

Ryc. 6. Schemat magnesu nowej generacji. Ciepło jest odbierane przez nieruchomy hel nadciekły znajdujący się w mikrokanalach [1].

tego tematu we własnym zakresie, gdyż kryje się za nim cała gama niezwykłych cech naszego świata, które są niewidoczne „gołym” okiem. Często przeczą naszej codziennej logice, dając możliwość na znaczące poszerzenie swoich horyzontów myślowych.

Bibliografia

1. Bozza G, Malecha ZM, Van Weelderden R (2016), Development and application of a generic CFD toolkit covering the heat flows in combined solid–liquid systems with emphasis on the thermal design of HiLumi superconducting magnets, *Cryogenics* 80: 253–264.
2. Chorowski M, Fydrych J, Modlinski Z, Polinski J, Taviani L, Wach J (2011), Risk analysis update of the LHC cryogenic system following the 19th September 2008 incident, *Proceedings of the ICEC 23-ICMC 2010*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 879–884.
3. Malecha ZM, Chorowski M, Polinski J (2013), Numerical study of emergency cold helium relief into tunnel using a simplified 3D model, *Cryogenics* 57: 181–188.
4. Malecha ZM, Jedrusyna A, Grabowski M, Chorowski M, van Weelderden R (2016), Experimental and numerical investigation of the emergency helium release into the LHC tunnel, *Cryogenics* 80: 17–32.
5. Sciver SWV (2012), *Helium Cryogenics*, 2nd Edition, Springer Florida State University.
6. Strychalski M, Chorowski M, Polinski J (2014), Heat transfer through the at surface of rutherford superconducting cable samples with novel pattern of electrical insulation immersed in Hell, *Cryogenics* 61: 79–85.

Dr inż Ziemowit Miłosz Malecha. Katedra Inżynierii Kriogenicznej, Lotniczej i Procesowej, Politechnika Wroclawska. E-mail: ziemowit.malecha@pwr.edu.pl

POSTĘP W POMIARACH BIAŁEK NIEUSTRUKTURYZOWANYCH

Bartosz Różycki (Warszawa)

Streszczenie

Komórki biologiczne zbudowane są z rozmaitych makrocząsteczek – białek, lipidów, kwasów nukleinowych, polisacharydów, etc. Wyznaczenie struktury przestrzennej danej makrocząsteczki prowadzi zwykle do wyjaśnienia tego, w jaki sposób wykonuje ona swoje funkcje biologiczne. Zajmuje się tym biologia strukturalna. Wśród makrocząsteczek stanowiących obecnie największe wyzwania dla biologii strukturalnej są białka pozbawione struktury trzeciorzędowej, a w szczególności te z nich, które zbudowane są z kilku odrębnych domen połączonych długimi, nieustrukturyzowanymi odcinkami łańcucha polipeptydowego. Białka tego rodzaju są powszechne i pełnią ważne funkcje biologiczne. Okazują się one jednak wyjątkowo trudne do zbadania za pomocą standardowych metod współczesnej biologii strukturalnej – tzn. rentgenografii strukturalnej i spektroskopii NMR. Natomiast rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami uzupełnia te metody i daje możliwość charakterystyki strukturalnej tego rodzaju białek.

Słowa Kluczowe: biofizyka molekularna, biologia strukturalna, białka pozbawione struktury trzeciorzędowej, rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami (SAXS)

Abstract

Biological cells are built of various macromolecules, including proteins, lipids, nucleic acids and polysaccharides. Determination of the atomic structure of a macromolecule can often lead to the understanding of how the given molecule performs its biological functions. It is the structural biology that takes such an approach. Among the macromolecules that pose the most difficult problems to contemporary structural biology are intrinsically disordered proteins, and in particular those of them which have several large domains connected by long, unstructured polypeptide segments. Such proteins are abundant and critically important in biological cells. However, they turn out to be very difficult to study using standard methods of structural biology, i.e., X-ray crystallography and NMR spectroscopy. Importantly, small angle X-ray scattering supplements these high-resolution methods and enables structural characterization of such proteins.

Wstęp

Białka stanowią ogromną rodzinę związków organicznych. Występują we wszystkich organizmach żywych oraz wirusach. Zaangażowane są bezpośrednio w praktycznie wszystkie funkcje komórek biologicznych. Powszechnie znane przykłady to metabolizm, sygnalizacja, transport, nadawanie kształtu komórkom, a przede wszystkim replikacja, transkrypcja i translacja kodu genetycznego. Zdumiewający wydaje się fakt, że podstawą tej ogromnej różnorodności i złożoności funkcji pełnionych przez białka jest sekwencja aminokwasowa.

Niektóre białka pośredniczą w transdukcji sygnału, tzn. kontroli łańcuchów reakcji biochemicznych, które pozwalają komórce reagować na zmiany w swoim środowisku. Inne białka pełnią funkcje metaboliczne. Są nimi enzymy wykorzystujące substancje odżywcze do produkcji energii, która służy do podtrzymania procesów życiowych w komórkach. Komórki używają białek także jako materiału budulcowego. Cytoskielet – czyli molekularne „rusztowanie” nadające kształt komórkom eukariotycznym – zbudowany jest całkowicie z białek. Białka służą również jako pompy i kanały w błonach komórkowych. Można stwierdzić, iż cząsteczki białek odpowiadają za zdecydowaną większość działań każdej żywej komórki. Dlatego zrozumienie podstaw życia wymaga dogłębnego poznania fizycznych i chemicznych własności cząsteczek białek.

Pionierskie prace Johna Kendrew i Maxa Perutza (Nagroda Nobla w dziedzinie chemii przyznana w roku 1962 za określenie pierwszej atomowej struktury białek za pomocą rentgenografii strukturalnej) doprowadziły do przełomowego odkrycia – dane białko wykonuje swoje funkcje dzięki temu, iż posiada ściśle określoną strukturę przestrzenną, która zwana jest strukturą natywną. Wyznaczenie struktury natywnej danej makrocząsteczki prowadzi zwykle do

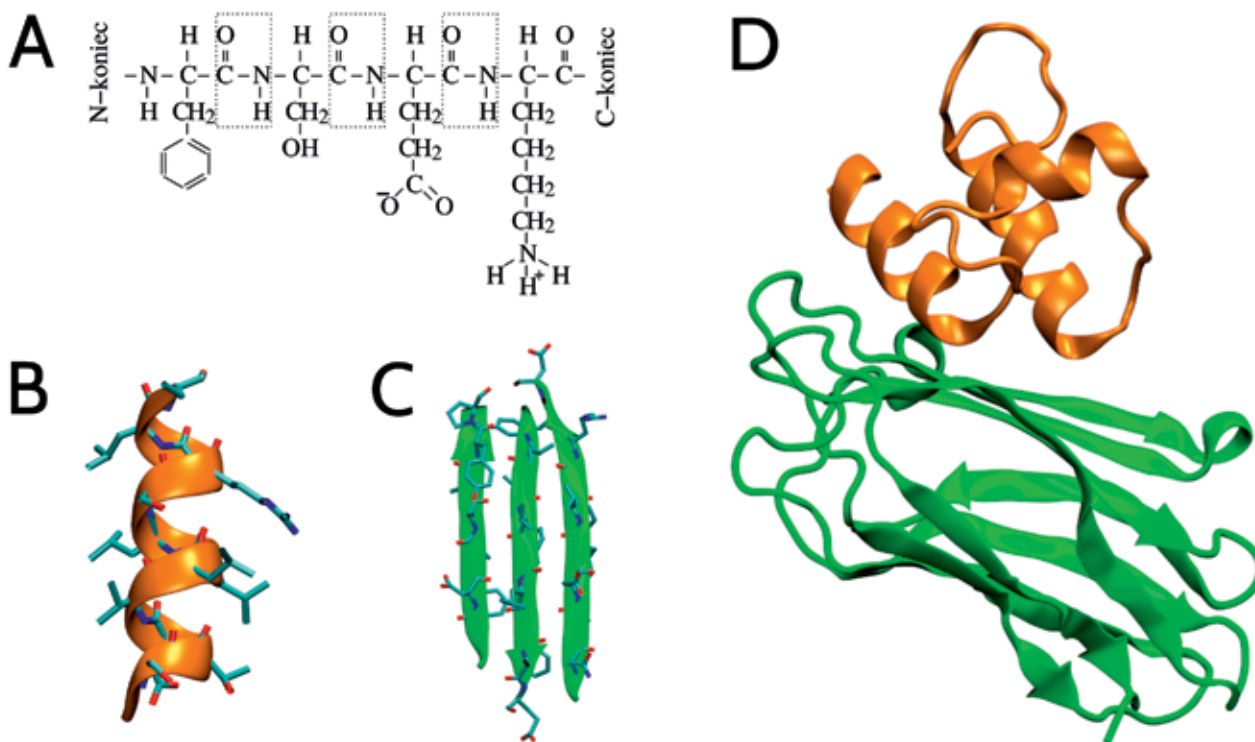
wyjaśnienia tego, w jaki sposób wykonuje ona swoje funkcje biologiczne. Znany przykładem jest struktura podwójnej helisy DNA, której odkrycie natychmiast wyjaśniło mechanizm replikacji DNA.

Rosnąca chęć poznania podstawowych procesów życiowych na poziomie molekularnym doprowadziła w latach pięćdziesiątych i sześćdziesiątych XX wieku do wyodrębnienia nowej dziedziny biologii – tzw. biologii strukturalnej – która zajmuje się badaniem struktur makrocząsteczek, a w szczególności białek i ich kompleksów, w celu szczegółowego zrozumienia zasad ich działania. Do największych (dosłownie) sukcesów biologii strukturalnej ostatnich lat można zaliczyć wyznaczenie struktur wirusów, takich jak enterowirus 71, które pomogły wyjaśnić mechanizmy infekcji komórki i dały podstawę do racjonalnego tworzenia leków [11]. Znakomitym przykładem racjonalnego projektowania leków są niedawne prace Balbasa [1]. Wykorzystano w nich zarówno metody współczesnej biologii strukturalnej, jak i techniki bioinformatyczne, dzięki czemu zidentyfikowano związki chemiczne hamujące wzrost odpornych na leki komórek raka prostaty. Wydaje się, że wykorzystanie metod biologii strukturalnej do racjonalnego projektowania leków będzie odgrywało coraz ważniejszą rolę w medycynie.

Cząsteczka nawet małego białka zbudowana jest z tysięcy atomów połączonych wzajemnie przez różnorodne wiązania kowalencyjne i niekowalencyjne. Dlatego w opisie struktury przestrzennej białka pomocne jest wyróżnienie kilku poziomów organizacji (Ryc. 1). Sekwencja (kolejność) aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym to tzw. struktura pierwszorzędowa (Ryc. 1A). Określenie odcinków łańcucha polipeptydowego tworzących helisy α (Ryc. 1B) i harmonijki β (Ryc. 1C) stanowi tzw. strukturę drugorzędową. Natomiast pełną strukturę przestrzenną, którą przyjmuje pofałdowany łańcuch polipeptydowy, nazywa się strukturą trzeciorzędową (Ryc. 1D).

W opisie struktury i funkcji białka pomocne może być także wyróżnienie jego domen. Domenę tworzy część łańcucha polipeptydowego (zwykle od 50 do 350 aminokwasów) zwinięta w upakowaną, stabilną i funkcjonalną strukturę przestrzenną. Domeny zawierają zwykle kilka helis α i/lub harmonijek β i stanowią element składowy wielu dużych białek. Zazwyczaj różne domeny danego białka wykonują różne funkcje.

trzeciorzędowa jest niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania białka w organizmie. Przekonanie to zostało zakwestionowane w pierwszych latach XIX wieku przez odkrycie białek natywne pozbawionych struktury trzeciorzędowej, które pomimo braku stabilnej struktury w warunkach fizjologicznych, pozostają w pełni funkcjonalne. Stanem natywnym białka tego rodzaju jest zespół różnorodnych konformacji (konformacja to układ przestrzenny atomów w danej



Ryc. 1. Poziomy organizacji cząsteczki białka. (A) Budowa chemiczna przykładowego fragmentu peptydu. Wiązania peptydowe między polarnymi grupami N-H oraz C=O (obramowane na rysunku linią przerywaną) łączą sąsiadujące w łańcuchu aminokwasy. Aminokwasy tworzące przedstawiony fragment peptydu to – od lewej – fenyloalanina (Phe), seryna (Ser), kwas glutaminowy (Glu) oraz lizyna (Lys). Sekwencja aminokwasów tworzących cząsteczkę białka, tzn. ich kolejność podawana od końca N do końca C, to struktura pierwszorzędowa. (B) Struktura przykładowej helisy α . Łańcuchy boczne aminokwasów tworzących tę helisę przedstawione są jako „patyczki”. Kolor czerwony, niebieski i cyjan reprezentuje odpowiednio atomy tlenu, azotu i węgla. (C) Struktura przykładowej harmonijki β . Helisy α i harmonijki β to struktury drugorzędowe. Są one stabilizowane przez wiązania niekwalencyjne – głównie wiązania wodorowe. (D) Ilustracja struktury trzeciorzędowej i czwartorzędowej przykładowego kompleksu białkowego (na podstawie wpisu nr 1OHZ do bazy danych PDB). Podjednostka oznaczona na pomarańczowo ma strukturę helikalną. Podjednostka oznaczona na zielono zbudowana jest z harmonijek β .

Wiązania niekwalencyjne, które powodują fałdowanie białka do określonej struktury przestrzennej, pozwalają również białkom wiązać się ze sobą, co prowadzi do powstania większych struktur białkowych, czyli tzw. kompleksów białkowych. Każdy łańcuch polipeptydowy w kompleksie białkowym zwany jest podjednostką. Jeśli cząsteczka białka jest kompleksem składającym się z więcej niż jednego łańcucha polipeptydowego, to wyróżnia się jeszcze jeden poziom organizacji – tzw. strukturę czwartorzędową, czyli wzajemnie położenie przestrzenne jego podjednostek (Ryc. 1D).

Początkowo wśród biologów strukturalnych panowało przekonanie, że ściśle określona, stabilna struktura

cząsteczki chemicznej). Białka natywne pozbawione struktury trzeciorzędowej zwane są także inherentnie nieuporządkowanymi (IDP od ang. *Intrinsically Disordered Protein*).

Ważną klasą białek typu IDP są białka wielodomenowe, w których odrębne, ustrukturyzowane domeny połączone są nieustrukturyzowanymi odcinkami łańcucha polipeptydowego. Chociaż są one powszechne i pełnią wiele istotnych funkcji w komórkach biologicznych, białka takie okazują się często bardzo trudne do zbadania za pomocą konwencjonalnych metod biologii strukturalnej. Otóż nie mogą być one zbadane całościowo metodami rentgenografii strukturalnej ze względu na obecność nieustrukturyzowanych

łączników międzydomenowych (mogą być wyznaczone tylko struktury poszczególnych, ustrukturyzowanych domen). Nie mogą być także zbadane metodami magnetycznego rezonansu jądrowego ze względu na duże rozmiary (zwykle rzędu kilkuset kDa). Dlatego do badań tego typu białek używa się coraz częściej metod komplementarnych, a w szczególności rozpraszania promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami (SAXS od ang. *Small Angle X-ray Scattering*). Głównym celem niniejszej pracy jest przedstawienie metody SAXS i opisanie jej przydatności w badaniach strukturalnych białek wielodomenowych, białek typu IDP oraz ich kompleksów.

Klasyczne metody biologii strukturalnej

Rentgenografia strukturalna i magnetyczny rezonans jądrowy (NMR od ang. *Nuclear Magnetic Resonance*) uważane są obecnie za główną siłę napędową biologii strukturalnej. Metody te umożliwiają tworzenie modeli opisujących przestrzenne rozmieszczenie poszczególnych atomów w badanych makrocząsteczkach. Takie trójwymiarowe modele są zwykle bardzo złożone, gdyż cząsteczki typowych białek zbudowane są z setek aminokwasów. Zarówno rentgenografia strukturalna, jak i NMR są uważane za metody o wysokiej rozdzielczości, ponieważ zwykle pozwalają one wyznaczyć położenia atomów w badanych makrocząsteczkach z dokładnością do paru Angströmów, a czasem nawet większą.

Od niedawna także kriogeniczna mikroskopia elektronowa (cryoEM od ang. *Cryo-Electron Microscopy*) jest używana do tworzenia atomowych modeli makrocząsteczek. Jednakże makrocząsteczki badane metodą mikroskopii cryoEM muszą zazwyczaj posiadać pewne szczególne właściwości, takie jak wysoka symetria, aby możliwe było osiągnięcie rozdzielczości atomowej. Dlatego np. ikozahedralne otoczki wirusów są idealnymi układami do badań metodami cryoEM [6]. Dopiero niedawno – dzięki osiągnięciom technicznym, takim jak wprowadzenie kamer termowizyjnych bezpośredniego wykrywania – w eksperymentach wykorzystujących mikroskopię cryoEM udało się wyznaczyć struktury niesymetrycznych makrocząsteczek z rozdzielczością atomową. Bardzo dobry zwięzły przegląd postępów w dziedzinie kriogenicznej mikroskopii elektronowej można znaleźć w artykule Smitha i Rubinsteina [14].

Wyżej wymienione metody biologii strukturalnej (rentgenografia, NMR, cryoEM) zostaną omówione w kolejnych akapitach bardzo fragmentarycznie – głównie w kontekście ich mocnych i słabych stron – gdyż

istnieje wiele doskonałych podręczników na ich temat. Nie zostaną w szczególności przedstawione ich podstawy fizyczne, lecz jedynie ich główne zastosowania we współczesnej biologii strukturalnej. Takie ogólne przedstawienie podstawowych metod biologii strukturalnej posłuży jako wstęp do omówienia metody SAXS, która coraz częściej wykorzystywana jest do strukturalnej charakteryzacji białek wielodomenowych, białek typu IDP oraz kompleksów białkowych.

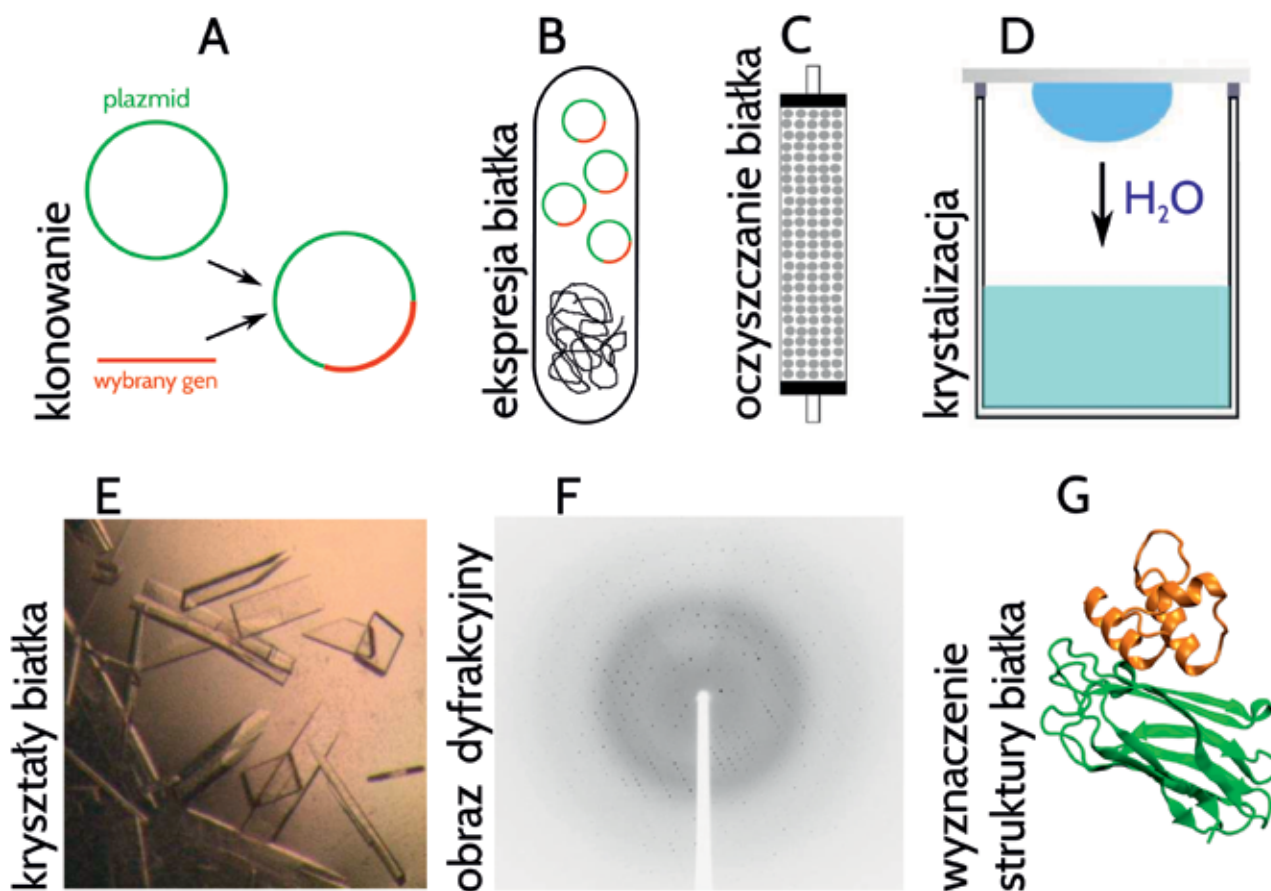
Do przeprowadzenia doświadczeń metodami biologii strukturalnej konieczne są czyste i jednorodne próbki białka w odpowiedniej ilości (Ryc. 2). Ponieważ zawartość badanych białek w komórkach biologicznych bywa często bardzo niewielka, obecnie używa się niemal wyłącznie białek produkowanych metodami inżynierii genetycznej – wybrane geny klonowane są do odpowiednich plazmidów (Ryc. 2A), a białka są zwykle uzyskiwane poprzez nadekspresję w pałeczkach okrężnicy (*Escherichia Coli*), drożdżach lub w komórkach owadów lub ssaków (Ryc. 2B). Mimo tego, że w niektórych przypadkach oczyszczanie białka może być trudne i żmudne, zazwyczaj rutynowe metody biochemiczne są do tego celu wystarczające (Ryc. 2C).

Jedną z zasadniczych różnic między rentgenografią strukturalną a metodami NMR jest to, że rentgenografia umożliwia wyznaczenie struktury białka jedynie w kryształach, a więc w układzie nie występującym zwykle w organizmach żywych, natomiast NMR pozwala uzyskiwać struktury białek w roztworach wodnych, a więc w środowisku zbliżonym do naturalnego. Dlatego struktury danego białka uzyskane tymi dwiema metodami różnią się zwykle do pewnego stopnia.

Główną trudnością współczesnej rentgenografii strukturalnej jest uzyskiwanie monokryształów białka (Ryc. 2D). Problem sprowadza się do znalezienia odpowiednich warunków, w których cząsteczki badanego białka będą samoorganizować się w idealne kryształy (Ryc. 2E). Na proces krystalizacji mają wpływ czynniki fizyczne (np. temperatura, ciśnienie, lepkość roztworu białka, a nawet zanieczyszczenia próbki, które mogą się stać jądrami krystalizacji), chemiczne (np. pH, siła jonowa i skład chemiczny buforu, w którym rozpuszczone jest białko) i biochemiczne (np. czystość i jednorodność próbki, modyfikacje potranslacyjne białka, obecność ligandów i wiele innych). Niemożliwe jest przewidzenie, jakie czynniki mogą doprowadzić do utworzenia kryształów konkretnego białka. Dlatego najbardziej efektywne wydają się obecnie testy przesiewowe – wraz z wprowadzeniem robotów do krystalizacji białek, możliwe stało się testowanie tysięcy warunków krystalizacji badanego białka.

Po wyhodowaniu odpowiedniego kryształu białka (Ryc. 2E) przeprowadza się na nim doświadczenie dyfrakcyjne. Kryształ naświetla się silną, monochromatyczną wiązką promieniowania rentgenowskiego, zmieniając stopniowo kąt jej padania na kryształ (poprzez jego obrót) i rejestrując zmiany obrazu dyfrakcyjnego po przejściu promieni przez kryształ (Ryc. 2F). W dzisiejszych czasach doświadczenia dyfrakcyjne na kryształach białka wykonuje się zwykle w synchrotronach. Na podstawie danych dyfrakcyjnych wyznacza się trójwymiarową mapę gęstości elektronowej w komórce elementarnej kryształu. Numeryczna analiza tej mapy umożliwia wyznaczenie współrzędnych poszczególnych atomów badanej ma-

samoorganizacja makrocząsteczek w identyczne, powtarzające się „bloki”, czyli tzw. komórki elementarne kryształu. W konsekwencji praktycznie wszystkie makrocząsteczki w kryształach – lub zestawy makrocząsteczek, jeżeli jest ich więcej niż jedna w komórce elementarnej – muszą przyjmować identyczną konformację. Stanowi to pewien problem, ponieważ białko w warunkach fizjologicznych nie musi przybierać tylko jednej, niezmiennej struktury, a działanie wielu białek (np. kataliza enzymatyczna) jest skutkiem ich zmian strukturalnych. Co więcej, białka pozbawione struktury trzeciorzędowej przypominają raczej łańcuch elastycznego polimeru i mogą przyjmować określoną strukturę przestrzenną tylko w szczegól-



Ryc. 2. Schemat kolejnych czynności i doświadczeń prowadzących do wyznaczenia struktury białka metodami rentgenografii strukturalnej. (A) Geny kodujące badane białka klonowane są do odpowiednich plasmidów. (B) Białka uzyskiwane są poprzez nadekspresję w *E. coli*. (C) Po lizie komórek *E. Coli* białka oczyszczane są metodami chromatografii. (D) Monokryształy białka uzyskiwane są np. metodą wiszącej kropli. (E) Wyhodowane kryształy wybiera się na podstawie ich rozmiarów i kształtów. (F) Na wybranych kryształach przeprowadza się doświadczenie dyfrakcyjne. Obraz dyfrakcyjny składa się z wielu plamek, których rozmieszczenie zmienia się, gdy kryształ jest obracany względem padającej wiązki promieniowania rentgenowskiego. (G) Na podstawie obrazów dyfrakcyjnych wyznacza się trójwymiarową mapę gęstości elektronowej w komórce elementarnej kryształu. Numeryczna analiza tej mapy umożliwia wyznaczenie struktury atomowej badanego białka.

krocząsteczki (Ryc. 2G). Dzięki rozwojowi specjalistycznego oprogramowania do analizy danych dyfrakcyjnych wyznaczenie struktury białka sprowadza się często do zaledwie kilku kliknięć [7].

Warunkiem koniecznym utworzenia monokryształów, które dają dobrej jakości obraz dyfrakcyjny, jest

nych warunkach, gdy na przykład zwiążą się z innymi, ściśle określonymi cząsteczkami biologicznymi.

Metoda jądrowego rezonansu magnetycznego opiera się na całkowicie odmiennych zasadach fizycznych niż rentgenografia strukturalna. Ma ona jednak analogicznie zastosowanie w biologii strukturalnej – jest

powszechnie używana do badania struktur makromolekuł z rozdzielczością atomową. Zasadniczą różnicą jest to, że wykorzystanie rentgenografii strukturalnej wymaga uprzedniego wyhodowania kryształów białka, natomiast doświadczenia NMR są przeprowadzane na cieplem roztworze badanego białka. Ponadto, na potrzeby pomiarów techniką NMR, białka muszą być znakowane stabilnymi izotopami (zwykle ^{13}C i ^{15}N), co może być trudne w przypadku ekspresji białek w komórkach owadów lub ssaków. Znakowane białko musi być stabilne w czasie pomiarów NMR, które trwać mogą nawet do dwóch tygodni. Musi być także stosunkowo niewielkie, gdyż rozdzielczość metody NMR znacznie się pogarsza dla białek o masie przekraczającej około 50 kDa. Główną przyczyną tego ograniczenia jest fakt, iż duże białka w środowisku wodnym – na skutek bezustannych zderzeń termicznych z innymi cząsteczkami – wykonują stosunkowo powolne ruchy obrotowe, co prowadzi do szybkiego zaniku sygnału NMR. Należy jednak zaznaczyć, że w dziedzinie NMR następuje ciągły postęp, przez co możliwe stają się badania strukturalne coraz większych białek [5].

Należy zwrócić uwagę na jeszcze jedną ważną różnicę między rentgenografią a metodami NMR. Za pomocą metod rentgenografii strukturalnej wyznacza się statyczny model opisujący położenia poszczególnych atomów białka w kryształach. Małe drgania pojedynczych atomów wokół położenia równowagi opisywane są przez tzw. czynniki temperaturowe. Natomiast NMR umożliwia badanie dynamiki białek w roztworach ciekłych. Otóż, na skutek zderzeń z innymi cząsteczkami, białka w środowisku wodnym pozostają w bezustannym ruchu. Są to między innymi ruchy obrotowe i postępowe całych cząsteczek białka. Mogą też występować ruchy polegające na znacznych zmianach względnych położenia atomów w cząsteczce białka. Ruchy tego rodzaju nazwane są zmianami konformacyjnymi. Na podstawie widm NMR wyznacza się zwykle grupę około 20 modeli przestrzennych, która reprezentuje typowe konformacje badanego białka w środowisku wodnym. Dlatego metody NMR doskonale nadają się do badania małych białek typu IDP.

Metoda rozpraszania promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami

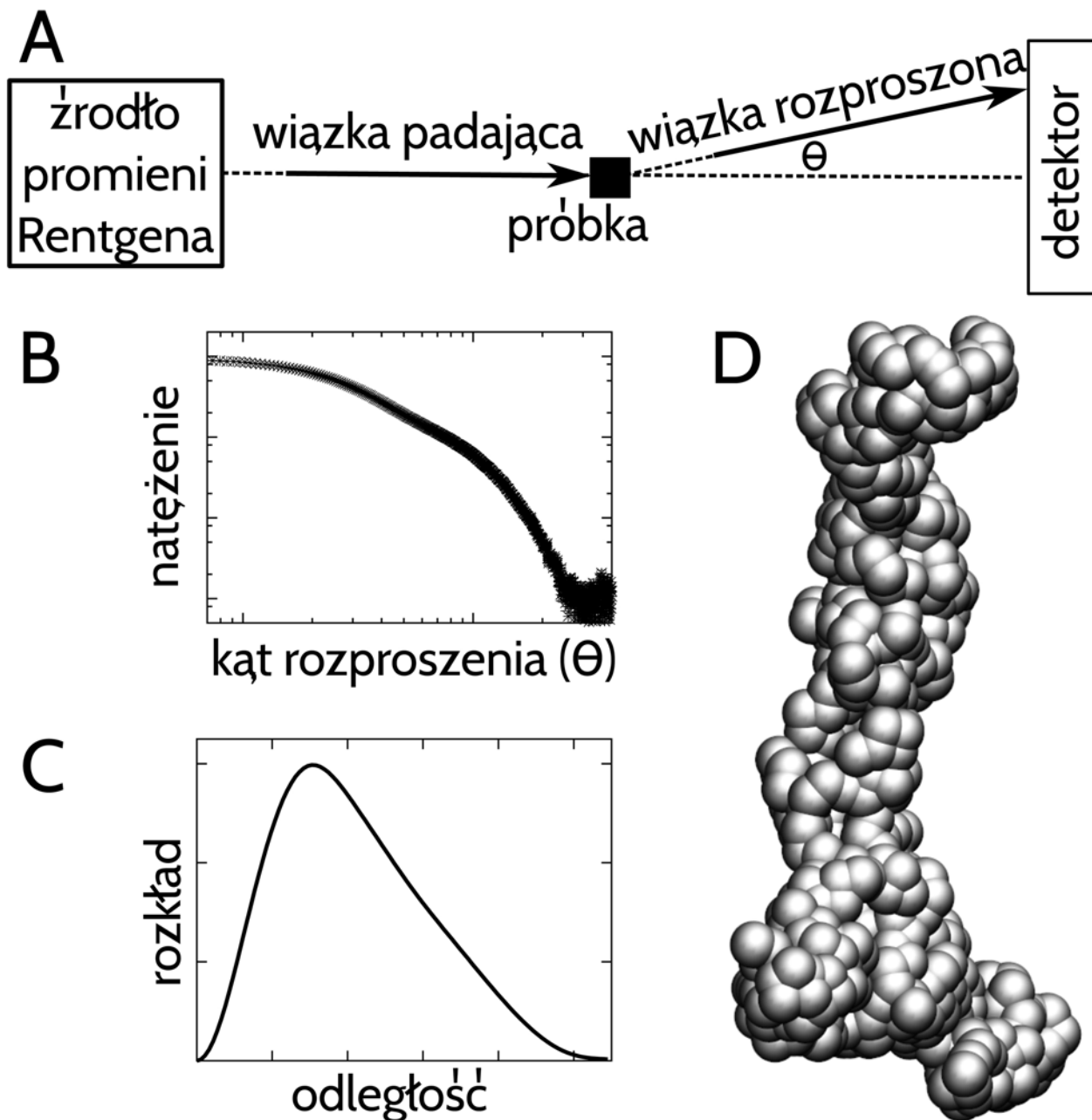
Jak już wspomniano, metody biologii strukturalnej wysokiej rozdzielczości mają swoje ograniczenia. Rentgenografia strukturalna optymalnie nadaje się do badania makrocząsteczek „nieelastycznych”, tzn. takich, które w warunkach zbliżonych do fizjologicznych

przyjmują jedną, stabilną, dobrze określoną strukturę przestrzenną. Natomiast obecne metody NMR stosowalne są do badań strukturalnych makrocząsteczek o masach nie przekraczających około 50 kDa. Metoda SAXS nie podlega tym ograniczeniom i daje dodatkową możliwość charakterystyki strukturalnej białek i innych makrocząsteczek w środowisku wodnym [3]. Po pierwsze, w przeciwieństwie do rentgenografii strukturalnej, metoda SAXS nie wymaga hodowli kryształów. Doświadczenia SAXS zawsze dostarczają danych rozproszeniowych, gdyż makrocząsteczki w cieplem roztworze zawsze rozpraszają promieniowanie rentgenowskie – niezależnie od stopnia ich ustrukturyzowania lub elastyczności. Dlatego może być ona stosowana np. do badania białek pozbawionych struktury trzeciorzędowej. Po drugie, w przeciwieństwie do NMR, metoda SAXS nie jest ograniczona przez rozmiar badanych makromolekuł. Może być ona stosowana zarówno do badania dużych kompleksów białkowych, jak i małych białek lub peptydów (uzupełniając np. informacje z pomiarów NMR). Jakość krzywych rozproszeniowych otrzymywanych z doświadczeń SAXS nie zależy bezpośrednio ani od rozmiaru ani od „miękkości” badanych makromolekuł w środowisku wodnym. Co więcej, metoda SAXS może być stosowana do badania ciekłych roztworów makrocząsteczek w szerokim zakresie stężeń, temperatur, pH, sił jonowych, itd.

SAXS powszechnie uważana jest za metodę o niskiej rozdzielczości, ponieważ w doświadczeniach SAXS rejestrowane jest promieniowanie rentgenowskie rozproszone jedynie pod małymi kątami względem kierunku wiązki padającej (Ryc.3A). Co więcej, w przeciwieństwie do krystalografii rentgenowskiej, doświadczenia SAXS dostarczają „sferycznie uśrednionych” informacji o strukturach badanych makromolekuł, co dodatkowo obniża dokładność tej metody. Otóż gdy promieniowanie rentgenowskie rozpraszane jest na kryształach, to obraz dyfrakcyjny składa się z wielu rozmieszczonych symetrycznie plamek, które zmieniają się, gdy kryształ jest obracany względem wiązki padającej (Ryc. 2F). Natomiast gdy promieniowanie rentgenowskie pada na roztwór ciekły, to jest ono rozpraszane na cząsteczkach mających różnorakie orientacje przestrzenne względem wiązki padającej, wskutek czego obraz dyfrakcyjny składa się ze współśrodkowych pierścieni. W tym przypadku obracanie próbki względem wiązki padającej nie zmienia obrazu dyfrakcyjnego. Wynikiem takiego doświadczenia jest więc jedynie jednowymiarowa krzywa, tzn. natężenie promieniowania rentgenowskiego w funkcji kąta rozproszenia (Ryc. 3B). Część informacji o strukturze badanych makrocząsteczek zostaje

zatem utracona, gdy doświadczenie rozproszeniowe przeprowadza się na roztworze ciekłym, a nie na monokryształach. Można powiedzieć, że skomplikowana, trójwymiarowa struktura makrocząsteczki zostaje w doświadczeniach SAXS zredukowana do jednowymiarowej krzywej rozproszeniowej. Jednak pomimo utraty informacji, analiza i interpretacja krzywych rozproszeniowych z doświadczeń SAXS może prowadzić do ważnych obserwacji na temat relacji strukturalno-funkcjonalnych badanych makrocząsteczek.

Niewątpliwą zaletą wykorzystania krzywych rozproszeniowych do modelowania białek jest to, że doświadczenia SAXS są przeprowadzane na roztworach ciekłych i w związku z tym dostarczają informacji o stanie termodynamicznym białek w naturalnym środowisku wodnym. Jednak aby z pomiarów SAXS uzyskać rzetelne informacje o strukturze białek, należy zadbać o wiele niuansów, wśród których dwa opisane poniżej wydają się najistotniejsze. Po pierwsze, krzywa rozproszeniowa jest wyznaczana jako różnica



Ryc. 3. Rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami na cząsteczkach białka w środowisku wodnym. (A) Schemat układu doświadczenia. Kąt rozproszenia oznaczony jest przez θ . Doświadczenia przeprowadza się zwykle w synchrotronach. (B) Przykład krzywej rozproszeniowej, tzn. zależności zarejestrowanego natężenia promieniowania rentgenowskiego w funkcji kąta rozproszenia θ . (C) Rozkład odległości pomiędzy wszystkimi parami atomów w badanym białku. Rozkład ten otrzymuje się z transformaty Fouriera krzywej rozproszeniowej z Ryc. 3B. (D) Obwiednia molekularna reprezentująca przestrzeń zajmowaną przez cząsteczkę badanego białka. Obwiednie molekularne dostarczają informacji o kształtach i rozmiarach badanego białka. Otrzymuje się je na podstawie rozkładu odległości par atomów z Ryc. 3C oraz sekwencji aminokwasowej badanego białka.

natężen promieniowania rozproszonego na próbce białka w buforze a próbce samego buforu. Jeśli odjęcie tych dwóch sygnałów zostanie wykonane niewłaściwie lub niedokładnie, to wyznaczona krzywa rozproszeniowa może być obciążona dużym błędem pomiarowym, a wyznaczone na jej podstawie modele strukturalne będą mylne. Po drugie, przy modelowaniu białek na podstawie danych z doświadczeń SAXS należy wziąć pod uwagę tzw. powłokę hydratacyjną na powierzchni białka. Jest to zadanie obliczeniowo złożone i niejednoznaczne. Różne programy do obliczeń krzywych rozproszeniowych na podstawie modeli strukturalnych (np. CRY SOL [15] lub AquaSAXS [12]) różnią się sposobem modelowania powłok hydratacyjnych, co może nakładać dodatkową niepewność na struktury białek wyznaczone metodą SAXS.

Metoda SAXS jest standardowo używana do wyznaczania charakterystycznych rozmiarów i kształtów białek [3]. Pomijając pewne aspekty techniczne, procedura jest następująca. Z doświadczeń SAXS (Ryc. 3A) otrzymuje się krzywe rozproszeniowe (Ryc. 3B). Odwrotna transformata Fouriera krzywej rozproszeniowej daje rozkład odległości pomiędzy wszystkimi możliwymi parami atomów w badanym białku (Ryc. 3C). Na podstawie tego rozkładu i sekwencji aminokwasowej białka (oraz przy upraszczającym założeniu równomiernego rozłożenia masy w cząsteczce białka) wyznacza się tzw. obwiednię molekularną, która reprezentuje przestrzeń zajmowaną przez cząsteczkę białka (Ryc. 3D). Do obliczeń tych używa się specjalistycznego oprogramowania komputerowego [9]. Obwiednie molekularne dostarczają informacji o charakterystycznych rozmiarach badanego białka i pozwalają zwizualizować jego kształt. Jednak nie pozwalają one określić atomowej struktury białka i dlatego SAXS jest powszechnie uznawana za metodę biologii strukturalnej niskiej rozdzielczości. Jednak jeśli dane z doświadczeń SAXS zostaną uzupełnione o pewne dodatkowe informacje strukturalne o badanym białku, to mogą być one wykorzystane w dużo bardziej wydajny sposób. Przykładowo SAXS może służyć do określenia struktury kompleksu białkowego, jeśli znane są struktury atomowe poszczególnych białek lub domen białkowych tworzących dany kompleks. Używane jest do tego celu specjalistyczne oprogramowanie [9,10]. Modelowanie tego typu przebiega zwykle następująco. Generowana jest najpierw duży zbiór zróżnicowanych modeli strukturalnych badanego kompleksu białkowego (zwykle dziesiątki tysięcy rozmaitych modeli przestrzennych). Aby proces ten był efektywny i niezbyt czasochłonny, struktury poszczególnych białek lub domen białkowych wchodzących w skład

badanego kompleksu reprezentowane są przez bryły sztywne. Można to porównać do łączenia kilku klocków Lego na wiele różnych sposobów. Następnie dla każdego z wygenerowanych modeli strukturalnych obliczana jest teoretyczna krzywa rozproszeniowa, która jest porównywana z krzywą rozproszeniową otrzymaną z doświadczenia SAXS na badanym kompleksie białkowym. Zgodność krzywej teoretycznej z doświadczalną oznacza, że dany model strukturalny może reprezentować rzeczywistą strukturę kompleksu białkowego w środowisku wodnym. Tak więc z wygenerowanej puli modeli wybierane są te, które najlepiej zgadzają się z krzywą rozproszeniową z doświadczenia SAXS. Dzięki tego typu modelowaniu można określić, w jaki sposób grupa danych białek jest wzajemnie połączona w kompleks. Możliwe jest więc wskazanie powierzchni, którymi te białka oddziałują ze sobą.

Rentgenografia strukturalna jest coraz częściej uzupełniana przez SAXS w celu określenia struktur białek wielodomenowych oraz kompleksów białkowych. Natomiast metody łączące NMR i SAXS pozwalają wyznaczać atomowe struktury białek w środowisku wodnym. Takie połączenie wydaje się szczególnie skuteczne, ponieważ NMR i SAXS dostarczają komplementarnych informacji strukturalnych. Mianowicie pomiary NMR nakładają „lokalne” ograniczenia na odległości między atomami lub na kąty dwusienne między płaszczyznami wiązań chemicznych w badanym białku, natomiast dane z doświadczeń SAXS dostarczają „globalnych” informacji o rozmiarze i kształcie tego białka.

Jak zostało to opisane wcześniej, dane z doświadczeń SAXS wykorzystywane są często do wyznaczania tzw. obwiedni molekularnych, które reprezentują kształty białek (Ryc. 3D). Jednak jeśli białko w warunkach fizjologicznych jest elastyczne, tzn. nie posiada stabilnej struktury trzeciorzędowej, to pojedyncza obwiednia molekularna nie może oczywiście przedstawić jego kształtu. Dlatego modelowanie tego typu białek wymaga innej strategii, która daje możliwość opisu zespołu konformacyjnego, a nie pojedynczej struktury. W podejściu tym stan natywny białka reprezentowany jest przez grupę modeli strukturalnych, która jako całość musi być zgodna z wynikami doświadczeń. Powstało wiele sposobów modelowania zespołów konformacyjnych białek w oparciu o dane SAXS [2,8,13]. Wszystkie te podejścia wymagają na początek wygenerowania dużej puli modeli przestrzennych badanego białka. Może być ona otrzymana przy użyciu, na przykład, algorytmów uwzględniających jedynie efekty wykluczonej objętości [2] lub symulacji typu Monte Carlo [13]

lub symulacji dynamiki molekularnej [8]. Po wygenerowaniu dostatecznie dużej i zróżnicowanej puli modeli strukturalnych, zwykle wykorzystywane są pewne algorytmy heurystyczne do określenia, która kombinacja struktur jest najbardziej zgodna z wynikami doświadczeń SAXS. Z puli wybierana jest w ten sposób wąska grupa modeli, która reprezentuje zespół konformacyjny badanego białka. Natomiast metoda o nazwie EROS (od ang. *Ensemble Refinement of SAXS*) wykorzystuje inną strategię, która polega na tym, że pula struktur otrzymanych z symulacji jest zmieniana możliwie łagodnie, a jednocześnie w taki sposób, aby uzyskać jej zgodności z krzywą rozproszeniową SAXS [13]. Do osiągnięcia tego celu wykorzystywana jest zasada maksymalnej entropii. Metoda EROS została poszerzona i udoskonalona – obecnie umożliwia modelowanie zespołów konformacyjnych białek na podstawie wyników doświadczeń SAXS, elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR od ang. *Electron Paramagnetic Resonance*) i Förstrowskiego rezonansowego przekazu energii (FRET od ang. *Förster Resonance Energy Transfer*) [4].

są z wielu domen połączonych długimi, elastycznymi łącznikami. Mimo tego, że białka tego rodzaju często występują w komórkach biologicznych i pełnią w nich wiele ważnych funkcji, to stanowią one białą plamę w dziedzinie biologii strukturalnej. Ich znaczny rozmiar oraz elastyczność strukturalna są powodem tego, że nie ma obecnie jednej, uniwersalnej metody badawczej, która mogłaby dostarczyć informacji o strukturach tego rodzaju białek. Jednak jeśli wyniki pomiarów przeprowadzonych kilkoma różnymi, uzupełniającymi się metodami – tj. krystalografia, NMR, cryoEM, SAXS, EPR, FRET – zostaną połączone przy pomocy zaawansowanych narzędzi obliczeniowych, to wyznaczenie reprezentatywnych konformacji tego typu białek staje się możliwe. Podejście takie zostało zastosowane np. do wyznaczenia zespołów konformacyjnych kompleksów białkowych ESCRT [4] (od ang. *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*). W przyszłości analogiczne metody mogą być zastosowane do innych kompleksów białkowych zaangażowanych w transport wewnątrzkomórkowy.

Podsumowanie

Wśród białek najtrudniejszych do scharakteryzowania strukturalnego są obecnie te, które zbudowane

Bibliografia

1. BALBAS M.D., EVANS M.J., HOSFIELD D.J., et al. 2013. Overcoming mutation-based resistance to antiandrogens with rational drug design. *eLife* 2, e00499.
 2. BERNADO P., MYLONAS E., PETOUKHOV M.V., et al. 2007. Structural characterization of flexible proteins using small-angle X-ray scattering. *J Am Chem Soc* 129, 5656–5664.
 3. BLANCHET C.E., SVERGUN D.I. 2013. Small-Angle X-Ray Scattering on Biological Macromolecules and Nanocomposites in Solution. *Annu Rev Phys Chem* 64, 37–54.
 4. BOURA E., RÓŻYCKI B., HERRICK D.Z., et al. 2011. Solution structure of the ESCRT-I complex by small-angle X-ray scattering, EPR, and FRET spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 9437–9442.
 5. FRUEH D.P., GOODRICH A.C., MISHRA S.H., et al. 2013. NMR methods for structural studies of large monomeric and multimeric proteins. *Curr Opin Struct Biol* 23, 734–739.
 6. GRIGORIEFF N., HARRISON S.C. 2011. Near-atomic resolution reconstructions of icosahedral viruses from electron cryo-microscopy. *Curr Opin Struct Biol* 21, 265–273.
 7. MINOR W., CYMBOROWSKI M., OTWINOWSKI Z., et al. 2006. HKL-3000: the integration of data reduction and structure solution—from diffraction images to an initial model in minutes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62, 859–866.
 8. PELIKAN M., HURA G.L., HAMMEL M. 2009. Structure and flexibility within proteins as identified through small angle X-ray scattering. *Gen Physiol Biophys* 28, 174–189.
 9. PETOUKHOV M.V., FRANKE D., SHKUMATOV A.V., et al. 2012. New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *J Appl Cryst* 45, 342–350.
 10. PETOUKHOV M.V., SVERGUN D.I. 2005. Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. *Biophys J* 89, 1237–1250.
-

11. PLEVKA P., PERERA R., CARDOSA J., et al. 2012. Crystal structure of human enterovirus 71. *Science* 336, 1274.
12. POITEVIN F., ORLAND H., DONIACH S., et al. 2011. AquaSAXS: a web server for computation and fitting of SAXS profiles with non-uniformly hydrated atomic models. *Nucleic Acids Res* 39, W184–W189.
13. RÓŻYCKI B., KIM Y.C., HUMMER G. 2011. SAXS ensemble refinement of ESCRT-III CHMP3 conformational transitions. *Structure* 19, 109–116.
14. SMITH M.T., RUBINSTEIN J.L. 2014. Structural biology. Beyond blob-ology. *Science* 345, 617–619.
15. SVERGUN D., BARBERATO C., KOCH M.H.J. 1995. CRY SOL - A program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J Appl Cryst* 28, 768–773.

■ **Bartosz Różycki.** Instytut Fizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa. E-mail: rozycki@if.pan.edu.pl



Ryc. Różnorodność genetycznie zmodyfikowanych linii Danio rerio. Brak ciemnych barwników na skórze ułatwia obrazowanie procesów zachodzących w ciele ryby. Fot. Michał Bazała.