

3D atomární struktura bílkoviny za 24 hodin

Z. Kolouchová ¹, V. Korolova ², O. Tichý ³

¹Gymnázium ALTIS, Praha; zuzanakolouchova07@gmail.com

²Gymnázium a obchodní akademie Bučovice;
korolyova.nika22@gmail.com

³Gymnázium ALTIS, Praha; tichy.ondra07@gmail.com

Odborný garant; Ing. Jan Stránský, Ph.D.; BTU AV ČR

Abstrakt:

Cílem našeho dvoudenní práce bylo určit strukturu proteinu, a to konkrétně cytoplazmatického enzymu, lysozymu. Součástí naší práce byla příprava jeho krystalků, dále pak na základě dat z rentgenové difrakce určení elektronovou hustoty. Z té jsme pak konečně zrekonstruovali i finální strukturu pozorované bílkoviny.

1 Úvod

Na úvod pro úplné porozumění tématu je nutné zopakovat několik základních informací nejen o proteinech jako životně důležitých sloučeninách, ale také i o námi zkoumaném lysozymu.

Proteiny jsou biomakromolekulární látky, které jsou tvořeny dlouhými řetězci aminokyselin. Tyto látky mají v našem těle nespočet funkcí. Některé jsou základní stavební jednotkou například našich vlasů (keratin), zatímco bez obranné funkce jiných proteinů by bylo pro nás život nemožný (imunoglobulin).

Mezi tyto obranné proteiny patří i námi zkoumaný lysozym. Tato bílkovina je tvořena řetězcem 129 aminokyselin. V lidském těle jej nalezneme například v našich slinách, v přírodě pak třeba ve vaječném bílku. Tento enzym katalyzuje rozklad polysacharidových řetězců v buněčných stěnách bakterií, a tím je způsobuje jejich smrt.

Znalost struktur proteinů je pro lidstvo a výzkum důležitá z mnoha důvodů od vývoje nových léčiv až po například pokrok v genetickém inženýrství

2 Krystalizace proteinu

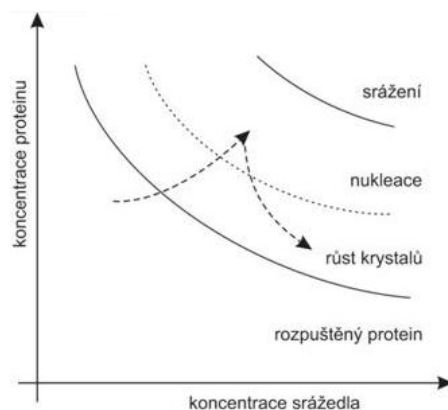
Běžným způsobem zjišťování struktur proteinů je pomocí difrakce rentgenového záření od krystalové mřížky pozorovaného proteinu. Stejným způsobem jsme postupovali i my vašem experimentu.

Existuje několik způsobů, jak takový krystal vypěstovat, my si vybrali níže popsanou metodu visící kapky.

2. 1 Princip a proces krystalizace

Krystalizace je proces fázové přeměny, během kterého se částice uspořádávají do pravidelné krystalické mřížky. Tento proces nastává, když dosáhneme limitu nasycení roztoku závisících na mnoha faktorech od změny koncentrace proteinu, přes změnu pH až po užití srážecí činidla. Za ideálních podmínek pak roztok vylučuje pevné látky právě v té žádoucí krystalické formě.

Krystalizace samotná probíhá ve fázích počínající nukleací, tedy vznikem krystalizačních jader. Tato jádra jsou pak stabilní a schopná spontánního růstu. Stupeň přesycení zakreslujeme do fázového diagramu, kde přesycení rozdělujeme do tří stupňů. Nejvyšším stupněm je oblast precipitační, kde se tvoří sraženiny a pro nás tedy není žádoucí. Další zónou je oblast labilní, kde chceme krystalizaci iniciovat. Vytvořením jader v labilní oblasti se sníží koncentrace proteinu a dostaneme se tak do té nejméně přesycené pro nás nejideálnější zóny, a tou je oblast metastabilní, kde probíhá už jen růst krystalků.



Obrázek 1- fázový diagram

2. 2 Metoda visící kapky

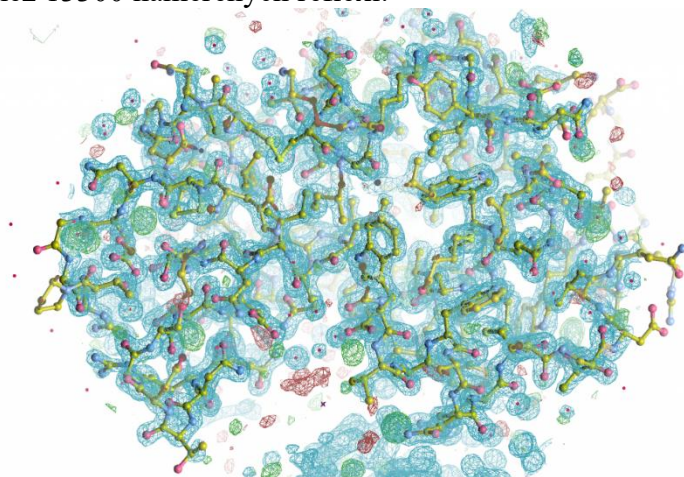
Tato metoda využívá principu difuze par, probíhající díky jednoduché osmóze, kdy se postupně zvyšuje koncentrace proteinu a precipitačního činidla v malé kapce, dokud nedojde k přesycení. Tato kapka visí na vnitřní straně víčka uzavíracího rezervoáru s matečným roztokem. Metoda je poměrně jednoduchá na provedení a mimo to také dobře pozorovatelná.

Abychom dosáhli požadované krystalizace, nutností je zajistit správné poměry mezi složkami matečního roztoku. Jeho součástí je nějaké precipitační činidlo, ta pak mají různé podoby. Může se jednat o soli, organická rozpouštědla či polymerní látky, jako je námi použitý PEG (polyethylenglykol). Další důležitou složkou je pak sůl, která narušuje vodní ochrannou vrstvu proteinů a snižuje jeho rozpustnost. My použili klasickou kuchyňskou sůl. Další složkou pak byl octan fungující jako pufr.

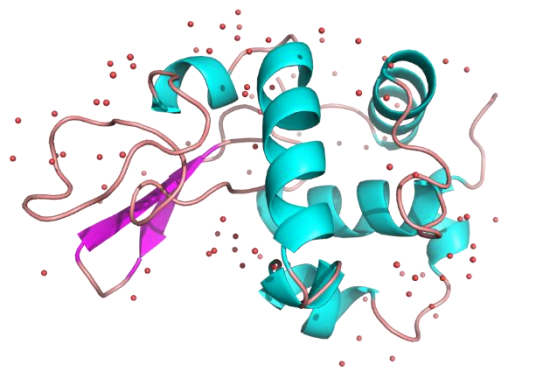
3 Provedení

Cílem naší práce bylo zmapování fázového diagramu, a tím ověření jeho pravdivosti v praxi. Pracovali jsme na třech destičkách o velikosti 3x5, tedy se 180 námi připravenými vzorky. Ve sloupcích jsme pak měnili koncentraci proteinu a v řádcích koncentraci soli. Celkový objem matečního roztoku byl vždy 400 μ l na 4 kapky. Z nich dvě v poměru proteinu a matečního roztoku 1:1 a dvě v poměru 1:2. Koncentrace rozpuštěného lysozymu byly 20, 40, 60, 80, 100 mg/ml. Gradient koncentrace soli byl 0,5M. Použili jsme tedy 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4 M soli

S jedním ze vzorků s poměry 1:1 lysozymu s koncentrací 50 mg/ml s matečným roztokem složeným z 1M NaCl, 50 mM octanu sodný pH 4,0 a 30 % PEGu 3350 jsme pak prováděli rentgenovou difrakci. Jako první musel být krystal z kapky vyrybařen pomocí smyčky na pinu o průměru 100 μm a dále zamražen ve vialce v kapalném dusíku. Difrakce pak probíhala v rentgenovém difraktometru. Z difrakčního obrazce jsme poté zanalyzovali data a zkonstruovali strukturu lysozomu za pomoci specializovaného programu (XDS, CCP4) a více než 13300 naměřených reflexí.



Obrázek 2 – mapa elektronové hustoty



Obrázek 3 – stužkový model molekuly lysozymu

4 Shrnutí

Výsledkem naší práce je níže vložená koláž na obrázku č. 4 ukazující úspěšnost krystalizace v závislosti na koncentraci rozpouštědla a proteinu. Z fotek můžeme pozorováním vyvodit závěr, že ideálním rozpětím je koncentrace soli na 1M a 40 mg/ml lysozymu až po 1,5 M po 60 mg/ml proteinu za správně nastavených podmínek. Při nízkých koncentracích nukleace neproběhla naopak při vysoké koncentraci se vytvořily sraženiny.

Výsledkem druhé části experimentu je pak výše vložená struktura jednoho z krystalů lysozymu (obrázek 2 a 3).

Získaná data byla publikována v databázi ZENODO na adrese <https://doi.org/10.5281/zenodo.15731146>

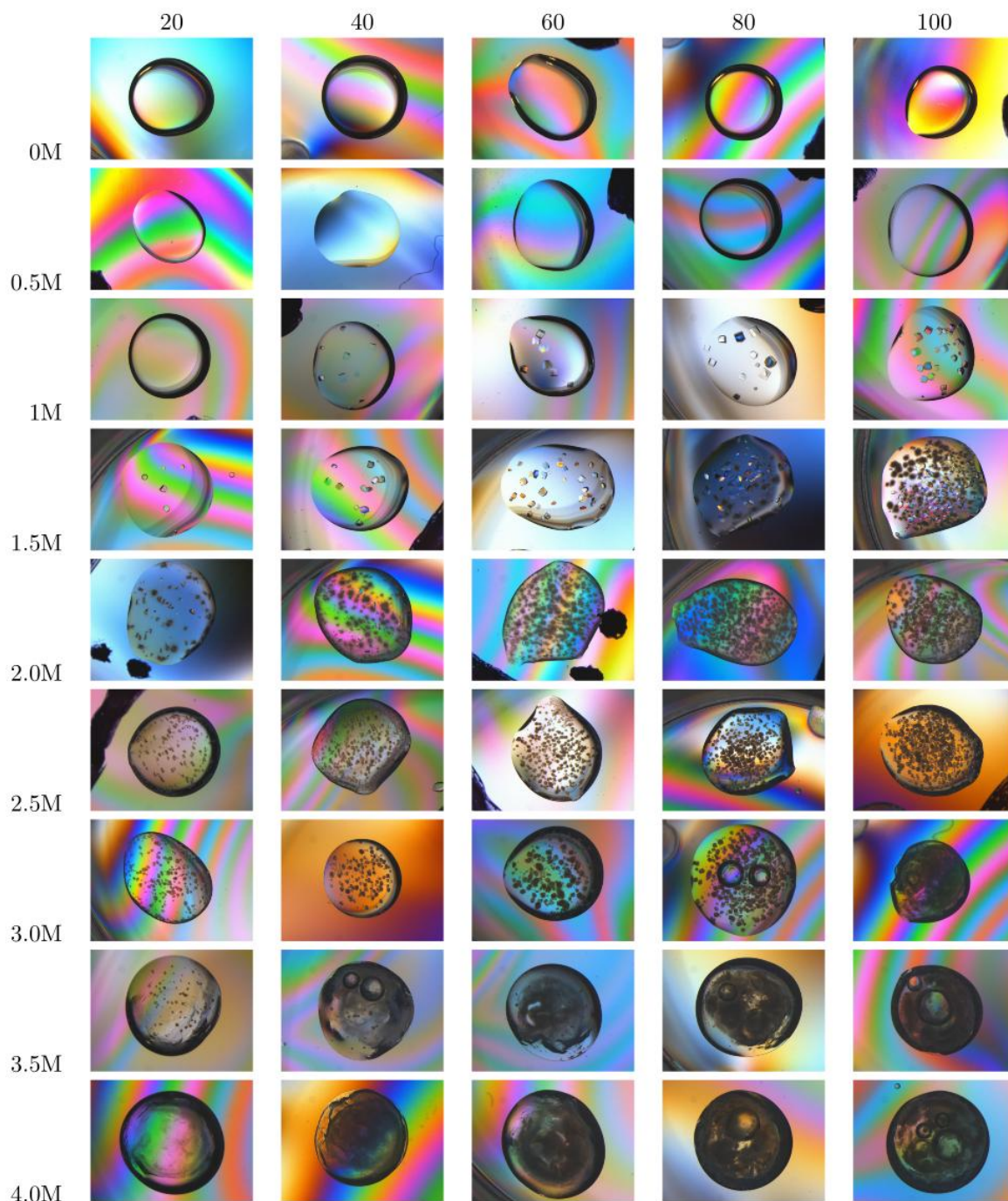
Poděkování

Především děkujeme našemu supervizorovi Ing. Janu Stránskému, Ph. D za odborné vedení tohoto projektu, prohloubení našich dosavadních vědomostí a otevřený, trpělivý přístup k nám při snaze správně vypočítat koncentrace a pochopit zdánlivě nepochopitelné. :)

Také samozřejmě děkujeme všem organizátorům Týdne vědy na FJFI ČVUT v Praze za zpříjemnění posledních předprázdninových dnů.

Reference

- [1] K čemu se lysozym používá? Online. Dostupné z: <https://cz.gygaoyuanbio.com/info/what-is-lysozyme-used-for-88895764.html>. [cit. 2025-06-24].
- [2] MARKOVÁ, Klára. *Krystalizace a strukturní charakterizace stabilních variant halogenalkandehalogenasy DhaA*. Online, Bakalářská práce. Brno, 2015. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/gcq3f/Bakalarska_prace_-_finalni_pdf.pdf. [cit. 2025-06-24].
- [3] KUTÁ SMATANOVÁ, Ivana. *Krystalizace biologických makromolekul*. Online. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kryst/difrakce/iva/krystalizace.htm>. [cit. 2025-06-24].x



Obrázek 4 – Krystalizační fázový diagram v praxi, na horizontální ose je koncentrace proteinu (mg/ml), na vertikální ose je koncentrace soli (M)