

Krystallisation af lysozym

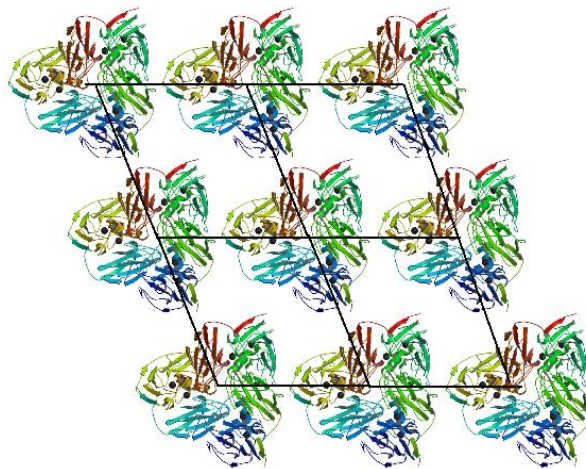
- øvelsen er taget fra Alexander McPherson *Crystallization of biological macromolecules*
© 1999 by Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Enzymet lysozym nedbryder cellevæggen i bakterier. Enzymet fra fx hønseæg er let at fremskaffe (kan købes hos kemikaliefirmaer), og det krystalliserer nemt. Lav en opløsning af lysozym (mellem 40 og 80 mg/ml) i en 0.1 M NaAcetat/eddikesyre-puffer (pH 4.8). Lav en 8% w/v opløsning af NaCl i den samme 0.1 M NaAcetat/eddikesyre-puffer. Bland de to opløsninger i forholdet 1:1. Dæk opløsningerne til, og vent 12-48 timer. Krystallerne kommer hurtigst ved 4°C, men bliver pænere ved stuetemperatur. De kan let ses i et mikroskop.

Proteinindholdet i krystaller

For at kunne løse en proteinstruktur ved hjælp af røntgenspredning er det essentielt at få proteinet til at krystallisere, så man kan detektere signalet fra så mange molekyler som muligt. Det er fordi intensiteten af den diffrakterede stråling går med kvadratet på antallet af proteinmolekyler krystallen!

Krystaller er opbygget af ens kasser – såkaldte enhedsceller. I den todimensionelle figur herunder er en enhedscelle tegnet ind. Hver enhedscelle indeholder 3 molekyler (angivet med farverne blå, rød og grøn).



Lysozym kan krystallisere på forskellige måder. De krystaller, man laver i øvelsen har celledimensionerne: $a=76.30 \text{ \AA}$, $b=76.30 \text{ \AA}$ og $c=36.86 \text{ \AA}$. Vinklerne er alle 90° . I hver enhedscelle er der 8 lysozymmolekyler.

En typisk krystal har dimensionerne $200 \times 200 \times 200 \text{ \mu m}^3$. Hvor mange proteinmolekyler indeholder sådan en krystal?

Diffraction

Interferens opstår, når to eller flere bølger er på samme sted til samme tidspunkt. Den resulterende bølges udsving vil være summen af de enkelte bølgers udsving. Når bølgerne forstærker hinanden, kalder man det konstruktiv interferens. Når bølgerne svækker eller helt udslukker hinanden, kalder man det destruktiv interferens. Der er ikke nogen klar definition på, hvornår man bruger ordet interferens, og hvornår man bruger ordet diffraktion. Generelt bruger man diffraktion, når der er mange bølger, der interfererer.

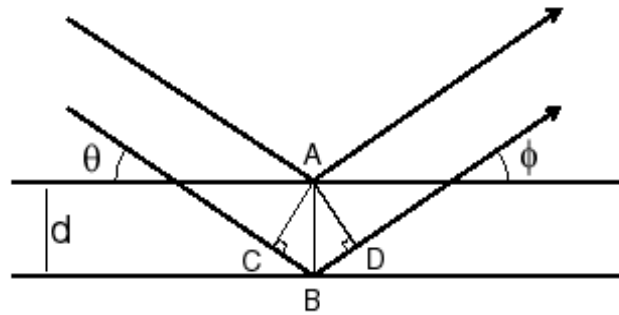
Bragg beskrev røntgendiffraktion som refleksion af strålingen i gitterplaner som vist i figuren herunder. Han antog at strålingen bliver reflekteret i flere ækvivalente gitterplaner. Der vil kun være konstruktiv interferens, hvis forskellen i vejlængde for bølgerne er et helt tal gange bølgelængden, $n\lambda$.

Forskellen i vejlængde mellem de to stråler, der er reflekteret i punkterne A og B, vil være længden $|CB|+|BD|$. Hvis man kender afstanden mellem gitterplanerne d og vinklerne θ og ϕ , kan man udregne $|CB|=d\sin\theta$ og $|BD|=d\sin\phi$, og man får Braggs lov:

$$d(\sin\theta + \sin\phi) = n\lambda$$

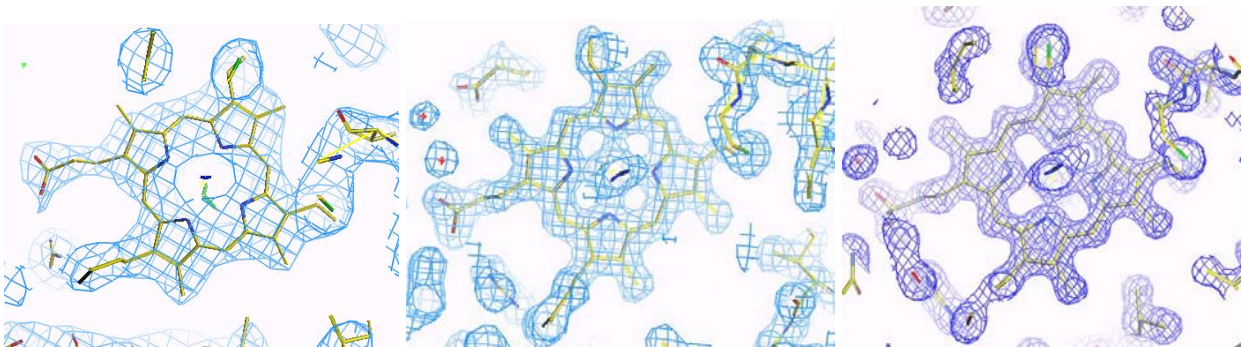
der, hvis den indkommende vinkel θ er lig den udgående vinkel ϕ bliver:

$$2d \sin\theta = n\lambda$$



Når man roterer en krystal vil man ramme mange gitterplaner, og der vil komme diffraktion i mange forskellige retninger. At beskrive hele eksperimentet er mere kompliceret, og man må tage hensyn til fordelingen af atomer, men Braggs lov er simpel og har derfor stadig sin anvendelse.

I moderne proteinkrystallografi kalder man den gitterafstand, d_{min} , der svarer til diffraktionsgrænsen, $2\theta_{max}$, for opløsningen af strukturen. Jo bedre en krystal diffrakterer røntgenstråling, jo større er den maximale spredningsvinkel, $2\theta_{max}$, jo mindre er opløsningen, d_{min} , og jo flere detaljer kan man se. I figuren herunder svarer elektrontætheden til venstre til 2,60 Å, den i midten svarer til 1,75 Å og den yderst til højre til 1,25 Å.



Antallet af diffraktionspletter er ligefrem proportionalt med volumenet af enhedscellen V_a og omvendt proportional med d_{min}^3 , så:

$$N_{ref} \propto \frac{V_a}{d_{min}^3}$$

Krystaller, der er lavet af mindre organiske molekyler, vil normalt sprede til 0,5-0,6 Å. En meget god proteinkrystal spreder til 1 Å og en almindelig god proteinkrystal til omkring 2 Å.

For en lysozymkrystal (med samme enhedscelle som ovenfor), der spreder til 2\AA (det vil sige $d_{min}=2\text{\AA}$) måler man ca. 7100 refleksioner?

Lysozym er et molekyle, der består af 129 aminosyrerester. Der er i alt 1264 atomer (her undlader vi at medregne hydrogenatomer, der er svære at se med røntgenstråling – hvorfor er de for øvrigt det?).

Hvert atom skal tilordnes koordinater x, y og z og den termiske B-faktor, der beskriver, hvor meget atomet bevæger sig. Dvs. der skal tilpasses 4 parametre pr. atom – i alt 5056 parametre i lysozym.

Hvad er forholdet mellem antallet af målinger ved $d_{min}=2\text{\AA}$ og antallet af parametre?

For at kunne bygge modellen udelukkende ud fra data skal man have mange flere målinger end parametre – dvs. data/parameter forholdet skal være mindst 20. Dette er aldrig tilfældet for proteiner, og derfor skal man udnytte al sin kemiske viden om blandt andet aminosyresekvensen, bindingslængder, bindingsvinkler, hydrogenbindingsafstande og hydrofobe vekselvirkninger for at kunne bygge modellen. Kvaliteten af strukturen bliver afhængig af opløsningen på diffraktionsdata, altså hvor god krystallen er.