

Badanie struktury kryształu białka z odległości 2000 km

Refleksy na kryształach



Prof. Mariusz Jaskólski jest kierownikiem Centrum Badań Biokrytalograficznych Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN. Wraz ze swoim zespołem w Zakładzie Krystalografii UAM bada strukturę białek metodami krystalograficznymi

MARIUSZ JASKÓLSKI
MIROSLAW GILSKI
Wydział Chemii UAM, Poznań
Instytut Chemii Bioorganicznej, Poznań
Polska Akademia Nauk
mariuszj@amu.edu.pl
mirek@amu.edu.pl

Badany obiekt nie musi dziś znajdować się w zasięgu rąk badacza. Pośrednictwo Internetu i precyzyjna aparatura pomiarowa umożliwiły pierwsze w Polsce badania struktury kryształów białka zanurzonych w ciekłym azocie w Grenoble bez opuszczenia pracowni w Poznaniu

Nowoczesna krystalografia białek datuje swoje początki na połowę lat 30. XX wieku



Dr Mirosław Gilski zajmuje się wykorzystaniem metod komputerowych w badaniach krystalograficznych

i wiąże się z nazwiskiem Maxa Perutza. Poszukując tematu pracy doktorskiej, postanowił on wyznaczyć strukturę hemoglobiny metodą dyfrakcji promieni rentgenowskich. Informacja o budowie przestrzennej makromolekuł, białek i kwasów nukleinowych była wówczas zerowa. Rozwiązanie struktury hemoglobiny zajęło Perutzowi ponad 20 lat. Nieco wcześniej, w roku 1957, strukturę krystaliczną czterokrotnie mniejszej mioglobiny rozwiązał John Kendrew, a w roku 1953 poznano budowę przestrzenną kwasów nukleinowych również dzięki dyfrakcji promieni rentgenowskich. W latach 60. i 70. XX wieku rozwiązanie zagadki budowy przestrzennej cząsteczki białka było nadal procesem wieloletnim, a przyrost wiedzy o strukturze białek był bardzo wolny. Z rozwojem metodyki oraz technik obliczeniowych biologia strukturalna, czerpiąca informację głównie z krystalografii, zaczęła nabierać tempa. Dziś bank

Malowniczo położony synchrotron ESRF w Grenoble ma średnicę 0,85 km, a krążące w nim elektrony posiadają energię odpowiadającą przyspieszeniu napięciem 6 mln V



ESRF

struktur białkowych PDB (*Protein Data Bank*) zawiera informację o budowie przestrzennej ponad 40 tys. makromolekuł i powiększa się w tempie ponad 5 tys. struktur rocznie. Stało się to możliwe dzięki rozwojowi inżynierii genetycznej ułatwiającej produkcję trudno dostępnych białek w komórkach bakteryjnych, a także dzięki rozpowszechnieniu potężnych synchrotronowych źródeł promieniowania rentgenowskiego.

Renesans

Jednak nawet tak wyposażona krystalografia białek nadal nie może sprostać popytowi, który wywołany został przez eksplozję informacji genetycznej u progu XXI wieku. Z astronomiczną szybkością gromadzimy informację o sekwencji całych genomów i jednocześnie nie potrafimy jej zrozumieć; nie wiemy, jakie białka zakodowane są szyfrem ATGC naszych genów, nie wiemy, jak białka te funkcjonują. Najprostsza droga do zrozumienia funkcjonowania komórek żywych wiedzie przez poznanie struktury molekuł życia - białek. Krystalografia białek jako podstawowa metoda wyznaczania ich struktury przeżywa więc renesans.

Giganty w skali atomowej

Oprócz genomiki strukturalnej, której motto brzmi „jak najwięcej struktur”, nowoczesna biokrystalografia ma też inne fronty. Na jednym z nich badacze starają się poznać strukturę olbrzymich kompleksów makromolekularnych, dochodzących do rozmiarów organelli komórkowych, czy prymitywnych obiektów wykazujących cechy życia. Na froncie tym oznaczono strukturę atomową wielu dziesiątków wirusów, poznano też strukturę maszyny syntetyzującej białka w komórkach - rybosomu. W tym ostatnim przypadku okazało się, że jest to maszyna działająca na bazie RNA, a nie białka, jak to ma miejsce w większości prostszych enzymów.

Cel – pal!

Krystalografia dostarcza też precyzyjnej informacji strukturalnej niezbędnej w racjonalnym projektowaniu leków. Poznanie struktury białek związanych z procesami chorobowymi jest najprostszą drogą do projektowania „pocisków molekularnych” - leków, które zapobiegają tym procesom, zdołają je odwrócić, a przynajmniej zatrzy-



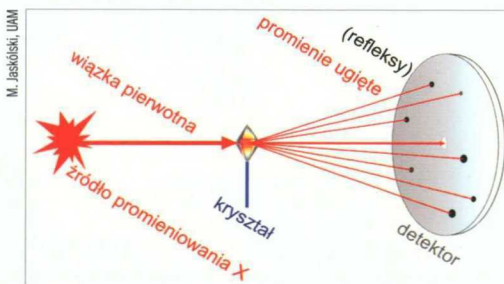
mać. W ten sposób na przykład powstały najbardziej skuteczne leki przeciw AIDS, zaprojektowane jako inhibitory jednego z enzymów retrowirusa HIV.

Krystalografia białek posiada też front „w głąb”, gdzie celem jest oznaczenie struktur makromolekuł z największą dokładnością i rozdzielczością. Rozdzielczość, mierzona w angstromach, jednostkach odległości w świecie atomów (1 angstrom to jedna dziesięciomilionowa część milimetra), oznacza poziom szczegółu, do którego dotarł model struktury. W praktyce wyższa rozdzielczość oznacza konieczność rejestracji większej liczby danych doświadczalnych. Nierzadko strukturę białka wyznacza się na podstawie milionów danych dyfrakcyjnych zarejestrowanych dla kryształu, którego rozmiary nie przekraczają 0,1 mm.

Na początku jest kryształ

Badanie struktury białka metodą dyfrakcji promieni rentgenowskich wymaga pojedynczego kryształu uformowanego z badanego materiału. Krystalizacja białek jest jed-

Stacja badawcza ID14 w Grenoble do pomiarów dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na kryształach białkowych. Zawieszony w mikroskopijnej pętlice kryształek umieszczony jest w wiązce promieniowania oraz w strumieniu par azotu. Obraz dyfrakcyjny rejestruje kamera CCD



Przechodząc przez kryształ, promieniowanie rentgenowskie rozdziela się na wiele promieni dyfrakcyjnych (refleksów). Ich położenie i intensywność mierzą urządzenia elektroniczne

Badanie struktury kryształu białka z odległości 2000 km

Dr Mirosław Gilski w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu steruje za pośrednictwem Internetu pomiarami dyfrakcyjnymi kryształów białkowych w ośrodku synchrotronowym ESRF w Grenoble



M. Stropocki, ICiB PAN

nym z trudniejszych etapów rozpoczynających proces rozwiązywania struktury. Dziś eksperymenty krystalizacyjne wspomagane są robotami, które w mikroskopijnej objętości testują tysiące warunków, by znaleźć te, w których cząsteczki białka utworzą kryształ. Kryształ białka przeznaczony do pomiarów dyfrakcyjnych jest z reguły jeszcze „dodatkowo zamrożony” w parach ciekłego azotu o temperaturze -170°C . Ma to na celu zabezpieczenie wrażliwego białka i towarzyszącej mu zawsze w kryształach otoczki wodnej.

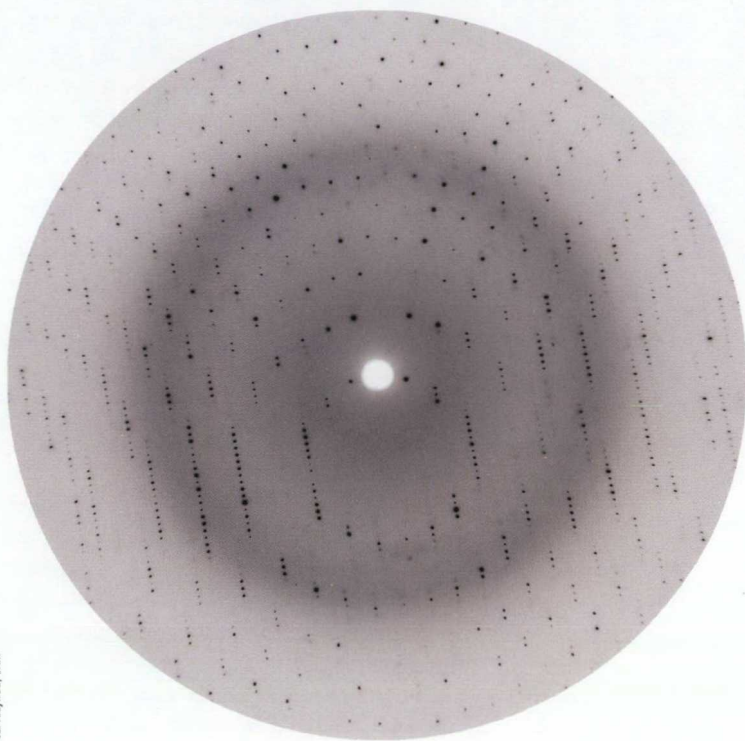
Jednak zarejestrowanie obrazu dyfrakcji kryształu nie daje jeszcze gwarancji poznania obrazu jego struktury. Wiąże się to z matematyczną relacją pomiędzy tymi dwoma obrazami, noszącą nazwę transformacji Fouriera. Do jej rozwiązania niezbędna jest dodatkowa informacja o fazach fal rentgenowskich rozproszonych przez kryształ. Doświadczalny pomiar faz nie jest możliwy. Uciekamy się więc do różnych „podstępów”, aby tę informację zdobyć. Można np. posłużyć się modelem struktury podobnego białka, aby rozwiązać nową, nieznaną strukturę. Można też wprowadzić do kryształu superciężki atom, który odcisnie piętno w obrazie dyfrakcji i ułatwi rozwikłanie zagadki fazowej. Odmiana tej metody polega na umieszczeniu w kryształach atomu rozpraszającego promienie rentgenowskie w sposób szczególny, by na jego bazie rozwikłać resztę struktury. Popularnym pierwiastkiem jest tu selen,

wprowadzany do białka metodami inżynierii genetycznej w postaci selenometioniny.

Sekret procesów życia

Rozwiązywanie struktury kryształu równoznaczne jest z wyznaczeniem mapy rozkładu elektronów w kryształach. Mapa ta obrazuje położenia centrów atomowych jako wysp o wysokiej koncentracji elektronów i moż-

Obraz dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na kryształach białka. Intensywność refleksów mówi o przestrzennym rozkładzie atomów w strukturze kryształu



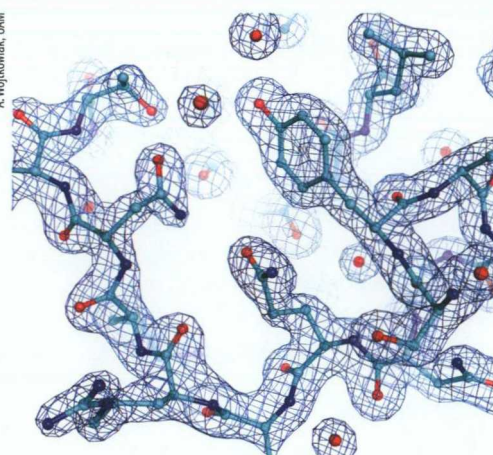
Sz. Krzywda, UMi

liwia zbudowanie modelu struktury przestrzennej makromolekuły. Modele takie składają się z tysięcy powiązanych atomów, z których każdy ma precyzyjnie wyznaczone współrzędne w przestrzeni trójwymiarowej. Zrozumienie funkcjonowania takiej molekuly giganta wymaga solidnej wiedzy chemicznej. Za pośrednictwem chemii, wspartej na fizyce krystalograficznego pomiaru dyfrakcyjnego, docieramy do największej zagadki biologii, do tajemnicy procesów życia.

Wiązka na wirażu

W laboratorium promieniowanie rentgenowskie wytwarza się w lampach rentgenowskich lub w nieco bardziej skomplikowanych generatorach z wirującą anodą. Źródła te jednak dają promieniowanie o niskiej intensywności, poważnie ograniczając pomiary makromolekularne. Większość badań białkowych prowadzi się obecnie z wykorzystaniem źródeł synchrotronowych. Synchrotron to cyklotron o średnicy kilkuset metrów, w którym elektrony sterowane polem magnetycznym krążą rozpedzone do prędkości podświetlonej. Wprowadzona w wiraż wiązka elektronów emituje promieniowanie rentgenowskie, wykorzystywane między innymi przez krystalografów białek. Ogromna intensywność tego promieniowania umożliwia skrócenie pomiarów do ułamka sekundy. Problem jednak w tym, by drogie krysztale (warte więcej niż podobne diamenty) dowieźć do często bardzo odległego ośrodka synchrotronowego, uzyskać dostęp do źró-

Obraz programu zarządzającego przebiegiem pomiarów dyfrakcyjnych w ośrodku synchrotronowym ESRF w Grenoble. Dzięki niemu sterowaliśmy robotem, który wyjął kryształ z ciekłego azotu, umieścił go w wiązce promieniowania synchrotronowego i rozpoczął rejestrację danych. Po kilkunastu sekundach zobaczyliśmy wyniki analizy



Mapa gęstości elektronowej wyliczona na podstawie obrazu dyfrakcyjnego kryształu ukazuje budowę atomową cząsteczki białka. Wysoka jakość i rozdzielczość obrazu pozwala dostrzec także cząsteczki wody (czerwone kule) towarzyszące cząsteczce białka nawet w kryształach

ła i mieć dość szczęścia, by pomiar dyfrakcyjny zakończyć sukcesem.

Pomiary na odległość

Problemy logistyczne i wysoki stopień skomplikowania pomiarów synchrotronowych skłaniają do poszukiwania nowych rozwiązań. Jedną z propozycji polega na wysłaniu zamrożonych w ciekłym azocie kryształów białkowych do ośrodka synchrotronowego i przeprowadzeniu pomiarów za pośrednictwem łączności internetowej. Program komputerowy umożliwiający taką operację powstaje w ramach projektu BioXHIT Unii Europejskiej, w którym koncentrują się wysiłki wielu zespołów badawczych. Poznańskie Centrum Badań Biokrystalograficznych (CBB) w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN posiada od ponad dwóch lat status tzw. ośrodka TID utworzonego w celu wdrażania innowacji projektu BioXHIT. W listopadzie 2006 r. z siedziby CBB przeprowadzono po raz pierwszy w historii zdalny pomiar dyfrakcyjny w największym europejskim ośrodku synchrotronowym ESRF w Grenoble. Łączność pomiędzy CBB i ESRF nawiązano za pośrednictwem Internetu, a specjalne oprogramowanie umożliwiło operowanie linią synchrotronową i delikatnymi kryształami białkowymi w Grenoble za pośrednictwem klawiatury i myszy przenośnego komputera osobistego w Poznaniu. Ten udany eksperyment otwiera perspektywy dla prowadzenia synchrotronowych pomiarów krystalograficznych z dowolnego miejsca na Ziemi. ■

Chcesz wiedzieć więcej?

Rhodes G. (2006). *Crystallography Made Crystal Clear*. Academic Press.

