

Strukturní analýza proteinů pomocí rentgenové difrakce

Jan Hrach¹, Veronika Mašková²

¹ Gymnázium Přípotoční 1337, Praha 10, jenda@hrach.eu

² Gymnázium Havířov-Podlesí, příspěvková organizace, maskova.ver@email.cz

18. června 2013

Abstrakt

Zjištění struktury proteinu je důležité pro mnoho oborů lidské činnosti. Pro metodu rentgenové difrakce je potřeba protein izolovat a vypěstovat krystaly. Určili jsme podmínky pro pěstování krystalů lysozymu, naměřili difrakční data a rekonstruovali jeho strukturu

1 Úvod

U makrobiomolekul, jako jsou například proteiny nebo nukleové kyseliny, je velmi důležité poznat prostorovou strukturu. Pomůže nám to chápat princip jejich činnosti. Pravděpodobně nejpoužívanější metodou analýzy prostorové konformace je rentgenová difrakční analýza. Jiné metody, jako jsou elektronová mikroskopie nebo mikroskopie atomárních sil, buď nedávají dostatečně přesné výsledky (SEM, TEM), nebo se teprve rozvíjejí (AFM, STM).

Krystal se chová jako difrakční mřížka, na rozdíl od difrakčních mřížek běžně užívaných pro viditelné světlo jsou však elementy mřížky mnohem blíže u sebe, řádově 0,1 nm. Proto je potřeba použít záření s krátkou vlnovou délkou – tedy rentgenové záření.

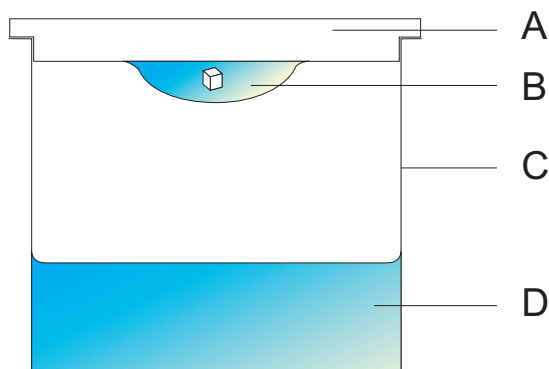
2 Metody

2.1 Krystalizace proteinu

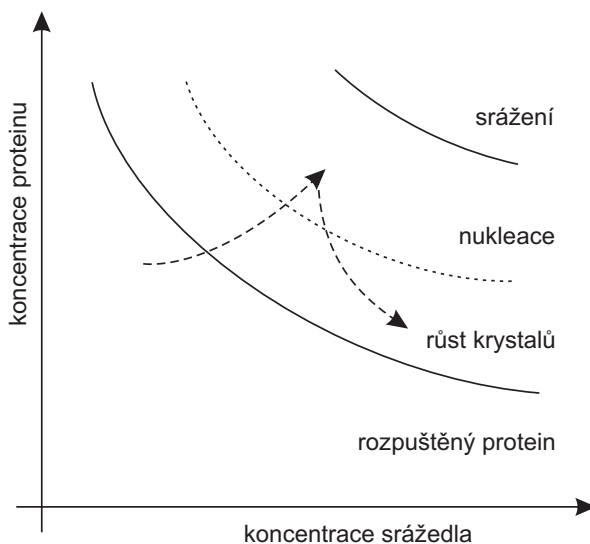
Základním požadavkem rentgenové krystalografie jsou krystaly zkoumané látky. Pro krystalizaci proteinů se používají difuzní metody, například metoda visící kapky.

Kapička roztoku proteinu a matečného roztoku v poměru 1:1 o objemu celkově 1 μ l se zavěsí na víčko nádoby, ve které je koncentrovaný matečný roztok (především pufru) [2]. Nyní dojde k difuzi a osmóze par vody z méně koncentrované kapičky do koncentrovaného rezervoáru, kapička se tak zahušťuje a protein začne krystalizovat (obr. 1).

Alternativně lze použít též metodu sedící kapky, která se liší prostorovým uspořádáním - kapka je na vyvýšenině nebo výstupku v nádobce.



Obrázek 1: Krystalizace metodou visící kapky. *A* - utěsněné víčko, *B* - krystalizační kapka, *C* - rezervoár, *D* - matečný roztok



Obrázek 2: Fázový diagram krystalizace proteinu. Srážedlo snižuje rozpustnost proteinu. Je jím například sůl nebo PEG.

2.2 Určení parametrů krystalizace neznámého proteinu

Aby proces krystalizace proběhl správně, musíme se dostat do fáze nukleace a potom se pohybovat v metastabilním stavu, kde dochází k růstu krystalů. Tato cesta je na obr. 2 naznačena šipkami. Pokud je koncentrace proteinu příliš vysoká, dojde ke vzniku nekrytalické sraženiny. Pokud je příliš nízká, protein nikdy pochopitelně nevykrystaluje.

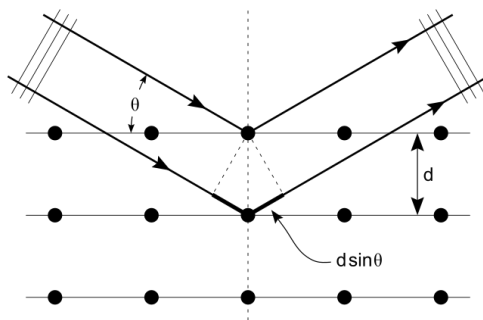
2.3 Ověření krystalu

Pro ověření původu krystalů, které mohou vzniknout nejen z proteinu, ale i ze soli a dalších složek roztoku, existuje několik testovacích metod. Proteiny narozdíl mohou být obarveny, neboť v krystalech proteinů existuje síť kanálků, do které mohou malé molekuly barviva proniknout a navázat se na protein. Krystaly proteinů jsou křehké, proto je možné vyzkoušet destruktivní test, a to test drcením například jehlou, nebo dehydratační test, kdy necháme krystalizační kapku vysychat, čímž se krystal vysuší a zkolabuje. Další metodou je použití polarizovaného světla. Proteiny narozdíl od většiny solí dokážou stáčet rovinu polarizovaného světla a jeví se tak jako barevné. Definitivním důkazem pak je rentgenová difrakce.

2.4 Zamrazení krystalu

Poté, co krystal vyroste (což může trvat pár minut i rok), je třeba jej z kapky vylovit pomocí smyčky a ihned potom zamrazit ponořením do tekutého dusíku, aby nedošlo k jeho rozpadu. Občas se při tom vytvoří na krystalu námraza, což dělá na difraktogramu kroužkové artefakty.

Krystal může nabývat rozměrů řádově desítky až stovky μm .



Obrázek 3: K odvození Braggovy podmínky

2.5 Rekonstrukce struktury, fázový problém

Krystal se skládá z atomů, které jsou uspořádány do rovin. Pokud na systém rovnoběžných rovin (hkl) s meziovinovou vzdáleností d_{hkl} dopadne rentgenové záření, dojde k rozptylu. Pokud je fázový rozdíl mezi rozptýlenými paprsky celočíselným násobkem n vlnové délky λ , vlny se sečtou (konstruktivní interference). K tomu dochází ve směrech θ_{hkl} , ve kterých je splněna Braggova podmínka:

$$2d_{hkl} \sin \theta_{hkl} = n\lambda \quad (1)$$

Na detektoru vidíme interferenční obrazec, na kterém každé maximum odpovídá jednomu systému rovin se splněnou Braggovou podmínkou.

Vztah mezi rozložením hustoty elektronových obalů a výsledným difrakčním obrazcem popisuje Fourierova transformace

$$\rho(x, y, z) = \sum_{hkl} F_{hkl} \cdot e^{i(hx+ky+lz)}$$

tedy každá reflexe hkl popisuje každý bod $[x, y, z]$ v prostoru. Bohužel ale vidíme jen jeho minima a maxima a už nemáme informace o rozdílu fází ($hx + ky + lz$). Pro experimentální určení fází lze použít následující metody:

Metoda molekulárního nahrazení (MR): známe sekvenci proteinu a můžeme zhruba tušit, jak vypadá, třeba na základě podobnosti jeho částí s částmi jiných proteinů, jejichž strukturu už známe

Metody anomálního rozptylu (MAD, SAD): na těžších atomech (např. aminokyseliny obsahující síru nebo bílkoviny obsahující kovy) dochází k anomálnímu rozptylu, z čehož lze určit jejich poloha a v důsledku struktura proteinu

Metody izomorfního nahrazení (MIR, SIR): měří se difrakce na krystalech proteinů, které byly máčeny v roztocích těžkých kovů a porovnává se s difrakcí na krystalech bez kovů

V tomto miniprojektu jsme použili metodu molekulárního nahrazení.

3 Experiment

Pěstovali jsme lysozym, což je enzym nacházející se ve vaječném bílku, bílých krvinkách, slzách a pod., který rozkládá bakteriální buněčné stěny. Pro nalezení optimální krystalizační podmínky jsme optimalizovali koncentraci proteinu a chloridu sodného jako srážecího činidla. Krystaly byly inkubovány jeden den při teplotě 291 K.

Krystaly byly vyloveny pomocí nylonových smyček (obr. 6) a vitrifikovány v kapalném dusíku. Difrakční data byla měřena na FZÚ Cukrovarnická na čtyřkruhovém difraktometru Gemini. Zdrojem záření byla rentgenka s měděnou anodou, záření bylo detekováno plošným CCD detektorem Atlas.

Naměřená difrakční data byla oindexována a zintegrována programem Mosflm, fázový problém byl vyřešen metodou molekulárního nahrazení v programu Molrep. Jako model byla použita struktura lysozymu (PDB ID 1Lyz, [1]).

4 Výsledky a diskuze

Vliv koncentrace proteinů a soli je patrný na obrázku 4. Chování roztoku reflektuje fázový diagram krystalizace. Je patrná oblast agragace (srážení), oblast krystalizace a oblast nenasycení.

Vybrané krystaly byly zmrazeny v kapalném dusíku.

Celkově 8 proteinových krystalů bylo analyzováno pomocí rentgenového záření. Byl sbírán 1 snímek při expozici 600 s. Ve všech případech byla pozorována silná proteinové difrakce. Ve dvou případech se jednalo o difrakci od dvou krystalů (obr. 8), ve dvou byly pozorovány ledové kruhy (obr. 7). Na vybraném krystalu byl měřen kompletní difrakční záznam, tedy 98 snímků v různých orientacích s expozicí 440 s.

Po zpracování dat jsme do map elektronové hustoty umístili odkaz na atomární model, viz obr. 10. V mapách elektronové hustoty bylo lokalizováno všech 129 aminokyselin a 134 molekul vody.

Molekula lysozymu se skládá ze 6 α -šroubovic, které jsou těsně uspořádány, a jednoho β -skládaného listu (obr. 9). Obsah rozpouštědla v krystalu je 38 %.

5 Shrnutí

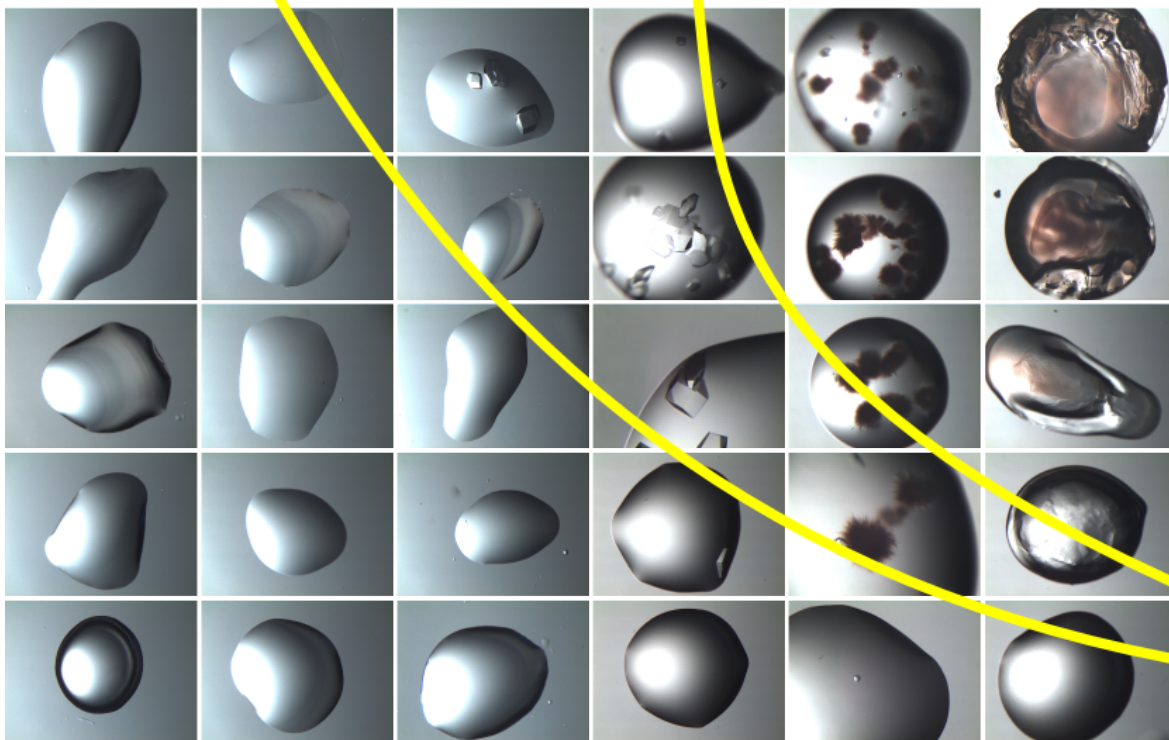
Ověřili jsme fázový diagram, určili správné podmínky pro růst krystalů lysozymu a na vypěstovaných krystalech naměřili kompletní sadu difrakčních dat, ze kterých jsme potom vyřešili strukturu proteinu.

Poděkování

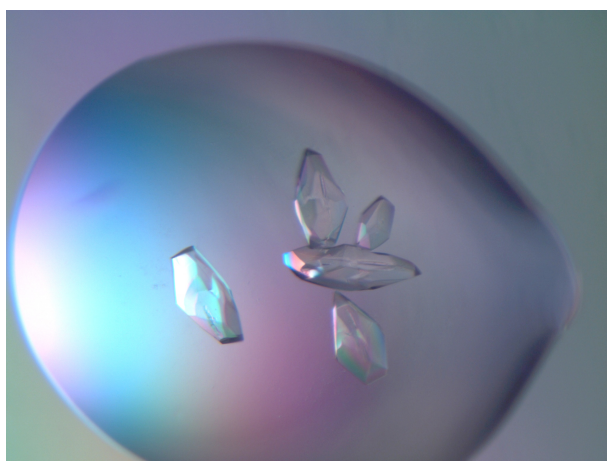
Autoři by rádi poděkovali Monice Kučerákové za podporu při měření difrakčních dat ve FZÚ AV ČR Cukrovarnická, Janu Stránskému a Leoně Švecové za trpělivost při vedení projektu, ÚMCH AV ČR za poskytnutí vybavení a prostor a FJFI ČVUT za organizaci akce.

Reference

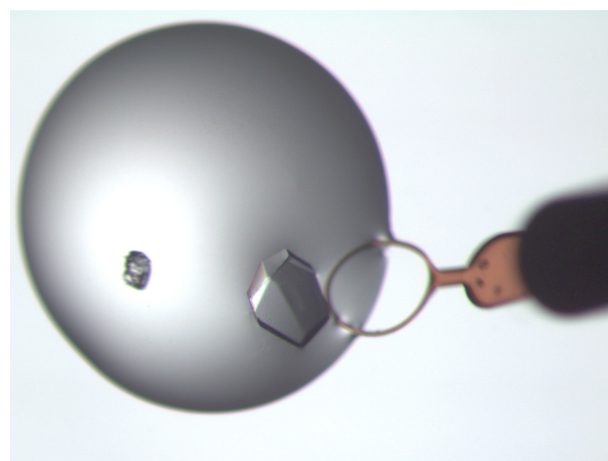
- [1] DIAMOND, R.: REAL-SPACE REFINEMENT OF STRUCTURE OF HEN EGG-WHITE LYSOZYME. *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY*, sv. 82, č. 3, 1974: str. 371–&.
- [2] Jaromír Marek, Z. T.: *Monokrystalová rentgenová strukturní analýza*. UPOL, 2002.



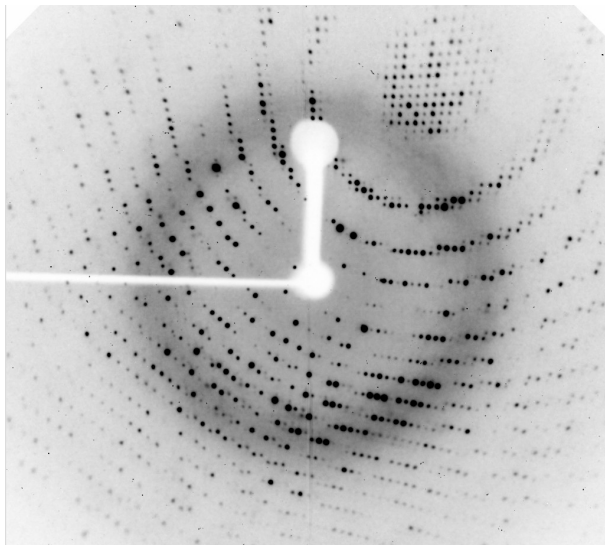
Obrázek 4: Kapky po dni inkubace. Koncentrace NaCl: 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 4 M (rostoucí s x-osou), koncentrace proteinu: 10, 30, 60, 90, 120 mg/ml (rostoucí s y-osou)



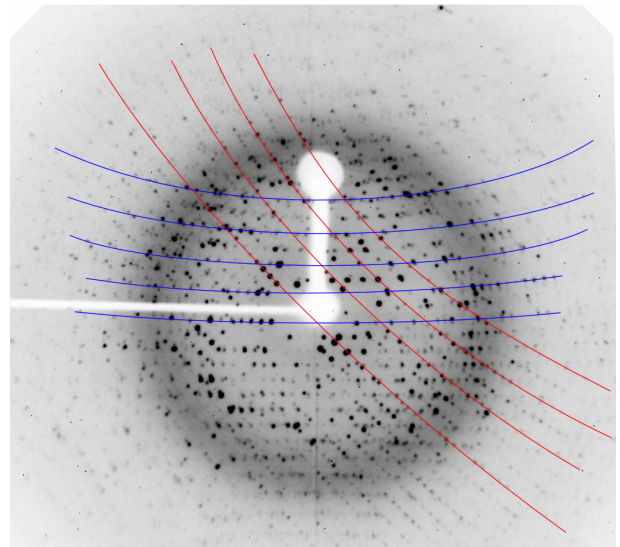
Obrázek 5: Vypěstované krystaly v polarizovaném světle



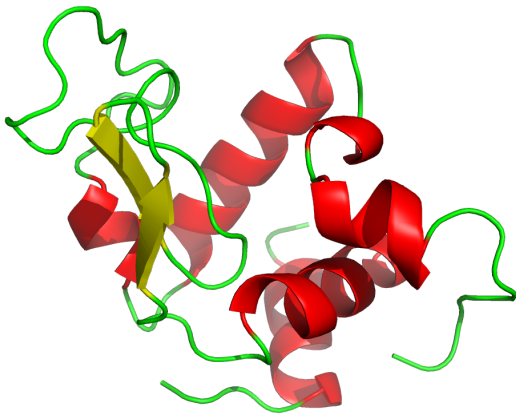
Obrázek 6: Lovení krystalu z kapky. Očko má průměr 300 μm



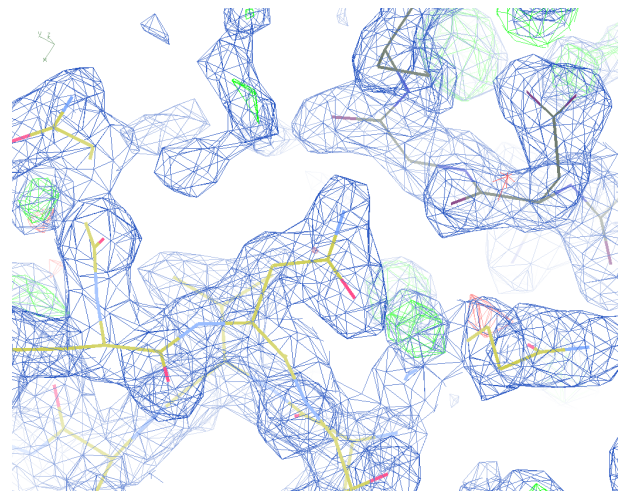
Obrázek 7: Difrakční obrazec, všimněte si rozmazaného kruhu, který vznikl kvůli ledu na krystalu



Obrázek 8: Difrakční obrazec vzniklý difrakcí na dvou krystalech. Příspěvek jedné krystalové mříže je označen modrými křivkami, druhé červenými.



Obrázek 9: Terciální struktura lysozymu. Červeně jsou α -helixy, žlutě β -skládaný list a zeleně smyčky bez sekundární struktury



Obrázek 10: Část modelu molekuly lysozymu - modře mapy elektronové hustoty, tyčky symbolizují vazby mezi atomy.