

Физика и структурная биология в начале XXI века

И. Н. Сердюк

Лаборатория физики нуклеопротеидов,

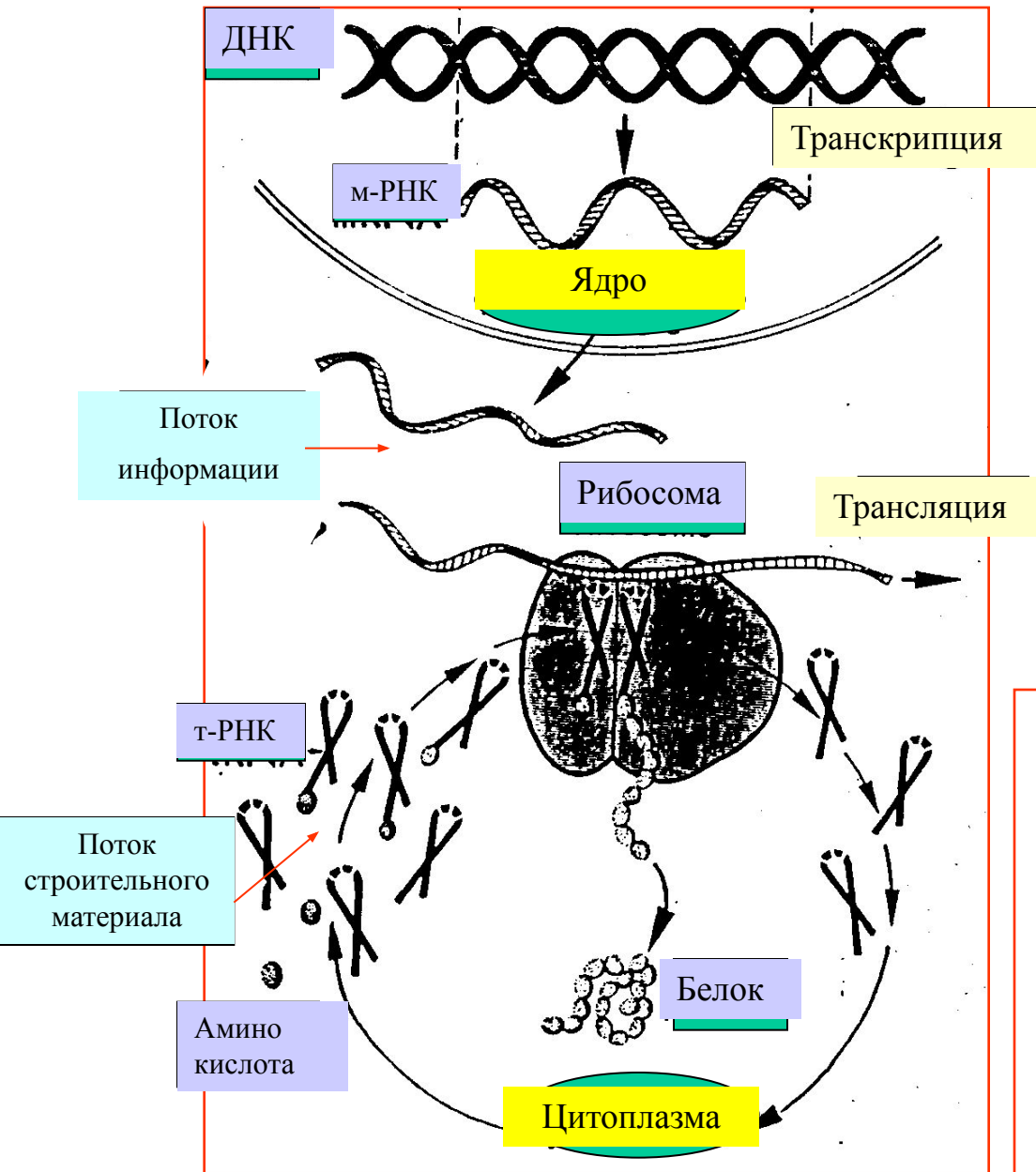
Институт Белка РАН, г. Пущино.

и

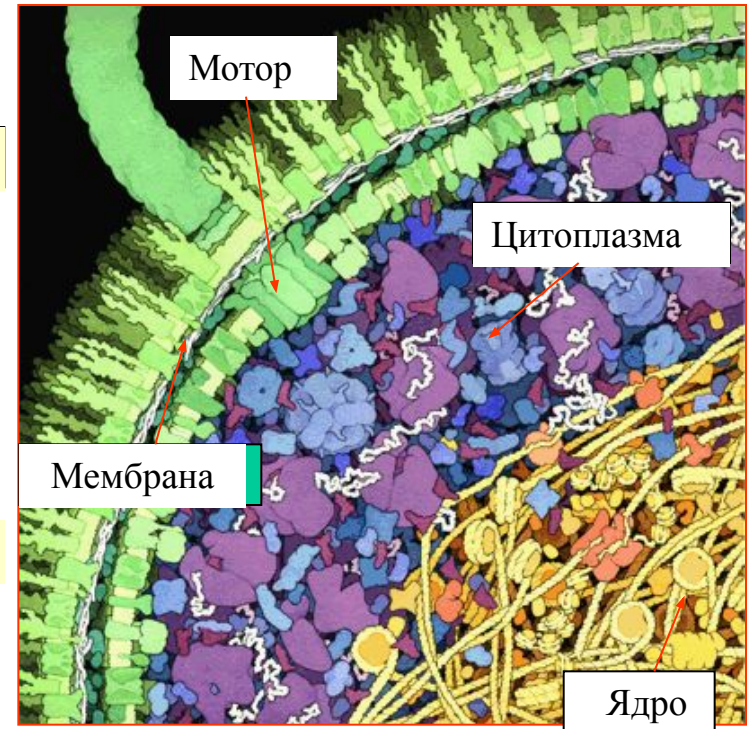
Лаборатория нейтронной физики,

Объединенный Институт Ядерных Исследований, г. Дубна

22 Февраля, 2005

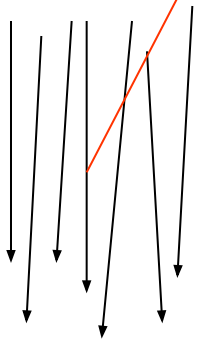
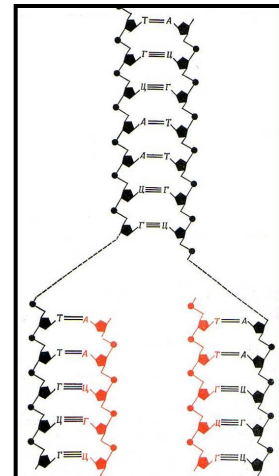
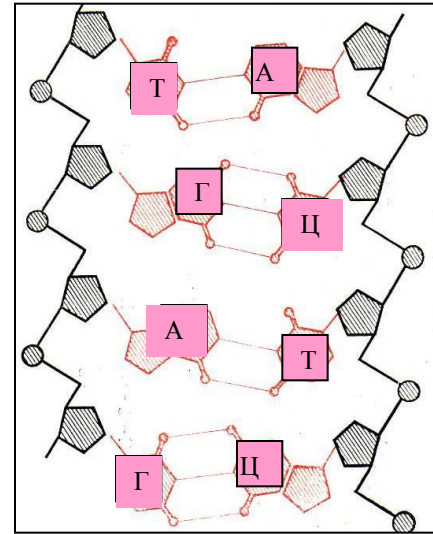
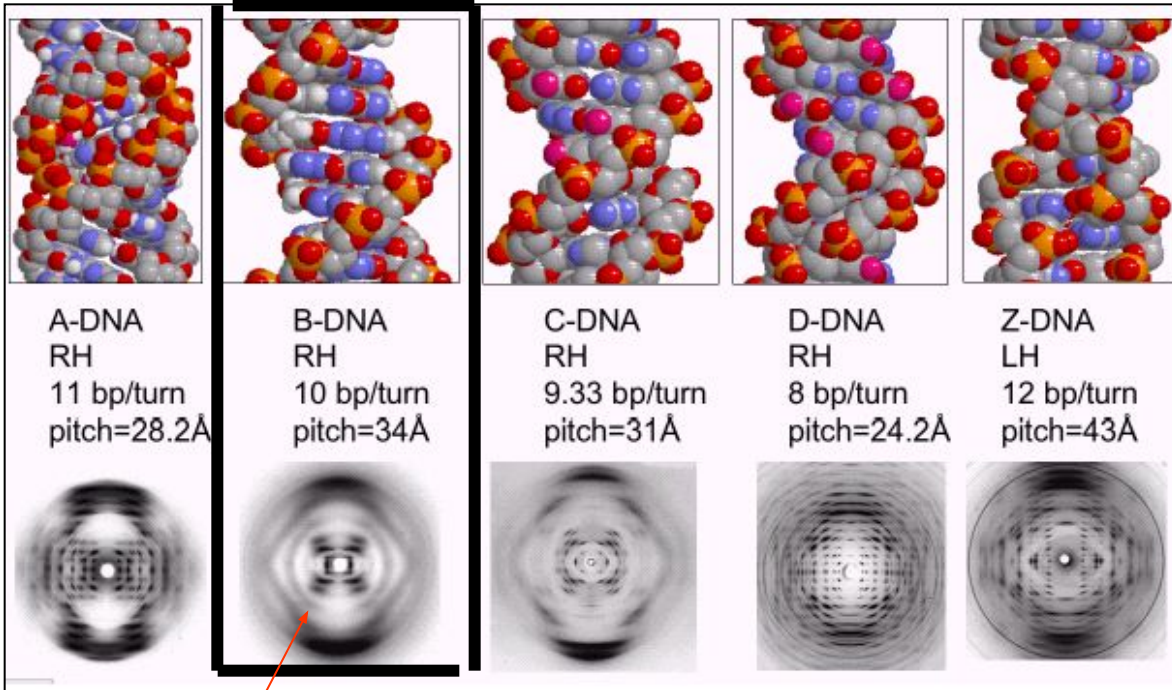


Общая схема биосинтеза белка

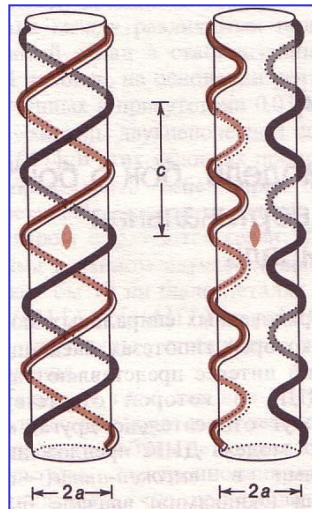


- Хромосома, нуклеосома, ДНК
- Факторы транскрипции
- Матричная РНК
- Рибосома, т-РНК, аминокислоты
- Факторы трансляции
- Разнообразные белки
- Линейные и вращательные молекулярные моторы

Двойная спираль ДНК (Дж. Уотсон и Ф. Крик, 1953)



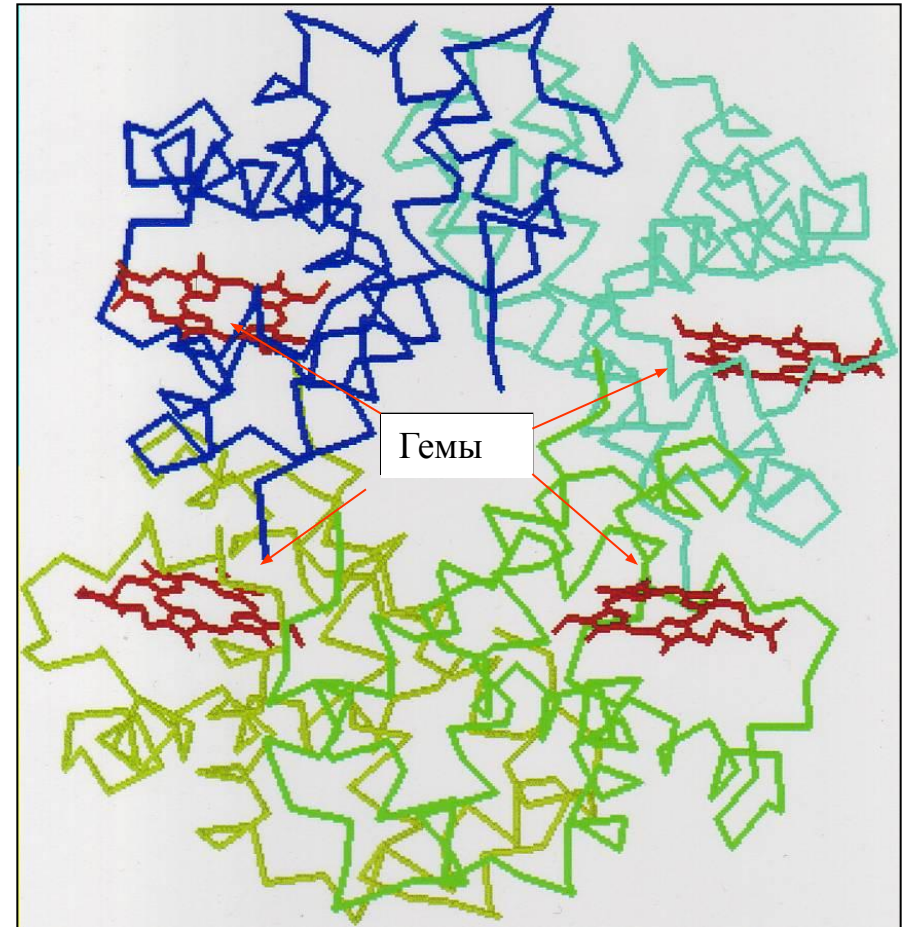
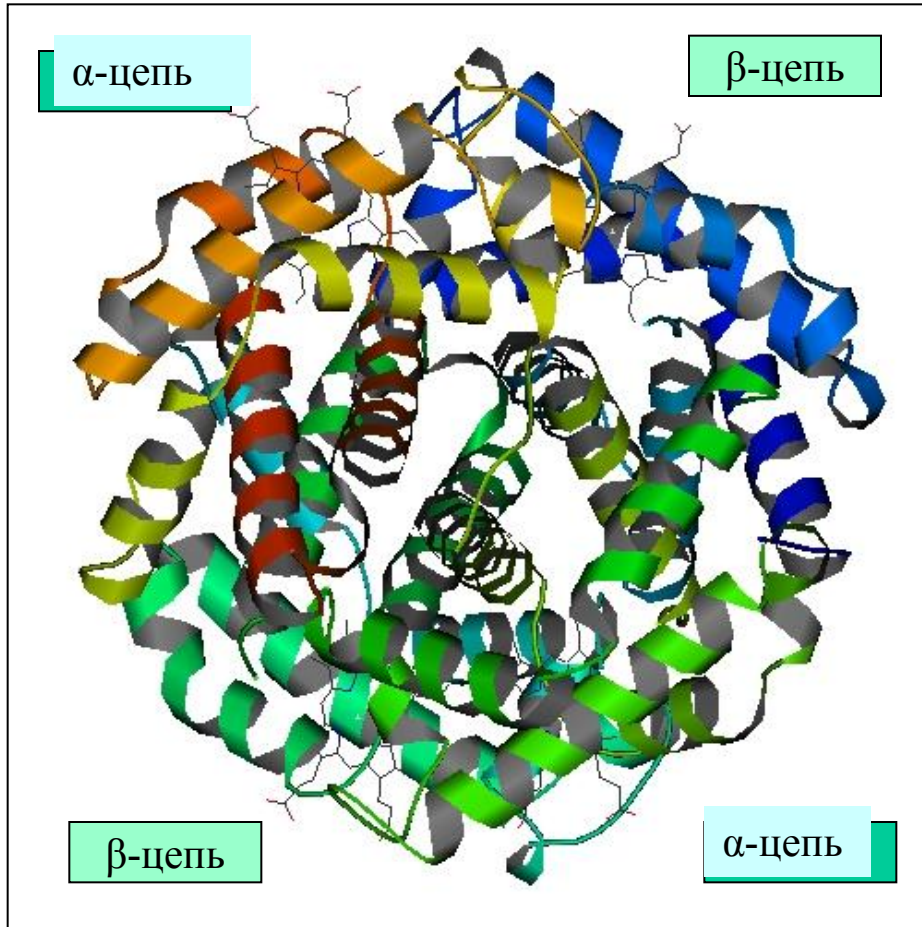
Упорядоченные
волокна ДНК



Схематическое изображение двойной спирали (слева) и структуры «бок о бок» (справа). Обратите внимание, что общие размеры (c - шаг спирали и $2a$ - диаметр спирали) в обоих случаях одинаковы.

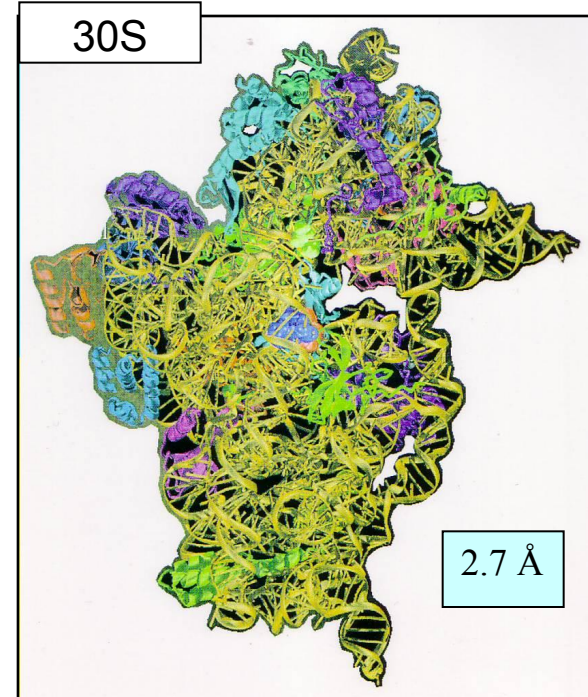
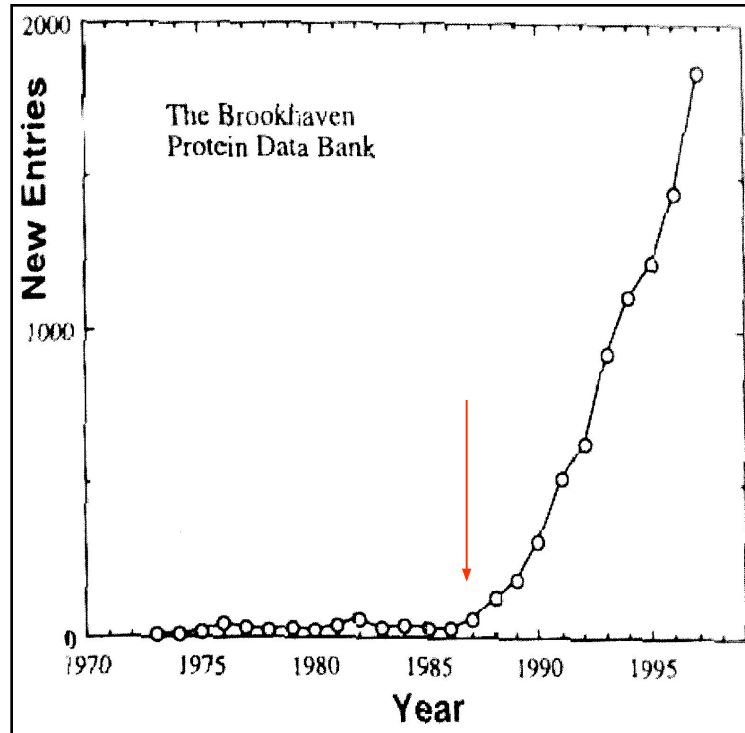
Репликация двойной спирали ДНК приводит к образованию двух гибридных молекул, состоящих из родительской и дочерней цепи. Обе гибридные молекулы идентичны друг другу и полностью повторяют исходную цепь.

Рентгеновская структура гемоглобина (М. Перутц и Дж. Кендрю, 1957)



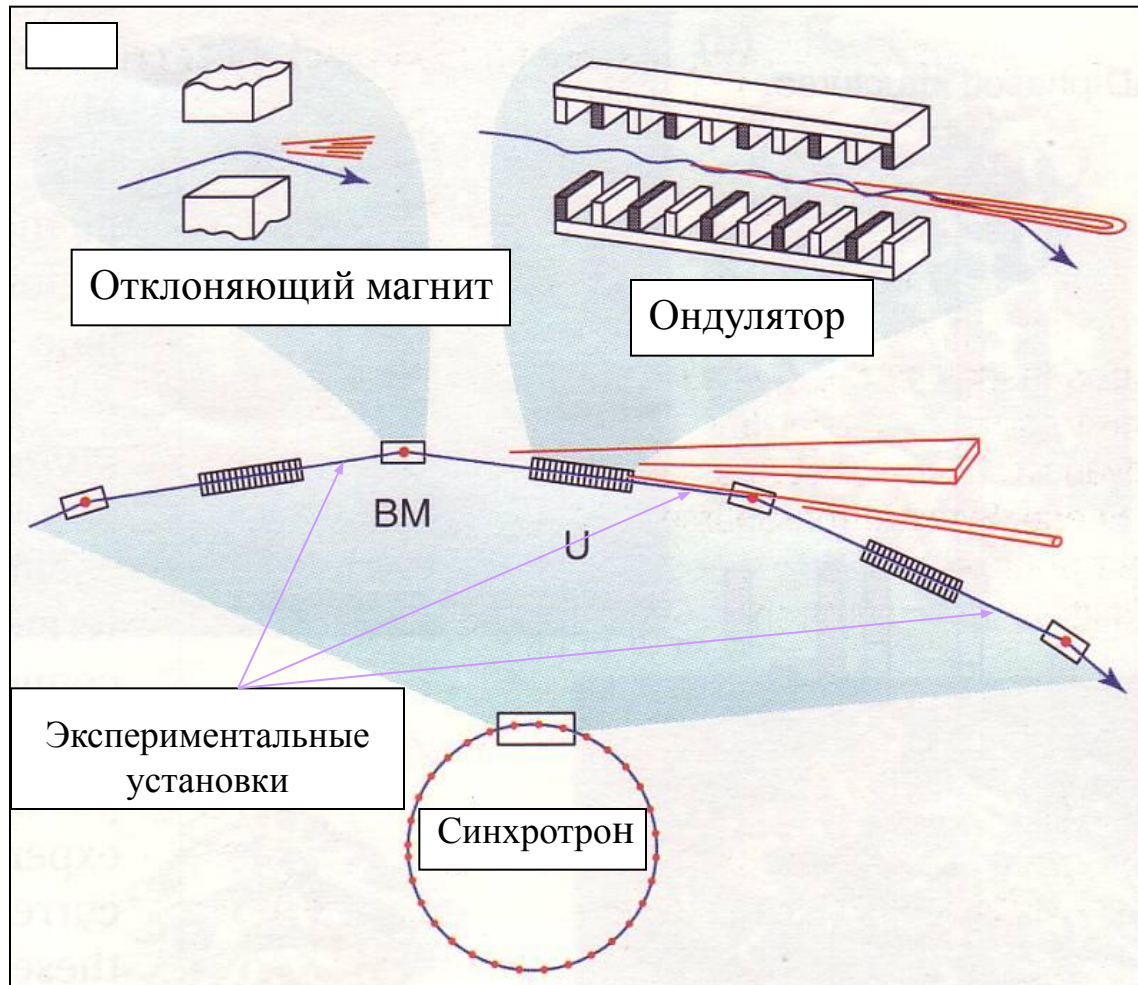
Молекула гемоглобина состоит из двух α -цепей и двух β -цепей. Каждая глобиновая цепь состоит из 8 спиралей, связанных короткими перемычками и образующих карман, в котором помещается группа гема.

Первое революционное событие в структурной молекулярной биологии



1. Появление синхротронных источников
2. Появление быстродействующих рентгеновских детекторов
3. Девиз: «NCNG»

Синхротронные источники третьего поколения



Большое число отклоняющих магнитов располагаются по окружности синхротронного кольца. Они удерживают пучок электронов на круговой орбите.

Ондуляторы располагаются между магнитами. Они содержат большое число магнитных полюсов, позволяющих сформировать хорошо сфокусированный узкий пучок (расходимость около 0.001 градуса). Кроме того они позволяют существенно увеличить яркость пучка и его когерентность.

ESRF в Гренобле (Франция)- самый мощный синхротронный источник в мире (Ø кольца ~300 м).

Нейтронные источники

Стационарные (с тратой энергии)

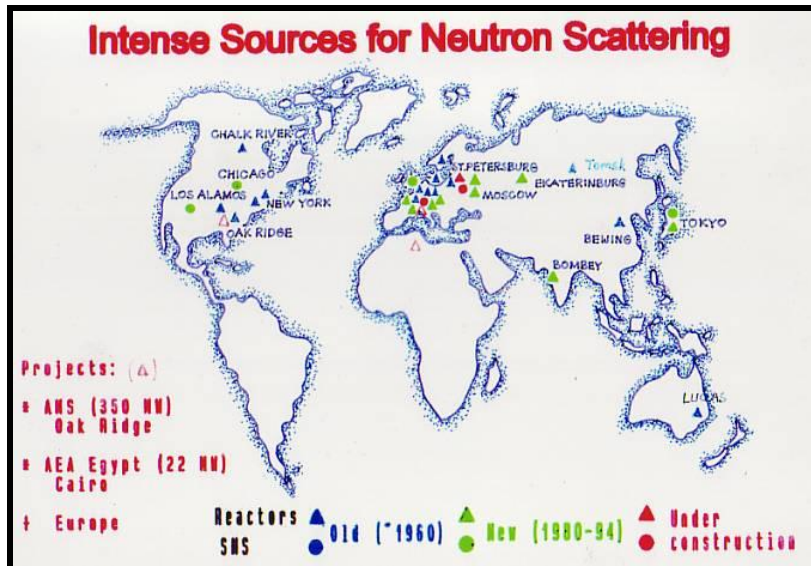
Обогащенный уран
U-235
HFR (60 MW)
Гренобль, Франция
 2×10^{15} н/см²сек

Обогащенный уран
U-235
PIK (100 MW)
Гатчина, Россия
 5×10^{15} н/см²сек

Импульсные (с накачкой энергии)

Ускоритель
электронов + мишень
из тяжелого металла
Orela
Окридж, США
(1.3×10^{14} н/см²сек)

Ускоритель протонов
+ мишень из тяжелого
металла
ISIS, Англия
(1.3×10^{15} н/см²сек)
SINQ, Швейцария
(2×10^{14} н/см²сек)

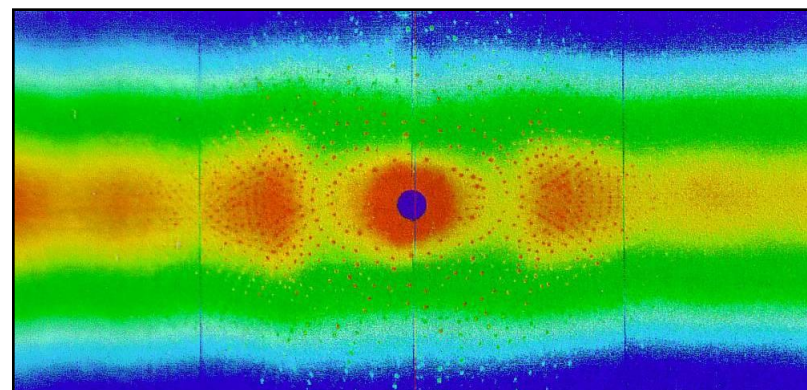
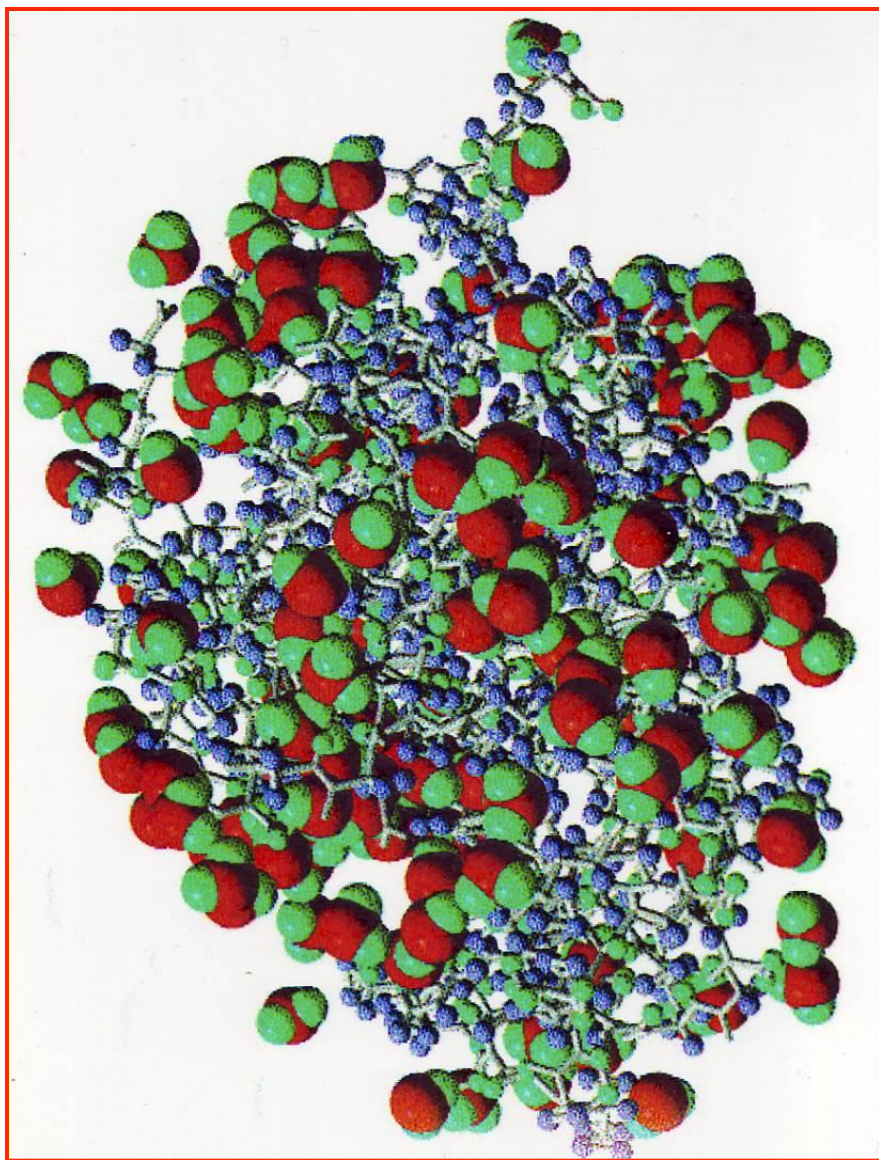


Мигающие (с тратой энергии)



Активная зона с
подвижным
отражателем
ИБР-2, Россия
 2×10^{16} н/см²сек

Нейтронная белковая кристаллография: лизоцим

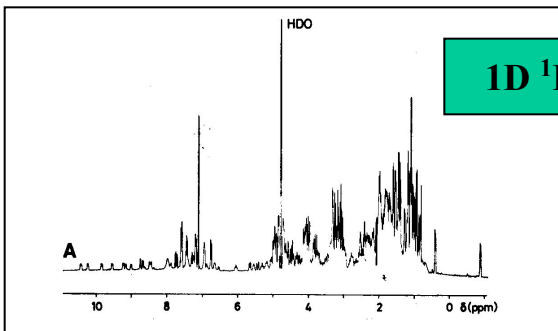


Трехмерная структура молекулы лизоцима и 157 молекул связанной с ним воды с разрешением 2 Å. Такое разрешение эквивалентно 0.9 Å рентгеновскому.

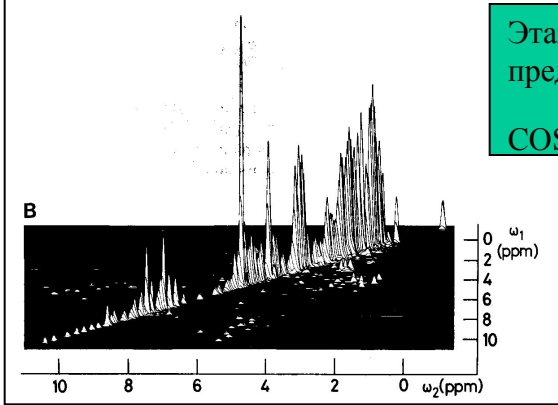
696 атомов водорода и 264 атома дейтерия показаны небольшими сиреневыми и зелеными сферами, соответственно.

Атомы кислорода и углерода показаны большими красными и зелеными сферами, соответственно.

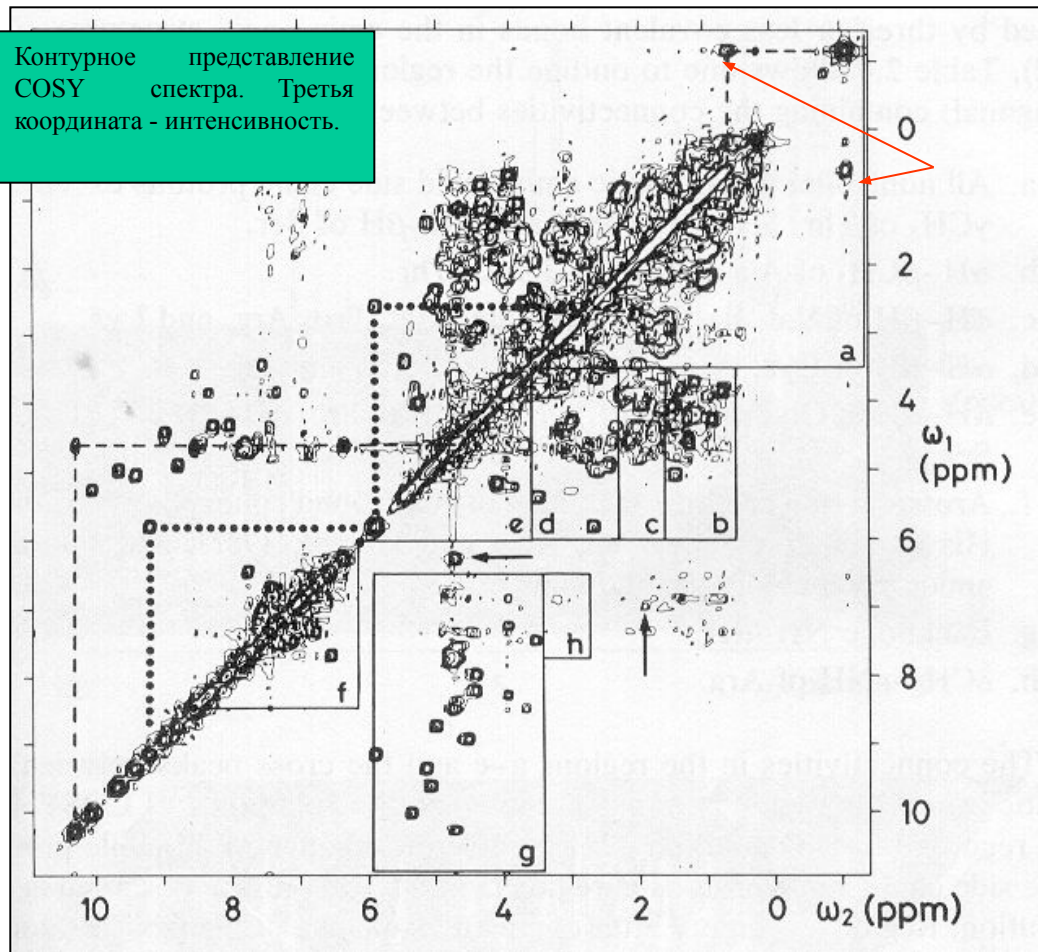
1D и 2D ЯМР спектры небольшого белка, протеазного ингибитора *K* (57 аминокислот) в 0.01 M, pH 3.4, 25°C, 360 MHz.



1D ¹H спектр



Этажерочное представление COSY спектра



Контурное представление COSY спектра. Третья координата - интенсивность.

Импульсная Фурье-ЯМР спектроскопия, многомерный и гетероядерный ЯМР, изоэтранные схемы селективного мечения белков и нуклеиновых кислот ²H, ¹³C, ¹⁵N, расширение рабочей частоты ЯМР до 1 ГГц - все эти инновации привели к тому, что сегодня 1/4 всех биологических структур с высоким пространственным разрешением получается методом ЯМР.

Методы рентгеновской кристаллографии и ЯМР обладают двумя принципиальными недостатками:

- 1) работают при очень высоких концентрациях вещества (число молекул в образце составляет 10^{15})
- 2) не позволяют видеть, как функционируют биологические молекулы в реальном режиме времени
- 3) не позволяют видеть, как функционирует одна биологическая молекула.

Новые физические подходы,

Принципиальный переход от исследования макромолекул в больших объемах (доли миллилитра) к исследованию макромолекул в предельно малых объемах (доли аттолитра).

Уникальная возможность перейти от описания свойств макромолекул в ансамбле к описанию их свойств на одиночном уровне.

«Мы никогда не сможем работать с одиночными электронами, атомами и молекулами» (Эрвин Шредингер, 1952)

Исследование структуры и функционирования одиночных биологических макромолекул

Детектирование одиночных флюоресцентно меченых молекул с помощью лазерной флюоресценции в предельно малых объемах (аттолитры)

Конфокальная микроскопия

Микроскопия ближнего поля

Визуализация одиночных макромолекул

Микроскопия силового поля

Манипулирование одиночными биологическими макромолекулами (растягивание модулярных белков и РНК, скручивание, растягивание, расстегивание, разгрызание одиночных двойных спиралей ДНК, сборка и разборка нуклеосом

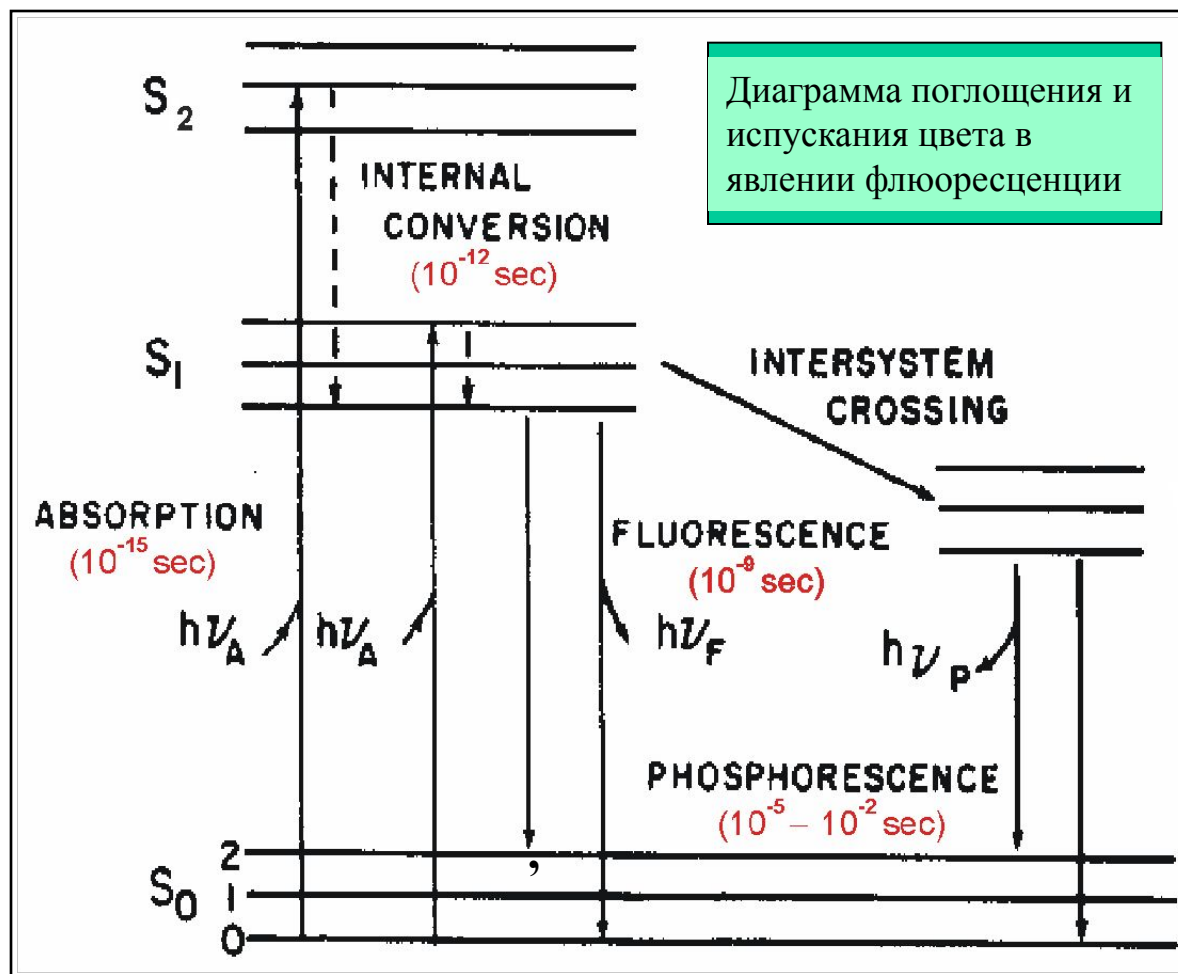
Микроскопия силового поля

Оптические и магнитные ловушки

Визуализация и описание работы линейных и роторных биологических моторов в терминах сил (пиконьютоны) и расстояний (нанометры), сопровождающих каждую фазу их рабочего цикла

1 attoliter = 10^{-18} L, 1 piconewton = 10^{-12} N, 1 nanometer = 10^{-9} m

Лазерная наведенная флюоресценция



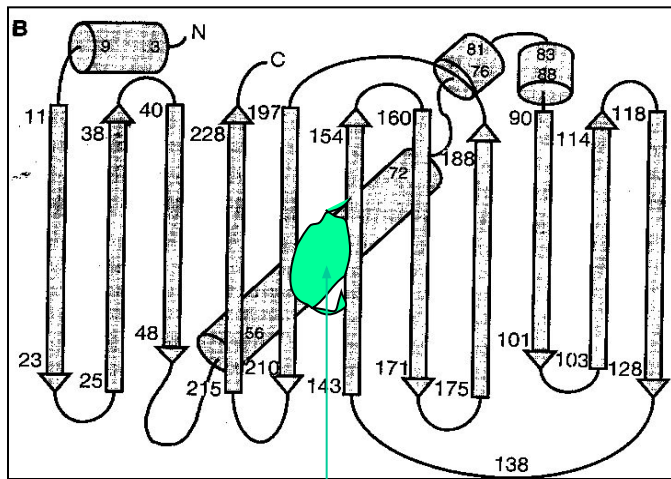
В лазерной наведенной флюоресценции одиночная молекула периодически возбуждается с тем чтобы дать максимальное число фотонов за время эксперимента.

Флюоресцентные метки, используемые в структурной биологии

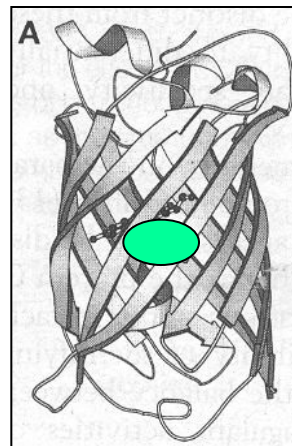
Внутренние метки: триптофан и тирозин в белках, а также минорные основания в т-РНК

Внешние метки: dansyl chloride, 8-anilino-1-naphthalen sulfonat, 1, etidium bromide, iodacetamide, maleimide, and много других

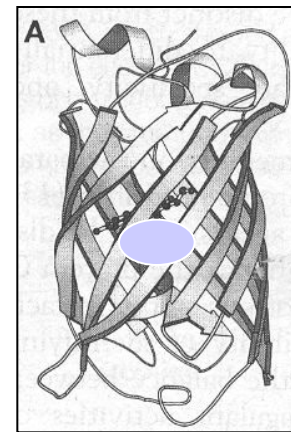
Зеленый флюоресцентный белок из медузы *Aequorea victoria*



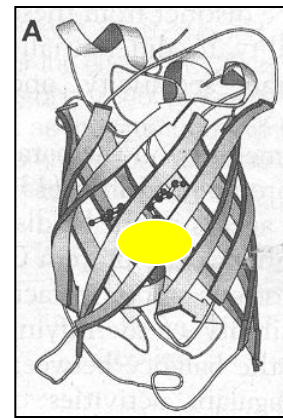
Вторичная структура зеленого флюоресцентного белка из медузы.
Хромофор
(*p*-hydroxybenzylideneimidazolidinone)



Green-FP,



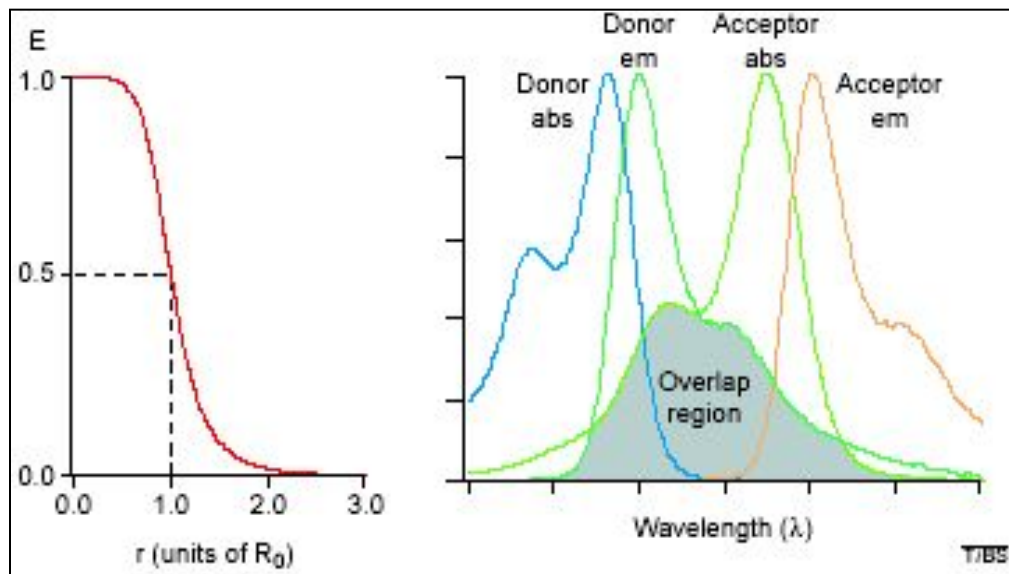
Cyan-FP,



Yellow-FP,

Кристаллическая структура зеленого белка с последовательностью **Thr65-Tyr66-Gly67** и его мутантов. Структура напоминает плетеную корзину из 11 спиралей длиной 41\AA и диаметром 24\AA

Флуоресцентный перенос энергии. Флуоресцентная линейка



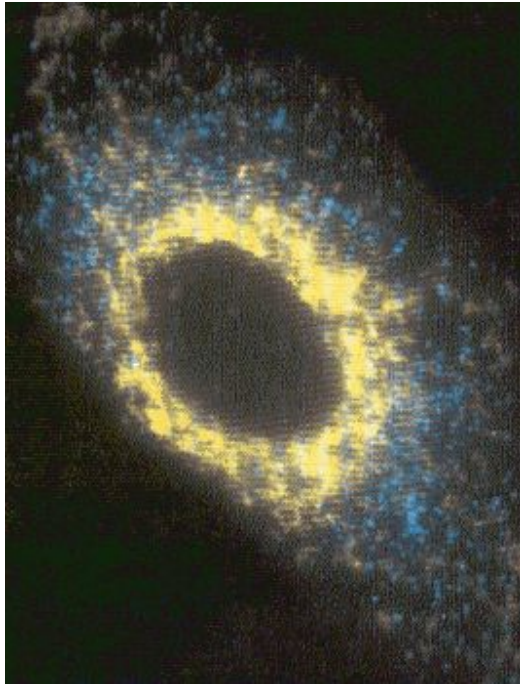
В флуоресцентном переносе энергии (FRET), флуорофор, называемый донором (D), переносит часть энергии на флуорофор, называемый акцептором. (A). Такой перенос энергии возможен только в том случае, если спектр эмиссии донора перекрывается со спектром поглощения акцептора и флуорофор (A) находится на определенном расстоянии от флуорофора (D)

FRET позволяет измерить расстояние между донором и акцептором, поскольку перенос энергии E_T очень сильно зависит от расстояния между флуорофорами

$$E_T = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (\text{F3.5})$$

где R_0 (nm), есть расстояние на котором 50% перенос энергии имеет место.

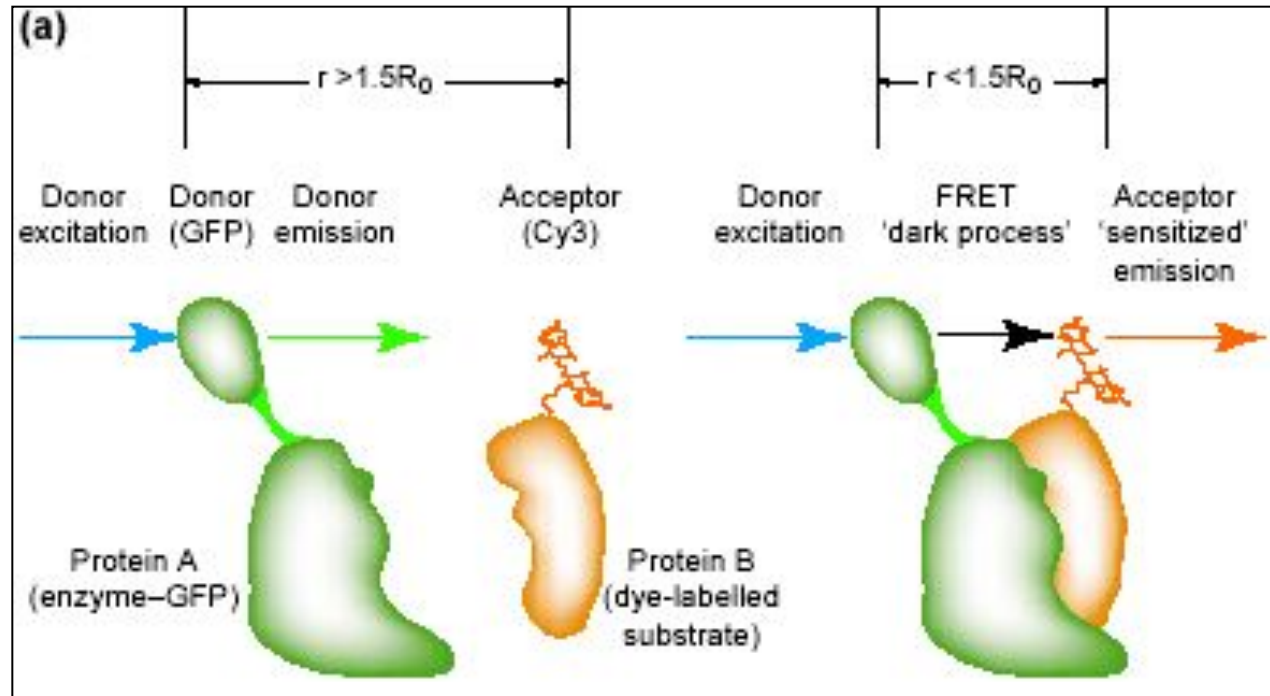
GFP как клеточный репортер



Двухцветная флюоресцентная фотография клетки выявляющая распределение двух белков (Yellow-FP и Cyan-FP) в разных ее компартаментах.

Каждый из GFP-белков присоединен к определенному исследуемому белку.

GFP как диагностик взаимодействия белков с лигандами



Принципиальная схема опыта, в которой GFP используется как конформационный индикатор взаимодействия белков с лигандами.

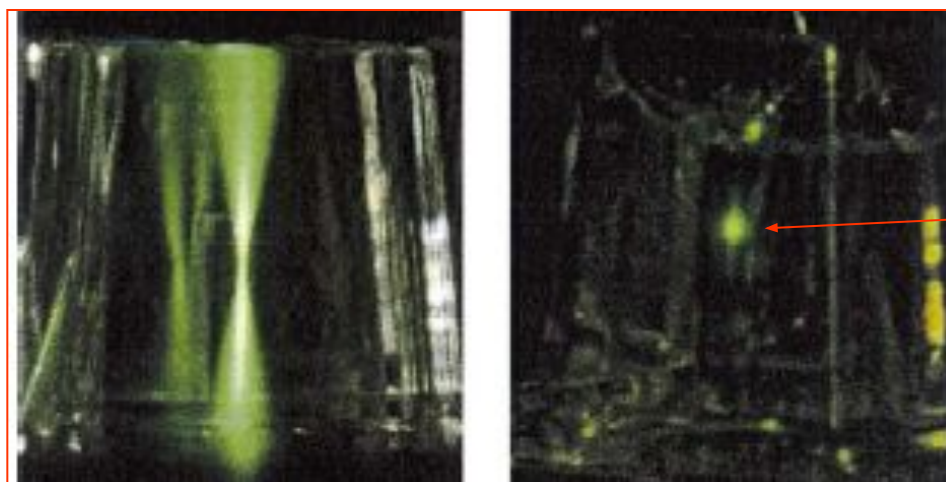
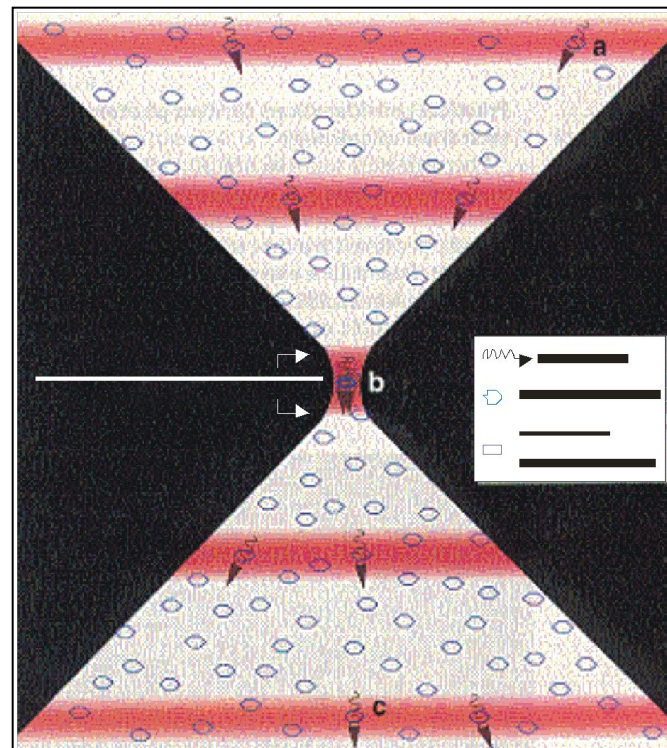
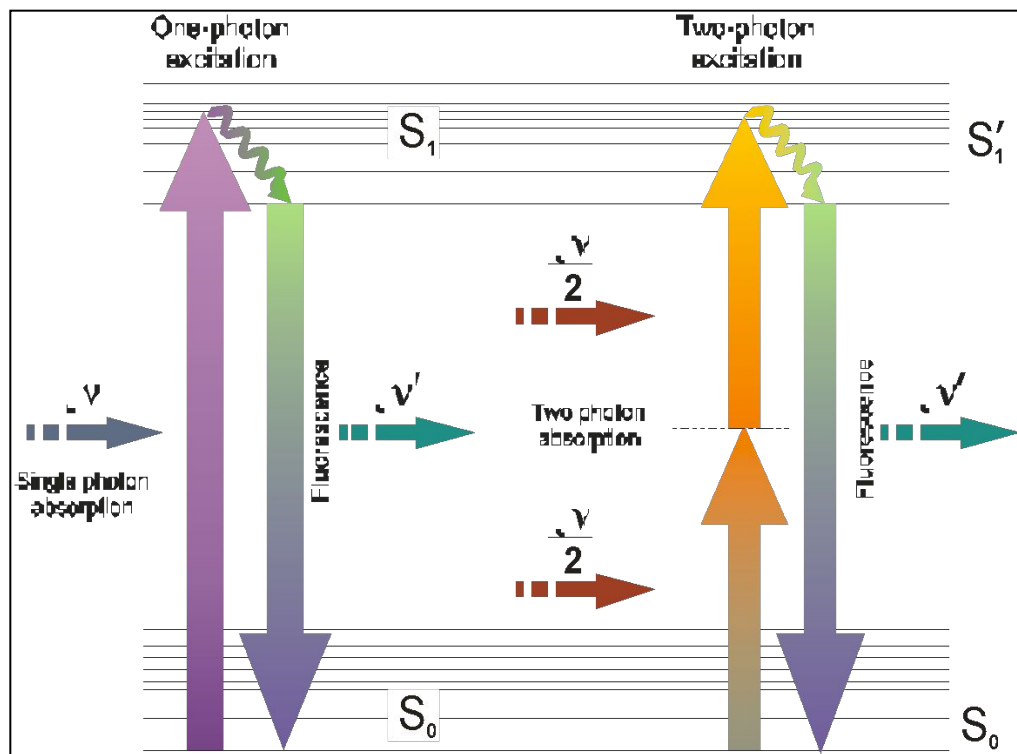
После связывания белка с лигандом измеряется перенос энергии между донором (GFP) и акцептором (Cy3). Перенос энергии очень чувствителен к расстоянию донор-акцептор.

Визуализация одиночных молекул требует радикального изменения наблюдаемого объема вплоть до нескольких аттолитров

- 1) Двухфотонное возбуждение в лазерной наведенной флюоресценции
- 2) Микроскопия ближнего поля
- 3) Флюоресцентная микроскопия в режиме полного внутреннего отражения
- 4) Конфокальная микроскопия

Двухфотонное возбуждение

In 1931 M. Goppert-Mayer gave theoretical background of two-photon excitation in fluorescence.



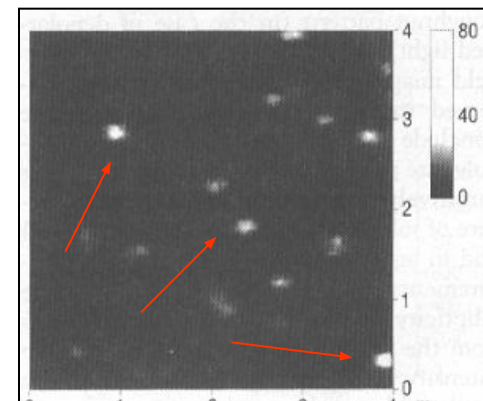
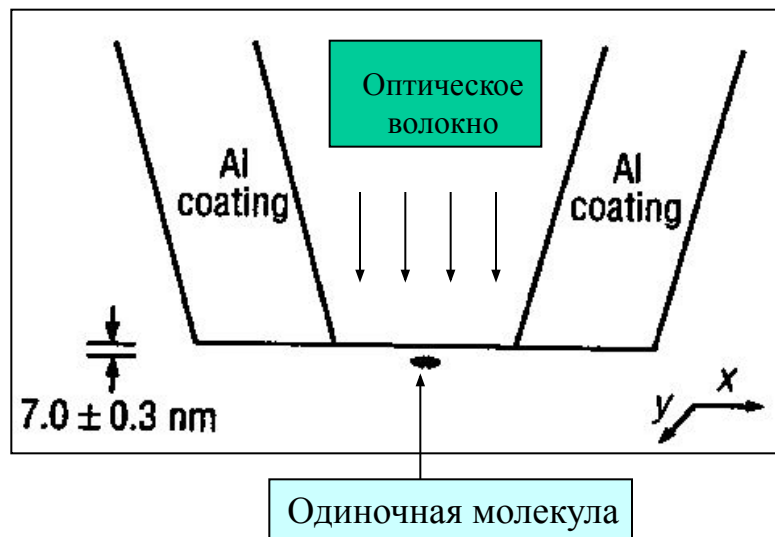
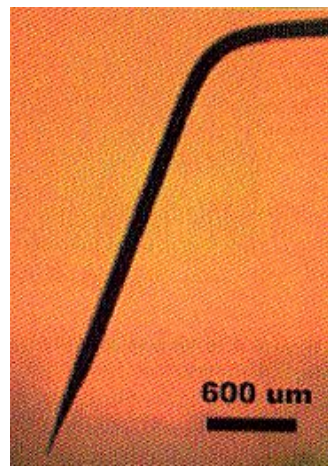
Предельно малый объем

Микроскопия ближнего поля

Near-field scanning optical microscopy (NSOM).

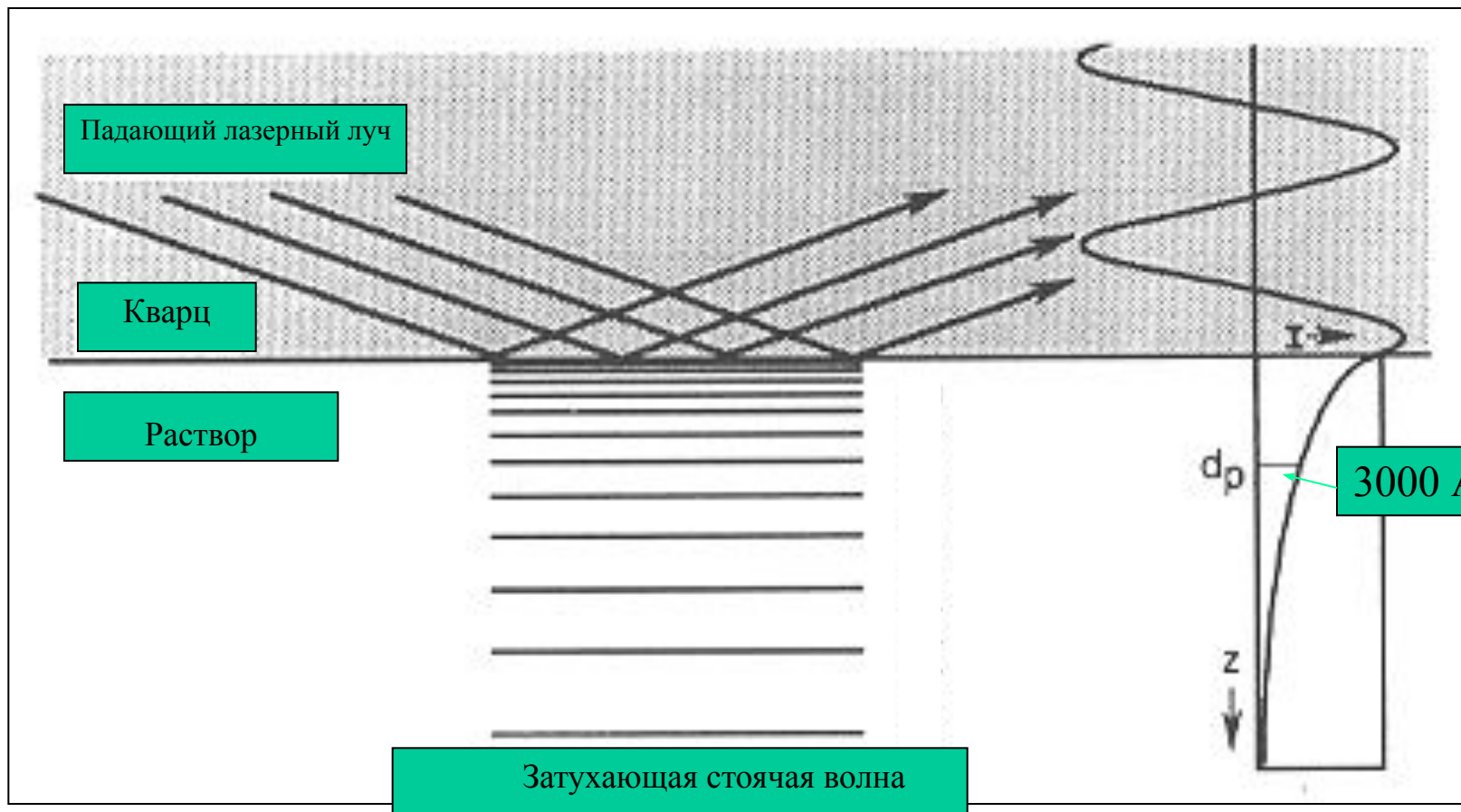
“Безлинзовая микроскопия”

Техника изображения основанная на принципе «оптического стетоскопа», помещающегося на максимально коротком расстоянии от образца (меньше длины волны). Изображение получается сканированием стетоскопа вдоль образца. Пространственное изображение ограничено диаметром светового сопла.



Одиночные молекулы
сульфородамина на стеклянной
поверхности.

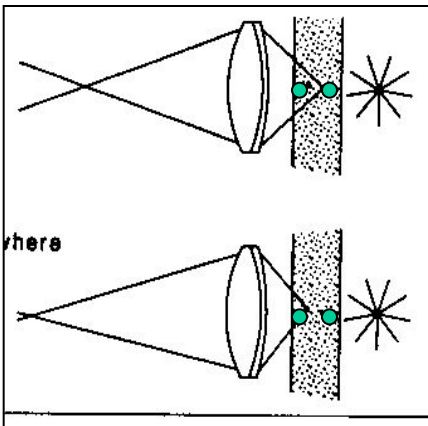
Флуоресцентная микроскопия при полном внутреннем отражении



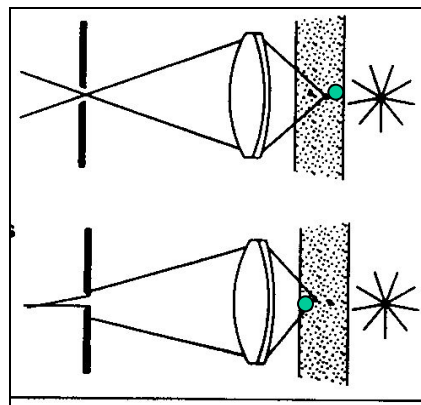
Характерная глубина проникновения света около 3000 \AA

Характерный объем возбуждения ~ 20 аттолитров

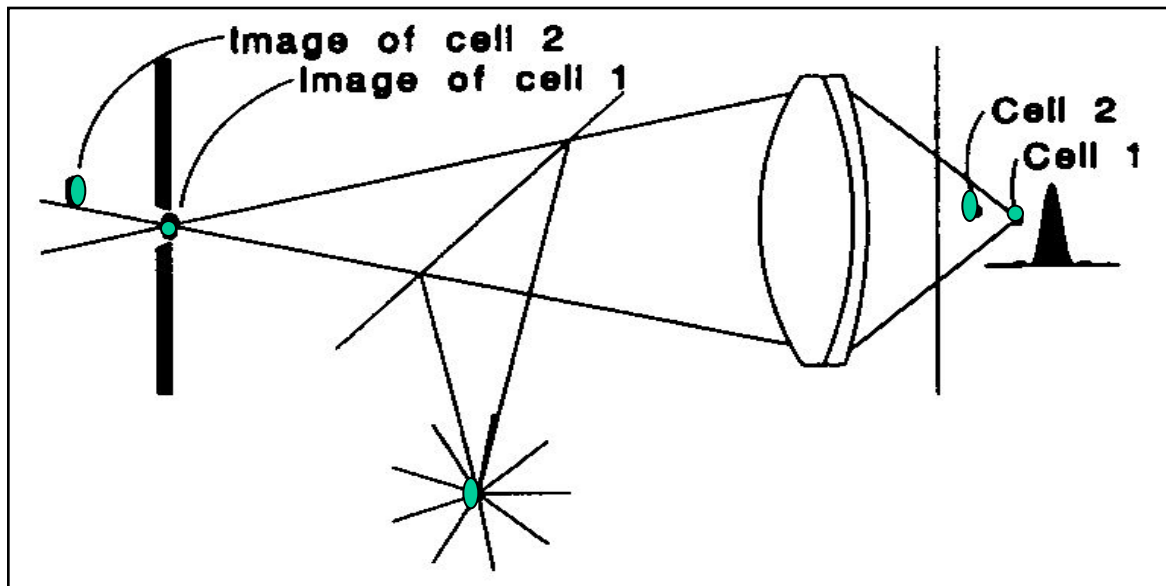
Конфокальная микроскопия



Формирование линзой изображения двух точек тонкого образца в отсутствии диафрагмы.



Формирование линзой изображения тонкого образца в присутствии точечной диафрагмы.



Демонстрация получения конфокального изображения. Три точки: клетка 1, точечная диафрагма и источник света взаимно конфокальны

The main characteristic of five methods of single molecules optical detection.

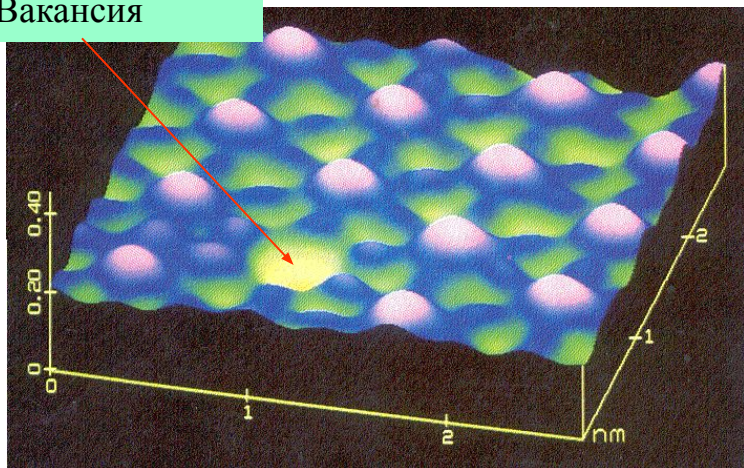
Method of optical detection	Excitation volume	Signal-to-noise	Spatial resolution	Mode of detection
1. Near field optical microscopy	Femtoliters (5×10^{-15} L)	High	50-100 nm	Point
2. Far-field confocal microscopy	Subfemtoliters ($\sim 5 \times 10^{-16}$ L)	High	Diffraction limit	Point
3. Far-field microscopy in flow stream	Picoliters ($\sim 5 \times 10^{-12}$ L)	High	Diffraction limit	Point
4. Wide-field epi-illumination	Femtoliters (5×10^{-15} L)	Reduced	Diffraction limit	Parallel
5. Wide-field epi-illumination with total internal reflection excitation.	Attoliters (20×10^{-18} L)	High	Diffraction limit	Parallel

П Е Р Е Р Ы В ?

Визуализация и манипулирование одиночными
макромолекулами

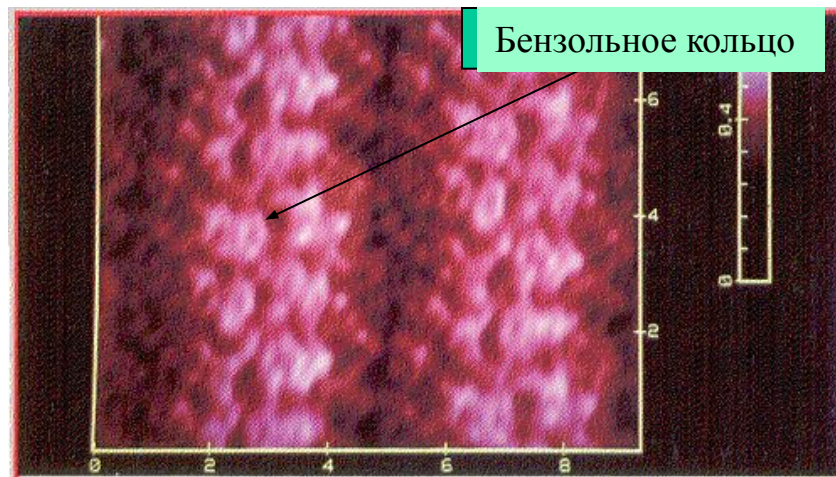
Сканирующая туннельная микроскопия (G. Binnig and H. Rohrer, 1980)

Вакансия



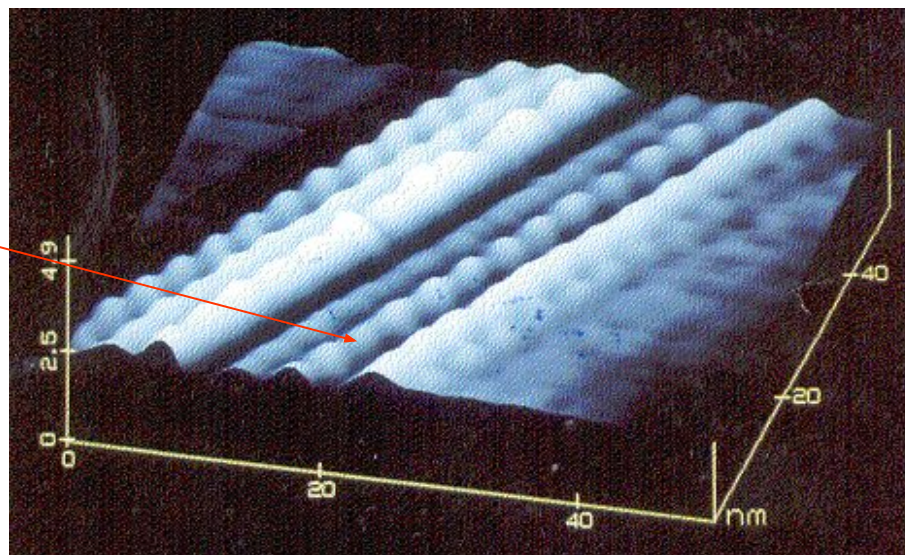
Iodine atoms on the surface of platinum crystal

Бензольное кольцо



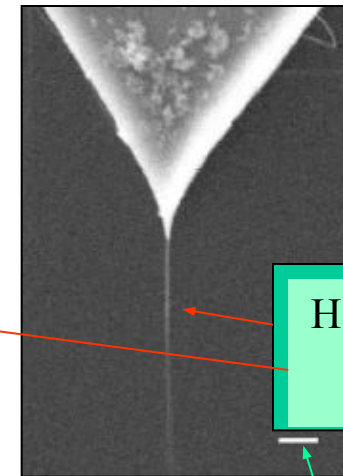
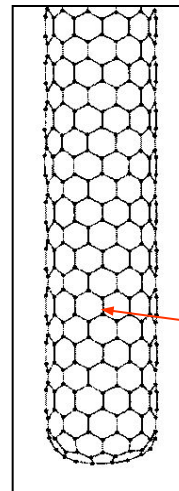
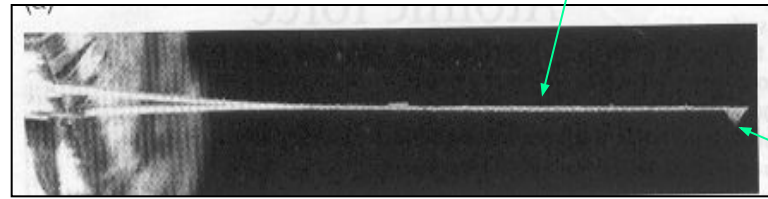
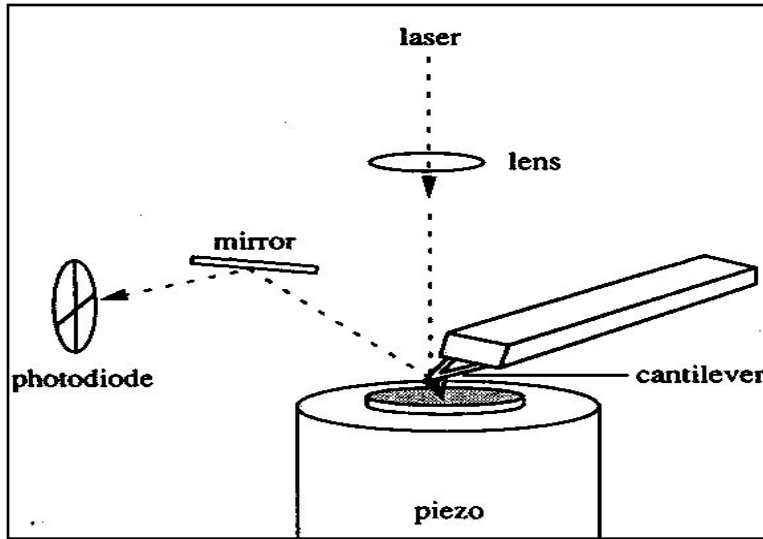
A Liquid crystal (8CB) on graphite. Benzene rings are revealed.

ДНК?



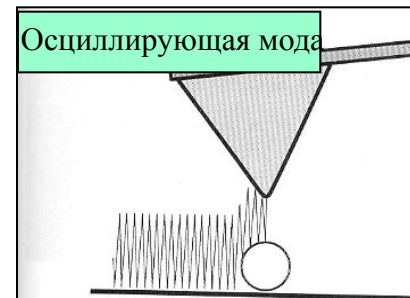
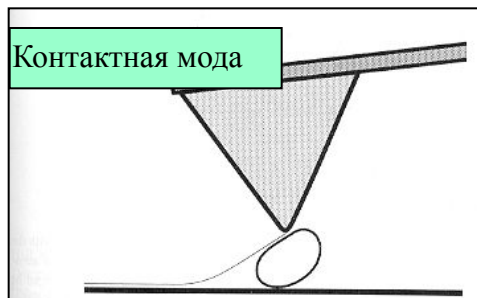
Strands Z-DNA laying on graphite

Микроскопия силового поля (безлинзовая микроскопия)

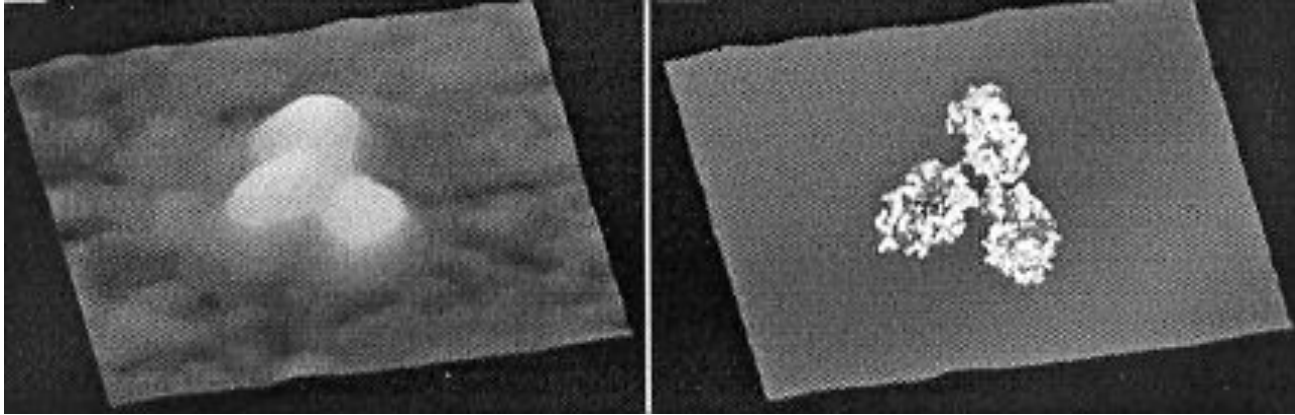


Микроскопия силового поля (по английски AFM), не содержит линзы как таковой для формирования изображения. Она использует острие «атомных» размеров на конце длинной гибкого «удилища». Острие сканирует поверхность молекулы.

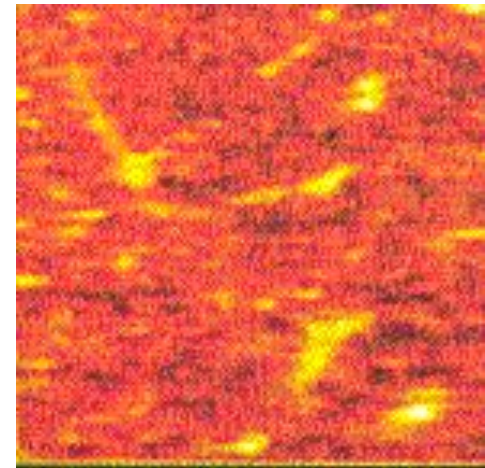
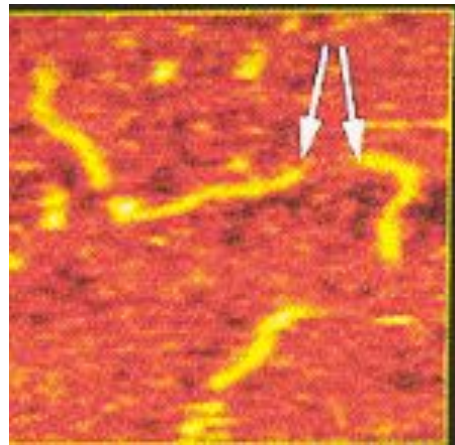
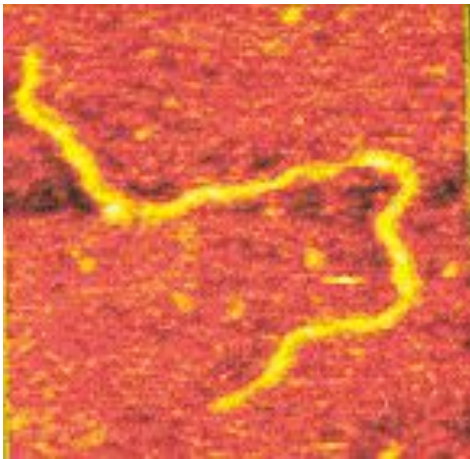
Работа острия напоминает работу палочки слепого.



Изображение биологических макромолекул методом АФМ

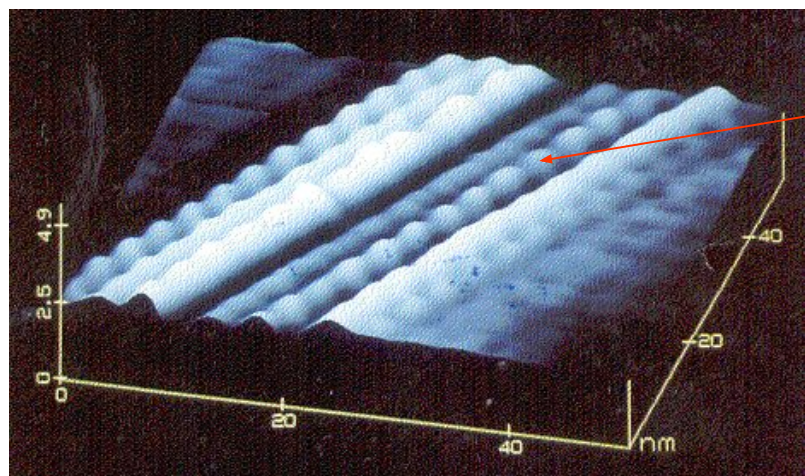


Слева: изображение иммуноглобулина G методом АФМ. Справа: кристаллическая структура



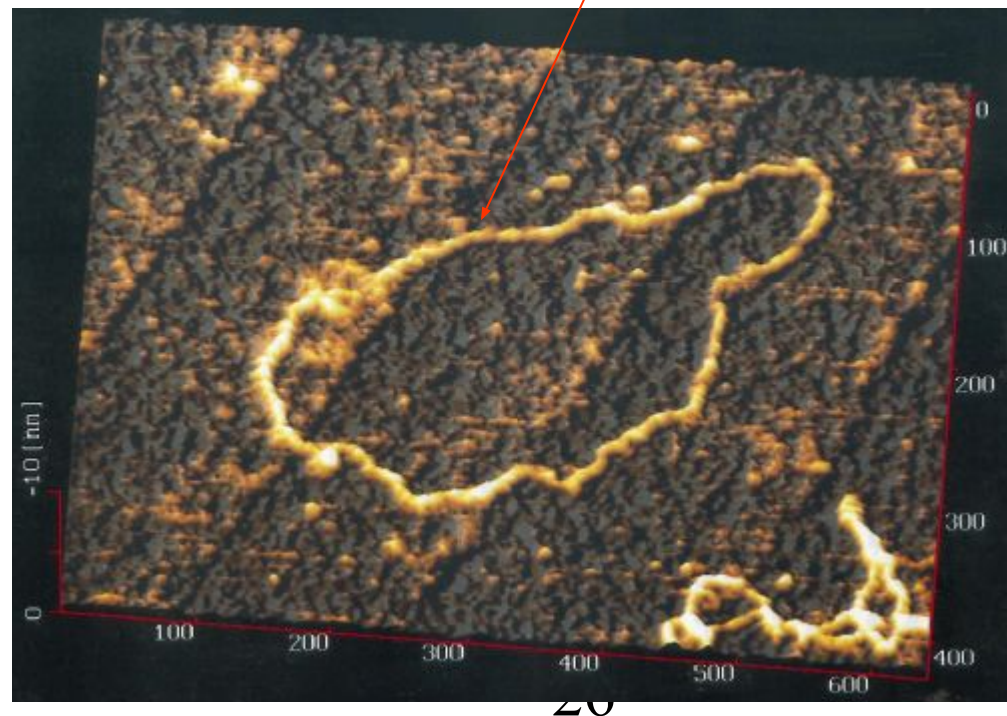
Три последовательных изображения (0, 12 и 24 минуты) показывают разрезание ДНК рестрикционной нуклеазой Bal_{31} .

Изображение биологических структур методом АФМ



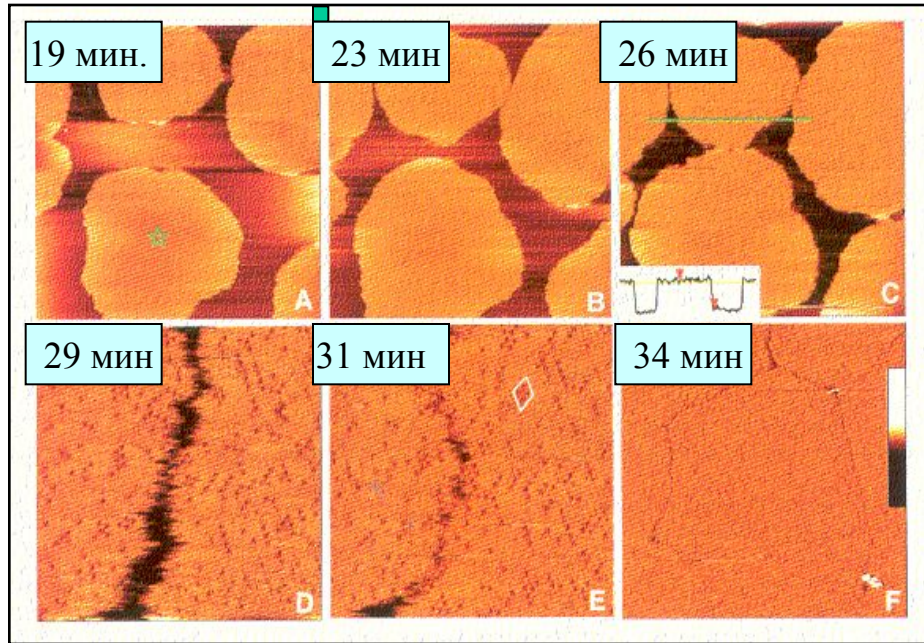
Фальш

Кольцевая ДНК в В-форме. Диаметр спирали 24 Å

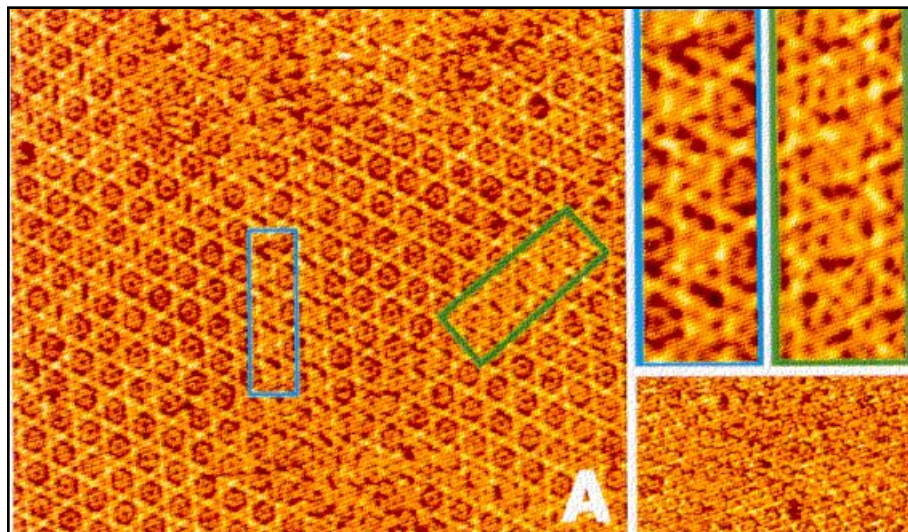


20

Наблюдение за ростом двумерных кристаллов методом АФМ

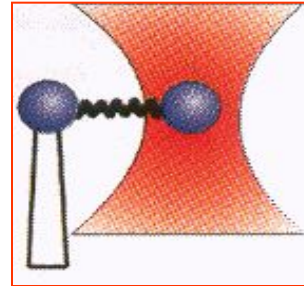
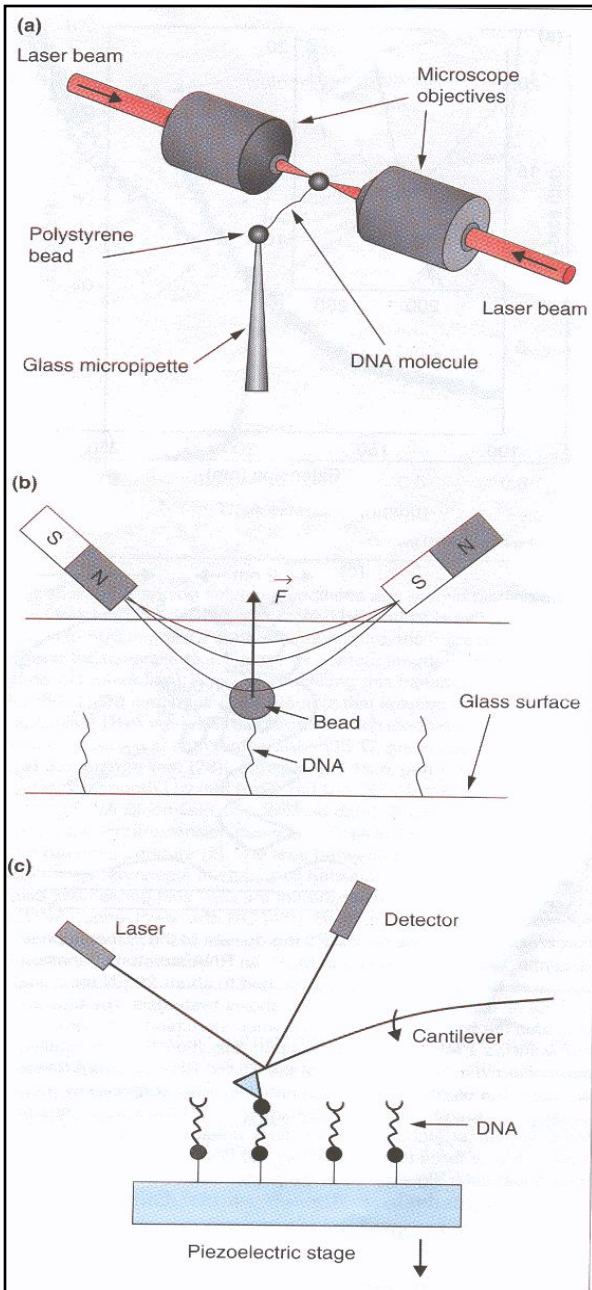


Рост кристаллов белка аннексина V на подложке из планарных липидных бислоев.

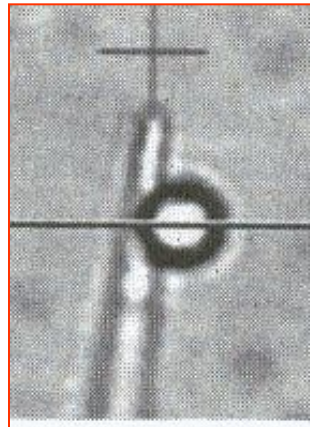


Прямая визуализация дефектов в кристаллах аннексина

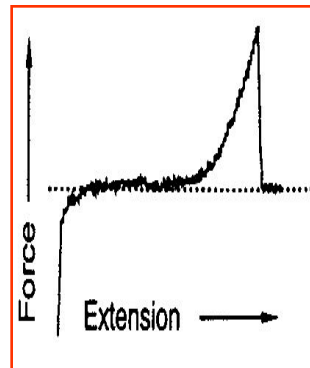
Манипуляция одиночными макромолекулами



Бусинка с высоким показателем преломления преломления располагается в центре интенсивного лазерного пучка.

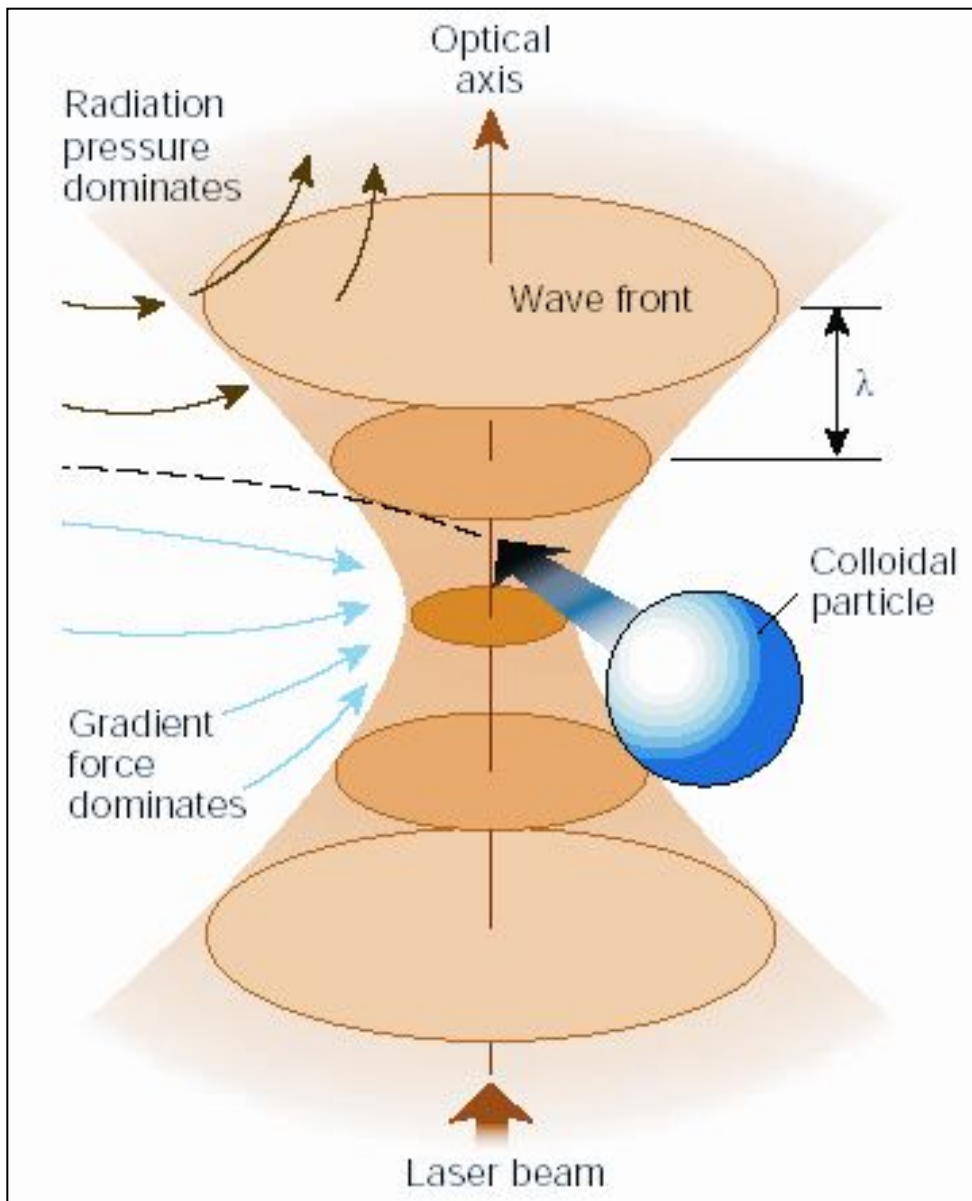


Типичное видео изображение магнитной бусинки (\varnothing 2.9 микрон) и микропипетки в оптическом микроскопе.

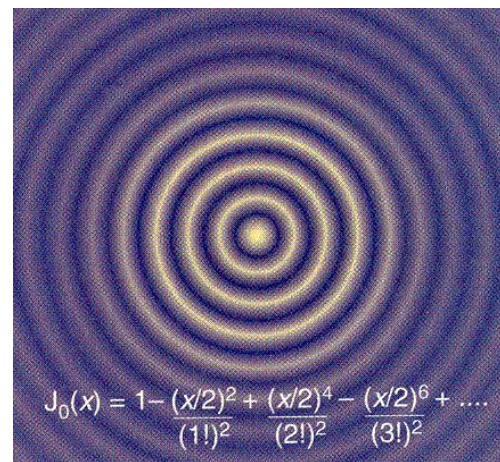


В типичном эксперименте острие укосины вдавливаются в слой белка, привязанного к золотой подложке. Затем подложка опускается вниз под действием пьезоэлектрической силы.

Оптический твизер

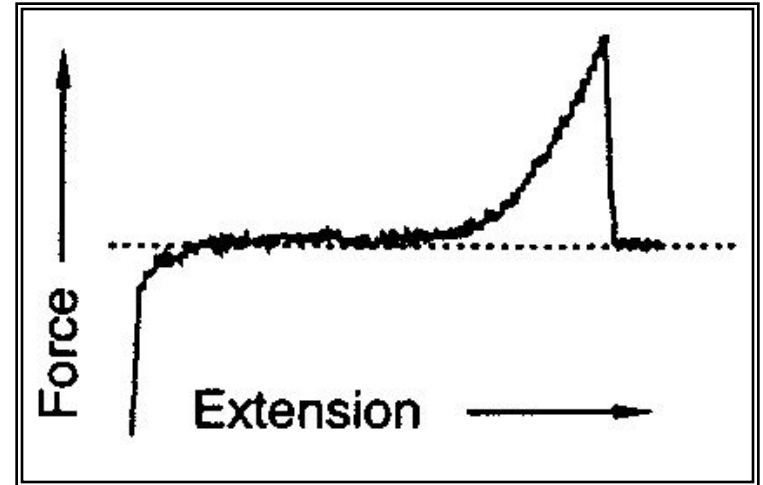
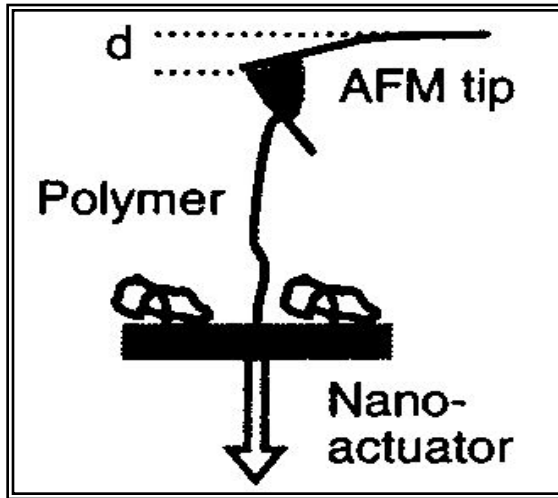


В оптическом твизере сильно сфокусированный лазерный луч является оптической ловушкой, которая втягивает в фокус маленькие коллоидальные частицы. Радиационное давление несколько смещает частицу вдоль оптической оси.



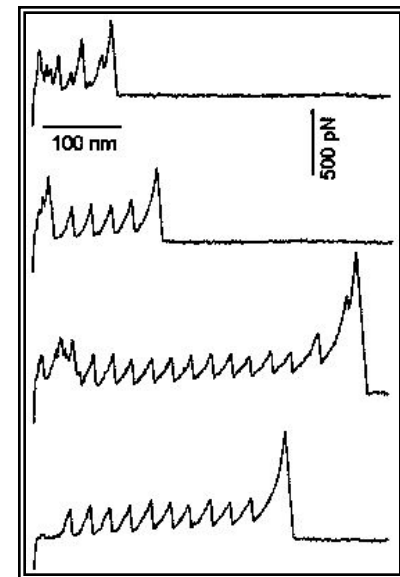
$$J_0(x) = 1 - \frac{(x/2)^2}{(1!)^2} + \frac{(x/2)^4}{(2!)^2} - \frac{(x/2)^6}{(3!)^2} + \dots$$

Метод AFM методе в режиме измерения силы.



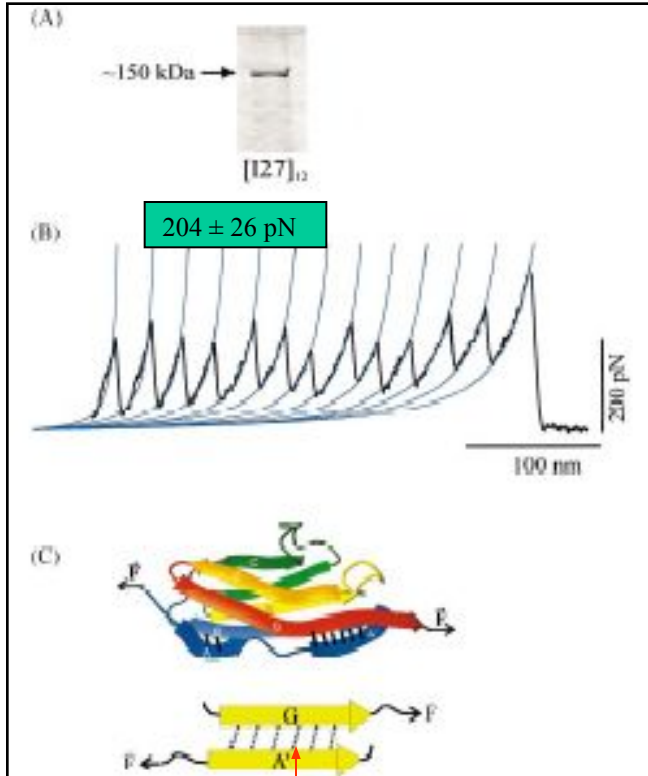
Типичный эксперимент по растягиванию одиночной молекулы в методе AFM

«Полибелок» состоит из множественных копий белка.

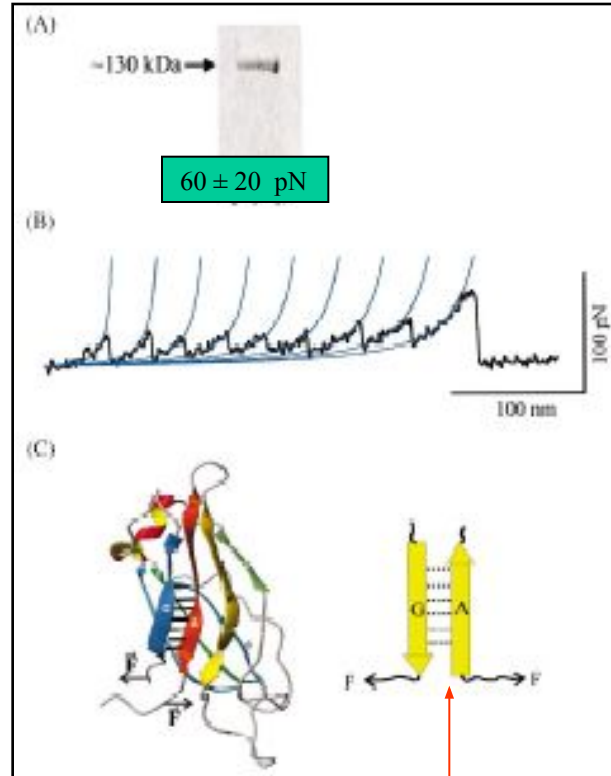


Белковая архитектура и механическая стабильность

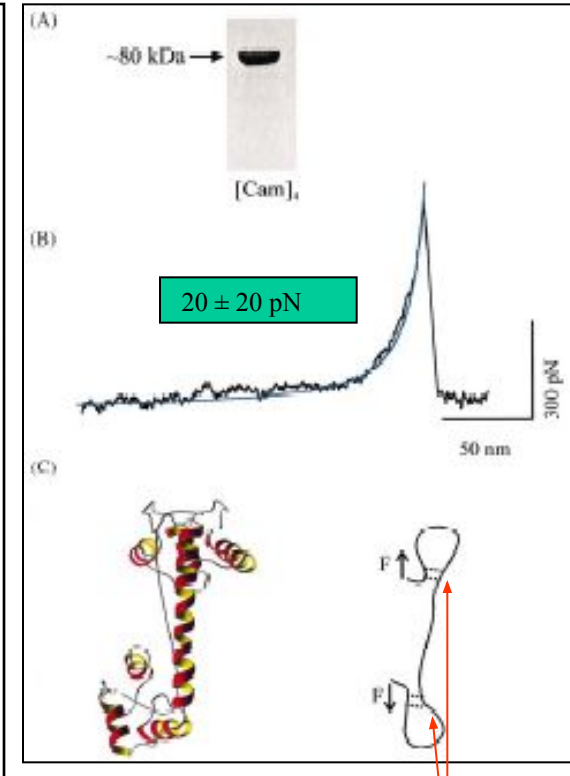
Human cardiac titin immunoglobulin



Single C2 domain

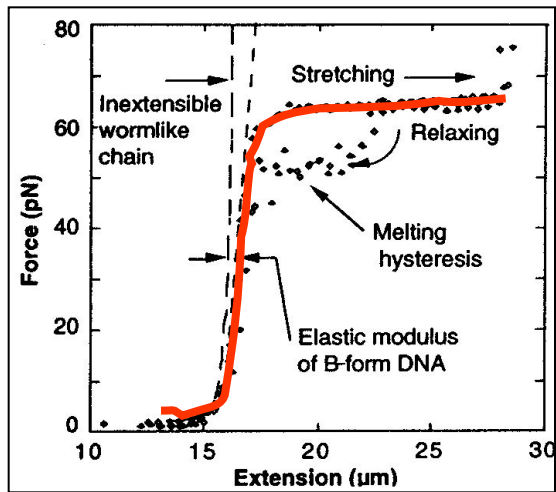


Rat calmodulin (CaM4)

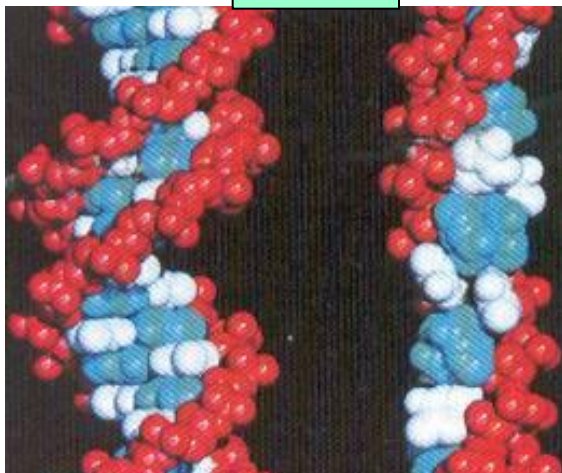


Красные линии указывают топологию критических H-связей, разрывающихся при приложении силы.

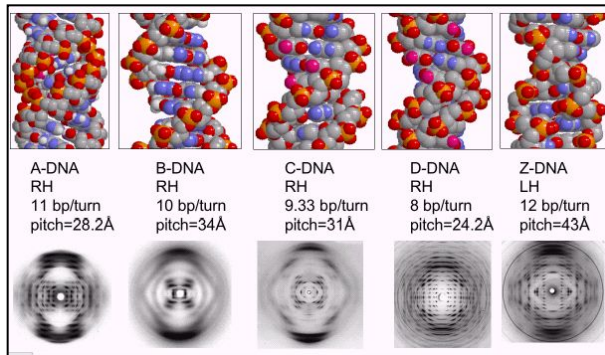
Растягивание ДНК



B → S



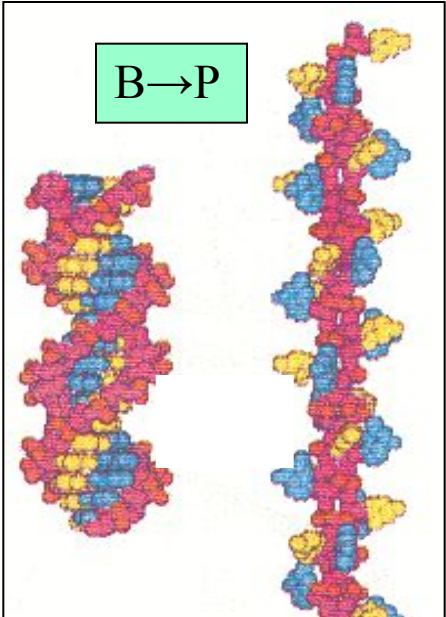
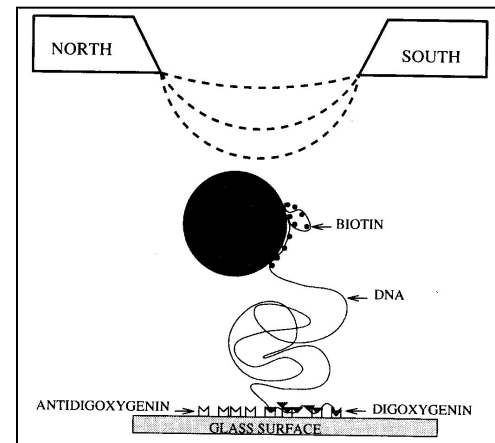
Величина сила для перехода ДНК из В- в S- форму ~ 65 pN



Природные конфигурации ДНК

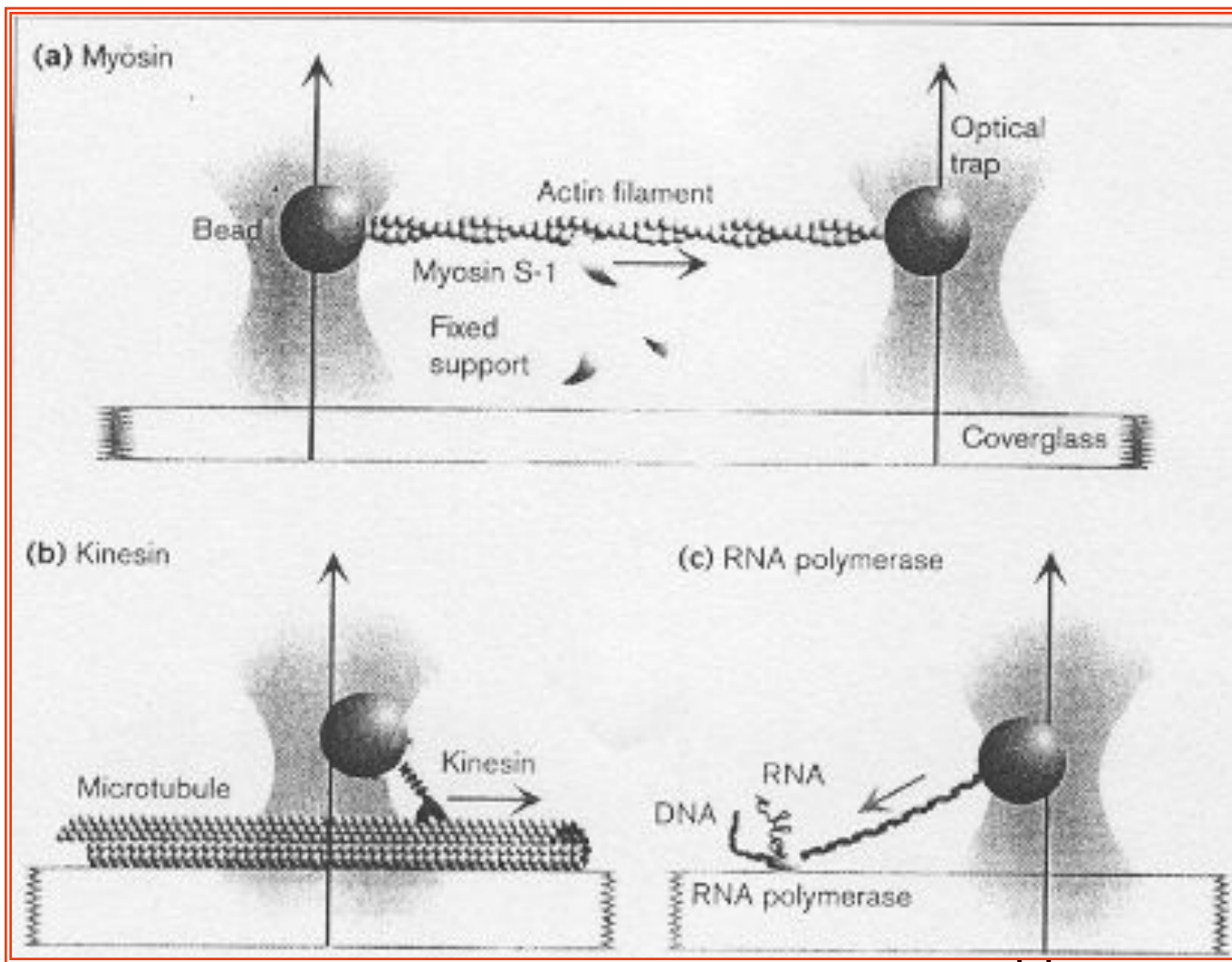
«Искусственные» конфигурации ДНК
 (Слева S-DNA), полученная растяжением В-DNA с помощью *оптического твизера* (диаметр на 30% меньше исходной)
 (Справа P-DNA), полученная скручиванием В-DNA с помощью *магнитного твизера*. Примечательно, что в такой ДНК основания смотрят наружу.

Скручивание ДНК



Величина силы для перехода ДНК из В- в P- форму ~ 20 pN

Схематические диаграммы использования оптических твизеров при исследовании линейных молекулярных моторов

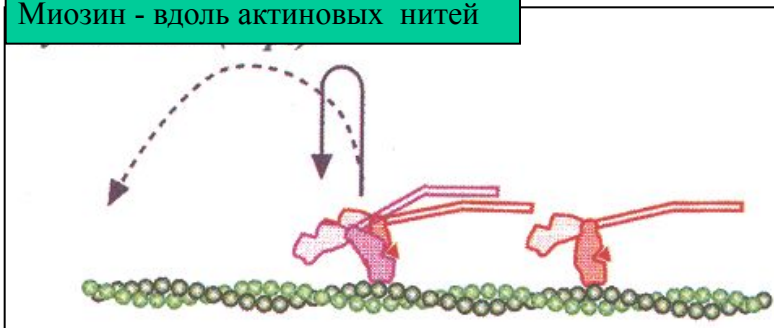


Все линейные моторы движутся вдоль полимерных субстратов за счет энергии АТФ.

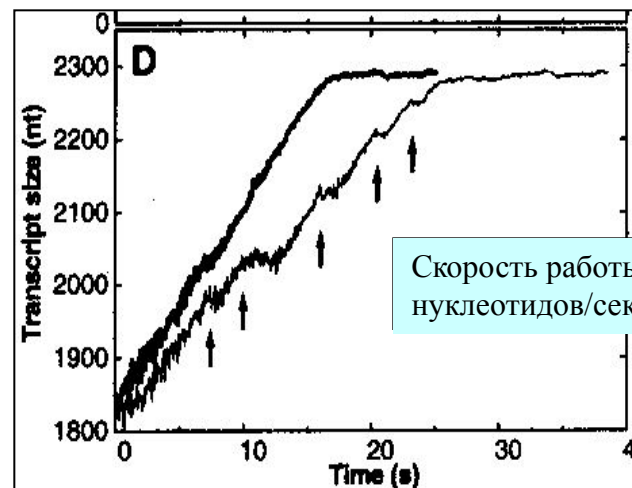
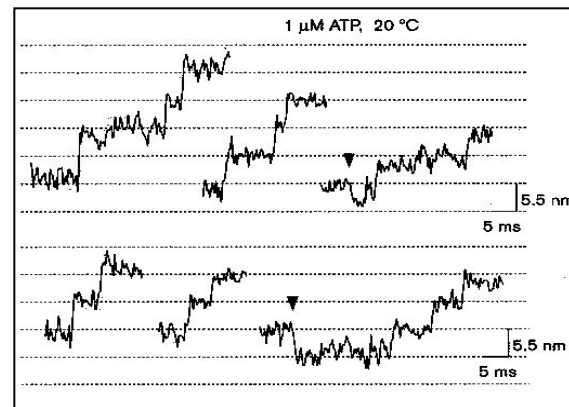
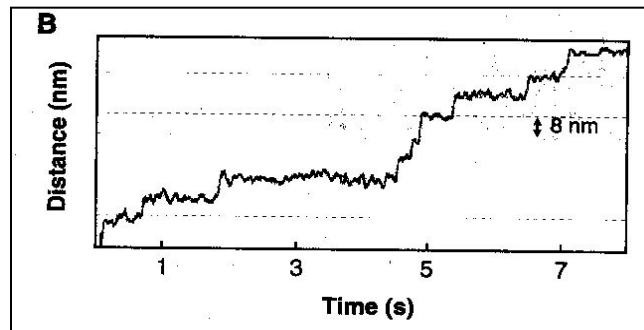
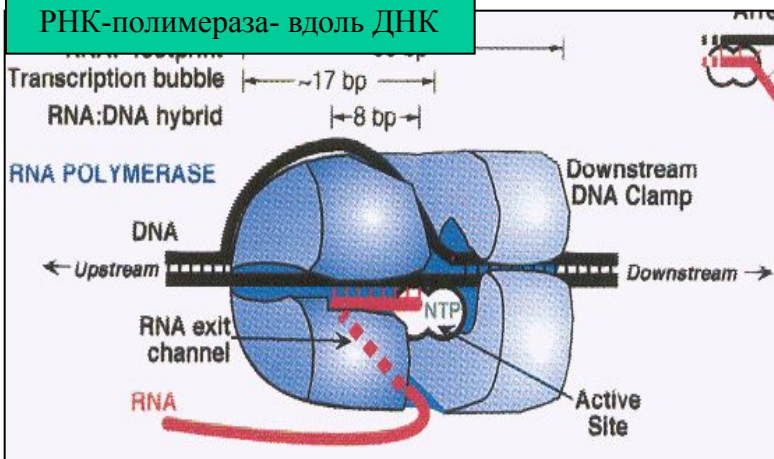
Кинезин- вдоль микротрубочек



Миозин - вдоль актиновых нитей



РНК-полимераза- вдоль ДНК



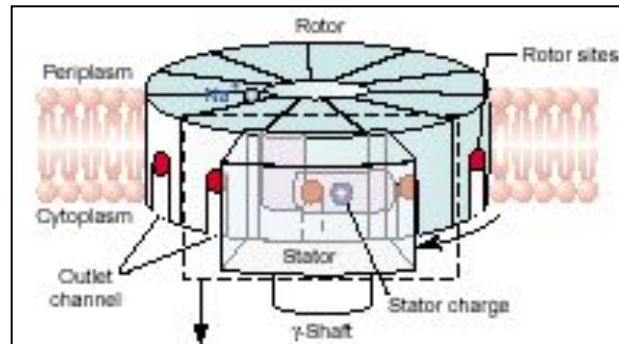
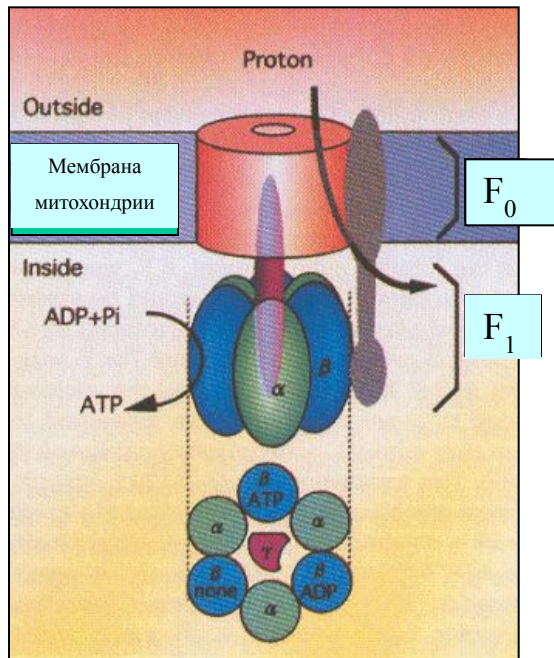
Сравнение основных механических характеристик молекулярных моторов.

Мотор/рельсы	Размер шага	Максим. усилие	Максим. эффективность (КПД)	Processivity (сцепляемость)	Мода движения
Миозин/актин	Переменный (5.5nm×n)	3-6 pN	~20%	плохая	прыжки
Кинезин/Микротрубочка	8 nm	5 pN	~50%	хорошая	гуляние
РНК-полимераза/ДНК	0.34 nm	14-27 pN	~20%	прекрасная	ползание

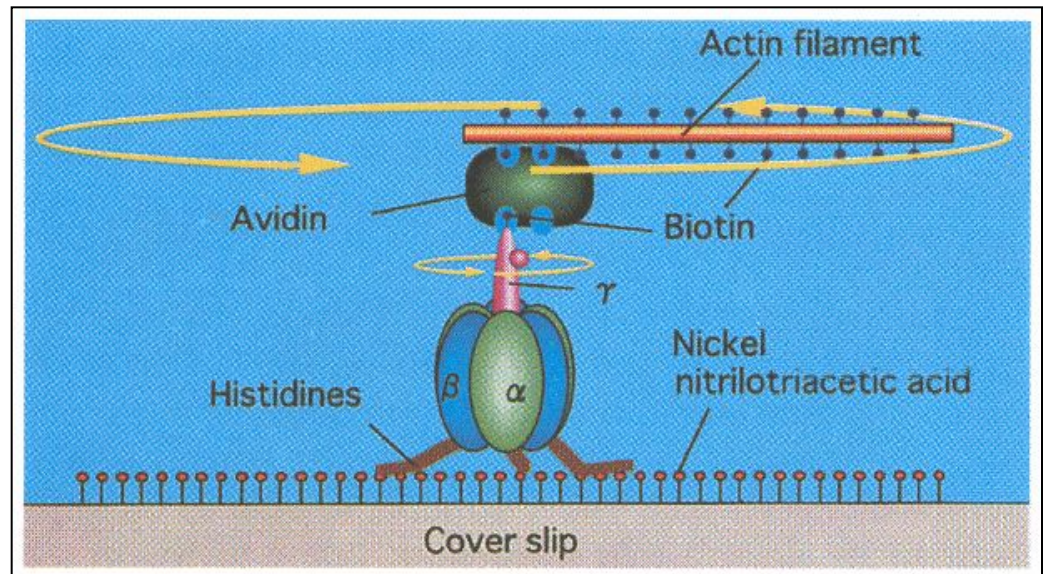
Размер шага каждого линейного мотора зависит типа платформы:

- Реальная величина шага передвигающегося миозина скорее всего ожидается с кратностью 5.5 нм, которое соответствует расстоянию между мономерами актина.
- РНК- полимераза движется с шагом 0.34 нм, которое соответствует шагу спирали ДНК.
- Кинезин движется с шагом 8 нм, что соответствует расстоянию между отдельными белками микротрубочки.

F_0F_1 ATP фазный мотор двойного действия

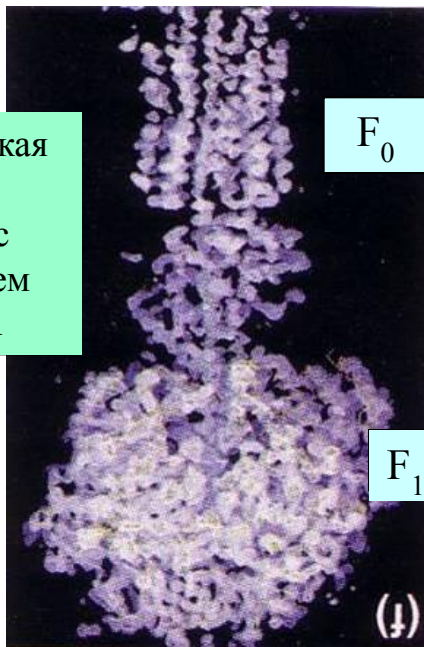


Молекулярная архитектура насоса F_0 мотора, генерирующего АТФ.

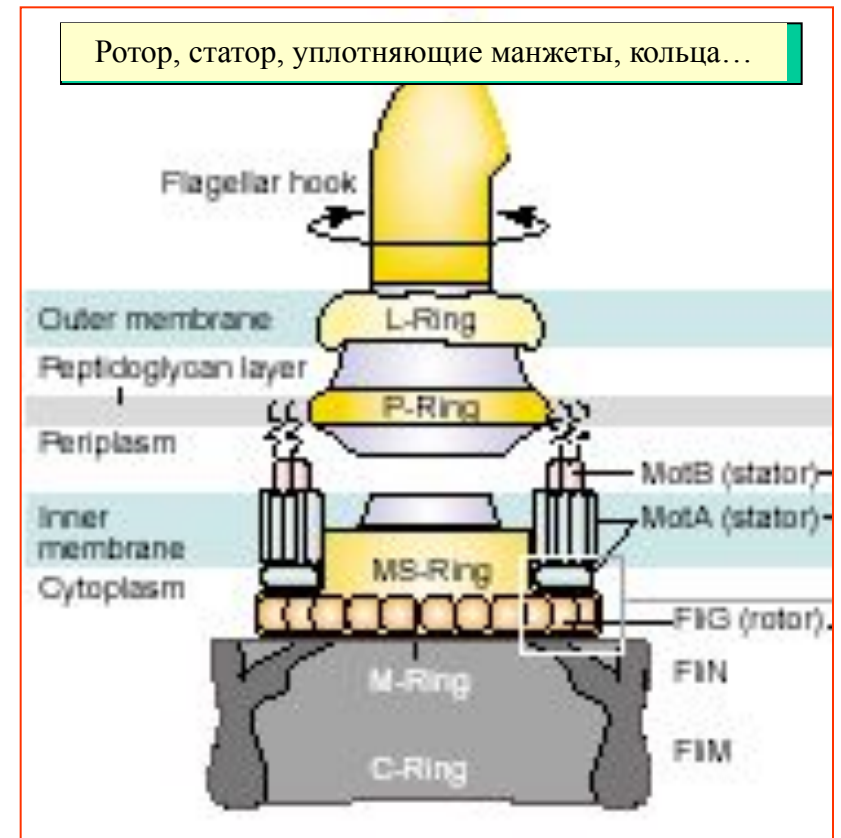
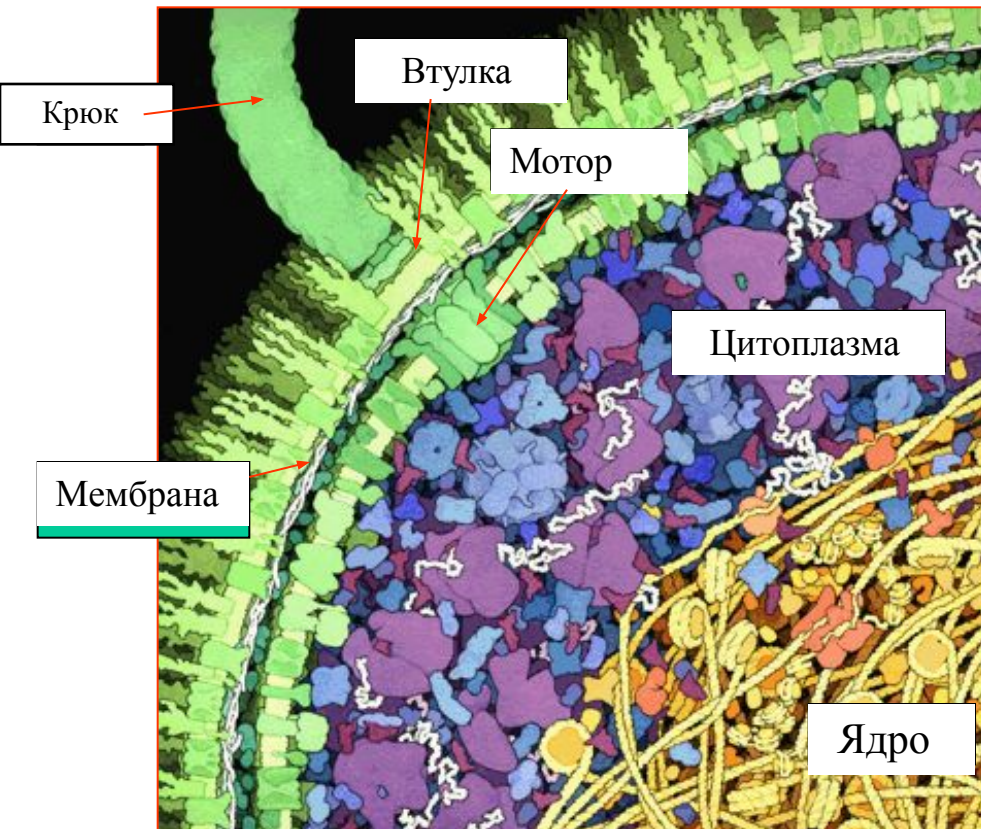


Экспериментальная схема прямого наблюдения вращения F_1 мотора. Мотор вращается со скоростью 4 оборотов/сек и шагом 120° .

Рентгеновская структура комплекса с разрешением около 2.2 \AA



Молекулярная архитектура бактериальной флагеллы как вращающегося устройства



Бактериальная флагелла состоит из мотора, располагающегося внутри клетки, втулки с различными уплотняющими манжетами в мембране, крюка и пропеллера длиной $10 \mu\text{m}$, располагающегося вне клетки (на рисунке не показан). В клетке *E. Coli* пропеллер вращается со скоростью 18.000 оборотов в минуту и двигает клетку со скоростью $30 \mu\text{m}/\text{сек}$.

I. Serdyuk N. Zaccai J. Zaccai

“Physical methods in structural biology”

Cambridge, 2005

Introduction. From thermodynamic to single molecule detection

Section A. Biological macromolecules and Physical Tools

Section B. Mass and charge

Section D. Hydrodynamics

Section C. Thermodynamics

Section E. Optical Spectroscopy

Section F. Optical Microscopy

Section G. X-ray and Neutron Diffraction

Section H. Energy and Time

Section J. Atomic resolution imaging

Section K. Nuclear magnetic resonance

Conclusion. Back to beginning...

Курс лекций

проф. И.Н. Сердюк

“Физические методы в структурной биологии”

Введение. От термодинамики к одиночным молекулам

Лекция 1. Макромолекулы как гидродинамические частицы

Лекция 2. Диффузия, ультрацентрифугирование, электрофорез

Лекция 3. Ориентация макромолекул в электрическом и гидродинамическом поле, вязкость,

Лекция 4. Динамическое рассеяние света, флюоресцентная корреляционная спектроскопия,
световая микроскопия

Лекция 5. Флюоресцентная микроскопия, атомная силовая микроскопия, исследования на
одиночных молекулах

Лекция 6. Масс спектрометрия и термодинамика

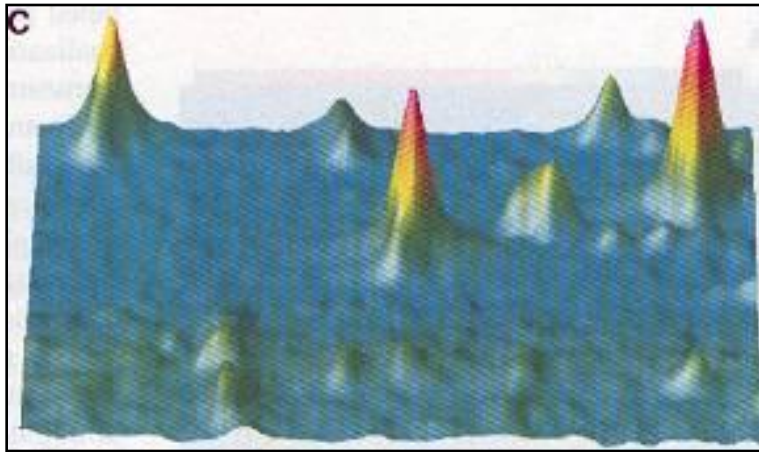
Лекция 7. Абсорбционная и инфракрасная спектроскопия, Рамановское рассеяние, оптическая
активность

Лекция 8. Ядерный магнитный резонанс

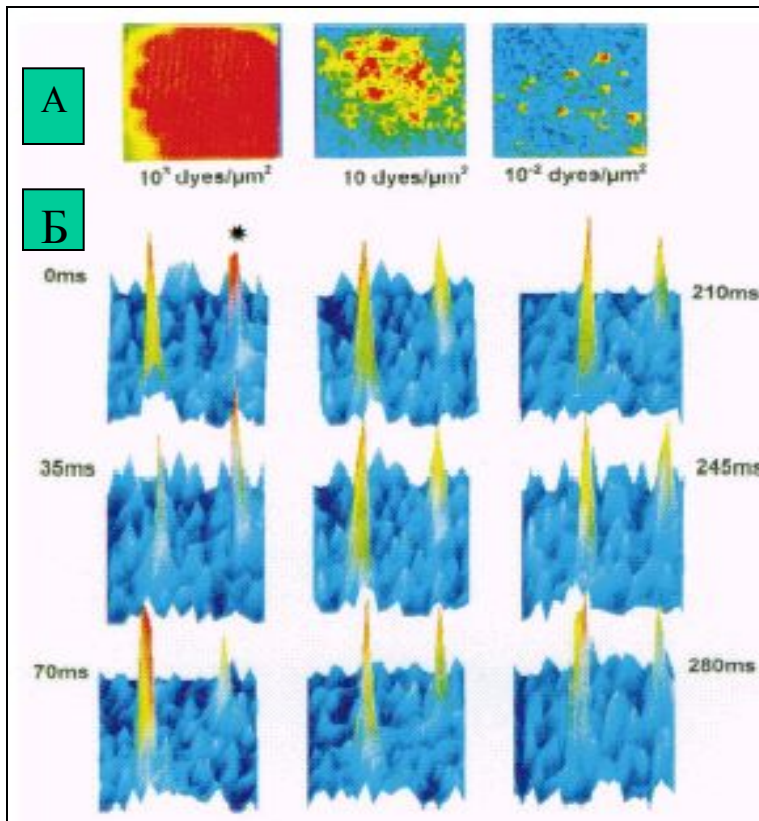
Лекция 9. Макромолекулы как рассеивающие частицы. Рентгеноструктурный и нейтроноструктурный
анализ

Лекция 10. Малоугловое рассеяние, электронная микроскопия, двумерная инфракрасная
спектроскопия

Оптическое детектирование одиночных молекул в твердой фазе



Исследуемые молекулы (pentacene) внедрены в поверхность кристалла (*p*-терпеныл кристалл при 1.8 К). Концентрация молекул составляет (10^{-7} - 10^{-9} М) (Moerner and Orrit, 1989).



Изображения флюоресцентно меченых липидов на поверхности мембраны:

А. Три разные концентрации липидов

Б. Девять последовательных изображений поверхности снятые через определенные промежутки времени (35 микросек) при самой низкой концентрации липидов. Вычисленный коэффициент диффузии $D_{\text{lat}} = 1.42 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{sec}$ (Schmidt, et al, 1996)