

МЕТОДЫ АНАЛИЗА СТРУКТУРЫ БЕЛКА

Пространственная (третичная) структура белков

Знание третичной структуры белков существенно углубляет наше понимание о том, как этот белок (фермент) работает (функция) и обеспечивает твёрдую почву для последующих попыток модификации этой функции - увеличение/уменьшение стабильности (температурной, pH, др.) и/или субстратной специфичности).

Глобулярные белки представляют наибольший интерес. Структура белков (взаимное положение тяжёлых атомов в пространстве) определяется экспериментально – методами рентгеноструктурного анализа, методом многомерного ЯМР.

В последние годы появились работы, посвящённые определению формы макромолекулярных комплексов методом криоэлектронной микроскопии.

Структуры макромолекул собраны в базы данных, основной из которых является **Protein Data Bank (PDB)**, поддерживаемая Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB).

Каждая структура имеет свой идентификатор (4 символа) и ей соответствует файл, в котором приведены координаты тяжёлых атомов.

Структура PDB файла. (Brookhaven Protein Data Bank)

```

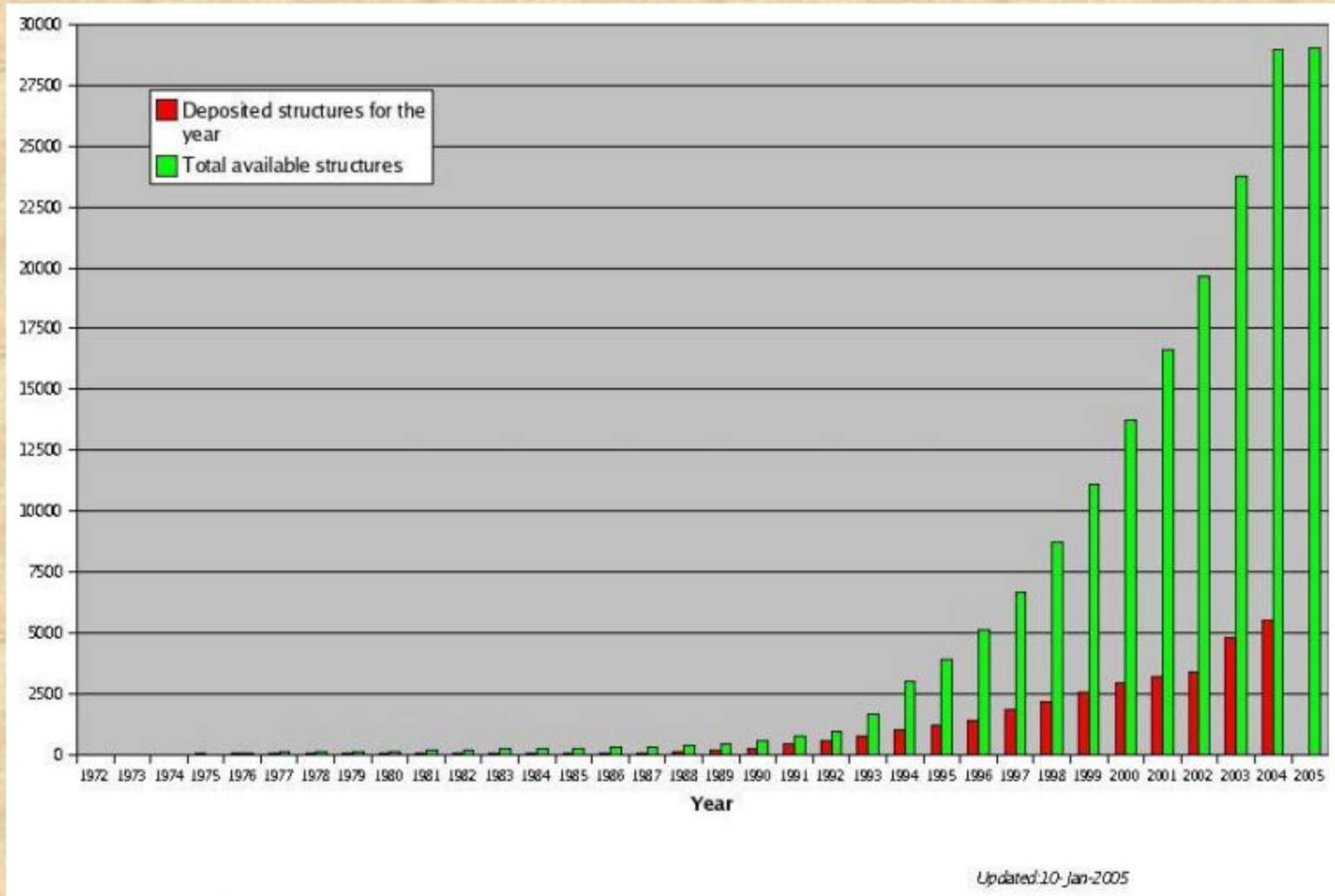
HEADER      OXIDOREDUCTASE (ALDEHYDE (D) ,NAD+ (A) )      06-JUL-94      2NAD      2NAD      2
COMPND      NAD-DEPENDENT FORMATE DEHYDROGENASE (E.C.1.2.1.2)      2NAD      3
COMPND      2 (HOLO FORM) COMPLEXED WITH NAD AND AZIDE      2NAD      4
SOURCE      (METHYLOTROPHIC BACTERIUM PSEUDOMONAS SP. 101)      2NAD      5
AUTHOR      V . S . LAMZIN , Z . DAUTER , V . O . POPOV , E . H . HARUTYUNYAN , K . S . WILSON      2NAD      6
.....
HELIX       1 H1A GLY A   55  LEU A   59  5 LEFT-HANDED      2NAD 194
HELIX       2 H1  LEU A   59  GLY A   67  1 3/10 FOR RES 63 - 67      2NAD 195
.....
ATOM       281  CB  LEU A   36           65.524  35.308  0.941  1.00 14.15      2NAD 584
ATOM       282  CG  LEU A   36           64.771  34.257  1.735  1.00 17.41      2NAD 585
ATOM       283  CD1 LEU A   36           64.749  34.636  3.209  1.00 28.05      2NAD 586
ATOM       284  CD2 LEU A   36           63.336  34.097  1.458  1.00 22.50      2NAD 587
.....
END

```

Поступления в базу данных пространственных структур биополимеров

На 9.03.2010 в базе данных PDB (<http://www.rcsb.org>) было депонировано **63956** структур, из них более **59183** белковых структур.

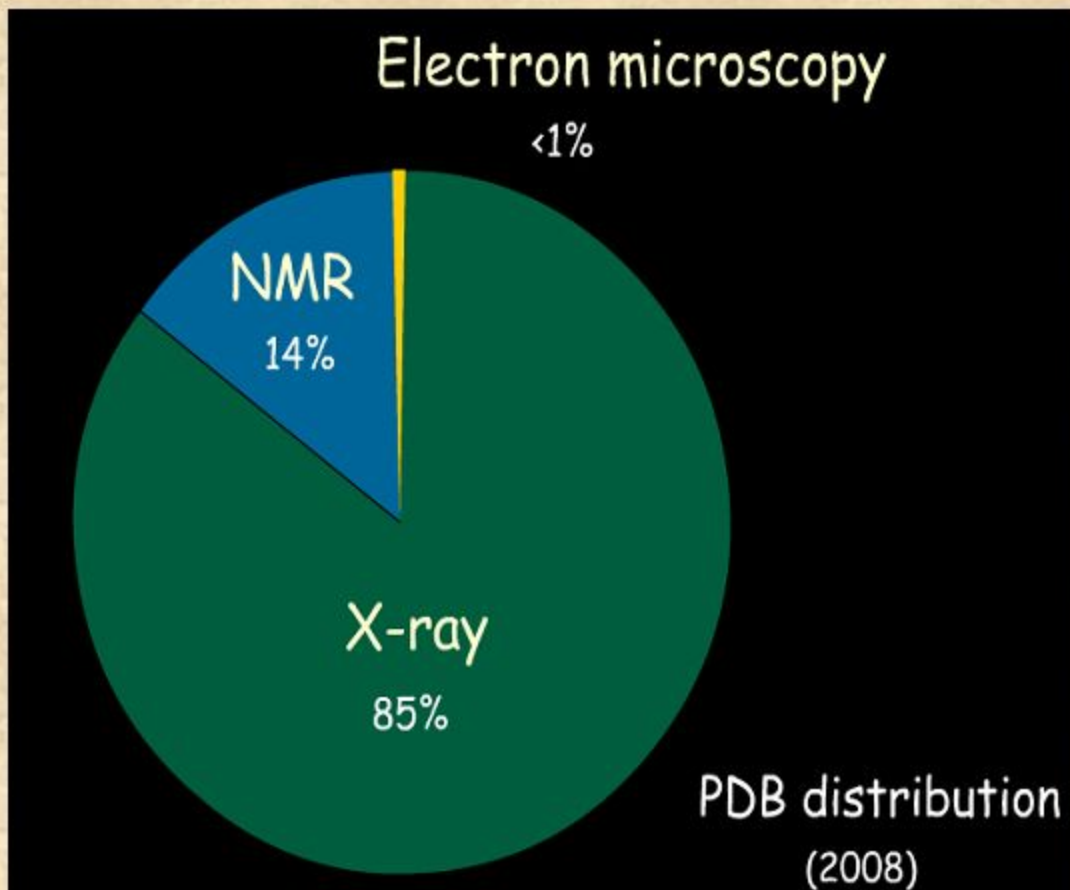
Динамика роста количества разрешённых структур



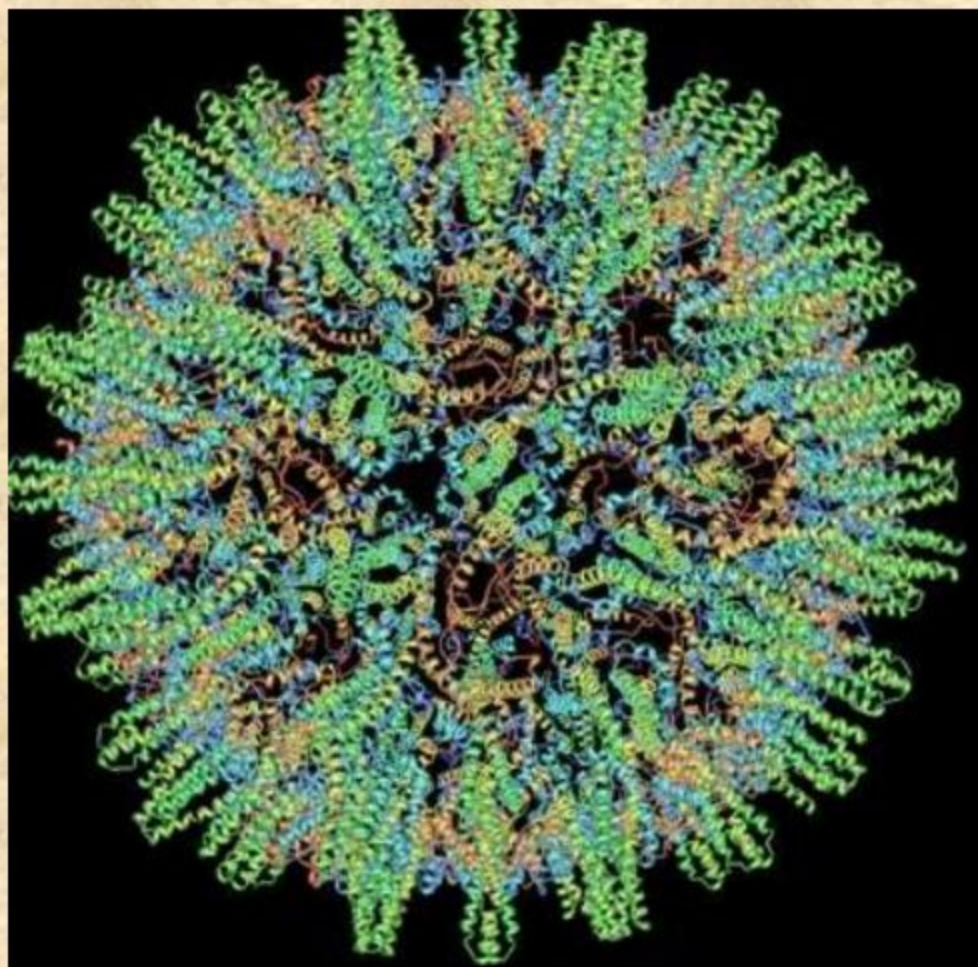
PDB сегодня

Экспериментальный метод	Белки	Нуклеиновые кислоты	Белок-НК комплексы	Другое	Всего
Рентгеноструктурный анализ	65950	1346	3261	2	70559
ЯМР	8185	979	186	7	9357
Электронная микроскопия	284	22	116	0	422
Гибридные методы	44	3	2	1	50
Другое	140	4	5	13	162
<i>Всего:</i>	74603	2354	3570	23	80550

Распределение разрешённых структур по экспериментальным методам



Преимущества метода рентгеноструктурного анализа.



- принципиально достижимо высокое разрешение. Разрешение выше 1 \AA позволяет определять степень протонирования а/к остатков в белках
- возможность разрешать структуры объектов большого размера (вирусная капсида, рибосома, фотосинтетический реакционный центр, т.д.), состоящих из нескольких десятков тысяч атомов.

Ограничения метода рентгеноструктурного анализа биомолекул

static view

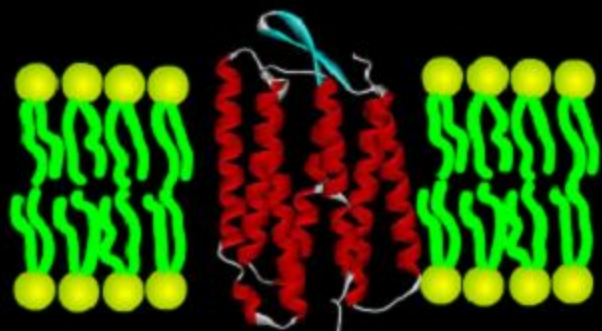


slow procedure

S	M	T	W	T	F	S
				1	2	3
4	5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16	17
18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	

20 человеклет на GroEL

can not be solved



contact effect

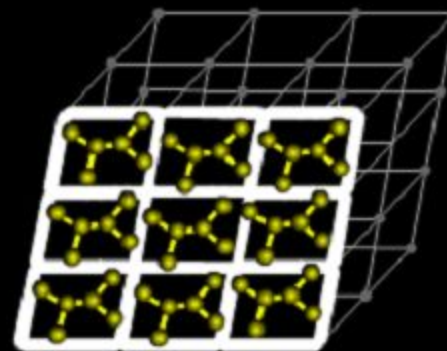
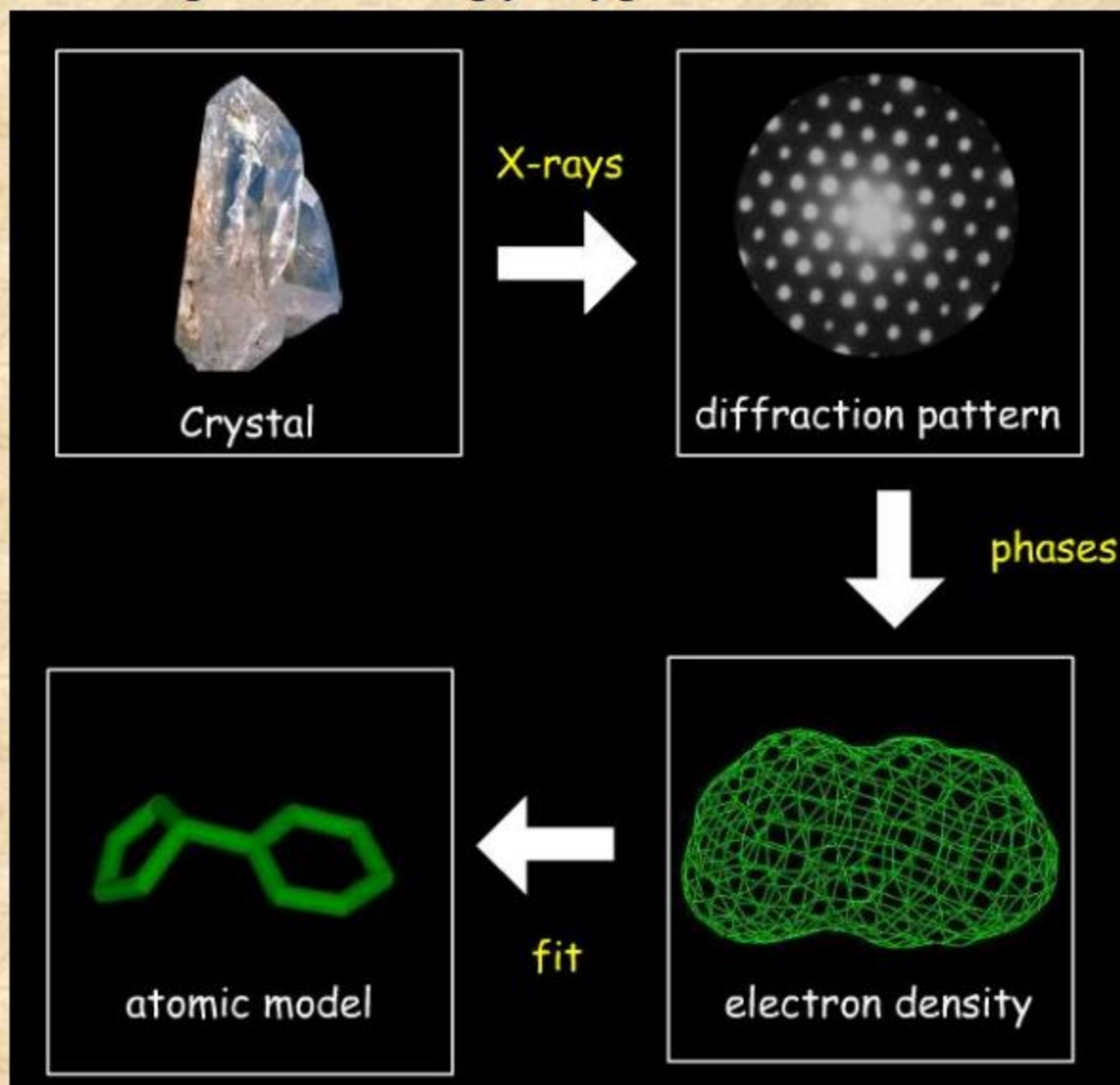
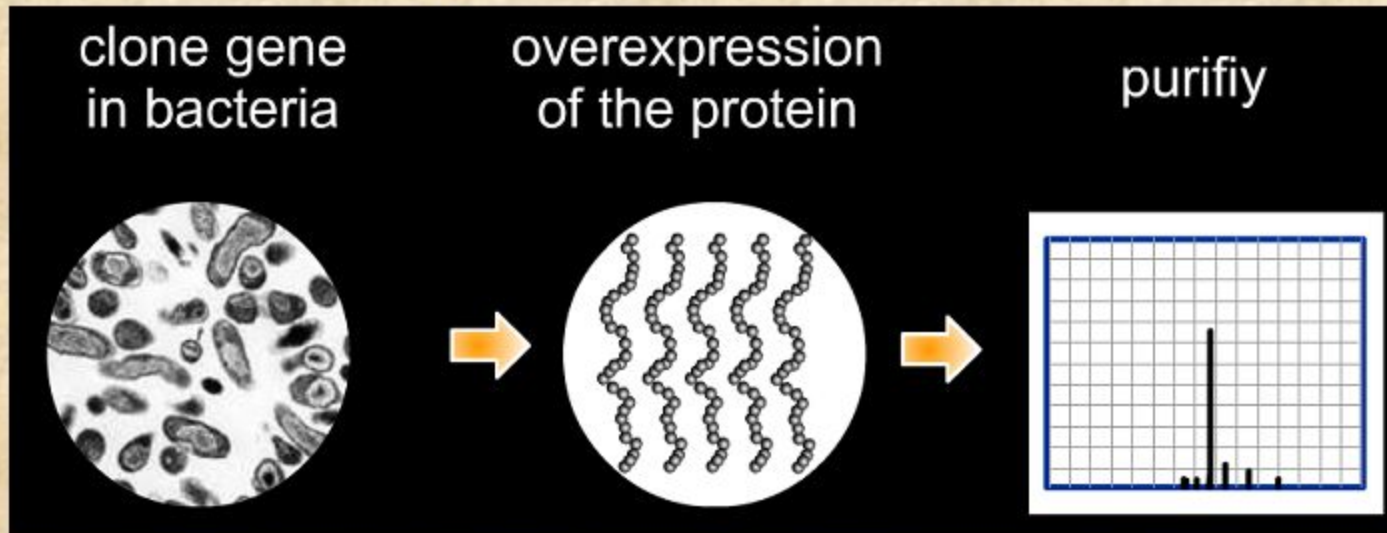


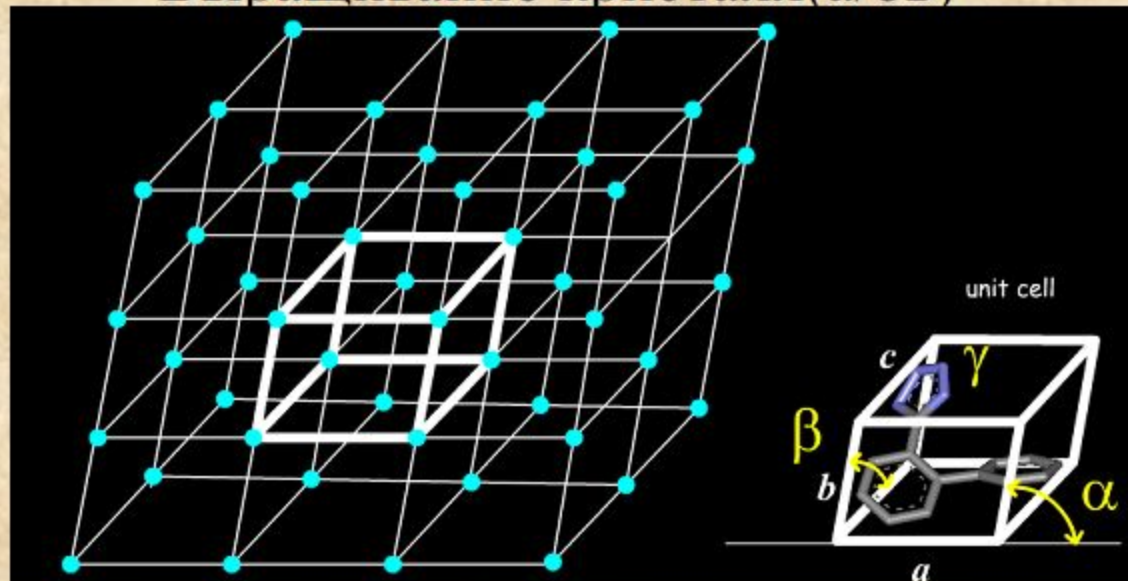
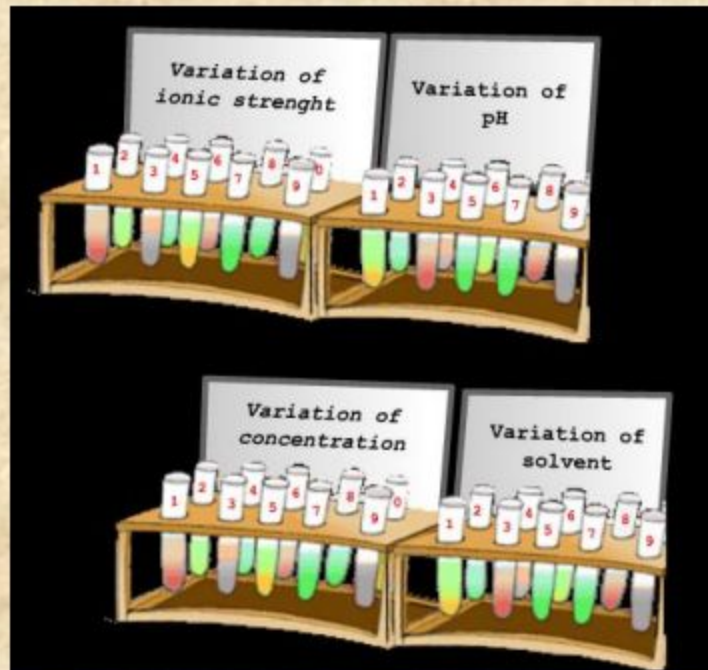
Схема рентгеноструктурного исследования



Наработка и очистка белка

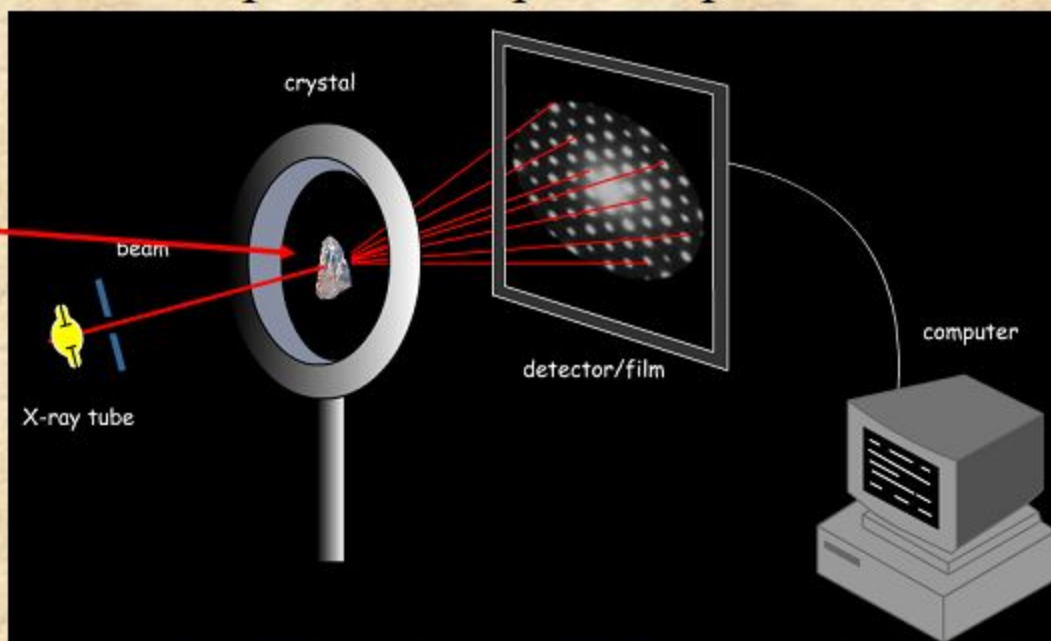


Выращивание кристалл(а/ов)

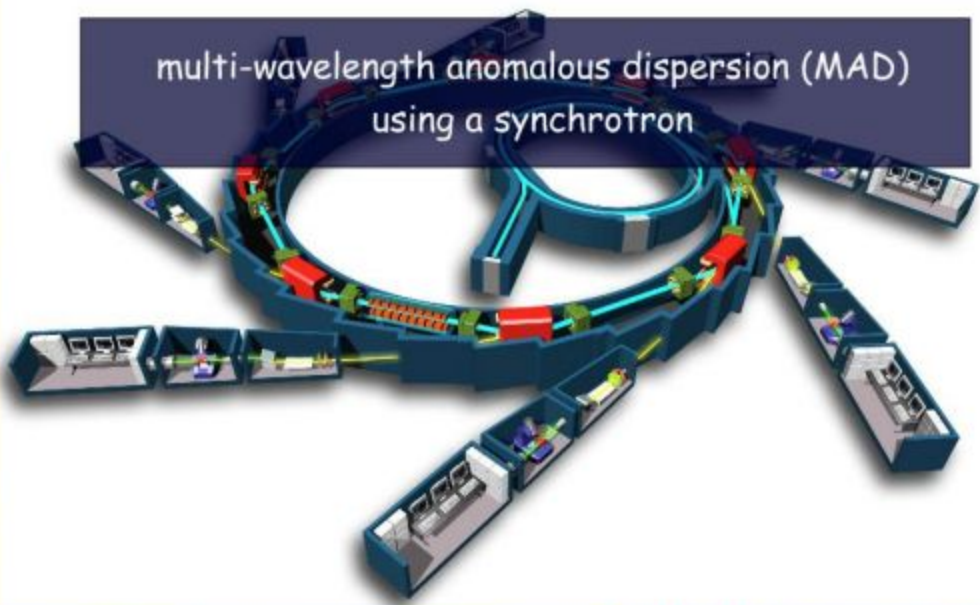


Снятие рентгенограмм кристаллов

Регулярный
Кристалл
Размером
От 0,3 мм



multi-wavelength anomalous dispersion (MAD)
using a synchrotron



<http://www.bruker-axs.de>

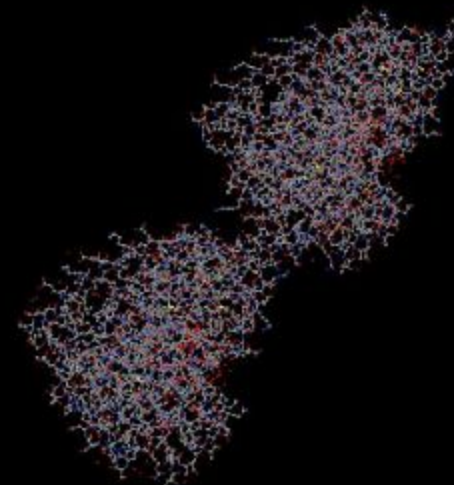


Определение координат тяжёлых атомов биомолекулы

Resolution = 1.9 Å

R-factor = 11%

					X	Y	Z
ATOM	17	C4	C A	1	15.917	28.226	25.120
ATOM	18	N4	C A	1	14.828	27.477	25.444
ATOM	19	C5	C A	1	15.719	29.442	24.471
ATOM	20	C6	C A	1	16.843	30.171	24.101
ATOM	21	P	G A	2	22.409	31.286	21.483
ATOM	22	O1P	G A	2	21.822	31.459	20.139
ATOM	23	O2P	G A	2	23.536	32.157	21.851
ATOM	24	O5*	G A	2	22.840	29.751	21.498
ATOM	25	C5*	G A	2	23.543	29.175	22.594
ATOM	26	C4*	G A	2	23.494	27.709	22.279
ATOM	27	O4*	G A	2	22.193	27.252	22.674



Molecular Conceptor v. 2.11, Synergix Ltd., USA

Protein Structure Initiative (NIGMS, NIH, USA, 2001-2010, 2011-2015 ?)



Выбор объекта

\$750M

Новая структура каждые 2 дня!

GroEL за 2 месяца.

4 крупных и 6 малых центров разрешили за 7 лет более 3000 белковых структур (40% новых структур)

Полуавтоматическая публикация

Валидация стр-ры, Помещение в PDB

Полуавтоматическое разрешение структуры

Кристаллизация

Отбор кристаллов, Сбор данных

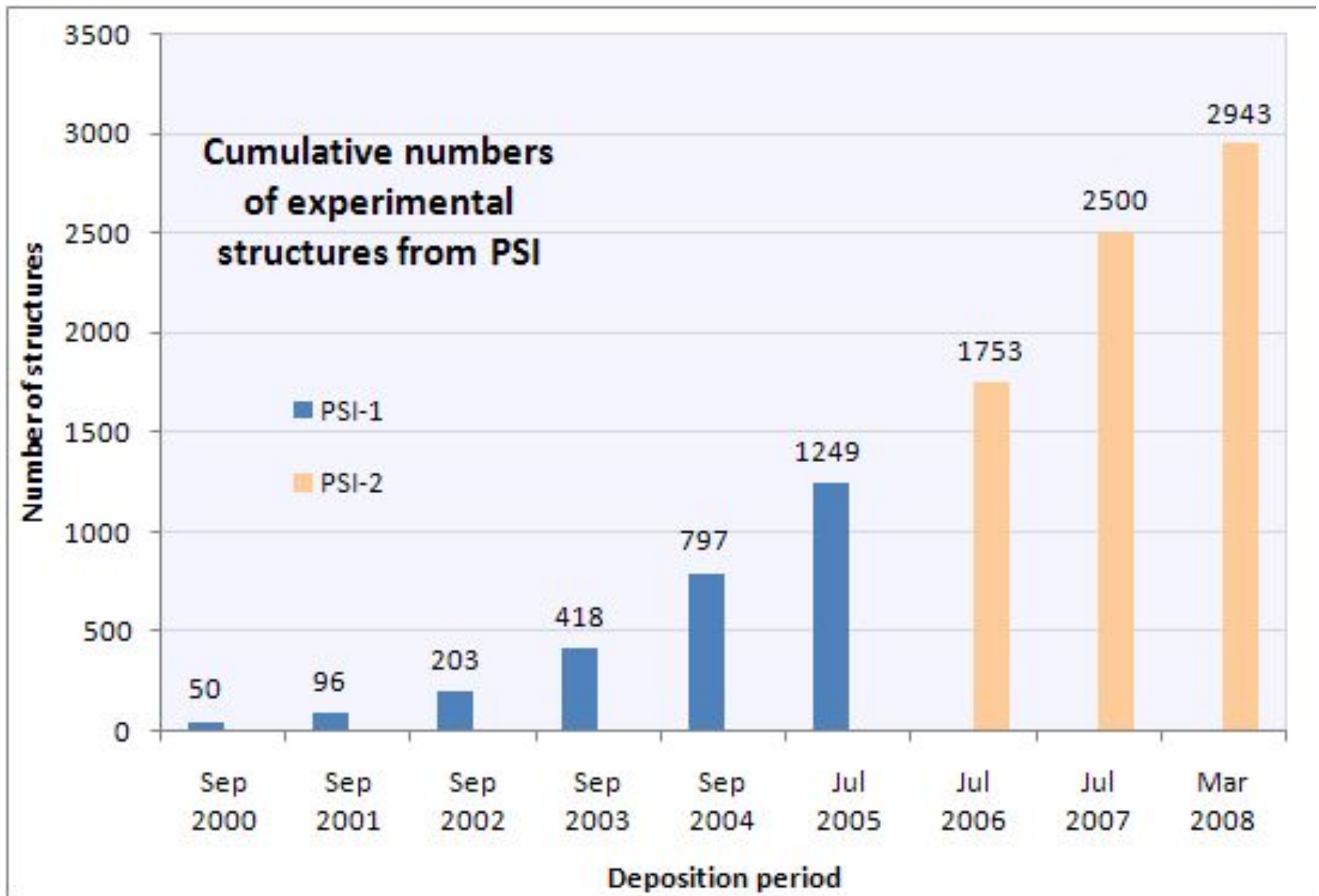
Экспрессия белка с высоким выходом

Высокоэффективная очистка

PSI

- **PSI-I** – 2000-2005. Цель – разработка высокопроизводительных методов для анализа структуры белка. Бюджет 270 млн. \$. 1100 структур, 700 уникальных. Объекты - *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans* and *Mycobacterium tuberculosis*.
- **PSI-II** – 2005-2010. Цель – масштабные исследования по определению структуры белков, преимущественно уникальных. Бюджет 325 млн. \$. 4800 структур, 4100 уникальных.
- **PSI-III** – использование разработанных подходов для решения важных биологических проблем, связанных с медициной.

Результаты PSI-I и PSI-II



Многомерная ЯМР спектроскопия



Преимущества:

- молекулы в растворе (тяжёлая вода), не нужно выращивать кристалл
- положения атомов водорода м.б. определены
- информация о динамике атомов м.б. определена

В белках $10^3 - 10^4$ протонов
Метильные и метиленовые группы 0,8-3,5 ppm, ароматические, индольные и иммидазольные кольца 6,5-8 ppm
В ДНК/РНК Н-2/Н-8 пуринов 8,4-9 ppm, Н-5 пиримидинов 6,3-6,6 ppm, Н-6 8,0-8,5 ppm, метильная группа тимидина 2,3-2,4 ppm.

Многомерная ЯМР спектроскопия



Преимущества:

- молекулы в растворе (тяжёлая вода), не нужно выращивать кристалл
- положения атомов водорода м.б. определены
- информация о динамике атомов м.б. определена

В белках $10^3 - 10^4$ протонов
Метильные и метиленовые группы 0,8-3,5 ppm, ароматические, индольные и иммидазольные кольца 6,5-8 ppm
В ДНК/РНК Н-2/Н-8 пуринов 8,4-9 ppm, Н-5 пиримидинов 6,3-6,6 ppm, Н-6 8,0-8,5 ppm, метильная группа тимидина 2,3-2,4 ppm.

Bruker Biospin AVANCE 1000

The World's First 1 Gigahertz NMR Spectrometer



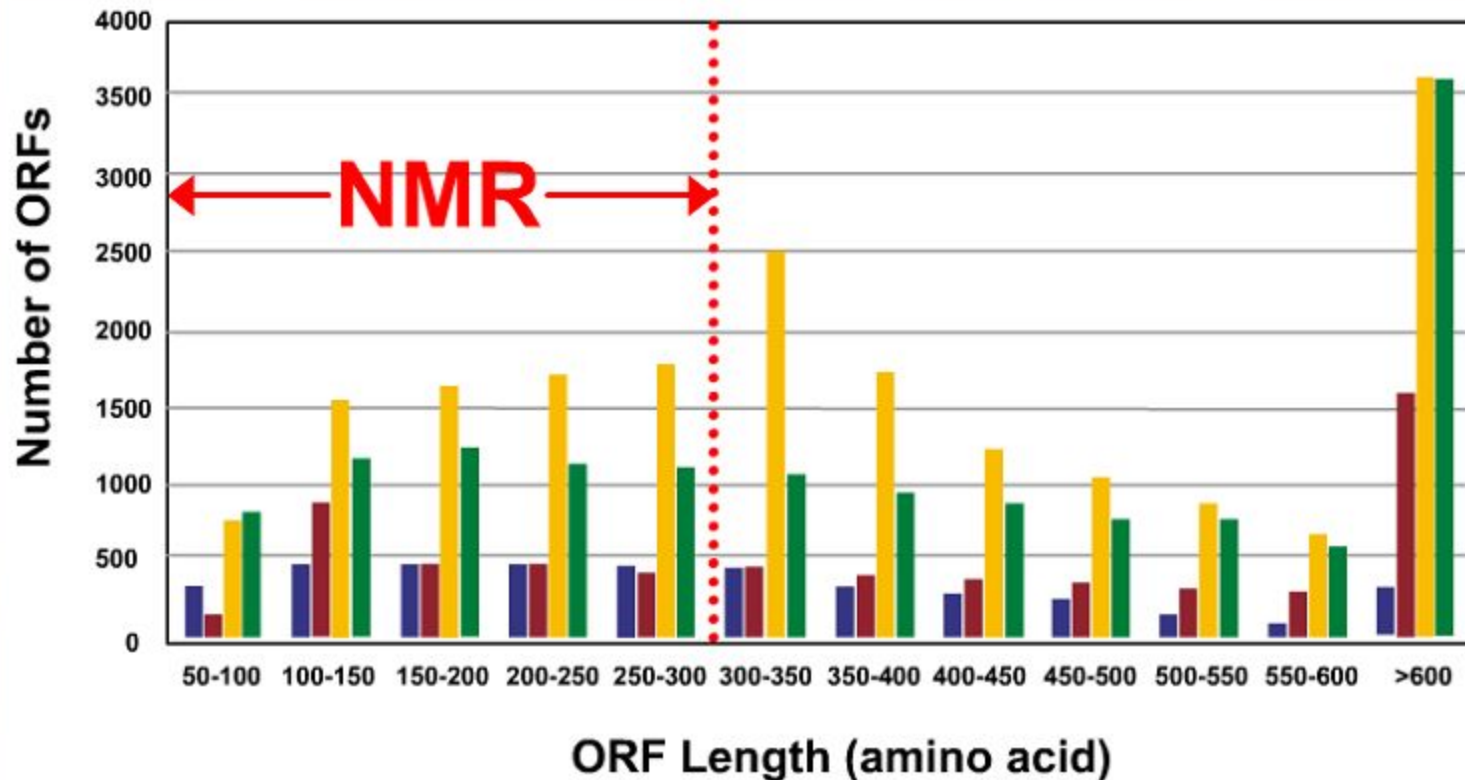
World's First 1 Gigahertz NMR Spectrometer based on unique 23.5 Tesla Standard-Bore, Persistent Superconducting Magnet (12-tonne, 4.5-metre-tall machine)

Dr. Lyndon Emsley,
European Centre for High
Field NMR (CRMN) in Lyon,
France.
Nature **463**,605(2010).

€11.7-million (US\$16.3-million)

<http://www.bruker-biospin.com/av1000-dir.html>

Ограничение метода многомерного ЯМР



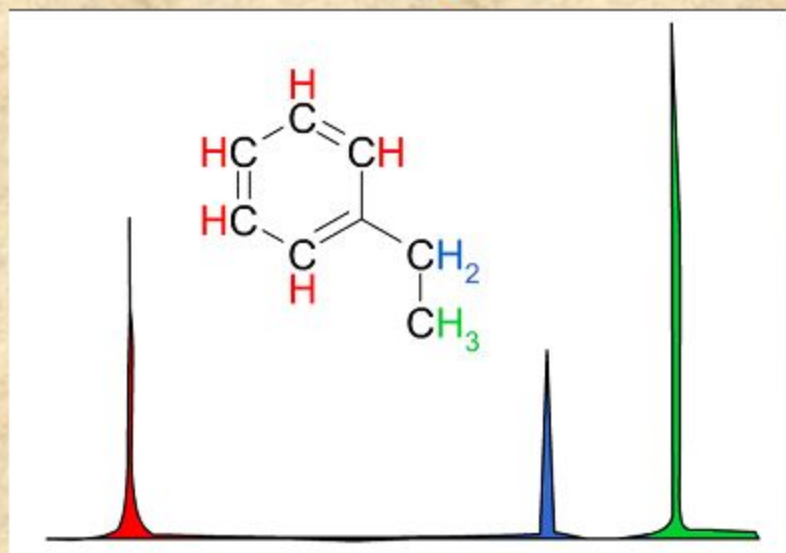
Molecular Conceptor v. 2.11, Synergix ltd., USA

- Структура белков < 300 а/к остатков м.б. Определена этим методом, что составляет менее половины известных белковых последовательностей. Известны примеры разрешения структур белков из 700 а/к.
- Дороговизна получения образцов с изменённым изотопным составом (^{13}C , ^{19}F , ^{31}P)
- Невысокая точность разрешения структуры

Физические принципы метода ядерного магнитного резонанса

without magnetic field **with magnetic field**

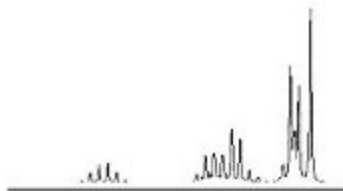
^1H , ^{13}C , ^{19}F and ^{31}P can spin in a magnetic field. The magnetic field stimulates nuclei, and enable to deduce the location of carbon and hydrogen atoms.



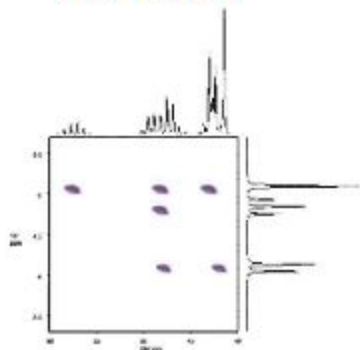
Характерные спектры
химических групп и
соединений

Сбор данных

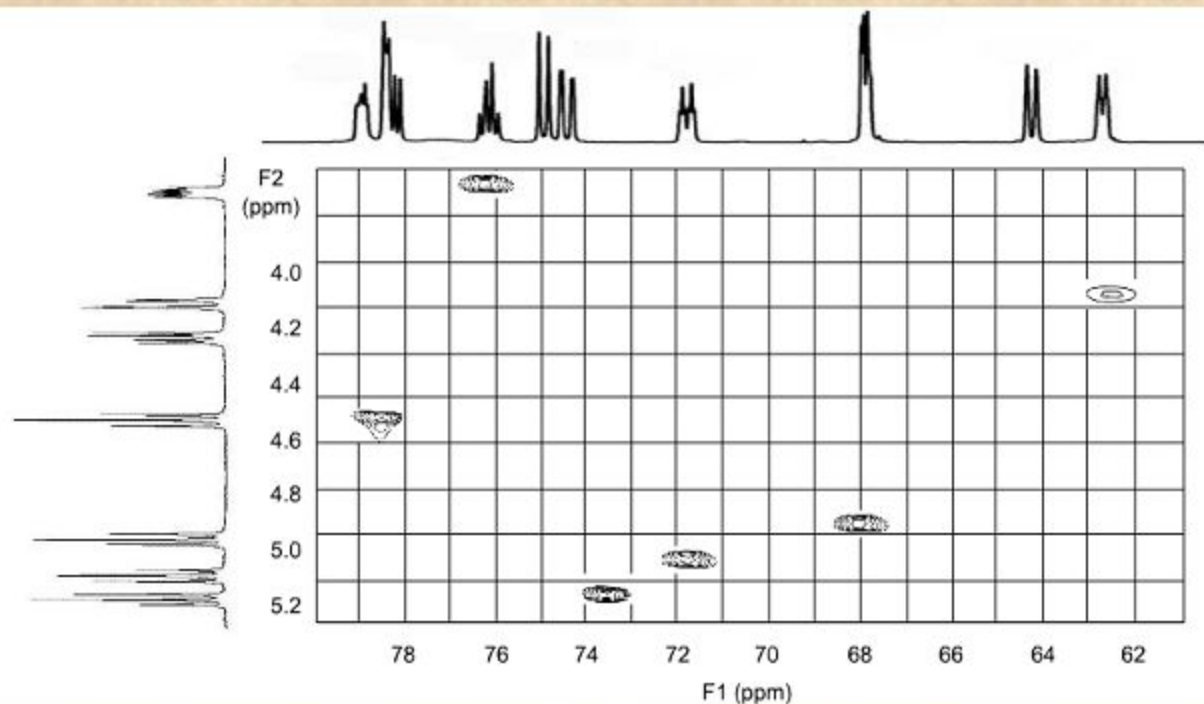
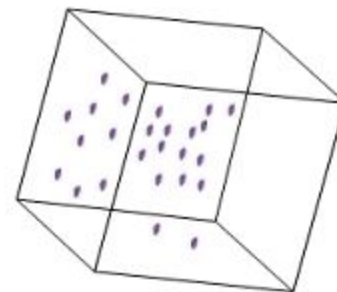
1D-NMR



2D-NMR

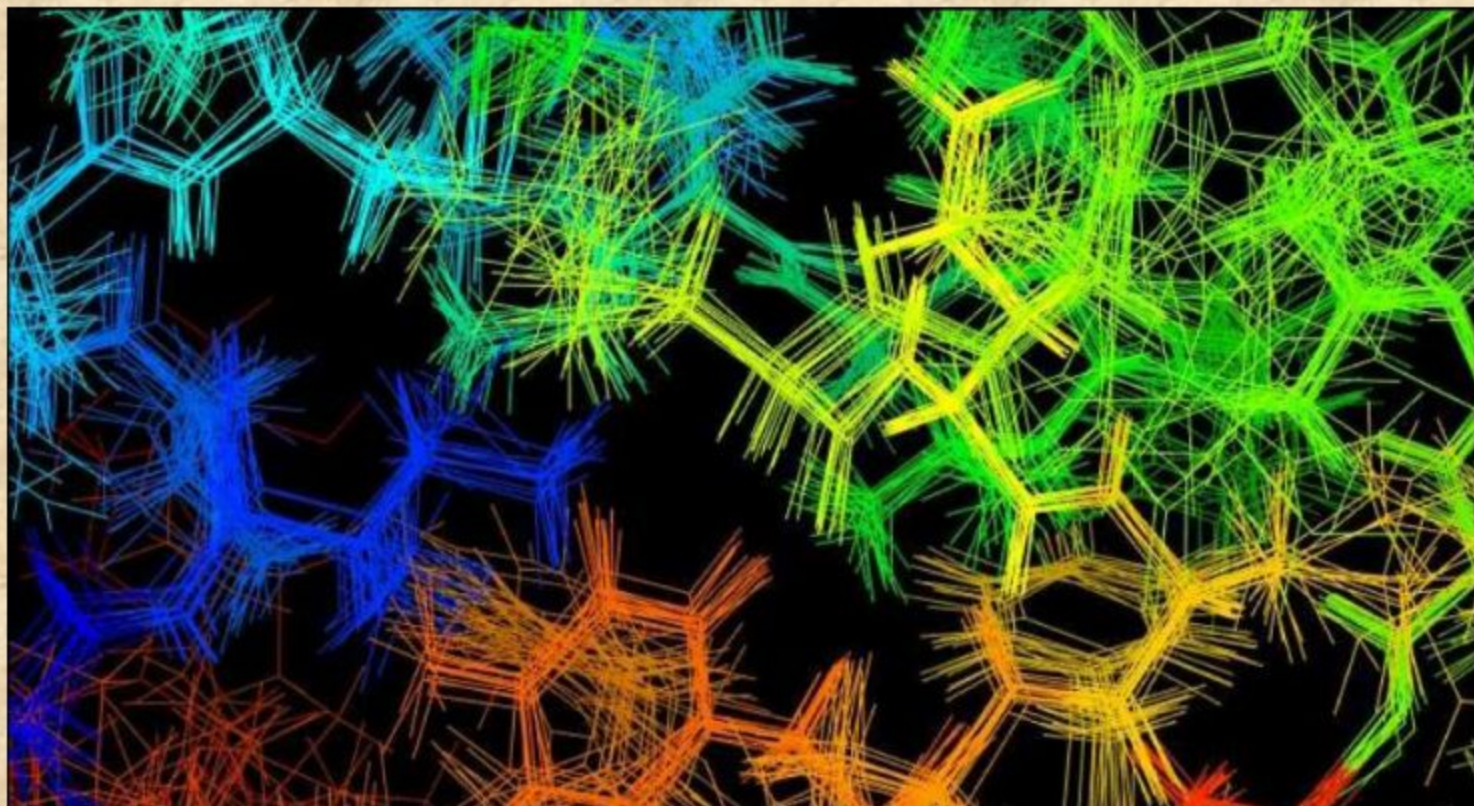


3D-NMR



Анализ,
Соотнесение
(assignment)

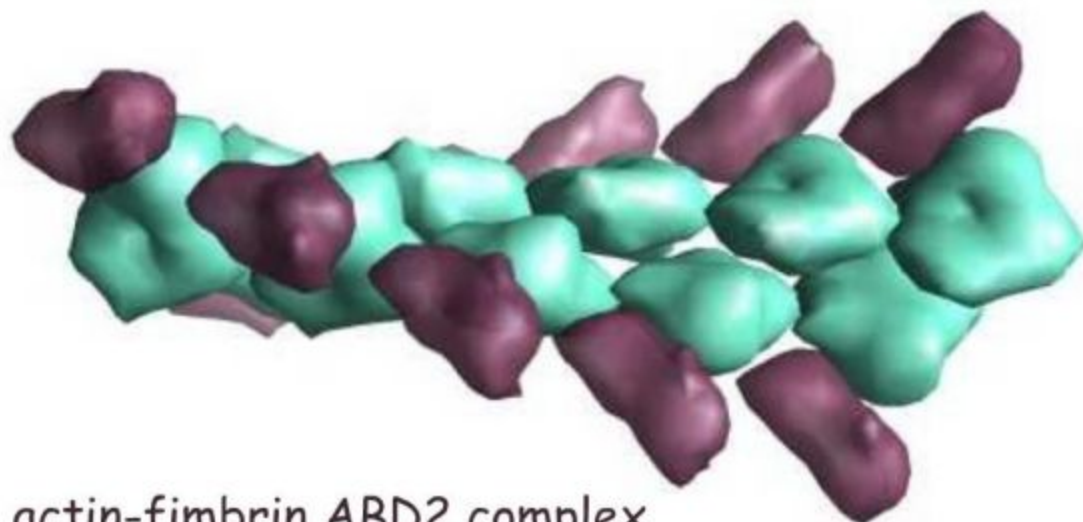
Определение координат атомов молекулы



Molecular Conceptor v. 2.11, Synergix Ltd., USA

Для структур разрешённых методом многомерного ЯМР представлено 10-20 структур. Усреднённая структура имеет наибольшую достоверность.

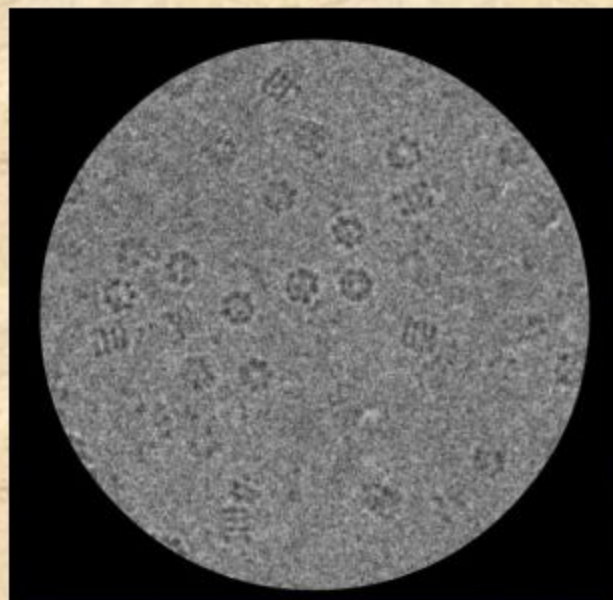
Электронная микроскопия



actin-fimbrin ABD2 complex

Определяется форма крупных межмолекулярных комплексов методом дифракции электронных пучков. Типичное разрешение этого метода 3-5 Å не позволяет определять координаты атомов.

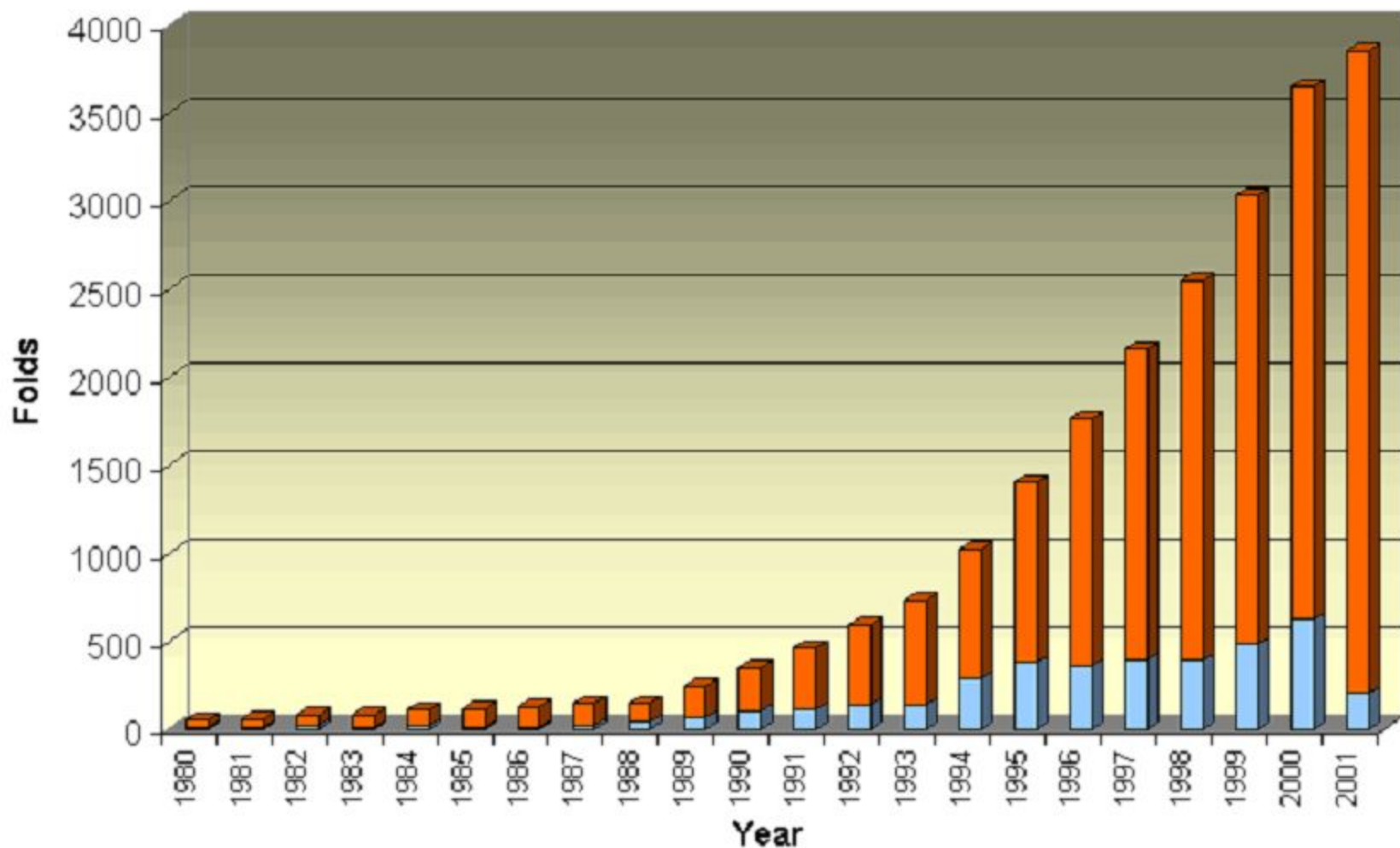
Molecular Conceptor v. 2.11, Synergix ltd., USA



Образцы в **замороженном** состоянии, что предотвращает радиационные повреждения и удерживает их в нативном состоянии.



Количество новых фолдов в банке белковых структур



Голубым цветом количество «новых» фолдов, оранжевым количество «старых» фолдов. PSI ставит своей целью разрешение структур с новыми фолдами в ущерб биологической значимости белка, что вызывает критику оппонентов.

Актуальность разработки методов моделирования белковых структур

Увеличивающийся разрыв между определёнными первичными структурами белков (11,000,000 в базе SWIS-PROT/TrEMBL) и количеством разрешённых белковых структур (59,000 из которых только около 5,500 непохожи друг на друга) указывает на необходимость разработки **методов предсказания третичных структур белков**.

Поскольку в настоящее время *отсутствуют надёжные теоретические методы** прямого предсказания третичной структуры белков из первичной, методы предсказания должны основываться на структурах известных белков.

Это подразумевает, что *структуры неизвестного и опорного (reference) белков должны быть похожи или гомологичны. О степени гомологичности белков судят по степени идентичности их первичных структур.*

Анализ эволюционно связанных белков показал, что при небольших эволюционных расстояниях степень их гомологичности, определённая по первичной структуре, достаточно высока.

При возрастании эволюционного расстояния **гомология по последовательности становится трудно уловимой, однако укладка полипептидной цепи (фолд/folding) остаются схожими.**

Суть моделирования третичной структуры по гомологиям – выравнивание последовательностей моделируемого и опорного белков с последующим переносом элементов структуры опорного белка на моделируемый.

* В работе Qian *et al.*, Nature 450, 259-264(2007) была аккуратно de novo предсказана третичная структура белка из 112 а/к остатков. **ROSETTA@HOME** сеть включает более 70,000 компьютеров.