



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Electron crystallography of three dimensional protein crystals

Georgieva, D.

Citation

Georgieva, D. (2008, December 11). *Electron crystallography of three dimensional protein crystals*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13354>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/13354>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse samenvatting

Zonder begrip van het mesoscopische gedrag van eiwitten is de ontwikkeling van nieuwe producten in de biotechnologie grotendeels een kwestie van trial en error. Het afwijkende aggregatiegedrag van eiwitten stelt niet alleen een limiet aan de productie van commercieel belangrijke eiwitten, maar heeft grote gevolgen in totaal verschillende velden, van menselijke pathologie tot biochemisch onderzoek. De bestaande methoden om natieve eiwitten terug te winnen uit aggregaten zijn vaak inefficiënt en tijdrovend. Aggregatie is bekend als de oorzaak van talrijke menselijke ziektes zoals cystic fibrosis, ziekte van Alzheimer en prion spongiform encephalopathie zoals de ziekte van Creutzfeldt-Jacob.

De visualisatie van biomoleculen om hun 3-D structuur en hun atomaire samenstelling te bepalen is onontbeerlijk in onderzoek dat tot doel heeft het gedrag van dergelijke moleculen tevoorspellen. In gevallen waarin macrokristallen verkregen kunnen worden is Röntgen kristallografie zonder twijfel de eerste keuze. De meeste eiwitten zijn echter moeilijk te kristalliseren en er zijn geen vastomlijnde regels om de juiste voorwaarden voor kristallisatie te bepalen.

Dit proefschrift behandelt het ontwikkelen van de techniek van elektronen diffractie voor structurele studies van eiwitten en andere stralingsgevoelige moleculen waarvan slechts kleine 3D kristallen verkregen kunnen worden.

Het eerste deel van het onderzoek betreft de proteïne nanokristallen van algemeen bekende eiwitten (lysozyme en glucose isomerase), alsmede van minder bestudeerde eiwitten als aardappel protease inhibitor verkregen met behulp van heterogene kristallisatie. Er zijn verscheidene praktische en theoretische afwegingen om de heterogene aanpak boven de homogene benadering te verkiezen voor het kristalliseren. Heterogene kristallisatie, bijvoorbeeld kristallisatie van eiwitten op een ingebracht heterogeen substraat, is per definitie een proces van voorkeurs nucleatie. Dit geeft de mogelijkheid om niet alleen eiwitkristallen bij een lagere concentratie van eiwitten te verkrijgen, maar ook om het kristallisatieproces beter dan in een bulk kristallisatieoplossing te kunnen regelen en bestuderen. Bovendien geeft het aangroeien van eiwit nanokristallen op een oppervlak zekere praktische voordelen ten aanzien van visualisatie, herkenning en behandeling van de kristallen.

De verzameling van elektronendiffractie is uitgevoerd onder cryo-condities. Image plates werden gebruikt om de patronen te registreren (vanwege het hoge dynamische bereik van image plates in vergelijking met een CCD camera). Daardoor was het mogelijk zowel sterke, lage resolutie reflecties als zwakke, hoge resolutie reflecties te registreren. Eerder is experimenteel vastgesteld dat door middel van microdiffractie, maar dan met een gedefocuseerde elektronen bundel in "image mode", hoge diffractie resolutie verkrijgbaar is. Als de elektronen bundel is gedefocuseerd op het preparaat in "image mode", wordt het diffractie patroon niet exact geproduceerd in het zogenaamde "back focal plane" maar enigszins er boven of beneden. In dit geval is de bundel ook weinig divergent en als resultaat worden diffractie punten verkregen in plaats van schijfvormige reflecties. Diffractie punten zijn, in het algemeen, makkelijker te registreren en analyseren, vooral als het diffractie signaal zwak is (zoals bij de bestudering van eiwit kristallen). Bovendien, als de bundel gedefocuseerd is op het preparaat, nemen meer kristal lagen deel aan het ontstaan van een diffractie patroon. Dit feit kan ook verklaren waarom nu het diffractie signaal sterker is en hoge resolutie reflecties gemeten kunnen worden. De besproken manier van data collectie is geen routine en zij moet nog nader worden onderzocht. Echter, de eerste resultaten zijn veelbelovend, gezien de mogelijkheid om hoge resolutie informatie te verkrijgen van stralingsgevoelige nanokristallen. De besproken manier van data collectie kan ook gebruikt worden in combinatie met precessie diffractie technieken waarbij de bundel op het kristal precedeert tijdens de data collectie. Daardoor worden geïntegreerde intensiteiten geregistreerd.

Aangezien het met de huidige instrumentatie niet mogelijk is om een 3D dataset van één enkel eiwit kristal te registreren, werden diffractie patronen afkomstig van verschillende kristallen geregistreerd. Een algoritme om *ab initio* de cel dimensies te bepalen uit diffractie patronen afkomstig van willekeurige georiënteerde kristallen is voorgesteld en besproken.

Het algoritme is getest met elektronen diffractie data van twee verschillende types penicilline. De cel dimensies verkregen uit the elektronendiffractie data en geanalyseerd met het besproken algoritme in zijn beide gevallen overeenkomstig met de cel dimensies verkregen uit Röntgen kristalgrafisch onderzoek.