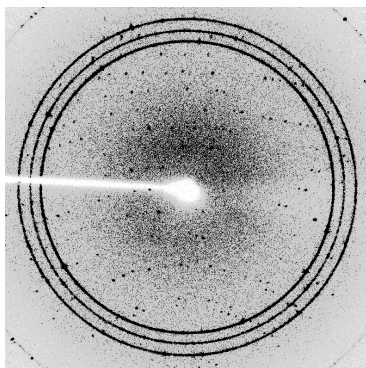
Pro práci byl použit vzorek lysozymu o koncentraci 120 mg/ml, který pocházel z vaječného bílku. Pro krystalizaci byla zvolena metoda visící kapky s objemem rezervoáru 500  $\mu$ l a s krystalizačními kapkami složenými z 0,5  $\mu$ l roztoku proteinu a 0,5  $\mu$ l roztoku z rezervoáru.

Jako pufr jsme použili octan sodný při pH 4,6 a jako srážedlo NaCl.

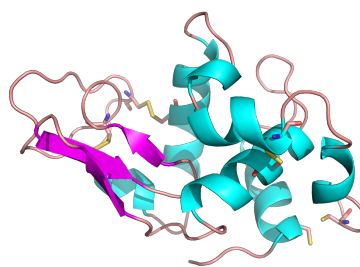
### 4 Výsledky a diskuze

Ověřili jsme fázový diagram krystalizace proteinu (obr. 3). Podle očekávání v první zóně (levá část diagramu) nevyrostly žádné krystaly, protože zde byla koncentrace proteinu nebo srážedla příliš nízká a systém se nedostal do zóny nukleace. V prostřední zóně (mezi červenými křivkami) se ve většině kapek objevily krystaly a u zbytku kapek jsme se dopustili nedokonalého zavření víčka, takže kapky vysychaly a nebylo dosaženo rovnováhy v systému. Napravo byla koncentrace proteinu nebo srážedla příliš vysoká, což způsobilo vznik sraženin.

U pár větších krystalů jsme získali jejich difrakční obraz (obr. 4). Na něm jsou patrné vodní kruhy – reflexe rozmístěné na soustředných kružnicích se středem uprostřed snímku



Obrázek 4: Difraktogram



Obrázek 5: Hotový model proteinu

způsobené ledem. Bílý stín vedoucí do středu snímku představuje stín lapače primárního svazku, který chrání detektor.

Struktura lysozymu byla vyřešena pomocí metod makromolekulární krystalografie (model viz obr. 5).

## 5 Shrnutí

Cílem naší práce bylo vytvořit krystaly lysozymu a zopakovat Laueho experiment. Krystalizace proteinu byla provedena metodou visící kapky. Na vypěstovaných proteinových krystalech byla naměřena difrakce rentgenového záření. Z naměřených dat byla vypočtena struktura molekul lysozymu.

## Poděkování

Chtěli bychom poděkovat svým supervisorům, Ing. Janu Stránskému a Bc. Leoně Švecové, za ochotu a trpělivost při vysvětlování teorie a praxe a za cenné rady a připomínky při psaní článku. Stejně tak bychom chtěli poděkovat všem organizátorům Týdne vědy na Jaderce, kteří nám umožnili zúčastnit se této akce.

## Reference

- [1] Smatanová I. K.: Krystalizace biologických makromolekul, [online], [cit.: 20. května 2014]  
<http://www.xray.cz/kryst/difrakce/iva/krystalizace.htm>
- [2] Řezáčová P.: Kryokrystalografie biologických makromolekul, [online], [cit.: 20. května 2014]  
<http://www.xray.cz/kryst/difrakce/rezacova/kryo.htm>
- [3] Wikipedia: Lysozyme – Wikipedia, the free encyclopedia, [online], [cit.: 20. května 2014]  
<http://en.wikipedia.org/wiki/Lysozyme>
- [4] RCSB Protein Data Bank  
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1LYS>