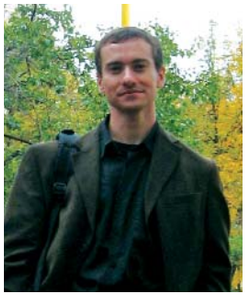
kniga5_p2_2_4.qxd 20.01.2007 21:07 Page 202

Современные методы определения пространственной структуры белков

М. Членов



Марк Членов
13-й выпуск (Кроссастеры), школа № 520 (1991 г.), окончил кафедру биохимии Биофака МГУ (1996 г.), к.б.н., работает в биотехнологической компании Differential Proteomics (Бостон), mark_chlenov@yahoo.com*

Кристаллизация белков и разрешение их структур являются одними из самых перспективных направлений современной биологии. В их основе лежит свойство биомолекул образовывать кристаллы, способные рассеивать рентгеновские лучи. Закон Брэгга, описывающий зависимость между углами и фазами падающих и отраженных волн и расстояниями между атомами в кристаллической решетке, позволяет воссоздать трехмерную кристаллическую структуру по картине дифракции кристаллами рентгеновских лучей. С момента получения первой структуры гемоглобина Максом Перуцом в 1959 г. современная кристаллография проделала долгий путь. В настоящее время сотни лабораторий в самых разных странах мира занимаются либо исключительно кристаллизацией и разрешением структур белков, либо используют этот процесс в качестве дополнения и доказательства правильности тех или иных теорий и моделей, основанных на биохимических данных. Сотни структур публикуются каждый год в самых престижных биологических журналах мира, пополняя компьютерную базу данных GenBank. Эта цифра продолжает расти из года в год. Ведущие фармацевтические компании мира (Pfizer, Novartis, Genzyme и т.д.) тратят миллиарды долларов на кристаллизацию белков патогенных бактерий и вирусов для того, чтобы лучше синтезировать потенциальные ингибиторы их функций. Технологии, используемые этими компаниями в процессе кристаллизации, значительно превосходят таковые, используемые основными научно-исследовательскими институтами. Они сочетают в себе не только последние достижения современной физики, но также роботизации и кибернетики. При этом всем, несмотря на значительный прогресс последних лет, кристаллография остается весьма трудоемким процессом, в котором многое зависит от простой удачи. Универсальных правил и гарантий получения кристаллов, которые будут достаточно хорошо рассеивать проходящие через них рентгеновские лучи, на настоящий момент не существует. Обычно процесс получения третичной структуры белка может занимать, в зависимости от опытности кристаллографа, интенсивности работы и других факторов, от нескольких месяцев до пары лет.

Процесс получения трехмерной структуры белка состоит из нескольких шагов. Каждый из них требует определенных навыков в биохимии, молекулярной биологии, статистической обработке данных, а также знакомства с интерфейсами программ, обеспечивающих построение конечной трехмерной структуры белка. Эти шаги включают в себя клонирование, очистку, кристаллизацию, сбор данных рассеивания, их обработку и компьютерное моделирование.

Клонирование

Успешная кристаллизация белков требует больших затрат белкового материала, обычно измеряющихся в миллиграммах или даже десятках миллиграммов. Поскольку объектами интереса современной кристаллографии зачастую являются белки, присутствующие в клетках в незначительных концентрациях (рецепторы, транскрипционные факторы, гормоны), их прямая очистка из организмов в достаточных количествах становится весьма проблематичной. Оптимальным способом решения проблемы является клонирование генов данного вида в бактериальные вектора под контроль сильных промоторов, и их последующая экспрессия

**В 1996–2000 гг. учился в аспирантуре ИМГ РАН. С 2000 по 2004 г. работал в лаборатории Сета Дарста в Рокфеллеровском Университете в Нью Йорке, занимаясь очисткой, кристаллизацией и разрешением структур белков.*

kniga5_p2_2_4.qxd 20.01.2007 21:07 Page 203

в подходящих бактериальных штаммах. Наиболее часто для этой цели используются плазмиды семейства pET, производимого фирмой Novagen, совместно с клеточными штаммами, содержащими T7 профаг (DE3) в своей хромосоме. Плазмиды семейства pET не только позволяют клонировать гены под контроль одного из самых мощных в мире промоторов (РНК-полимеразы бактериофага T7), но также добавляют к синтезируему белку отщепляемый гексагистидиновый хвост (His tag), значительно облегчающий очистку.

«Включение» промотора посредством добавления к растущим клеткам нерасщепляемого аналога лактозы (IPTG) позволяет получать миллиграммы рекомбинантных белков из одного литра клеточной культуры. Одним из подводных камней при клонировании белков для их последующей кристаллизации является проблема растворимости. Многие чужеродные для клетки белки, произведенные в клетке в огромных количествах, образуют нерастворимые агрегаты, называемые телами включения (inclusion bodies). В большинстве случаев белки из подобных агрегатов удается извлечь посредством их растворения в концентрированной мочевине или гуанидине. Однако в таких случаях ренатурация белков происходит *in vitro*, без клеточных систем, облегчающих правильное свертывание, что часто приводит к потере способности кристаллизоваться. В этой связи большинство кристаллографов предпочитают иметь дело только с теми белками, которые изначально оставались в растворимой фракции клеточных лизатов. Одна из методик, часто позволяющая увеличивать количество растворимого рекомбинантного белка, состоит в выращивании и индукции клеток при низких температурах (30 или даже 25 °C). Похожие результаты приносит также использование малых концентраций IPTG. Другой подход к этой проблеме – использование штаммов (pLys), кодирующих, помимо T7 РНК-полимеразы, еще и ее ингибитор, что замедляет скорость транскрипции рекомбинантного белка, увеличивая таким образом пропорцию его растворимой фракции.

Очистка

Белки, используемые для кристаллизации, должны обладать высокой степенью чистоты, что требует нескольких хроматографических шагов. Для очистки белков чаще всего используется система FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). Одним из наиболее популярных инструментов для очистки белков в современной кристаллографической лаборатории является FPLC AKTA фирмы Pharmacia. Эта высокоавтоматизированная система позволяет не только оперировать несколькими хроматографическими колонками одновременно, но и обладает большим количеством датчиков, записывающих все параметры данных шагов очистки. К ним относятся скорость прокачки буферов, их температура, давление, pH, ионная сила и, конечно же, оптическая плотность сходящего с колонки раствора при разных длинах волн.

Первый шаг очистки — получение «осветленного» клеточного лизата (clarified cell lysate), в процессе которого клетки, суспендированные в соответствующем буфере (содержащем лизоцим и ингибиторы протеаз), разрушаются либо с помощью ультразвука (sonication), либо с помощью высокого давления (french press). Кроме разрушения клеточной стенки и многочисленных мембран происходит также разрывание хромосомной ДНК на небольшие фрагменты, что делает полученную суспензию значительно менее вязкой. Фрагменты клеточных стенок и прочие нерастворимые компоненты убираются из раствора посредством высокоскоростного центрифугирования.

Следующий шаг — это аффинная хроматография (affinity chromatography), в ходе которой белок пропускается сквозь колонку с сорбентом, обладающим специфическим сродством к гистидиновому хвосту белка, добавленному при клонировании. После этого шага очищенный белок либо концентрируют с помощью фильтров (Amicon, Centricon), либо переосаждают трехмолярным раствором сульфата аммония с последующим растворением осадка в меньшем объеме.

За аффинной хроматографией обычно следует гель-фильтрация (gel filtration/sizing), в процессе которой белковая смесь пропускается сквозь пористые сферы определенного сорбента, что обеспечивает ее разделение по молекулярной массе. Наиболее часто используемые колонки для гель-фильтрации – это Superose, Sephadex и Sephacryl. Первыми с колонки сходят самые тяжелые белки, за которыми следуют средние и более легкие. Самые легкие белки и примеси снимаются с колонки в последнюю очередь. Гель-фильтрация обеспечивает значительную очистку интересующего белка, также позволяя отделить его возможные агрегаты от основной, гомогенной, фракции. Как и после предыдущего шага, фракции, содержащие интересующий белок, определяются с помощью белкового геля и объединяются для следующего шага.

kniga5_p2_2_4.qxd 20.01.2007 21:07 Page 204

Следующей стадией очистки обычно служит ионообменная хроматография (ion exchange chromatography), в которой белки разделяются по своему заряду при разных значениях pH. В создаваемом при помощи двух буферов градиенте соли или pH первыми с колонки сходят те белки, которые обладают наименьшим сродством к данному сорбенту. Те, что обладают более сильным зарядом при выбранном pH, сходят последними. Типичными примерами ионообменной смолы являются Mono-Q и Mono-S.

Фракции, содержащие чистый рекомбинантный белок, объединяют, подвергают диализу, концентрируют, смешивают с глицерином, разбивают на небольшие аликвоты, замораживают и хранят при –80 °C. Эффективность очистки определяют стандартным денатурирующим белковым гелем (SDS PAGE), на котором интересующий белок не должен содержать никаких примесей.

Обычно перед началом кристаллизации очищенный белок (или его фрагмент) исследуют при помощи масс-спектроскопии (electrospray или MALDI), чтобы убедиться в том, что он не претерпел никаких изменений в ходе очистки или протеолитического расщепления. Многие исследователи также оценивают и гомогенность своего белка при помощи нативного полиакриламидного гель-электрофореза или же метода светорассеивания.

Кристаллизация

Когда насыщенные растворы белков в виде висячих капель (hanging drops) помещают в герметичную ячейку, наполненную кристаллизующим раствором, концентрация соли (precipitant) в капле постепенно увеличивается, что приводит к выпадению белка в осадок, иногда принимающего форму кристаллов.

Процесс раскапывания разных растворов солей в ячейки, их смешивание с раствором белка, нанесение вакуумной смазки и их запечатывание всегда был очень долгим и трудоемким. Появление нескольких биотехнологических компаний (в первую очередь Hapmton Research), занимающихся исключительно производством оборудования, растворов и прочих приспособлений для кристаллизации, значительно ускорило темпы получения кристаллов. В большинстве современных лабораторий кристаллы выращиваются в специальных кристаллических подносах (crystal trays), разбитых на 24 ячейки. В эти ячейки раскапываются растворы солей разных концентраций и pH (crystal screens). Самым простым и в то же время чаще всего приносящим результаты методом кристаллизации является сульфат аммониевый и полиэтиленгликолевый (ПЭГ) скрининг, охватывающий широкий спектр их pH и молярности (процентности, в случае разных ПЭГов). Концентрированный раствор белка (обычно 20 мг/мл, хотя эта цифра может варьировать от 10 до 100 мг/мл) смешивают с равным количеством кристаллизуюшего раствора на покровном стекле (cover slip) и, перевернув его, помешают в виде висячей капли в загерметизированную с помощью вакуумной смазки ячейку кристаллического подноса, наполненную тем же раствором (mother liquor).

Другим, более редким, вариантом кристаллизации (в первую очередь из-за того, что это требует кристаллизирующих подносов определенной формы) является сидячая капля (sitting drop). Чаще всего для увеличения шансов получения кристаллов кристаллические подносы с одними и теми же условиями хранят при 25 и 4 °C. Так как кристаллы белков очень чувствительны к малейшим колебаниям температуры, для их роста используются специальные инкубаторы, строго поддерживающие заданную температуру. В среднем на получение изначальных кристаллов уходит от нескольких дней до пары недель. Если после этого капли остаются прозрачными (или же, наоборот, первоначальный осадок не растворяется), вероятнее всего, в этих условиях никаких кристаллов уже не вырастет. Те капли, которые содержат в себе кристаллы или которые выглядят обещающе, после этого воспроизводят, охватывая более узкий спектр молярности и pH данной соли. Изначальные кристаллы, полученные в одних или нескольких условиях скрининга, чаще всего не являются удовлетворительными для рассеивания рентгеновских лучей. Обычно они либо слишком малы (microcrystals), либо имеют игольчатую форму (needle crystals), либо образуют конгломераты, в то время как для получения хорошей картины дифракции требуются практически идеальные одиночные кристаллы, прямоугольной или же квадратной формы с четкими гранями.

Одной из методик улучшения формы кристаллов является дополнительный скрининг изначально найденных условий при помощи органических добавок (additives screen). Очень часто это приводит к значительному улучшению формы и качества изначальных кристаллов белков.

Следующим шагом является заморозка и хранение полученных кристаллов в специальном растворе криопротектора, предотвращающим их разрушение. Для этого создают пологий градиент «сидячих капель» (от данных условий кристаллизации до условий ближайшего подходя-

kniga5_p2_2_4.qxd 20.01.2007 21:07 Page 205

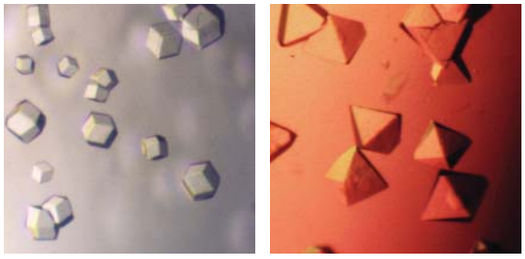


Рисунок 1. Кристаллы белка, выросшие в «висячей капле».

щего криопротектора), в которых полученные кристаллы последовательно вымачивают до тех пор, пока они не оказываются в 100% растворе криопротектора. После этого отдельные кристаллы вылавливают из капли с помощью специальной микропетли, замораживают в жидком этане, переносят в специальную пробирку и хранят в жидком азоте. Теперь кристаллы полностью готовы для следующего шага — рассеивания рентгеновских лучей и получения картины их дифракции.

Для успешного разрешения структуры белка, а именно получения фаз (solving phases), необходимо также выращивание кристаллов с тяжелыми атомами. Наиболее часто используемым для этого соединением является селенометионин, в котором атом серы замещен атомом селена. Для этого клетки, синтезирующие интересующий белок, выращивают в минимальной среде (M9), в которой единственным источником метионина является селено-метионин. В результате, рекомбинантный белок содержит тяжелые атомы селена в каждом своем метиониновом остатке, что в ходе разрешения структуры создает первые «пространственные ориентиры» и точки отсчета, по которым, как по цепочке, определяют остальные аминокислотные остатки молекулы белка.

Сбор данных рассеяния

Большинство современных кристаллографов используют синхротроны, которые являются одними из самых мощных в мире источников когерентного рентгеновского излучения. В отличие от стандартных рентгеновских аппаратов, где рентгеновское излучение получают за счет торможения электронного пучка о катодную пластинку, в синхротроне электроны постоянно циркулируют по замкнутому контуру (имеющему размеры от одного до сотен метров), излучая рентгеновские волны в местах преломления их траектории электромагнитами. Замороженный кристалл белка крепят на специальный прибор — гониометр, который позволяет контролировать углы его поворота с большой точностью, и помещают в струю жидкого азота под источник рентгеновского излучения. Получаемую в результате картину дифракции записывают при помощи прибора с зарядовой связью — CCD (coupled charge device) и отображают на экране компьютера в виде файла с графическим расширением.

Прогресс последнего десятилетия по части технологии детектирования картины рассеивания позволил сократить крайне трудоемкий процесс сбора данных от недель (и тысяч рентгеновских пленок) до часов, при этом все данные умещаются на одном магнитном носителе. Для анализа дифракционных данных существует большое количество разных компьютерных программ, большинство из которых написано для операционной системы UNIX. Информационный пакет HKL, содержит в себе 3 программы: XdisplayF, обеспечивающую визуализацию картин дифракции; Denzo, проводящую анализ и объединение многочисленных слайдов; Scalepack, обеспечивающую их статистическую обработку. Этот информационный пакет относится к одному из самых массово используемых в современной кристаллографии. Анализ самой первой картины дифракции кристалла позволяет быстро определить все его основные параметры. К ним относятся: разрешение, от которого зависит, возможно ли будет увидеть отдельные аминокислоты на конечной структуре или же только элементы вторичной структуры; количество молекул белка в элементарной ячейке и ее размеры (unit cell); и тип расположения элементарных ячеек в кристалле (space group). Эта же программа просчитывает необходимое количество дифракционных картинок, которое нужно получить для полной оценки данной системы. После пропускания рентгеновского луча сквозь кристалл белка и фиксирования дифракционной

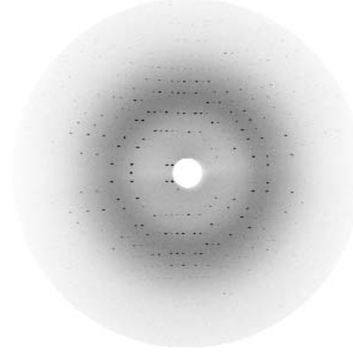


Рисунок 2. Типичная картина дифракции рентгеновских лучей, вызванная их пропусканием через кристал белка.

kniga5_p2_2_4.qxd 20.01.2007 21:07 Page 206

картины последний поворачивают на один или на полградуса, и повторяют всю процедуру до тех пор, пока не будет охвачен весь необходимый спектр (обычно около 120–180°). Одновременно с записью картин дифракции происходит их статистическая обработка, в ходе которой все полученные сигналы анализируют и сравнивают с теоретически предсказанными. Весь процесс высокоавтоматизирован и, после изначальной установки тех или иных параметров, занимает всего несколько часов. Кроме обычных нативных кристаллов, для успешного разрешения фаз необходимо также собрать данные рассеивания селено-метиониновых кристаллов, что обычно делают при трех разных длинах волн.

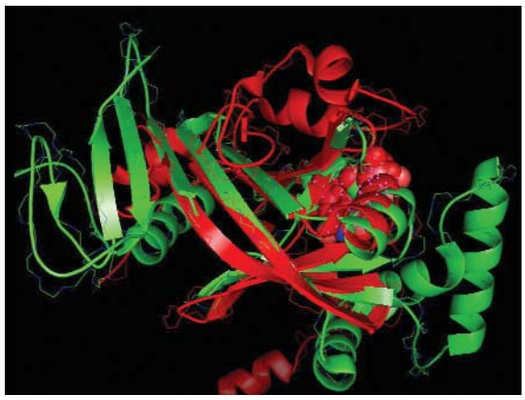


Рисунок 4. Трехмерная модель белка.

Определение структуры белка

Данные, полученные из сотен дифракционных картин как нативных, так и Se-Met кристаллов, обрабатывают, переводят в цифровой формат и группируют с помощью программы Scalepack. Следующим шагом в определении структуры белка является нахождение пространственных координат атомов тяжелых металлов. Это достигается при помощи метода MAD (Multiple-wavelength anomalous dispersion), который оценивает возмущения обычной картины дифракции, вносимые сигналами от атомов селена. Программа, выполняющая эту функцию, называется Shake and Bake. После завершения работы она выдает пространственные координаты всех тяжелых атомов в элементарной ячейке кристалла. Другая программа – Mlphare, применяя математическое преобразование, называемое трансформацией Фурье, строит первоначальную карту электронной плотности, используя картины дифракции кристалла под разными углами и координаты тяжелых атомов, полученные с помощью Shake and Bake. На этот процесс обычно уходит целый день. Эта карта часто содержит много шумов и позволяет увидеть лишь отдельные структурные мотивы. Существует большое количество программ (под Unix), обеспечивающих обработку и улучшение первоначальной электронной плотности. Одна из них называется Density Modification. После нее в общей картине уже можно рассмотреть отдельные аминокислоты и их группы. После ввода первичной последовательности белка и с помощью других программ компьютер автоматически строит первую модель, в которой он помещает узнанные аминокислоты в соответствующие им фрагменты электронной плотности. Процент успешного автоматического построения модели зависит в первую очередь от качества карты электронной плотности и, конечно же, ее разрешения. Это определяет время, которое придется затратить на построение и «доводку» модели вручную. Другая программа, появившаяся несколько лет назад и пользующаяся большой популярностью, называется Solve/Resolve. Она объединяет в себе функции Shake and Bake, Mlphare Density Modification и обладает улучшенной автопостроительной функцией. Однако, как и в предыдущих случаях, очень многое зависит от качества изначальной карты электронной плотности. Построенная компьютером модель обычно состоит из разрозненных групп аминокислот, разнесенных в пространстве, и нуждается в окончательной доводке. Это осуществляется при помощи программы O, в которую загружают карту электронной плотности с наложенными на нее группами аминокислот. Эта программа позволяет вставлять, размещать в любой точке

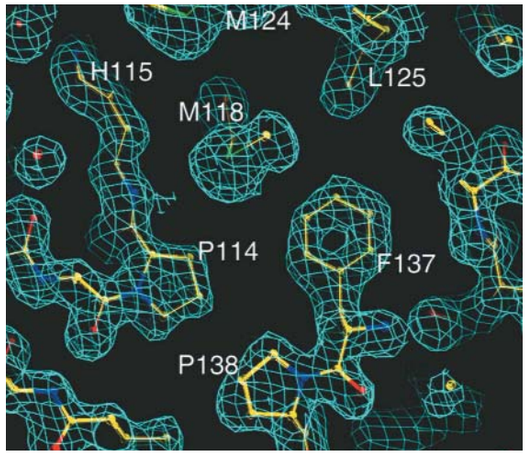


Рисунок 3. Улучшенная картина электронной плотности с наложенными на нее аминокислотными остатками.

kniga5_p2_2_4.qxd 20.01.2007 21:07 Page 207

пространства и вращать в трех измерениях все 20 аминокислот, соединяя, их друг с другом и строя из них элементы третичной структуры. Часто для этого используют специальные стереоочки, позволяющие видеть строящуюся модель в трехмерном изображении.

После построения окончательной модели определяют один из важнейших ее показателей Пи-фактор, характеризующий качество полученной модели и точность расположения в ней аминокислотных остатков. Ну вот и все, на этом процесс разрешения структуры закончен! Полученную при помощи программы О модель сохраняют в виде файла, содержащего трехмерные координаты всех ее атомов. Наиболее распространенным, но не единственным, форматом для подобных файлов, является pdb. В таком виде все опубликованные структуры хранятся в базе данных GenBank, откуда их может бесплатно скачивать любой пользователь Интернета.