

## Krystalografia białek w kryształowej kuli

Mariusz Jaskólski <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Zakład Krystalografii, Wydział Chemii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza

<sup>b</sup> Centrum Badań Biokryystalograficznych, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań  
mariuszj@amu.edu.pl

Głównym celem biologii strukturalnej jest zrozumienie na poziomie atomowym mechanizmów molekularnych procesów określanych jako "życie", poprzez poznanie struktury i funkcji makromolekuł biologicznych, w pierwszej kolejności białek. Podstawową metodą badawczą jest krystalografia białek, stosująca dyfrakcję promieniowania rentgenowskiego na kryształach makromolekuł w celu poznania ich budowy atomowej. Krystalografia białek przeszła w ostatnich kilku dekadach przez trzy kolejne rewolucje, które doprowadziły do jej nieoczekiwanego odrodzenia i bezprecedensowego rozkwitu. Rewolucje te związane były kolejno z wprowadzeniem promieniowania synchrotronowego do rutynowych pomiarów dyfrakcyjnych, z wdrożeniem metody dostrojonej dyfrakcji anomalnej (MAD) na atomach selenu do automatycznego rozwiązywania problemu fazowego, oraz z zapoczątkowaniem programów genomiki strukturalnej (SG). Można oczekiwać, że w następnych 10-15 latach krystalografia białek nadal będzie w tej fazie rewolucyjnych przemian. Spodziewać się należy nie tylko lawiny struktur białkowych rozwiązywanych masowo w centrach genomiki strukturalnej, ale także sięgania po coraz ambitniejsze cele strukturalne, takie jak białka membranowe czy ogromne kompleksy makromolekularne. Na gruncie technik doświadczalnych można oczekiwać rychłego wprowadzenia promieniowania rentgenowskiego z lasera na swobodnych elektronach. Zrewolucjonizuje to całkowicie perspektywy eksperymentalne, umożliwiając na przykład badanie dyfrakcji na pojedynczych molekułach czy na kompletnych obiektach biologicznych, takich jak komórki organizmów żywych.

*Keywords: protein crystallography; structural biology; high-throughput crystallography; structural genomics; single-particle imaging; synchrotron radiation; X-ray free-electron laser;*

Niełatwo snuć przepowiednie, szczególnie dotyczące przyszłości. Zaczę więc swoje uwagi na temat przyszłości krystalografii biologicznej, nazywanej często krystalografią białek, od podsumowania kilku rewolucyjnych przemian, jakie dokonały się na tym polu w ostatnich kilkudziesięciu latach.

Na przełomie lat 70. i 80. ubiegłego stulecia wydawało się, że krystalografia białek powiedziała już swoje ostatnie słowo i osiągnęła status bardzo dojrzałej dyscypliny, wzbogacającej systematycznie skarbiec wiedzy strukturalnej o 10-20 struktur makromolekularnych rocznie. I oto w trzech kolejnych dekadach krystalografią białek wstrząsnęły trzy kolejne rewolucje, prowadzące do jej odrodzenia, widocznego w eksplozji aktywności, charakteryzującej się aktualnie liczbą 7000 struktur rocznie i sumą prawie 60000 struktur krystalograficznych zdeponowanych do dziś w Banku Struktur Białkowych PDB (Protein Data Bank) [2].

Pierwsza z tych rewolucyjnych przemian miała miejsce w latach 80. i związana była z wprowadzeniem promieniowania synchrotronowego (SR) do rutynowych pomiarów dyfrakcyjnych [3]. Rentgenowskie promieniowanie generowane w olbrzymich instalacjach synchrotronowych początkowo traktowano w krystalografii jako interesującą ciekawostkę naukową, ale na przestrzeni kilku lat zdominowało ono eksperymenty dyfrakcyjne, sprawiając, że

uciażliwe tygodniowe pomiary można było skrócić do zaledwie kilku godzin. Dziś, najsilniejsze linie synchrotronowe trzeciej generacji umożliwiają skrócenie pomiarów do sekund. Co więcej, poprawiła się jednocześnie radykalnie jakość danych, mimo że stosowane kryształy są coraz mniejsze, "kurcząc" się obecnie do rozmiarów zaledwie 10  $\mu\text{m}$ . Zastosowanie SR stało się jednocześnie siłą napędową kolejnych innowacji, z których najważniejszą było przeniesienie praktycznie wszystkich pomiarów białkowych do temperatury ciekłego azotu (ok. 100 K). Pełne zautomatyzowanie eksperymentu to inny aspekt pomiarów synchrotronowych. Już dziś sporo eksperymentów przeprowadza się za pomocą łączy internetowych w sposób zdalny, na kryształach wysłanych uprzednio (w formie "zamrożonej" do 100 K) pocztą kurierską do (często bardzo odległego) ośrodka synchrotronowego [4] (tzw. "Fedex crystallography").

Druga rewolucja zaszła w latach 90. i wiązała się z rozpracowaniem teorii [5] metody MAD ("Multiwavelength Anomalous Diffraction", czyli dostrojonej dyfrakcji anomalnej) oraz, przede wszystkim, jej aspektów praktycznych [6] związanych z zastosowaniem selenu (wprowadzanego do białka w postaci selenometioniny, Se-Met) jak głównego anomalnego "konia pociągowego" w

sprawnym (bo algebraicznym) rozwiązywaniu problemu fazowego.

Dziś istnieją również algorytmy fazowania wykorzystujące znacznie prostsze podejście SAD [7] oparte na jednej długości fali. Jednakże, aby metody te mogły mieć walory rutynowego "wysokoprzepustowego" (HT od "High Throughput") algorytmu, konieczny był kolejny przełom.

Wkroczył on do krystalografii białek wraz z nowym Tysiącleciem. Spektakularne sukcesy projektów sekwencjonowania genomów, z mającym niemal symboliczny wymiar zsekwencjonowaniem genomu ludzkiego w 2002 roku [8,9] na czele (dziś znamy pełną sekwencję kilkuset genomów), uświadomiły nam jednak przy okazji dość kłopotliwą sprawę, że oto mianowicie w ogóle nie rozumiemy księgi genomu zapisanej literami ATGC, i że do zrozumienia tej informacji niezbędne jest przełożenie jej na język struktury białek. Potrzebna była metoda, która szybko w trybie wysokoprzepustowym byłaby w stanie dostarczyć niezbędną informację strukturalną. Tak zrodziła się genomika strukturalna (SG), stawiająca sobie za cel poznanie struktury proteomu, tj. wszystkich białek danego organizmu, a wraz z nią ponownie odrodziła się krystalografia białek, jako metoda z wyboru mogąca w sposób szybki, stosunkowo niedrogi i jednocześnie bardzo wiarygodny sprostać temu wyzwaniu. W połączeniu z inżynierią genetyczną (i inżynierią białka), dostarczającą w sposób niemal automatyczny kolejnych białek rekombinowanych, biokrystalografia stała się niezwykle potężnym narzędziem badawczym. W krajach wysokorozwiniętych pojawiło się niemal równocześnie wiele ośrodków genomiki strukturalnej. Choć ich szumne hasła zalanania nas powodzią struktur nie spełniły się jeszcze w pełnym zakresie, już odczuliśmy skutki tego przełomu, przede wszystkim w postaci wprost niewiarygodnego postępu metodycznego.

Czas przedzierać się z "historyka" we "wrózkę" i zacząć dywagować o przyszłości. Zaczę od tego, że wydaje mi się, iż genomika strukturalna niebawem, po okresie polowania na łatwe cele, zacznie, zgodnie z obietnicą dostarczać struktur w tempie lawinowym. Genom ludzki koduje ok. 30000 białek a większość z nich to nadal wielka niewiadoma. W dodatku produktów białkowych jest znacznie więcej ze względu na alternatywne składanie genów i inne mechanizmy RNA. A na zbadanie czekają przecież także białka z niezliczonych innych organizmów, które towarzyszą nam na Ziemi. Wszystko więc wskazuje na to, że krystalografia białek będzie miała "pełne ręce roboty" jeszcze przez następnych kilkanaście lat.

Ale liczby to nie wszystko. Należy oczekiwać, że krystalografia będzie atakować w przyszłości coraz trudniejsze problemy, np. stanowiące dotąd tabu białka błonowe, które nie poddają się znanym metodom krystalizacji, a które prawdopodobnie dominują w naszym proteomie. Choć już dziś mamy coraz więcej struktur białek błonowych w PDB, możemy przewidywać, że najbliższe lata przyniosą radykalny postęp na tym polu. Wydaje mi się, że spowoduje to zmianę naszych poglądów na świat struktury białek, do tej pory zdominowany przez rozpuszczalne białka globularne.

Inną dziedziną, w której można oczekiwać rewolucji, są badania strukturalne olbrzymich kompleksów białkowych, również z udziałem białek błonowych. Już dziś znamy strukturę kilkuset wirusów, a zeszłoroczna Nagroda Nobla w dziedzinie chemii ukoronowała heroiczne zmagania o poznanie struktury atomowej rybosomu, tj. organelli, w której, jak w fabryce, produkowane są wszystkie białka wszystkich komórek żywych na świecie. Dzięki wysiłkom zeszłorocznych Noblistów, Ramakrishnana, Steitza i Yonath [10–13], znamy dziś dokładną pozycję w przestrzeni każdego z około 200000 atomów niewodorowych rybosomu bakterii. Ale rybosom jest bardzo trwałym kompleksem makromolekularnym. W najbliższej przyszłości natomiast krystalografia zacznie atakować strukturę znacznie słabiej scementowanych kompleksów, których krótkotrwałe pojawianie się i znikanie w komórce wyznacza prawdopodobnie rytm procesów życiowych. Głównym celem tych badań będzie zrozumienie rozpoznawania molekularnego w takich "przelotnych związkach" cząsteczek życia.

Wyzwania biologii to tylko jeden z motorów postępu w krystalografii białek w najbliższych kilkunastu latach. Drugim motorem będzie "skok kwantowy" czekający nas już niebawem na polu nauk fizycznych. Oto ziszcza się niebawem wieloletnie marzenia o posiadaniu lasera rentgenowskiego. Wkrótce okaże się, że źródła synchrotronowe trzeciej generacji, uważane dotąd za szczyt możliwości w generacji promieniowania rentgenowskiego, dosłownie "przygasną" w świetle astronomicznie jasnego błysku światła lasera rentgenowskiego. Tego typu urządzenie, w przeciwieństwie do lasera konwencjonalnego, nie działa w trybie oscylacyjnym lecz jest konstrukcją otwartą, o długości do kilkudziesięciu kilometrów; stąd też jego nazwa: laser rentgenowski na swobodnych elektronach (X-ray Free Elektron Laser, XFEL). Obecnie nie wiemy nawet, w jaki sposób da się najlepiej wykorzystać wiązkę lasera XFEL, która będzie o ponad 10 rzędów wielkości bardziej intensywna niż promieniowanie z synchrotronu. Wyobraźnia (szczególnie w zakresie "obrazowania") nie ma tu prawie żadnych ograniczeń!

Jedną z możliwości, testowana obecnie przy tradycyjnych synchrotronach, zakłada badanie struktury kryształu w niesłychanie krótkim czasie [14]. Już teraz możliwe jest zarejestrowanie pełnego obrazu dyfrakcyjnego tzw. metodą Lauego w czasie 1 ns. W przyszłości osiągalny będzie czas krótszy niż 1 ps. Robiąc serię poklatkowych zdjęć struktury z tak szybką "migawką", będziemy w stanie odtworzyć trajektorię przemiany chemicznej lub fizycznej przebiegającej wewnątrz kryształu. W skali naszych zmysłów, przemiana taka mogłaby być bardzo szybka (trwać np. 1 ms lub nawet 1 fs), jednak mimo to byłibyśmy w stanie odtworzyć jej przebieg od początku do końca. Tak więc w zasięgu możliwości krystalografii są nie tylko statyczne struktury kryształów ale także dynamika białek i kinetyka procesów, którym ulegają.

Pojawia się jednak pytanie, czy dysponując tak silnymi źródłami promieniowania rentgenowskiego, musimy odwoływać się ciągle do kryształu? Kryształ jest nam potrzebny w charakterze wzmacniacza koncentrującego

słabutkie rozpraszanie od pojedynczej cząsteczki w pikach braggowskich. Jeśli jednak dysponujemy wiązką lasera, która jest miliardy razy bardziej intensywna, "wzmocniacz" sygnałów staje się niepotrzebny. Obliczenia teoretyczne [15] potwierdzają, że powinna udać się rejestracja rozpraszania na pojedynczej molekuły. To nic, że ulegnie ona natychmiast dysocjacji. Jeśli tylko zdołamy przedtem zarejestrować jej obraz dyfrakcyjny – strukturę da się bez trudu wyliczyć, gdyż ciągle transformata Fouriera obiektu nieperiodycznego zawiera aż nadto danych do rozwiązania problemu fazowego. Podejście to jest intelektualnie bardzo pociągające. Oto wychodząc z koncepcji opartej na krystalografii, porzucamy okowy narzucone przez kryształ, a mimo to w ostateczności stosujemy aparat matematyczny mający właśnie krystalograficzny rodowód.

Jeśli już myślimy tak śmiało, idźmy dalej. Dlaczegoż mielibyśmy ograniczać nasz aperiodyczny obiekt do pojedynczej cząsteczki? Przecież równie dobrze mógłby to być olbrzymi kompleks makromolekularny, a nawet... cała komórka biologiczna, na której też można uzyskać rozpraszanie. Wstępny rekonesans eksperymentalny został już przeprowadzony i wyniki są nader obiecujące. Jest coś symbolicznego w fakcie, że pionierem tych metod jest, mimo zaawansowanego wieku, David Sayre [16] – współtwórca metod bezpośrednich rozwiązywania problemu fazowego w krystalografii.

Pisząc, że idea laserów rentgenowskich XFEL niebawem się ziści – rozminąłem się nieco z rzeczywistością, gdyż pierwszy laser rentgenowski na swobodnych elektronach już działa na Uniwersytecie Stanforda w USA i badacze już mogą występować o przydział czasu pomiarowego na tym urządzeniu! Kolejny laser XFEL zostanie oddany do użytku wkrótce w ośrodku DESY w Hamburgu. W Europie planuje się budowę kolejnych laserów rentgenowskich, np. przy brytyjskim synchrotronie DIAMOND i hiszpańskim ALBA. Injektorem nowego synchrotronu MAX IV w Lund będzie akcelerator liniowy (linac), który w przyszłości przerobiony zostanie na laser na swobodnych elektronach. Tak więc, jeśli – zapatrzeni w klasyczne synchrotrony trzeciej generacji – myślimy, że spoglądamy w przyszłość, w rzeczywistości możemy oglądać się do tyłu!

Podsumowując dotychczasowe uwagi można powiedzieć, że krystalografia białek będzie przez najbliższe lata ciągle w fazie "rewolucyjnego rozwoju". Będzie to wynikiem dramatycznego postępu w metodologii pomiarowej, nadchodzącego głównie z kierunku fizyki, oraz śmiałych i wizjonerskich wyzwań rzucanych przez nauki biologiczne. W takim też sensie krystalografia utrzyma swoją rolę jako tygiel, w którym rodzą się rzeczy, "o jakich nie śniło się filozofom", czerpiący życiodajną energię ze styku nauk biologicznych i fizycznych. Jednak w tej niszy krystalografia powinna zdecydowanie trwać przy swoim chemicznym dziedzictwie. Siłą krystalografów było i będzie nadal to, że przez pryzmat struktury potrafią wnikliwie interpretować zjawiska chemiczne stanowiące podstawę procesów określanych jako życie. Parafrazując mógłbym napisać "kto posiadał umiejętność rozumienia struktury materii – ten stał się jej panem". Do roli tej bez wątpienia predestynowani są krystalografowie.

Na koniec chciałbym poruszyć dwie dodatkowe, lecz niezwykle ważne sprawy. Po pierwsze, sprawę jakości modeli strukturalnych wyznaczanych metodami krystalografii. Dzięki postępowi technicznemu i metodycznemu jakość struktur krystalograficznych staje się systematycznie coraz wyższa, co trzeba szczególnie mocno podkreślić, zważywszy, że struktury te stają się jednocześnie coraz bardziej złożone. Najogólniej rzecz ujmując, struktury makromolekularne określane są z coraz lepszymi parametrami statystycznymi (widocznymi również w jakości danych eksperymentalnych) i z coraz wyższą rozdzielczością. Mamy obecnie całkiem sporo struktur w banku PDB, które swoją jakością dorównują rutynowym strukturom małocząsteczkowym [17], a czasem nawet je prześcigają. Zdarzają się też, na razie rzadko, perełki, jak na przykład struktury białkowe, dla których udało się udokładnąć model multipolowy, tj. precyzyjnie zbadać rozkład elektronów na wiązaniach chemicznych i w niesferycznie sparametryzowanych atomach [18,19]. Słyszysz się czasami opinię, że takie dokładne badania struktury białek są zbędne, gdyż odpowiedzi na podstawowe pytania udzielają już nawet bardzo zgrubne modele. Opinię taką kategorycznie odrzucam. Po pierwsze, jako uczeni mamy moralny obowiązek dociekać prawdy tak dobrze, jak to jest tylko w naszej mocy. Po drugie, uważam, że nasza siła, jako krystalografów, leży właśnie w tym, że nie ograniczamy się do enigmatycznych i mglistych modeli, ale poprzez przesuwanie granicy rozdzielczości jesteśmy w stanie budować modele bardzo precyzyjne, ukazujące struktury z prawdziwie atomową rozdzielczością. Nigdy nie wiadomo, czym może zaskoczyć nas nawet najbardziej trywialna struktura białkowa. Przy kiepskiej jakości danych, tego co nietypowe a przy tym najciekawsze – moglibyśmy po prostu nie zauważyć!

Na nic się zda przepowiadanie przyszłości krystalografii, jeśli nie zadamy o to, by w przyszłości istnieli krystalografowie. Choć zabrzmiałoby to kuriozalnie – możliwość takiego czarnego scenariusza jest całkiem realna. Oto krystalografia znika w szybkim tempie z programów studiów uniwersyteckich i może okazać się, że w następnym pokoleniu zabraknie fachowców nie tylko zdolnych rozwijając naszą dziedzinę, ale nawet utrzymać ją na minimalnym poziomie egzystencji [20]. Byłoby niepowetowaną stratą, jeśli za 15-20 lat istotnie zabrakłoby krystalografów, którzy mogliby realizować te wspaniałe wizje, jakie rysują się przed naszą dyscypliną. Zróbmy wszystko co w naszej mocy, aby oddalić to niebezpieczeństwo.

#### Literatura

- [1] M. Jaskolski, "Personal remarks on the future of protein crystallography and structural biology," *Acta Biochim. Polon.* **57** (2010) 330–337.
- [2] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, "The Protein Data Bank," *Nucleic Acids Res.* **28** (2000) 235–242. [3] Z. Dauter, M. Jaskolski, A. Wlodawer, "Impact of synchrotron radiation on macromolecular crystallography: A personal view," *J. Synchrotron Radiat.* **17** (2010) 433–444.
- [4] M. Gilski, "Automation and remote synchrotron data collection," *Acta Phys. Polon. A* **114** (2008) 331–338.

- [5] J. Karle, "Some developments in anomalous dispersion for the structural investigation of macromolecular systems in biology," *Int. J. Quant. Chem.* **S7** (1980) 357–367.
- [6] W.A. Hendrickson, "Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation," *Science* **254** (1991) 51–58.
- [7] Z. Dauter, M. Dauter, E. Dodson, "Jolly SAD," *Acta Crystallogr. D* **58** (2002) 494–506.
- [8] International Human Genome Sequencing Consortium, "Initial sequencing and analysis of the human genome," *Nature* **409** (2001) 860–921.
- [9] J.C. Venter, et al., "The sequence of the human genome," *Science* **291** (2001) 1304–1351.
- [10] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P.B. Moore, T.A. Steitz, "The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution," *Science* **289** (2000) 905–920.
- [11] F. Schluenzen, A. Tocilj, R. Zarivach, J. Harms, M. Gluehmann, D. Janell, A. Bashan, H. Bartels, I. Agmon, F. Franceschi, A. Yonath, "Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution," *Cell* **102** (2000) 615–623.
- [12] B.T. Wimberly, D.E. Brodersen, W.M. Clemons Jr., R.J. Morgan-Warren, A.P. Carter, C. Vornrhein, T. Hartsch, V. Ramakrishnan, "Structure of the 30S ribosomal subunit," *Nature* **407** (2000) 327–339.
- [13] M. Selmer, C.M. Dunham, F.V. Murphy, A. Weixlbaumer, S. Petry, A.C. Kelley, J.R. Weir, V. Ramakrishnan, "Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA," *Science* **313** (2006) 1935–1942.
- [14] D. Bourgeois, A. Royant, "Advances in kinetic protein crystallography," *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15** (2005) 538–547.
- [15] J. Hajdu, "Single-molecule X-ray diffraction," *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10** (2000) 569–573.
- [16] D. Sayre, "Single-particle imaging," w: *Evolving Methods for Macromolecular Crystallography*, R.J. Read, J.L. Sussman (red.) (Springer, Dordrecht, 2007).
- [17] J. Wang, M. Dauter, R. Alkire, A. Joachimiak, Z. Dauter, "Triclinic lysozyme at 0.65 Å resolution," *Acta Crystallogr. D* **63** (2007) 1254–1268.
- [18] C. Jelsch, M.M. Teeter, V. Lamzin, V. Pichon-Pesme, R.H. Blessing, C. Lecomte, "Accurate protein crystallography at ultra-high resolution: Valence electron distribution in crambin," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (2000) 3171–3176.
- [19] B. Guillot, C. Jelsch, A. Podjarny, C. Lecomte, "Charge-density analysis of a protein structure at subatomic resolution: the human aldose reductase case," *Acta Crystallogr. D* **64** (2008) 567–588.
- [20] A. Wlodawer, W. Minor, Z. Dauter, M. Jaskolski, "Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures," *FEBS J.* **275** (2008) 1–21.