

**Prof. dr hab. Mariusz Jaskólski**

## **METODYKA KRYSTALOGRAFII BIAŁEK**

Odkrycie przez Maxa Lauego w 1912 roku, że promienie rentgenowskie ulegają dyfrakcji na kryształach dało fizykom i chemikom, a nieco później również biologom, potężne narzędzie badawcze pozwalające wnikać w strukturę materii z rozdzielczością atomową. Dzięki badaniom krystalografów dowiedzieliśmy się, jaką budowę przestrzenną mają związki chemiczne, od najprostszych po bardzo skomplikowane. Jeszcze przed odkryciem Lauego, biochemicy nauczyli się otrzymywać w formie krystalicznej także białka. Dzięki pionierskim pracom m.in. Dorothy Hodgkin, Maxa Perutza i Johna Kendrew od drugiej połowy lat 30-tych XX wieku rozpoczęły się zmagania krystalografów o rozszyfrowanie struktury białek. Dziś krystalografia białek stanowi fundament biologii strukturalnej, a w banku struktur białkowych PDB zgromadzona jest informacja o strukturze przestrzennej prawie 50 tys. makromolekuł. Krystalizacja białek stała się ważną samodzielną dyscypliną naukową dostarczającą obiektów, tj. kryształów makromolekularnych, do badań strukturalnych. Włączone w nurt "wysokosprawnej" (*ang.* High Throughput) genomiki strukturalnej, eksperymenty krystalizacyjne są coraz częściej zrobotyzowane i skomputeryzowane. Kluczowym ogniwem procesu badania struktury białka metodami krystalograficznymi jest zarejestrowanie obrazu dyfrakcji rentgenowskiej od kryształu białkowego. Polega to na zmierzeniu intensywności,  $I(hkl)$ , dziesiątków, a nawet setek tysięcy odrębnych promieni dyfrakcyjnych, zwanych refleksami, ugiętych na sieci przestrzennej kryształu. Pomiary dyfrakcyjne w biokrystalografii prowadzi się dziś w temperaturze ciekłego azotu, poprawiającej jakość danych oraz przedłużającej żywotność delikatnych kryształów białkowych. W intensywnościach refleksów zaszyfrowana jest informacja o strukturze kryształu, tj. o współrzędnych  $xyz$  każdego atomu cząsteczki białkowej w przestrzeni. Wzór wiążący strukturę kryształu,  $\rho(xyz)$ , z jego obrazem dyfrakcyjnym,  $I(hkl)$ , nie jest skomplikowany: jest to zwykły szereg Fouriera. Do jego wyliczenia potrzebna jest informacja o amplitudzie oraz fazie każdej fali elektromagnetycznej stanowiącej refleks  $hkl$ . Amplitudy łatwo wyliczyć z intensywności,  $|F(hkl)| = \sqrt{I(hkl)}$ , jednak fazy,  $\phi(hkl)$ , nie można zmierzyć doświadczalnie. W tym miejscu próba rozwiązania struktury jakiegokolwiek kryształu natrafia na fundamentalny problem, zwany **problemem fazowym**. W krystalografii białek do rozwiązania problemu fazowego służą trzy metody: (1) metoda podstawienia izomorficznego (SIR lub **MIR**) Maxa Perutza, (2) metoda podstawienia cząsteczkowego (**MR**) Michaela Rossmanna oraz (3) metoda dostrojonej dyfrakcji anomalnej (**MAD**) Wayne'a Hendricksona.

W **metodzie podstawienia izomorficznego** do cząsteczki białka w natywnej formie krystalicznej wprowadza się dodatkowe, bogate w elektrony, tj. ciężkie, atomy, zwykle jako jony metali ciężkich lub halogenki. Atomy te staną się znacznikami gęstości elektronowej, od których rozpoczyna się ujawnianie całej struktury w kryształach.

W **metodzie podstawienia cząsteczkowego** rozwiązujemy nieznaną strukturę krystaliczną nowego białka posługując się jako sondą – modelem przestrzennym podobnego białka. Poszukiwanie rozwiązania prowadzi się w przestrzeni wektorów międzyatomowych próbując dopasować gigantyczny zestaw wektorów pomiędzy atomami modelu do analogicznej funkcji, zwanej funkcją Pattersona, wyliczonej na podstawie  $I(hkl)$  dla struktury nieznanej.

Najnowsza metoda rozwiązywania problemu fazowego, **dostrojona dyfrakcja anomalna**, powstała dzięki osiągnięciom na dwóch przeciwnych biegunach nauk przyrodniczych: w inżynierii genetycznej i w fizyce wysokich energii. Rozpraszanie promieni rentgenowskich przez kryształy ma zwykle charakter „normalny”, zachodzi zgodnie z prawami optyki, bez nadzwyczajnych efektów. W pewnych sytuacjach to normalne oddziaływanie promieni rentgenowskich z materią zostaje zakłócone, dochodzi do zjawisk anomalnych. Dzieje się tak wówczas, gdy promieniowanie o odpowiednio dobranej długości fali wzbudza rezonans w chmurach elektronowych wybranych atomów w kryształach. Silne efekty anomalne obserwowane są rzadko, wymagają bowiem z reguły obecności bardzo ciężkich, niebiologicznych pierwiastków oraz, przede wszystkim, precyzyjnego dobrania długości fali, niemożliwego w tradycyjnych aparatach rentgenowskich. Pokonanie tej drugiej trudności zaferowała rentgenografia fizyka wysokich energii poprzez potężne urządzenia cyklotronowe zwane synchrotronami, generujące promieniowanie rentgenowskie o ogromnej intensywności oraz dające się łatwo dostrajać do pożądanej długości fali.

A jak umieścić w strukturze odpowiednie atomy rozpraszające anomalnie, bez uciekania się do żmudnych prób współkryształizacyjnych lub zawodnych metod nasączania kryształów? Rozwiązanie przyniosły metody rekombinacyjne otrzymywania białek, które stanowią dziś główne źródło materiału białkowego do badań krystalograficznych. Jeśli zamiast typowych szczepów ekspresyjnych *Escherichia coli* użyjemy auktotrofów metioninowych hodowanych na pożywce selenometioninowej, wówczas nadprodukowane przez te bakterie białko będzie posiadało w miejscu metioniny jej selenopochodną, przy praktycznie niezmiennych właściwościach biochemicznych i fizykochemicznych, w szczególności jeśli idzie o formowanie kryształów oraz o oddziaływanie z promieniowaniem rentgenowskim. Z jednym wszakże wyjątkiem: obecny w cząsteczce selen będzie znakomitym centrum rozpraszania anomalnego! W typowym eksperymencie MAD selenometioninową pochodną białka poddaje się działaniu odpowiednio dostrojonego promieniowania synchrotronowego, a uzyskane efekty anomalne wykorzystuje się do wyliczenia faz  $\varphi(hkl)$ .

Po rozwiązaniu problemu fazowego, omówiony szereg Fouriera pozwala wyliczyć **mapę gęstości elektronowej**  $\rho(xyz)$ , tj. rozkład elektronów w kryształach definiujący kształt cząsteczek chemicznych. Dopasowany do tej gęstości rozkład atomów w przestrzeni ukazuje badaczowi trójwymiarowy obraz biomolekuły. Końcowy etap badawczy nazywa się udokładnianiem struktury. Polega on na optymalizacji parametrów modelu w celu najlepszego wyjaśnienia wielkości doświadczalnych. Parametrami tymi są współrzędne atomów oraz amplitudy ich drgań termicznych. Po zakończeniu udokładniania pozostaje już tylko interpretacja wyników.

Oceniając wyznaczoną krystalograficznie strukturę białka warto zwrócić uwagę na trzy parametry charakteryzujące jej „jakość”. Podawana w angstromach ( $1 \text{ \AA} = 10^{-8} \text{ cm}$ ) **rozdzielczość**  $d$  odnosi się do minimalnego odstępów między płaszczyznami sieciowymi kryształu, od których odbijało się promieniowanie rentgenowskie w czasie pomiarów dyfrakcyjnych. Z grubsza biorąc, ta rozdzielczość obrazu dyfrakcyjnego przekłada się na rozdzielczość optyczną, charakteryzującą detale geometryczne, jakie możemy rozróżnić na kreślonych mapach gęstości elektronowej.  $d > 2 \text{ \AA}$  oznacza rozdzielczość średnią, tym gorszą (niższą), im większa liczba  $d$ . Przy  $d < 2 \text{ \AA}$  mówimy o rozdzielczości wysokiej. Gdy  $d$  zbliża się do  $1.2 \text{ \AA}$  - osiągnęliśmy rozdzielczość atomową.

Krystalograficzny **wskaźnik rozbieżności R** podaje (czasem w procentach), rozbieżność pomiędzy wielkościami zmierzonymi i wyznaczonymi na podstawie modelu struktury. Uzyskanie jak najniższej wartości R, a więc jak najlepszego dopasowania modelu do obserwacji doświadczalnych, jest technicznym celem udokładniania struktury. Struktury o  $R > 20\%$  są niezbyt dobrze udokładnione, tym gorzej, im R wyższe.  $R < 20\%$  charakteryzuje struktury dobrze udokładnione. Do oceny, czy udokładniane parametry mają pełne oparcie statystyczne w informacji wynikającej z pomiaru, stosuje się testowy wskaźnik rozbieżności zwany  $R_{free}$ , liczony dla refleksów wykluczonych z udokładniania. Jego wartość nie powinna znacząco przekraczać wartości R.

Wreszcie średnia kwadratowa (rms, *ang.* root-mean-square) **odstępstwa** wartości **parametrów stereochemicznych modelu od wielkości uznanych za standardowe** charakteryzuje poprawność geometryczną biomolekuły. W przypadku analizy długości wiązań walencyjnych wartość ta dla poprawnie wyznaczonej struktury powinna wynosić ok.  $0.02 \text{ \AA}$ . Wartości znacznie wyższe niż  $0.03 \text{ \AA}$  powinny wzbudzić naszą podejrzliwość. Cennym narzędziem weryfikacji modelu jest też **wykres Ramachandrana** przedstawiający rozrzut wartości kątów  $\phi$  i  $\psi$  charakteryzujących konformację łańcucha polipeptydowego. Zwykle kąty te nie są udokładniane, stąd stanowią doskonałe kryterium weryfikacyjne. W poprawnym modelu białka pary kątów  $\phi/\psi$  ograniczone są do dozwolonych obszarów wykresu Ramachandrana, z grubsza odpowiadających helisie  $\alpha$  i łańcuchowi  $\beta$ .