

3D atomární struktura bílkovin za 24 hodin

Romana Čanigová, Rastislav Turányi, Ladislav Nagy
Bilingválne gymnázium Milana Hodžu; Gymnázium a SOŠZE Vyškov, p.o.
r.canigova@gmail.com; t.rastislavv@gmail.com; ladislav.nagy@mensa.cz

Abstrakt

Proteiny jsou důležitou součástí živých organismů. Znalost jejich struktury pomáhá k pochopení jejich funkce. Metodou proteinové krystalografie jsme určili strukturu proteinu lysozymu a prozkoumali jsme možnosti jeho krystalizace.

1 Úvod

Cílem tohoto projektu bylo určit strukturu bílkoviny. Bílkoviny jsou biopolymery složené z aminokyselin. Určování jejich struktur je důležité pro lepší pochopení jejich funkcí, na to, aby jsme mohli měnit některé z jejich částí, a tak měnit jejich funkce a vlastnosti.

My jsme pro naše účely využívali protein lysozym, protože je pro něj známá krystalizační podmínka, jeho krystalizace probíhá poměrně rychle a jeho krystaly dobře difraktují rentgenové záření. Lysozym vykazuje antibakteriální účinky a vyskytuje se například v slzách nebo ve vaječném bílku.

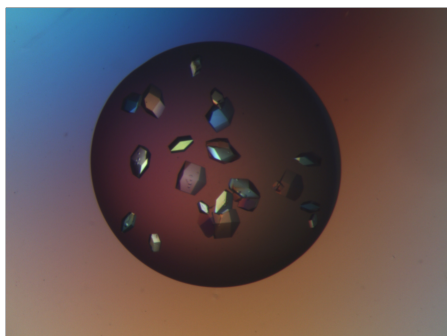
2 Materiály a metody

Začali jsme smícháním proteinu lysozymu o koncentraci 90 mg/ml s roztokem 100 mM galaktózy (cukr) v poměru 1:1. Zředěný protein jsme použili, protože nezředěný by krystalizoval příliš rychle a vytvořil by příliš malé krystaly. Protein jsme mohli ředit vodou, ale protože by z vody následně vzniklý led mohl poškodit krystaly proteinu, použili jsme jako ředidlo roztok galaktózy.

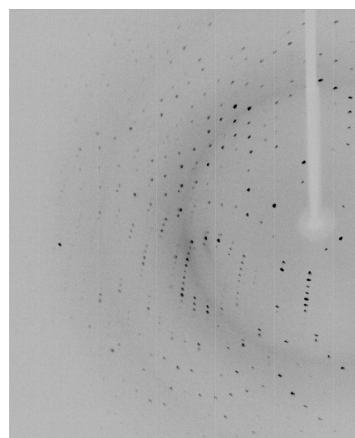
V rezervoáru jsme smíchali 30% roztok polyethylenglykolu 5000 (dále jen PEG 5000), 1M NaCl, 50mM octan sodný pH 4,6. PEG 5000 a NaCl sloužili jako srážedla a octan sodný sloužil na udržení konstantního pH.

Víčko rezervoáru jsme za pomoci stlačeného vzduchu zbavili nečistot a kápli na něj směs smíchaného proteinu a roztoku z rezervoáru. Rezervoár jsme víčkem uzavřeli a pod mikroskopem jsme 20 minut sledovali růst krystalu.

Vypěstované krystaly jsme pod mikroskopem vylovili pomocí nylonových smyček a zmrazili v tekutém dusíku o teplotě 77 K. Zmrazení bylo nutné proto, aby se při následném ozařování krystalů rentgenovým zářením krystaly nerozpadly. Zmražené krystaly jsme umístili na goniometr v difraktometru a změřili difrakční data. Zdrojem záření byla rentgenová lampa s anodou z tekutého galia (Excillum MetalJet). Data byla zaznamenána na plošný detektor (Bruker Photon 2). Naměřená data jsme zpracovali za pomoci programů XDS, SHELLXC/D/E a strukturu jsme upřesnili pomocí programů z balíčku CCP4 (programy Coot, Refmac5).



Obrázek 1: Krystaly lysozymu v polarizovaném světle.



Obrázek 2: Difrakční snímek naměřený na krystalu lysozomu

Další prací bylo vytvořit fázový diagram krystalizace lysozymu. Fázový diagram ukazuje závislost krystalizace na koncentraci srážedla (zde NaCl) a proteinu. Koncentrace NaCl se pohybovala v rozmezí 0,1M až 3M a proteinu 10 mg/ml až 100 mg/ml. Krystalizační podmínky navíc obsahovaly již zmíněný stabilizátor pH 0,1M octan sodný.

3 Výsledky a diskuze

V krystalizační podmínce s PEG 5000 vyrostly krystaly o velikosti $150\mu m - 250\mu m$ (obr. 1). Na těchto krystalech jsme naměřili difrakční data (obr. 2) a vyřešili strukturu lysozymu. Molekula proteinu obsahuje 6 α -helixů, 1 β -skládaný list (obr. 3). Na molekulu lysozymu je navázáno 8 chloridových iontů a 1 sodíkový iont (obr. 4).

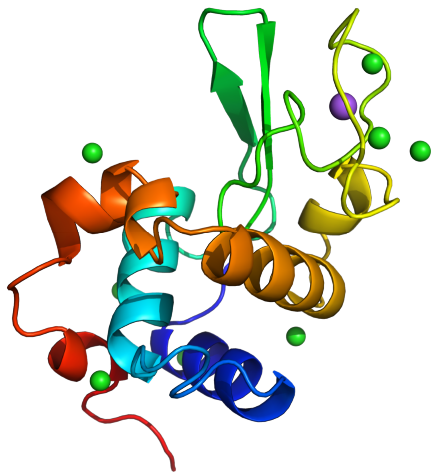
Výsledkem druhé práce je následující fázový diagram (obr. 5). Z fázového diagramu lze pozorovat, že při vysokých koncentracích NaCl a proteinu dojde ke sražení proteinu a naopak při nízkých koncentracích ke krystalizaci nedochází. Zjistili jsme, že optimální podmínka pro růst krystalů lysozymu je 1M NaCl a 75 mg/ml vzorek lysozymu.

4 Shrnutí

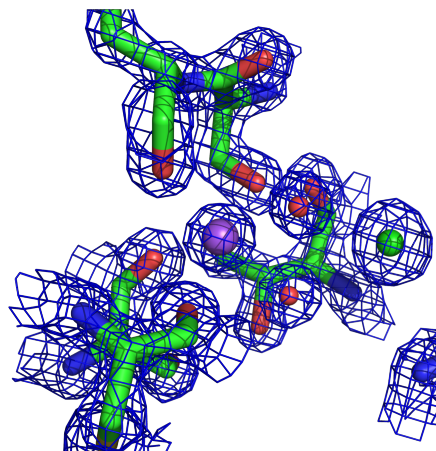
Během našeho projektu jsme vypěstovali krystaly lysozymu, na kterých jsme následně naměřili difrakční data. Tato data jsme zpracovali a vyřešili jsme strukturu jmenovaného proteinu. Zároveň jsme vytvořili fázový diagram krystalizace lysozymu a zjistili tak optimální koncentraci složek pro krystalizaci.

Poděkování

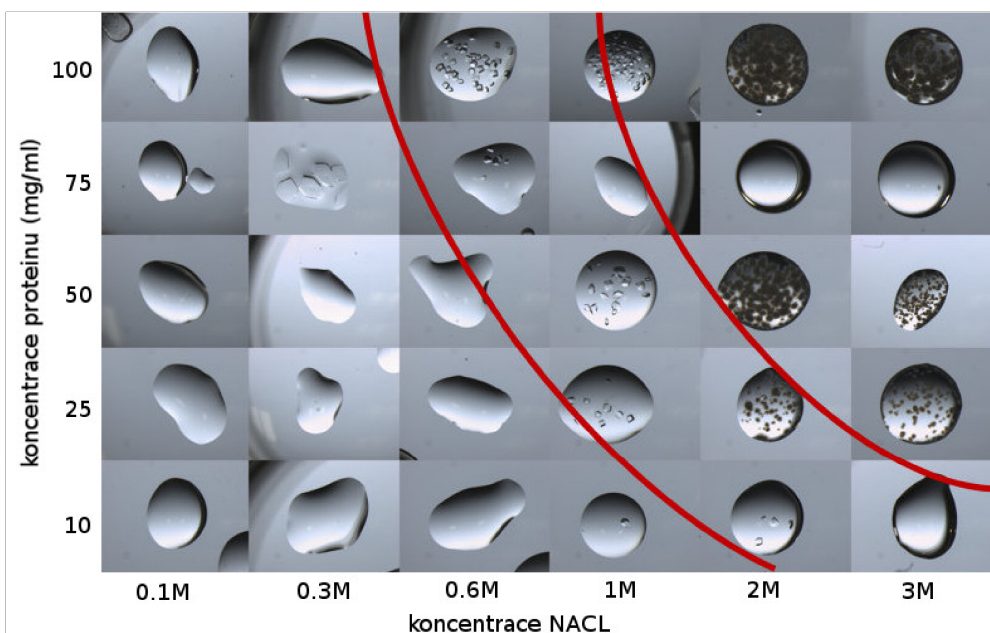
Děkujeme našim supervizorům Ing. Janu Stránskému a Ing. Leoně Švecové za pomoc při vypracování projektu. Děkujeme také ostatním organizátorům Týdne vědy za pořádání této akce a za možnost zúčastnit se jí.



Obrázek 3: Zjednodušený model molekuly lysozymu (zelené kuličky jsou ionty Cl, fialová kulička je iont sodíku)



Obrázek 4: Detail struktury lysozymu s mapou elektronové hustoty (modrá mřížka). Tyčky zobrazují mezi atomární vazby, červené kuličky molekuly vody, fialová kulička atom sodíku, zelené kuličky atomy chlóru.



Obrázek 5: Fázový diagram krystalizace lysozymu. Prostor mezi červenými křivkami označuje ideální koncentraci obou složek, jak soli tak proteinu, pro růst krystalů.