Livets kemi under lup

Af lektor Pernille Harris

Forståelse af hvordan biologiske molekyler, som for eksempel proteiner, fungerer og spiller sammen, er en vigtig del af den biokemiske forskning. En betydelig brik i dette puslespil er kortlægning af molekylernes tredimensionelle atomare struktur. Kendes den, vil man ofte kunne forklare mange andre biokemiske data. Den atomare struktur kan findes ved hjælp af røntgendiffraktion, hvis man altså kan få molekylerne til at krystallisere. Krystallisering af proteiner og andre store molekyler kan lade sig gøre, og forskningsfeltet, hvor man bestemmer store biologiske molekylers struktur ved hjælp af røntgendiffraktion, er i stor fremgang, blandt andet fordi man i dag kan fremstille store mængder protein ved gensplejsning.

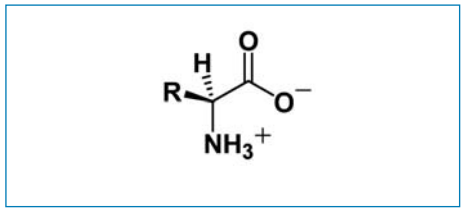
Mennesket har altid stræbt efter at udforske og forstå livets byggesten. Vores nysgerrighed efter at udforske de materialer, der omgiver os, samt materialernes bestanddele har ført os langt omkring. De gamle ægyptere mente, at stof kunne tilknyttes en ånd og senere arbejdede videnskaben ud fra teorien om, at alt stof kunne føres tilbage til et af de fire grundelementer: Jord, luft, ild eller vand. I årenes løb har vi naturligvis samlet mere viden, og i dag ved vi, at alt stof er opbygget af atomer.

Kendskab til og undersøgelser af den atomare struktur danner grundlag for materialeforskningen, og op mod 300.000 stoffer er nu blevet strukturbestemt ved hjælp af røntgendifffraktion. Inden for biokemi og forskningen i livets byggematerialer er molekylerne langt mere komplekse, og det er sværere at kortlægge deres atomare struktur. Det er dog muligt, og forskningsfeltet har opnået markante resultater blandt andet med forbedring af lægemidlers effekt. Den nye og mere virkningsfulde hivmedicin er eksempelvis udviklet fra studier af den atomare struktur af proteiner fra hiv-virus. Det mest spændende perspektiv kan dog gemme sig i de store genomsekventeringsprogrammer, der har opnået at kortlægge en række genomer fuldstændigt, således også det humane genom. Da generne koder for proteiner, kan forskere ved at studere nogle af proteinerne i de ældste organismer her på kloden få værdifuld information om selve livets store gåde: Hvordan er livet her på jorden opstået?

Proteiner og deres opbygning

Proteiner er en bestemt klasse af biologiske molekyler, der indgår i alle levende celler. Proteiner kan spille en rolle for cellernes struktur, som for eksempel proteinerne keratin i hår og collagen i bindevæv. Proteiner kan også transportere andre molekyler. Et velkendt eksempel er hæmoglobin, der transporterer oxygen rundt i blodet. De kan ligeledes transmittere information fra en celle til en anden, som hormoner (dog findes der også hormoner, som ikke falder ind under betegnelsen proteiner) eller receptorer. Endelig kan de være biologiske katalysatorer, enzymer, der kan få en bestemt kemisk proces til at forløbe hurtigere, end den ellers ville.

Proteiner er polymerer, der er bygget op af i alt 20 forskellige aminosyrer. Polymerer er lange kædemolekyler bestående af identiske mindre segmenter, der kan have forskellige sidegrupper. En aminosyre består af et kulstofatom, hvortil der er bundet en aminogruppe, en carboxylsyregruppe, et hydrogenatom og endelig en sidekæde, der varierer for de 20 aminosyrer. I et enkelt tilfælde, prolin, er aminogruppen bundet til enden af sidekæden.

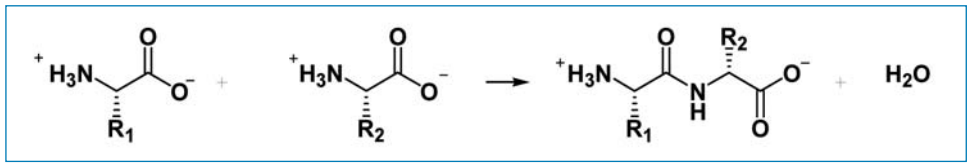


Opbygningen af en aminosyre. Sidekæden R varierer for de forskellige aminosyrer.

Proteinerne bliver lavet i cellen under proteinsyntesen ved, at der bliver dannet en peptidbinding mellem aminosyrerne, der bliver koblet sammen en efter en. En peptidbinding er en amidbinding mellem carboxylsyregruppen fra én aminosyre og aminogruppen fra en anden aminosyre.

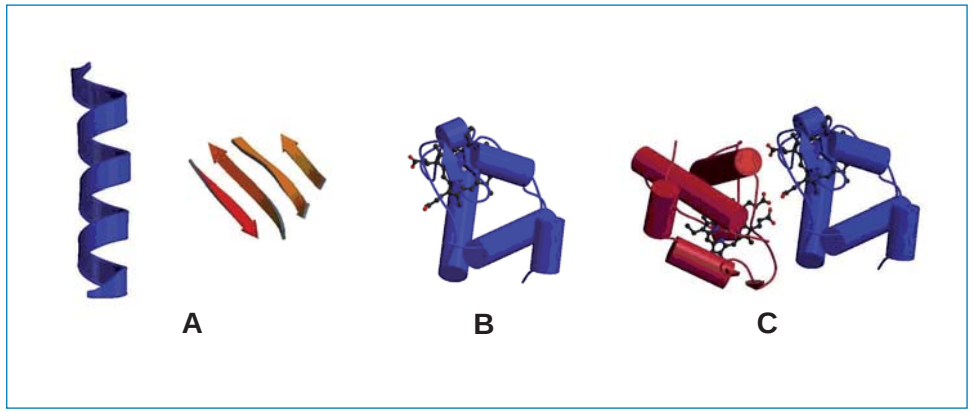
På den måde får man dannet en lang kæde af -N-C-C- enheder, hvor der er forskellige sidekæder på det midterste af C-atomerne.

Man kan tale om proteinstruktur på flere niveauer med primær, sekundær, tertiær og kvaternær struktur. Den primære struktur er aminosyresekvensen, dvs. rækkefølgen af aminosyrer. Den sekundære struktur er den lokale tredimensionelle foldning af aminosyrerne, f.eks. α-helix eller β-foldeblad. Den tertiære struktur er den overordnede tredimensionelle foldning af proteinet, og endelig er den kvaternære struktur udtryk for, hvorvidt det aktive protein måske er sammensat af flere peptidkæder, der enten kan være flere ens peptidkæder eller flere forskellige peptidkæder.



Dannelsen af en peptidbinding sker ved fraspaltning af vand.

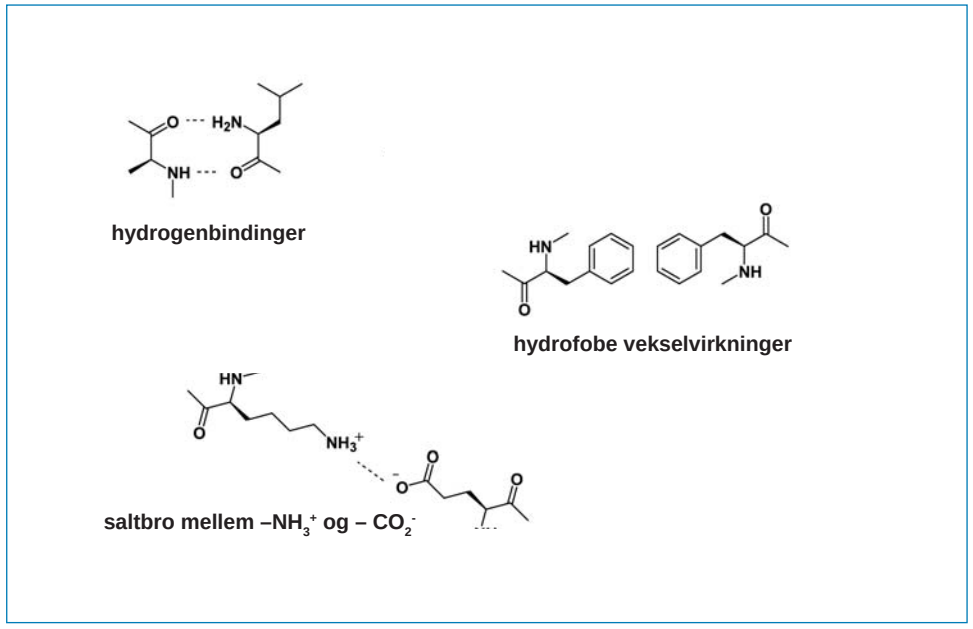
Lektor Pernille Harris undersøger de biologiske molekylers struktur.

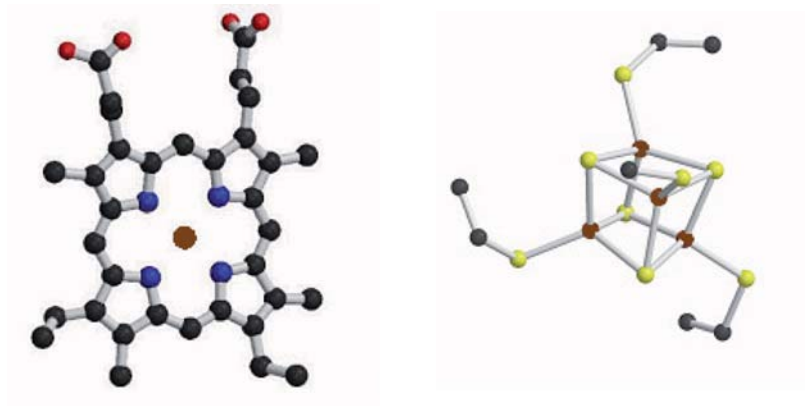


Proteiners strukturer kan ses på flere forskellige niveauer. De sekundære strukturer er illustreret i (a), med en α-helix og et β-foldeblad. Den tertiære struktur er den overordnede tredimensionelle foldning af proteinet, som ses i (b). Den kvaternære struktur for et protein, der består af to ens molekyler, er vist i (c).

Et aktivt protein folder op i cellen og har en helt veldefineret tertiær struktur. Strukturen bestemmes af proteinets kemi. Det er holdt sammen af hydrogenbindinger, af hydrofobe vekselvirkninger, hvor kemisk upolære grupper tiltrækker hinanden, af saltbroer, hvor positivt og negativt ladede grupper tiltrækker hinanden og evt. af svovlbroer (-S-S- bindinger mellem to cysteinsidekæder).

Desuden kan proteinet indeholde uorganiske ioner, som kobber eller calcium eller f.eks. hæmgrupper eller jern-svovlklynger. Disse er med til at holde proteinet sammen og er ofte vigtige for proteinets funktion.





Forskellige kemiske grupper indgår ofte i proteiner. F.eks. jern-svovl klynger og hæmgrupper.
(a) hæmgruppe, hvor jernatomet er koordineret af 4 nitrogenatomer fra porphyrinringen. To ligander (over og under papirets plan) kommer fra proteinet eller fra et andet molekyle. I proteinet hæmoglobin, der transporterer ilt rundt i blodet, binder iltmolekylet til jernatomet i en hæmgruppe, der sidder i hæmoglobinet.
(b) (b) jern-svovlklynge, der er omgivet af sidekæderne fra 4 cysteiner.
• carbon, • oxygen, • nitrogen, • svovl, • jern

Proteinerne undersøges

Den første strukturbestemmelse af biologiske molekyler var bestemmelsen af DNA´s helix-struktur ved hjælp af pulverrøntgendiffraktion i 1953. Det første protein, hvis tredimensionelle struktur blev afklaret, var myoglobin. Opdagelsen blev publiceret i 1957 og forbedret i 1959. I 1959 blev strukturen af hæmoglobin fundet, men der gik yderligere 6 år, før den næste proteinstruktur – af enzymet lysozym – kom på plads. Computerteknologien og molekylærbiologisk teknik, der blev udviklet i 1980'erne, satte for alvor fart på udviklingen.

Databehandling blev håndteret stadigt hurtigere, og store mængder protein blev fremstillet ved gensplejsning. Desuden er røntgenkilderne gradvist blevet stærkere.

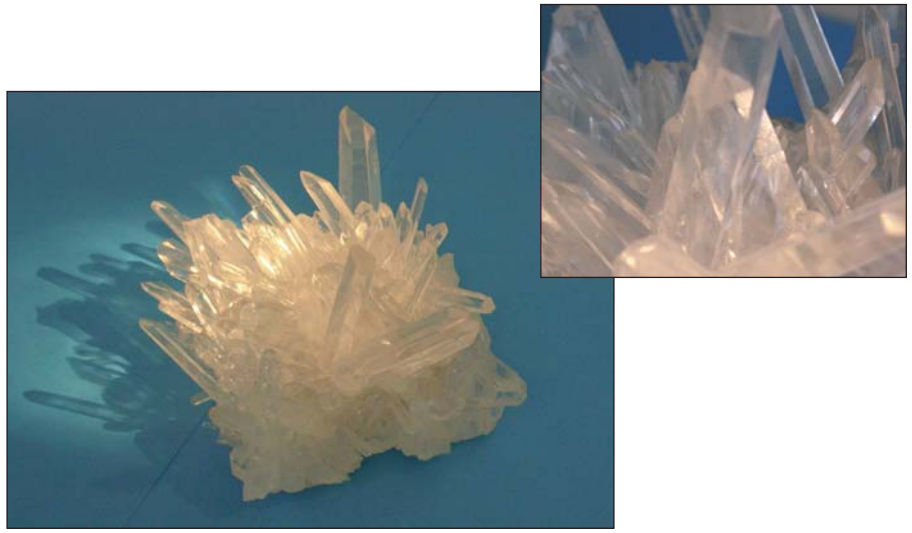
Det er ikke usædvanligt, at man i dag kan indsamle røntgendiffraktionsdata fra en proteinkrystal på nogle timer og databehandle og løse strukturen på yderligere nogle timer – en proces der tog årevis i 1960'erne. I dag bliver der publiceret flere strukturer om dagen. Disse kan findes i Protein Data Bank-databasen, PDB www.rcsb.org/pdb/, hvor langt de fleste proteinstrukturer bliver deponeret.

	1913	1928	1940	1957	2000
	NaCl	hexamethyl-benzen	penicillin	myoglobin	ribosom
Mw: (g/mol)	58,5	156	334	16700	946036

I løbet af det 20. århundrede er det blevet muligt at løse strukturen af større og mere komplekse systemer, fra NaCl i 1913 over myoblobin i 1957 til langt mere komplekse stoffer efter år 2000, som har molekylvægte på ca. 1.000.000 g/mol.

Strukturkemiens udvikling

Krystallers indre har altid haft interesse. Helt tilbage i 1669 observerede Niels Steensen (Niels Steno), at vinklen mellem fladerne i krystaller var bevaret for krystaller af samme materiale. Man formodede derfor, at krystaller bestod af éns repeterbare enheder, men man vidste ikke, hvad disse indre enheder bestod af.



Kvartskrystaller. Niels Steensen observerede, at vinklen mellem fladerne i kvartskrystaller altid var den samme ved samme temperatur, uafhængigt af krystallernes størrelse.

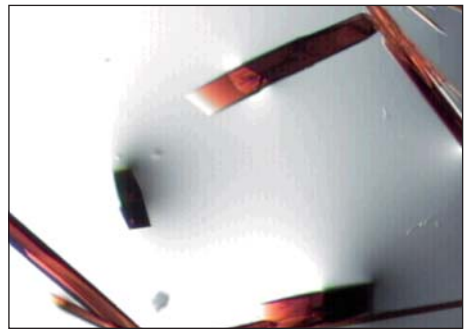
Den moderne strukturkemi startede populært sagt i 1912, hvor Laue udviklede en teori for diffraktion (spredning) af røntgenstråler fra en periodisk række af atomer, samtidig med at Friedrich og Knipping observerede, at krystaller kunne diffraktere (sprede) røntgenstråler. Man fik således både vist, at røntgenstråler var bølger, der kunne interferere (diffraktere), og at krystaller var opbygget af periodisk gentagne enheder. Året efter, i 1913, kom den første bestemmelse af en krystalstruktur fra røntgendiffraktion, hvor far og søn, W.L. og W.C. Bragg, bestemte strukturerne af KCl, NaCl, KBr og KI. Opdagelserne var betydningsfulde, og Laue fik da også nobelprisen i 1914, mens Bragg'erne fik nobelprisen i 1915.

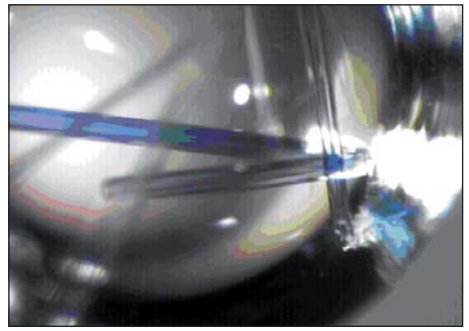
I starten var forskerne begrænsede til at holde sig til krystalstrukturer af små systemer, hvor man havde en formodning om resultatet. Man gættede en struktur og beregnede, hvordan den ville diffraktere og sammenlignede så med det eksperimentelle diffraktionsmønster. I løbet af 1920'erne blev det muligt at løse strukturen af små organiske molekyler som f.eks. hexamethylbenzen, og da man i løbet af det 20. århundrede udviklede matematisk værktøj og computere, kunne stadigt større systemer undersøges.

Krystaller

Krystaller er nødvendige, hvis man skal lave en strukturbestemmelse ved hjælp af røntgendiffraktion. Dette skyldes, at et enkelt molekyle spreder for lidt af strålingen til, at man kan opspore den spredte stråling. Man skal have mange molekyler for, at signalet fra den spredte stråle bliver stærkt nok til, at det kan bruges til noget. Krystallisering af proteiner kompliceres dog af, at det er store og komplekse molekyler, og at proteinopløsningen ikke nødvendigvis er helt ren eller homogen. Det er ofte krystalliseringen af proteinmolekylet, der er flaskehalsen i en røntgenstrukturbestemmelse.

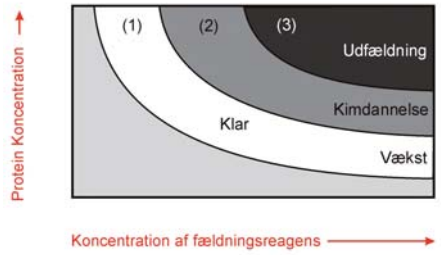
En krystal består af periodisk ordnede tredimensionelle rækker af atomer eller molekyler. De fleste kender til krystaller af bordsalt (NaCl) eller $CuSO_4$, der ofte laves i demonstrationsforsøg i skolen, fordi de gror let og bliver meget store. De er bundet sammen af Na^+- og Cl^--ioner (eller Cu^2+- og SO_4^{2+} -ioner) i et såkaldt iongitter. I proteinkrystaller er proteinmolekylerne holdt sammen af hydrogenbindinger, hydrofobe vekselvirkninger eller eventuelt saltbroer. Disse krystaller er skrøbelige og bliver sjældent særligt store. En proteinkrystal, der er ca. 0,1 mm i alle tre dimensioner, er således en forholdsvis stor krystal.





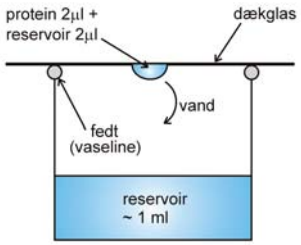
Krystaller af proteinet cytochrom c_4. De indeholder en hæmgruppe, og er derfor røde.
Krystaller af proteinet nitritreduktase er blåt, da det indeholder en Cu^{2+} ion. Krystallerne måler ca. 0,05 mm på den korte led, og 0,5 mm på den lange led. Til sammenligning er tykkelsen af et almindeligt A4 papir ca. 0,1 mm.

Krystaller dannes fra overmættede opløsninger, når opløseligheden for det molekyle, man vil krystallisere, er overskredet. Den overmættede opløsning er ikke i ligevægt, og systemet vil derfor forsøge at indstille sig til ligevægt ved at danne krystaller. Overmætning kan opnås på forskellige måder. Da opløseligheden ofte afhænger af temperaturen, kan temperaturændringer benyttes. Ligeledes kan fordampning af et fældningsreagens ved diffusion eller ændring af pH resultere i en overmættet opløsning.



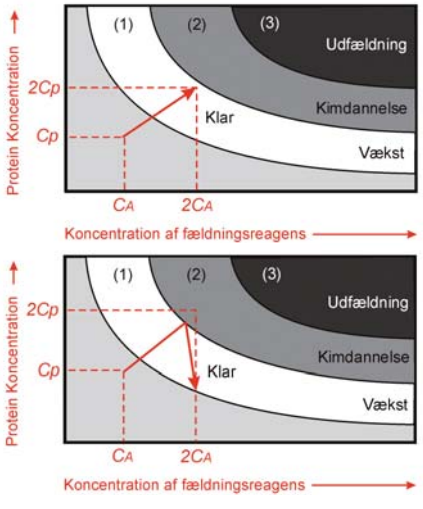
Fasediagram, hvor proteinkoncentrationen og koncentrationen af et fældningsreagens er vist. De undermættede og overmættede områder er adskilt af opløselighedskurven. I område (1) kan krystaller gro, men ikke dannes, i område (2) dannes der krystalkim, der så kan vokse til krystaller. I område (3) vil overmætningen være så stor, at proteinet udfældes uden dannelse af krystaller.

I praksis bruger man ofte dampdiffusion fra en hængende dråbe til at krystallisere proteiner. Man har et reservoir på 500-1000 µl og laver en dråbe på et dækglas, der består af 2 µl proteinopløsning og 2 µl fra opløsningen i reservoiret. Dækglasset lægges oven på reservoiret og tætnes med vaseline, så der dannes et lukket system. Der vil fordampe vand fra dråben over i reservoiret, indtil ligevægt har indstillet sig. Det vil sige, at proteinkoncentrationen langsomt stiger. Hvis de fysiske og kemiske betingelser er valgt rigtigt, vil der være overmætning i dråben, og der er mulighed for krystaldannelse. Krystallerne dannes bestemt ikke med sikkerhed, selvom man har en overmættet opløsning.

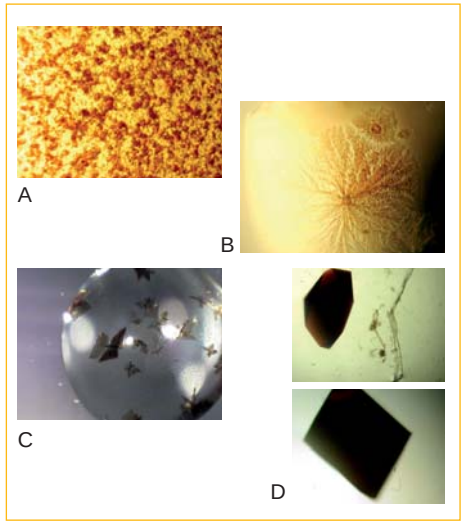


Hængende dråbe. Reservoiret rummer typisk 500-1000 µl og dråben 2-4 µl. For at få ligevægt mellem dråbe og reservoir (samme koncentration af fældningsreagenset), vil der fordampe vand fra dråben og over i reservoiret.

Hvis man følger proteinkoncentration og koncentration af fældningsreagenset i fasediagrammet, vil man starte med koncentrationerne C_p og C_A, når dråben er inddampet til ligevægt er koncentrationerne $2C_p$ og $2C_A$. Hvis startbetingelserne har været heldige, vil der kunne dannes krystaller undervejs. I så fald vil proteinkoncentrationen aldrig nå op på $2C_p$.



Øverst ses eksperimentelle startbetingelser, hvor der ikke dannes krystaller til sidst, idet man ikke når ind i kimdannelseszonen. Nederst ses et eksperiment, hvor der kan dannes krystaller. I det der bliver dannet kim, og krystaller begynder at gro, vil proteinkoncentrationen ikke stige ved yderligere inddampning af dråben. Krystallerne vil blot vokse, indtil man rammer opløselighedskurven.

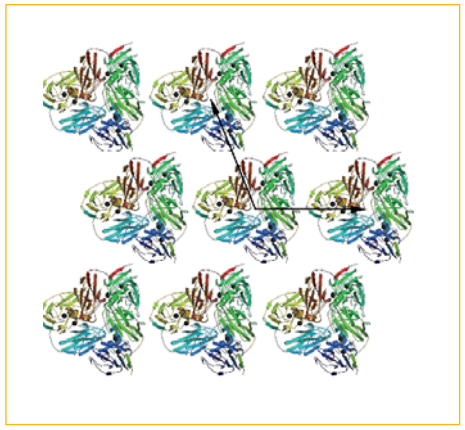


Krystaller, der skal bruges til bestemmelse af proteinstrukturer, skal være regulære krystaller, der vokser uden fejl. Disse kaldes for énkrystaller. Forskellige stadier ved optimering af brugbare krystaller. (a) bundfald, (b) krystaller, der ikke vokser som énkrystaller, (c) sammenvoksede krystaller, hvor énkrystallerne kan skæres fri, (d) énkrystaller, der er klar til at måle på.

Diffraktion

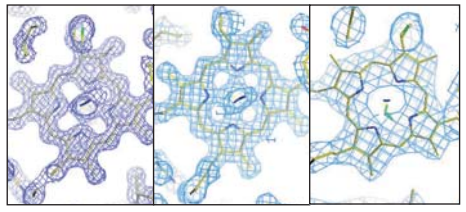
I et røntgendiffraktionseksperiment udnyttes, at elektroner spreder røntgenstråling.
Alle molekyler består af kerner og elektroner, dvs. af ladede partikler. Røntgenstrålen, der rammer en ladet partikel, vil få den til at svinge, og den vil så udsende stråling med samme bølgelængde. Dette fænomen kaldes spredning.

Da en atomkerne vejer mindst 2.000 gange så meget som en elektron, vil atomkernerne svinge langt mindre end elektronerne og dermed også sprede røntgenstrålen mindre. I praksis kan man derfor se bort fra bidraget fra atomkernerne. Det er således elektrontætheden, altså elektronernes fordeling i molekylet, man måler på. Eksperimentet kan lykkes, fordi røntgenstrålingens bølgelængde er sammenlignelig med de detaljer, man forsøger at se. Bølgelængden er typisk mellem 0,07 og 0,16 nm, og en C-C bindingslængde i et almindeligt organisk molekyle er 0,15 nm. Et enkelt isoleret molekyle vil ikke sprede røntgenstrålingen kraftigt nok til, at vi vil kunne se det på en detektor. Derfor er det vigtigt, at vi får molekylerne periodisk ordnet i en krystal.

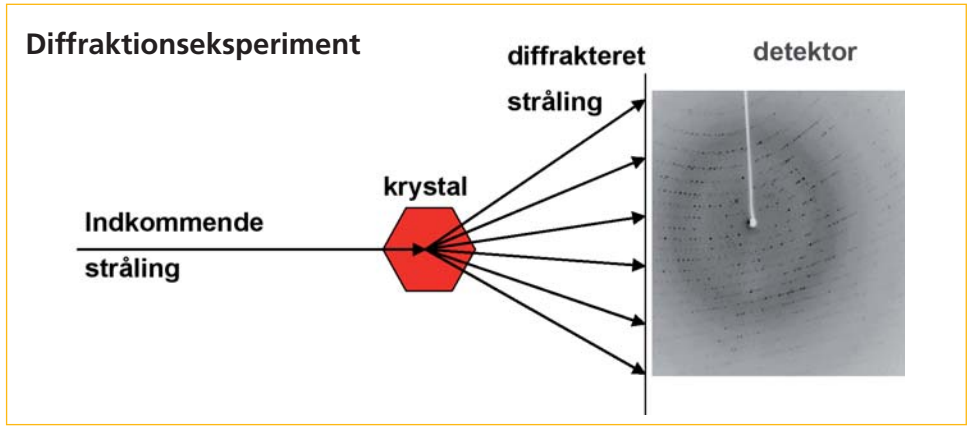


Skematisk tegning af todimensionel proteinkrystal. Her kan man se hvorledes molekylerne er ordnet i krystallen. Denne ordning af molekylerne gør, at man vil kunne mangedoble sin spredning af røntgenstrålingen i forhold til spredningen fra kun et molekyle. Derved vil man få et langt kraftigere signal og få mere information ud af molekylerne.

Et diffraktionseksperiment er skitseret på figuren nedenfor. Man skyder røntgenstråling ind mod sin krystal, og den diffrakterede stråling opsamles på en detektor. Ud fra oplysningerne på detektoren kan man få information om elektrontætheden i krystallen. Ved hjælp af denne information kan man bygge en model af proteinet ved brug af avancerede regne- og grafikprogrammer.
Kvaliteten af modellen afhænger af det elektrontæthedskort, man beregner. Dette er afhængigt af krystallens og målingernes kvalitet. Bedre krystaller og målinger giver et bedre elektrontæthedskort og dermed en bedre model. Herunder er vist tre forskellige elektrontæthedskort, hvor en hæmgruppe er indsat. Kvaliteten af elektrontæthedskortet til venstre er bedst – det vil sige, at man kan se flere detaljer og kan bygge en mere nøjagtig model.



Udsnit af elektrontæthedskort omkring en hæmgruppe. Kvaliteten er bedst for kortet til venstre og dårligst for kortet til højre.



Aids er en af de helt store problemer i mange udviklingslande, ikke mindst i det sydlige Afrika, hvor millioner af mennesker er smittet med hiv-virus. Kemisk forskning har ført til udvikling af medicin, der radikalt kan forbedre hiv-patienters tilværelse.

Perspektiver og fremtid

Selvom den atomare struktur af proteinet kan bestemmes før eller efter den kemiske reaktion, er man alligevel ofte uvidende om proteinets præcise virkemåde. Hvilke bindinger brydes først, og hvordan forlader produktet enzymet, er eksempler på spørgsmål, der ikke umiddelbart kan besvares. Dette skyldes, at et røntgendiffraktionseksperiment tager meget længere tid (typisk omkring en time) end den normale reaktionstid for et enzym (typisk få mikrosekunder).

Tidsopløste studier – filmoptagelse af en kemisk proces

Med tidsopløste strukturelle studier søger man at løse dette problem. Det handler om at lave strukturbestemmelser, der er foretaget så hurtigt, at man kan nå at se processen foregå. Man kan med andre ord få en slags film af den kemiske reaktion. Tidsopløste strukturstudier kan realiseres på flere måder. Enten kan man modificere sin kemi, så den kommer til at gå så langsomt, at man kan nå at se reaktionen. Dette sker eksempelvis, hvis man får fastfrosset en intermediær forbindelse. Eller man kan anvende noget apparatur, der er beregnet til at måle et helt datasæt på nogle få mikrosekunder.

Det er en stor udfordring at gennemføre vellykkede tidsopløste målinger, da de både er teknisk krævende og kræver stor indsigt i proteinsystemets fysik og kemi. Hvert eksperiment skal designes specifikt til det system, man vil undersøge. På internationalt plan begrænser studierne sig i dag til nogle få systemer, som myoglobin, photoaktive yellow protein og peroxidase. Imidlertid vil den viden, der allerede er samlet, kombineret med den langt større tilgængelighed af faciliteter, der er designet til tidsopløste studier, gøre det muligt for mange flere forskere at bidrage til dette felt.

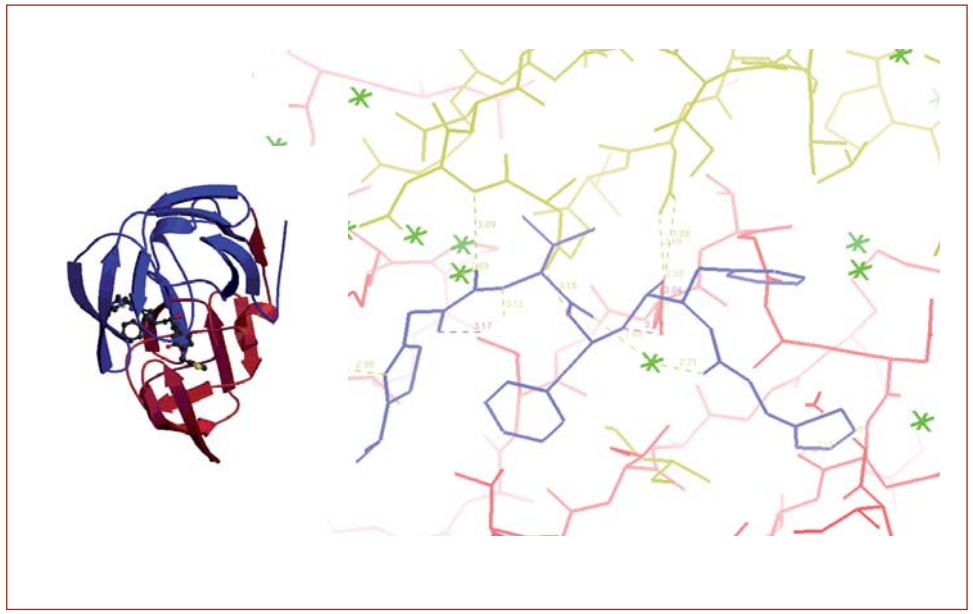
Medicinudvikling på basis af struktur

Mange lægemidler virker ved at påvirke funktionen af et helt bestemt protein, der har indflydelse på en bestemt kemisk proces i kroppen. Bivirkninger skyldes som regel, at lægemidlerne også har en effekt på andre proteiner. Med andre ord påvirkes andre processer end den, der er årsag til sygdommen, uhensigtsmæssigt.

I arbejdet mod et nyt lægemiddel fremstilles mange forskellige forbindelser, som er mulige lægemiddelkandidater. Forbindelser, med den ønskede effekt krystalliseres med det protein, der skal påvirkes, og ud fra røntgenstrukturen kan man se, hvordan forbindelsen binder til proteinet. Hermed kan man søge at optimere lægemidlet, så det strukturelt passer bedre til proteinet. Lykkes det, kan doseringen normalt reduceres kraftigt, og bivirkningerne vil normalt reduceres tilsvarende (læs mere i kapitlet: ”Kemisk design af lægemidler”).

Medicin kan stoppe hiv-1-virus

Et af de mere kendte eksempler på medicinudvikling på basis af struktur er udviklingen af medicin mod hiv-virus. Medicinen man køber, kan ikke helbrede hiv, men den kan stoppe vi-



Figuren viser hiv-protease, hvori der er bundet medikamentet ritonavir, der stopper proteasens funktion i virus. Til venstre ses hele hiv-proteasen, bestående af 2 peptidkæder i henholdsvis blå og rød, samt ritonavir, hvor atomerne er vist. Til højre ses et nærbillede af ritonavir i blå samt de to peptidkæder i rød og gul. De grønne kryds illustrerer vandmolekyler.

rus, så man kan leve med hiv i kroppen. Der findes forskellige typer medicin mod hiv, og en af typerne virker mod hiv-1-virus ved at stoppe enzymet hiv-1-protease. Hiv-1-protease er et meget vigtigt enzym for hiv-virus. Hiv danner alle sine proteiner i en lang kæde, så disse er bundet sammen. Hiv-1-proteasen klipper kæden op, hvorved alle de individuelle proteiner, der er nødvendige for hiv-virus, kan dannes. Hvis den lange polypeptidkæde ikke bliver skåret i stykker, kan virus ikke modne og inficere en ny celle.

Den første røntgenstruktur af hiv-1-protease blev publiceret i 1989. Hiv-1-protease er et lille enzym, der består af to identiske proteinkæder. Hver kæde består af 99 aminosyrerester. De danner sammen en lang tunnel, hvor det område, der skal binde polypeptidkæden, er dækket af et fleksibelt låg. Medicin som f.eks. ritonavir, der er vist på figuren, virker ved at binde til hiv-1-protease det sted, hvor peptidkæden skulle have bundet. Ved at studere hiv-1-proteases atomare struktur, og vekselvirkningen med forskellige forbindelser, har man fundet frem til stabile forbindelser, der binder kraftigere til proteasen, end peptidkæden gør. Disse forbindelser er så stabile, at de ikke kan kløves af proteasen og bliver derfor siddende. Strukturelt ligner de en polypeptidkæde, og de binder til proteasen som sådan, men de er for stabile til at blive kløvet. Resultatet er medicin, der radikalt har ændret hiv-patienters tilværelse.

Livets udvikling – fra simple organismer til mennesket

Store genomsekventeringsprogrammer i først og fremmest USA har i de sidste 10 år opnået at kortlægge flere genomer fuldstændigt. Det humane genom har således været kendt i årevis (det humane genom blev kortlagt i 2001), og da generne koder for proteinerne, kender man nu sammensætningen af alle proteiner, som en bestemt celle producerer. Dette har ført videre til mange strukturgenom-programmer, hvor formålet er at løse så mange strukturer så hurtigt som muligt. Strukturstudier af biologiske molekyler er i hastig vækst. I dag er over 30.000 proteinstrukturer løst og deponeret i PDB-databasen, men mange er stadig ukendte. Efterhånden som databaserne fyldes med information, bliver det muligt at grave længere ned i livets gåde. Når man kender talrige proteiner fra forskellige organismer i detaljer og samtidig ved, hvilke organismer der har været længst på jorden, bliver det muligt at få indsigt i kemien i de ældste biologiske systemer på kloden.

Forfatter

Lektor Pernille Haris