

ВВЕДЕНИЕ В МОЛЕКУЛЯРНУЮ БИОФИЗИКУ

- Предмет молекулярной биофизики
- Специфика биомакромолекул
- Обзор методов, используемых для изучения биомакромолекул. Рентгеноструктурный анализ
- Пространственные структуры биомакромолекул
- Силы, стабилизирующие биомакромолекулы

ПРЕДМЕТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОФИЗИКИ

- РАСКРЫТЬ ПРИРОДУ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АТОМАРНЫХ ГРУПП, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ КОНФОРМАЦИИ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ,
- ВЫЯВИТЬ МЕХАНИЗМЫ ЭЛЕКТРОННЫХ И КОНФОРМАЦИОННЫХ ПЕРЕХОДОВ,
- РАСКРЫТЬ МЕХАНИЗМ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ

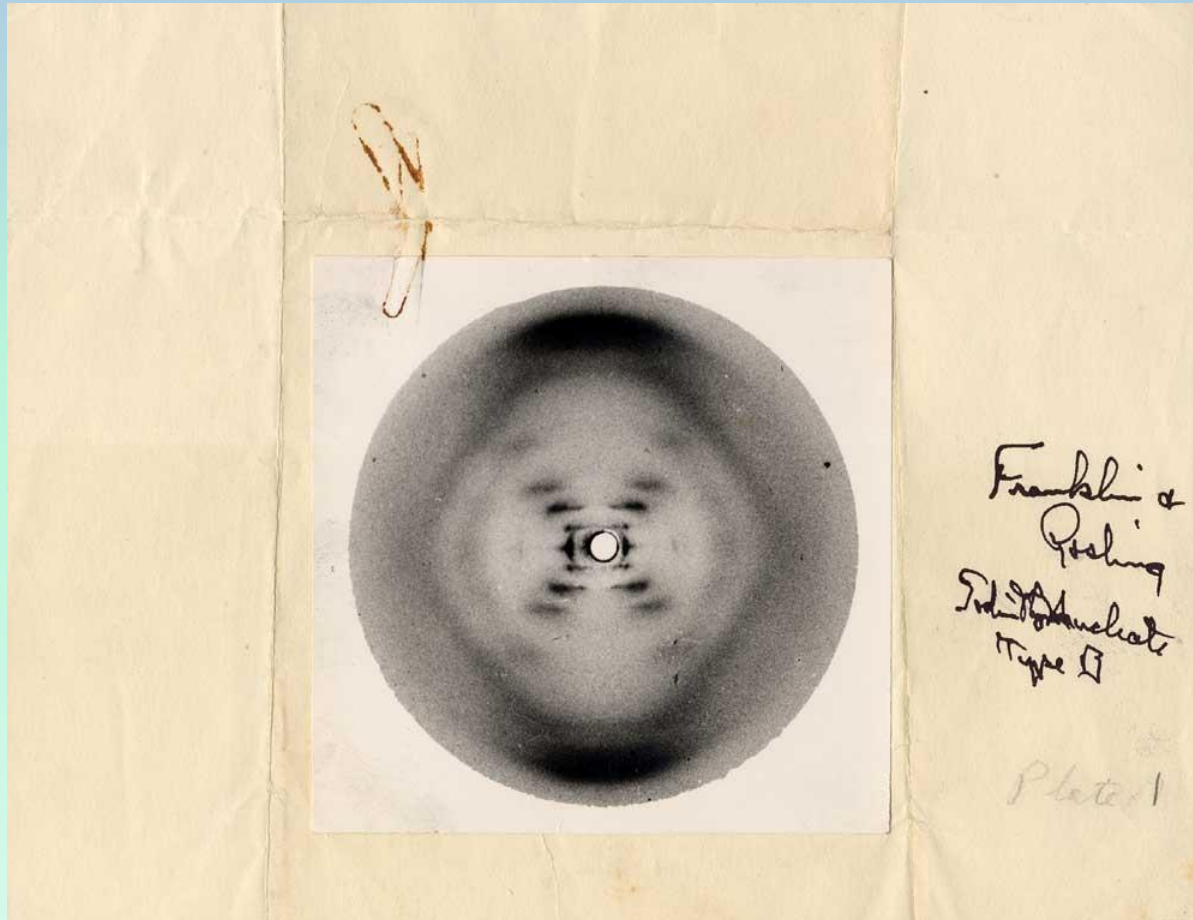
СПЕЦИФИКА БИОМАКРОМОЛЕКУЛ

1. СТАТИСТИЧЕСКИЙ ХАРАКТЕР ПОВЕДЕНИЯ, Т.К. БИОМАКРОМОЛЕКУЛЫ СОСТОЯТ ИЗ БОЛЬШОГО ЧИСЛА ОДНОТИПНЫХ ЗВЕНЬЕВ – МОНОМЕРОВ.
2. НАЛИЧИЕ НЕ ТОЛЬКО ХИМИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ, НО И ДРУГИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ РАЗНОГО ТИПА, ЧТО ОГРАНИЧИВАЕТ ЧИСЛО ВОЗМОЖНЫХ КОНФОРМАЦИЙ.

**МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
БИОМАКРОМОЛЕКУЛ
(обзор)**

В 1953 **Дж. Уотсон** и **Ф.Крик** предложили модель молекулы ДНК, которая хорошо согласовалась с результатами **рентгенографических** исследований ДНК, полученными **М.Уилкинсом** и **Р. Франклин**.

РЕНТГЕНОГРАММА ДНК, ПОЛУЧЕННАЯ РОЗАЛИНДОЙ ФРАНКЛИН



**Розалинда
Франклин
(1920–1958)**



**Л.Полинг
1901 - 1994**

Первые
рентгенограммы
белков получены
еще в 30-х годах (**У.
Астбюри, Л.Полинг,
Р.Кори**).

РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ

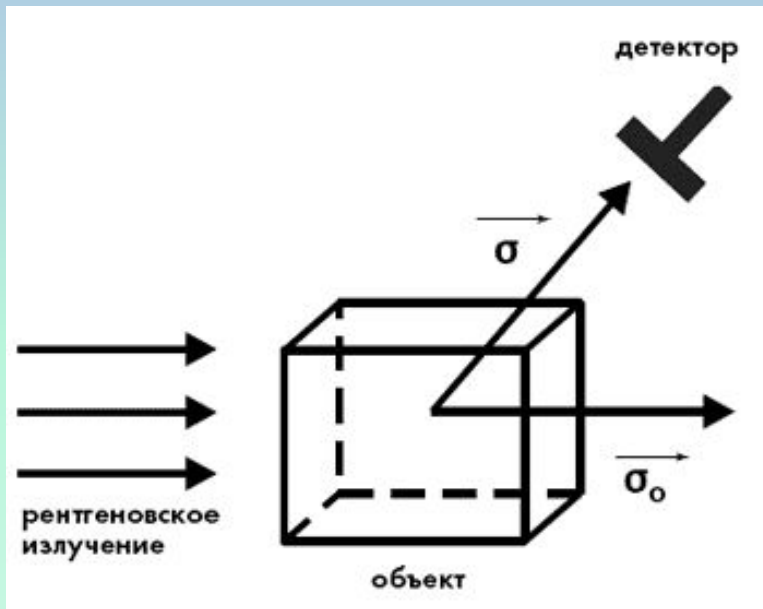
- ПРЯМОЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ
- ПОЗВОЛЯЕТ ОПРЕДЕЛИТЬ РАСПОЛОЖЕНИЕ ВСЕХ АТОМОВ В ТРЕХМЕРНОМ ПРОСТРАНСТВЕ
- ИМЕЕТ ОГРАНИЧЕНИЯ

Рентгеновский структурный анализ

Взаимодействие рентгеновского излучения с
электронами вещества.



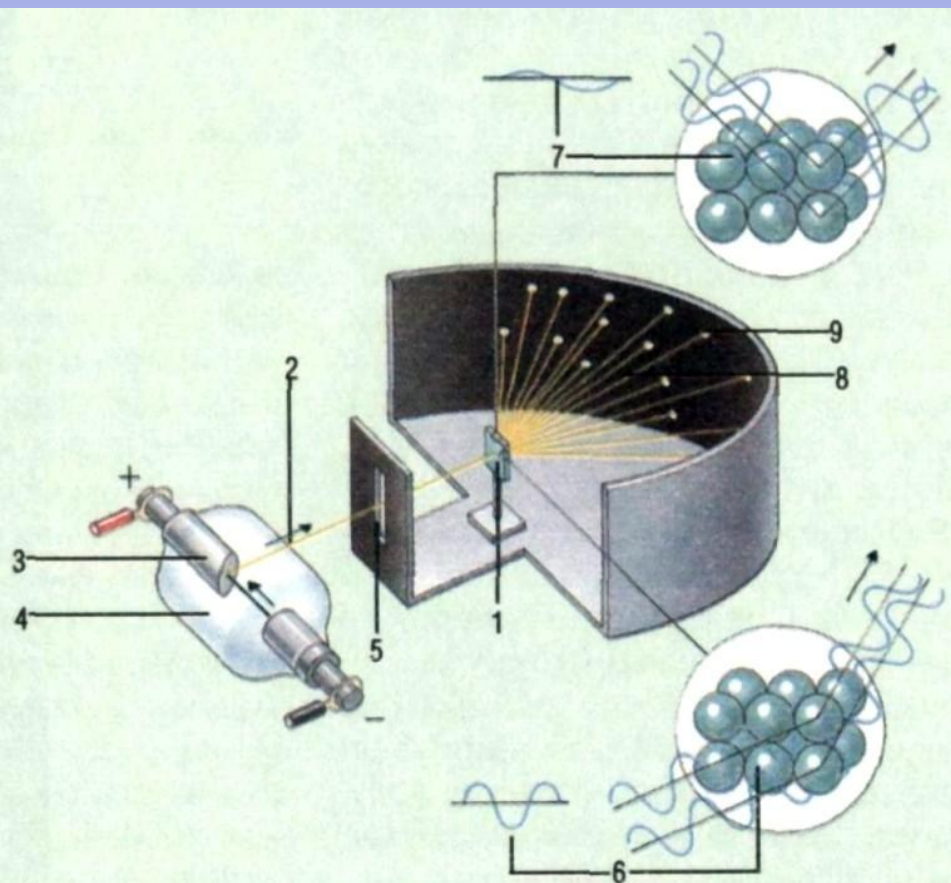
~~Дифракция рентгеновских лучей~~ (рассеяние пучка
рентгеновских лучей атомной структурой кристалла).



Принципиальная схема :
исследуемый объект помещают в пучок рентгеновских лучей и измеряют интенсивность рассеянного в различных направлениях излучения.

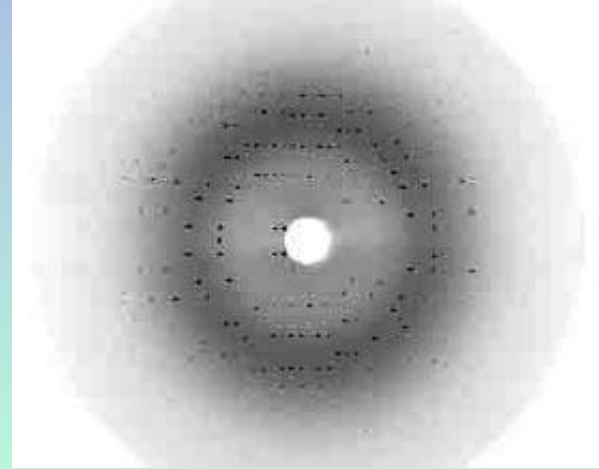
Основные положения

1. Пучок рентгеновских лучей является плоской монохроматической электромагнитной волной.
2. Под воздействием этой электромагнитной волны каждый электрон образца приходит в движение.
3. Движущийся электрон - источник новой рассеянной сферической электромагнитной волны, распространяющейся во всех направлениях.
4. Эти новые волны суммируются и определяют интенсивность излучения в интересующем нас направлении.



**Кристаллический образец (1)
рентгеновские лучи (2).
Рентгеновские лучи образуются при
бомбардировке вольфрамового анода
(3) электронами в вакууме (4).
Прорезь (5) фокусирует лучи на
кристалле.
Расстояние между плоскостями
атомов в кристалле либо усиливает
(6), либо ослабляет (7) рентгеновские
лучи.
Когда луч усиливается,
возникающий луч (8) создает пятно
(9) на фотопленке. Рисунок пятен
служит для установления точной
структуры молекулы**

1. Из данных **рентгенограммы** получают **карту распределения электронной плотности** в кристалле исследуемого объекта.



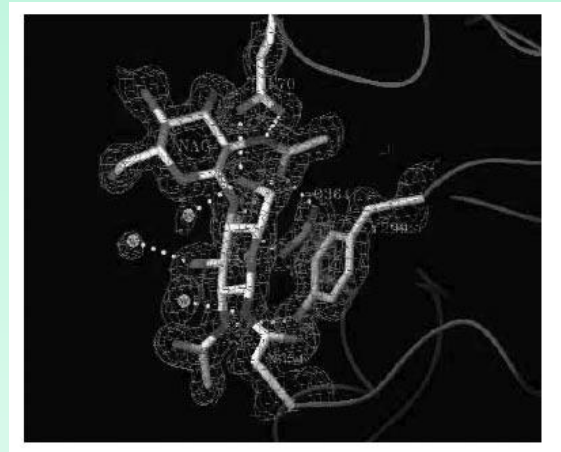
Принципиальная трудность: невозможность получить из эксперимента всю информацию, необходимую для восстановления исследуемой структуры.

Для получения недостающей части информации используют различные обходные пути. Но универсального пути нет, и в каждом случае исследователь выбирает наиболее подходящий, основываясь на своем опыте и интуиции

2. На основании карты распределения электронной плотности определяют **положения атомов** в исследуемом объекте.

Для решения этой задачи структура многократно подвергается программной обработке и ручной доводке для достижения наилучшего совпадения с электронной плотностью

Модель, вписанная в карту электронной плотности



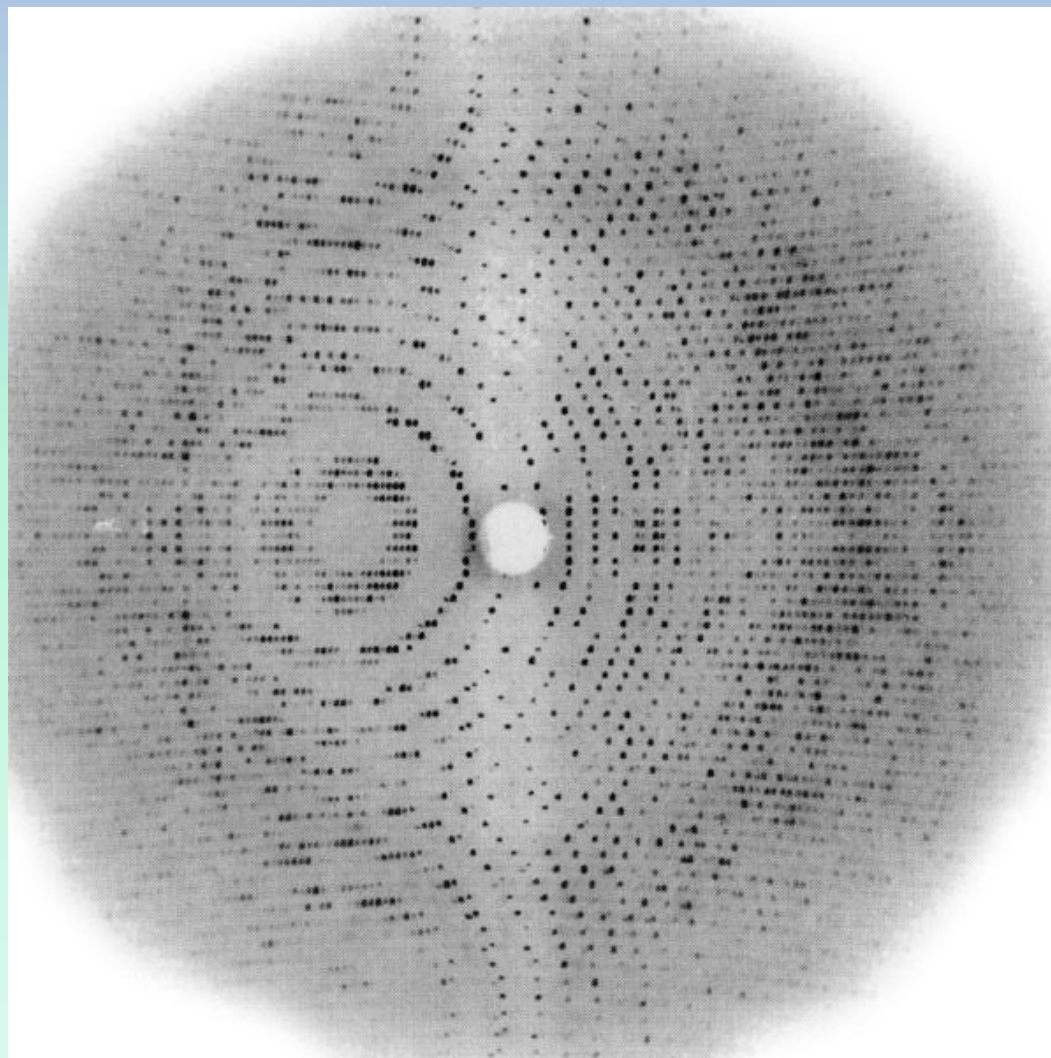
Основные этапы определения структуры белка

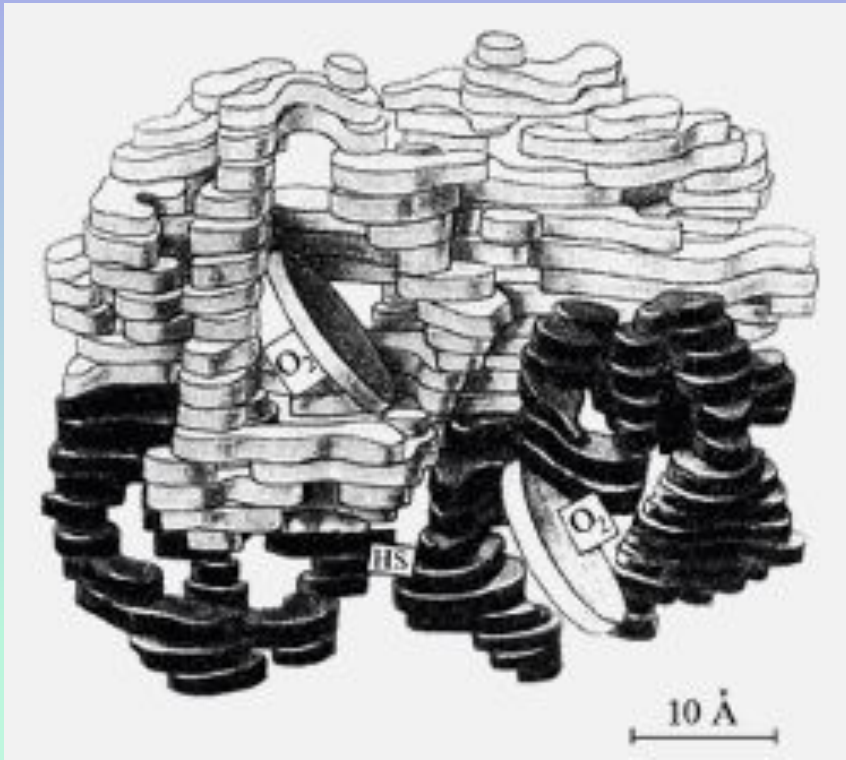
□Выделение, очистка

□Кристаллизация

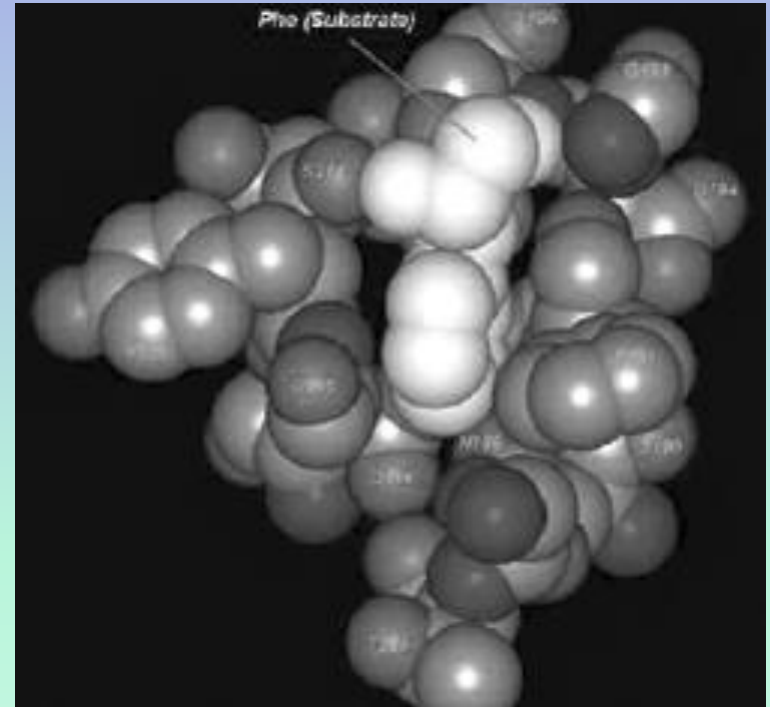
***□Рентгеновский эксперимент, обработка
результатов***

РЕНТГЕНОГРАММА БАКТЕРИАЛЬНОГО БЕЛКА





Схематичная модель
молекулы гемоглобина
(М.Ф.Перутц, 1960 г.)



**Структура фермента
дуоденазы с
молекулой субстрата**

Рентгеноструктурный анализ
белковой молекулы позволяет
установить

- **Последовательность**
аминокислотных остатков в цепи
- **Закономерности конфигурации**
белковой молекулы

ОГРАНИЧЕНИЕ МЕТОДА:

С ПОМОЩЬЮ РЕНГГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ МОЖНО ИССЛЕДОВАТЬ ТОЛЬКО ТЕ БЕЛКИ, КОТОРЫЕ **КРИСТАЛЛИЗУЮТСЯ**.

ЭТО СУЖАЕТ ОБЛАСТЬ ПРИМЕНИМОСТИ МЕТОДА РЕНТГЕНСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА.

ПРИЧИНА: кристаллы обладают строгой периодичностью строения и представляют собой природную дифракционную решётку для рентгеновских лучей.

для определения **МАССЫ, РАЗМЕРОВ, ГИБКОСТИ** БИОМАКРОМОЛЕКУЛ
ИСПОЛЬЗУЮТСЯ

- **ЭЛЕКТРОФОРЕЗ**
- **ВИСКОЗИМЕТРИЯ**
- **СЕДИМЕНТАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ**
- **КВАЗИУПРУГОЕ РАССЕЯНИЕ СВЕТА**
- **ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ**

для изучения **ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ**
ИСПОЛЬЗУЮТСЯ

- СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ
- ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ
- КРУГОВОЙ ДИХРОИЗМ
- ДИСПЕРСИЯ ОПТИЧЕСКОГО ВРАЩЕНИЯ

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ

ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ **ДИНАМИКИ**
БИОМАКРОМОЛЕКУЛ ИСПОЛЬЗУЮТСЯ

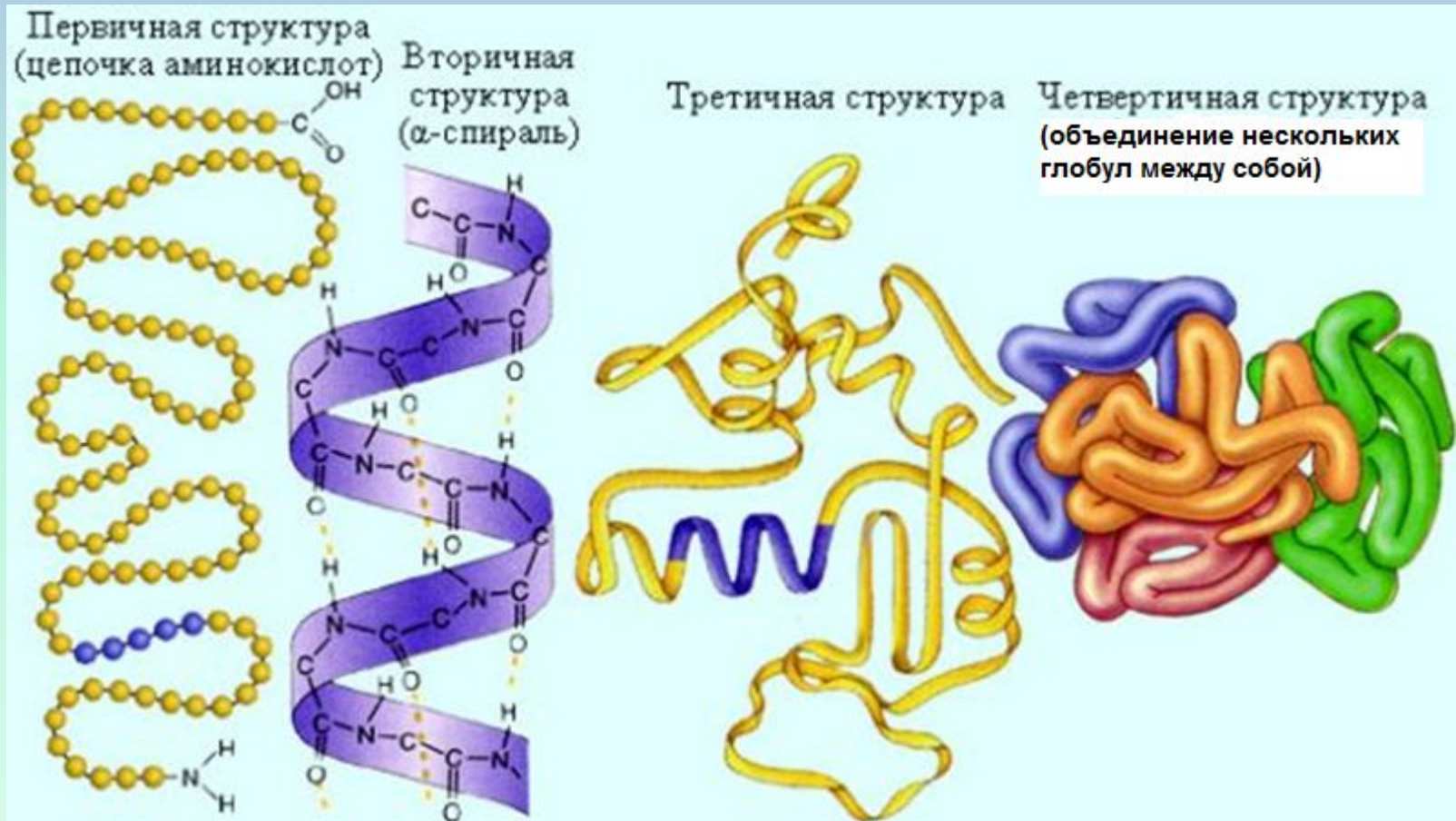
- **ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ**
- **ЯМР**
- **ЭПР**

КОНФОРМАЦИИ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ

УРОВНИ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКА



ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА



УРОВНИ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКА (по Шульцу и Ширмеру)



СИЛЫ, СТАБИЛИЗИРУЮЩИЕ СТРУКТУРУ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ, СТАБИЛИЗИРУЮЩИЕ СТРУКТУРУ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ

```
graph TD; A[ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ, СТАБИЛИЗИРУЮЩИЕ СТРУКТУРУ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ] --> B[СИЛЬНЫЕ СВЯЗИ]; A --> C[ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ СВЯЗИ]; A --> D[СЛАБЫЕ СВЯЗИ]; B --> B1[• КОВАЛЕНТНЫЕ]; B --> B2[• ИОННЫЕ]; C --> C1[• ВОДОРОДНЫЕ]; D --> D1[• ВАН-ДЕР-ВААЛЬСОВЫ]; D --> D2[• ГИДРОФОБНЫЕ];
```

СИЛЬНЫЕ СВЯЗИ

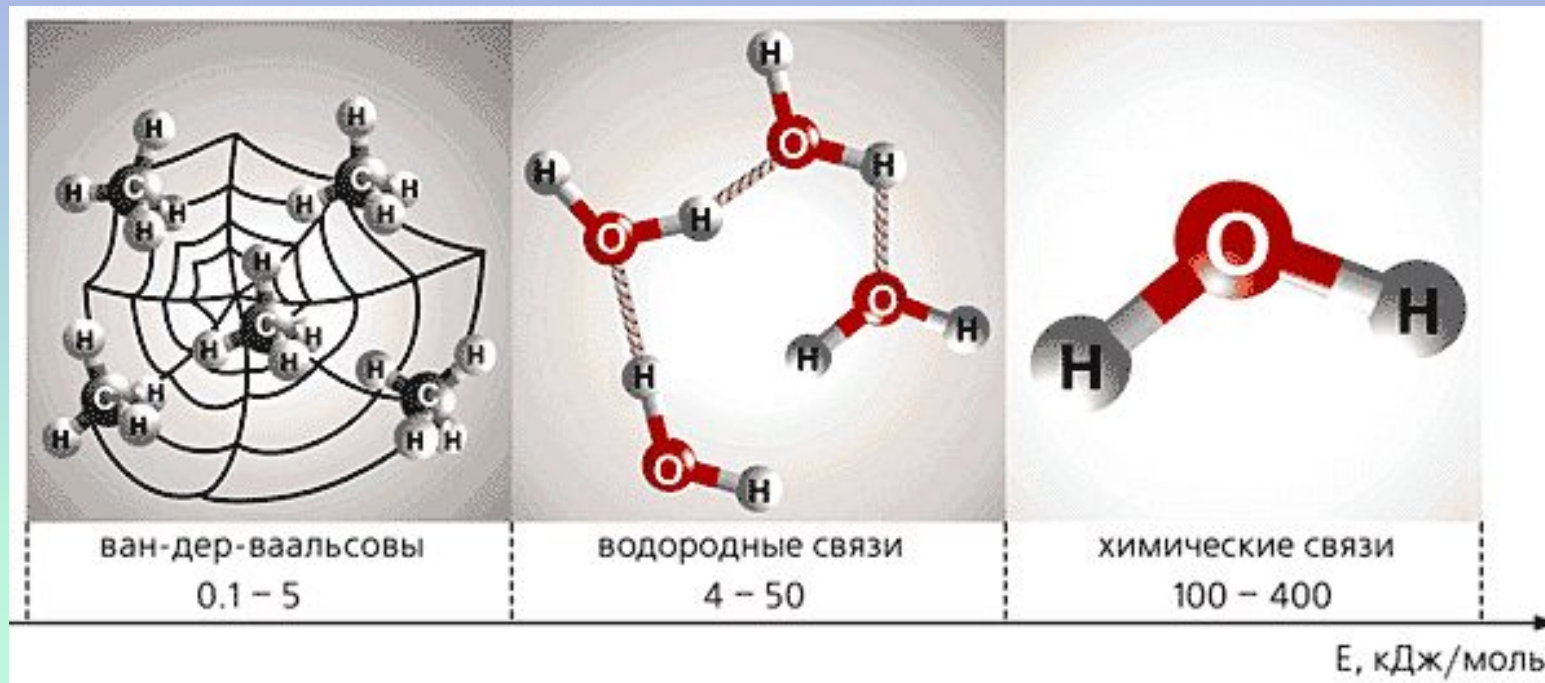
- КОВАЛЕНТНЫЕ
- ИОННЫЕ

ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ СВЯЗИ

- ВОДОРОДНЫЕ

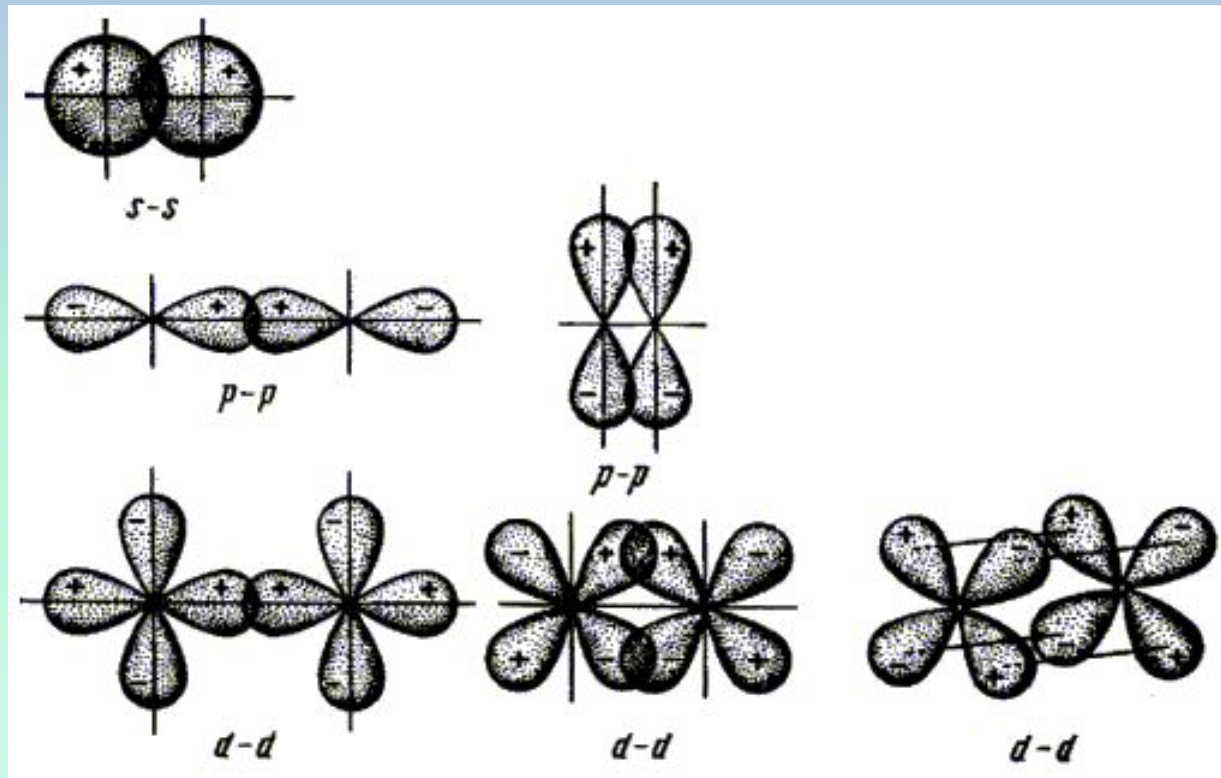
СЛАБЫЕ СВЯЗИ

- ВАН-ДЕР-ВААЛЬСОВЫ
- ГИДРОФОБНЫЕ

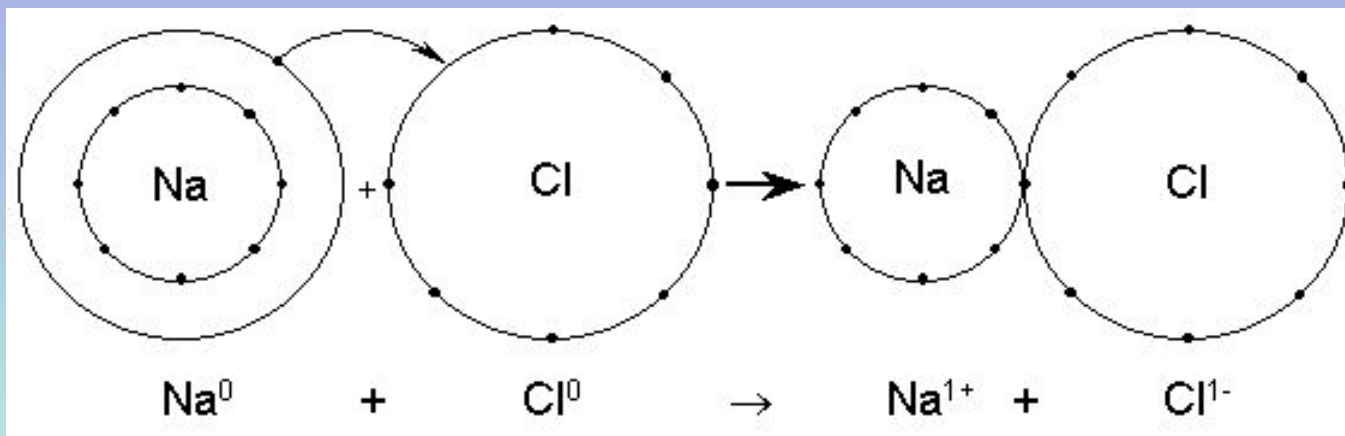


ЭНЕРГИЯ ТЕПЛОВЫХ КОЛЕБАНИЙ – 2,5 кДж/моль

КОВАЛЕНТНЫЕ СВЯЗИ

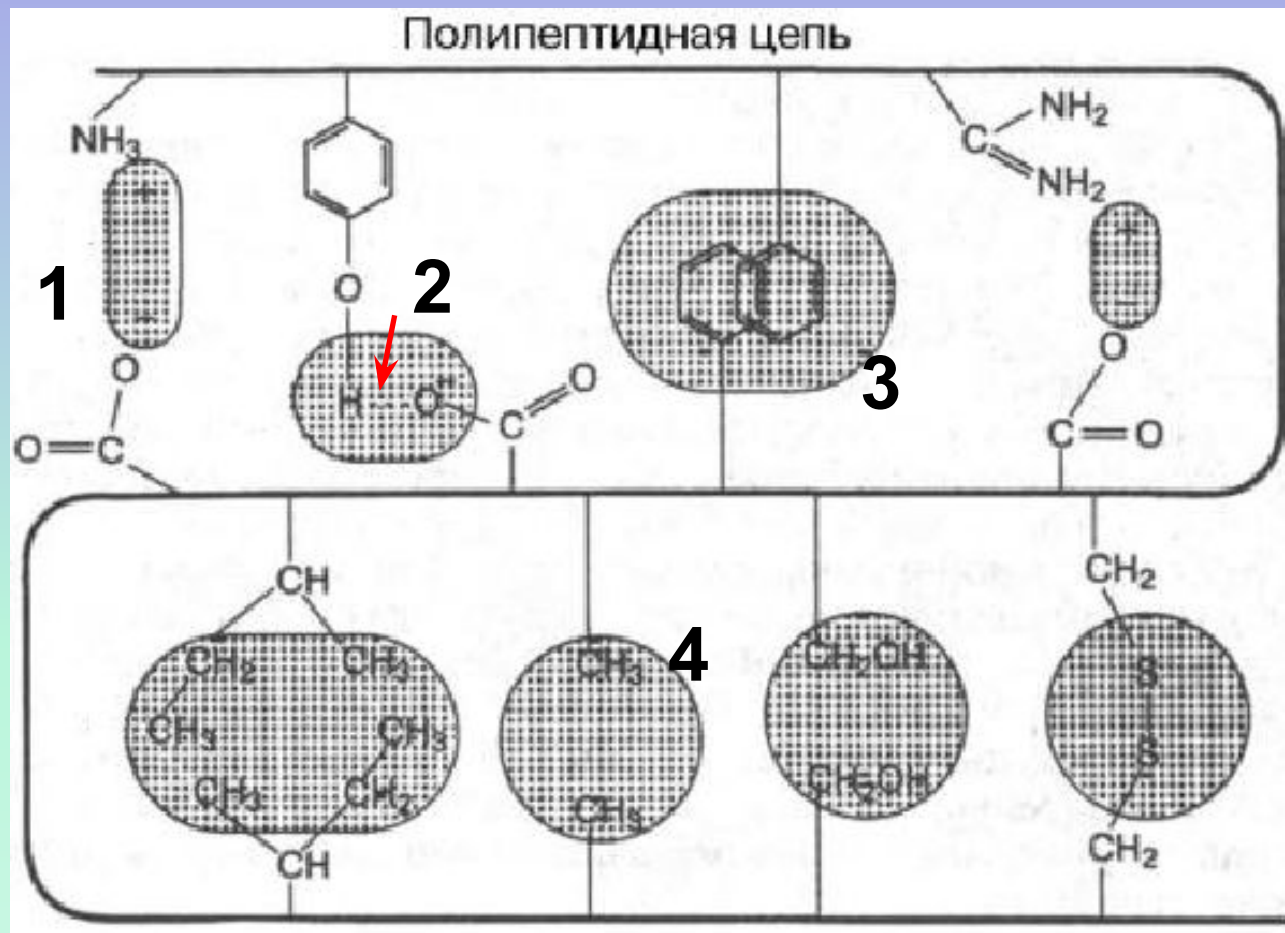


Схемы перекрывания орбиталей при образовании s -, p -, d -связей



Образование ионов Na^+ и Cl^-

Ионная связь – взаимодействие двух нейтральных атомов которое сопровождается истинным переносом электрона от одного атома к другому, образуются при этом анионы и катионы.



1 – ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИЕ СИЛЫ 4 – ВАН-ДЕР-ВААЛЬСОВЫ СИЛЫ

2 – ВОДОРОДНАЯ СВЯЗЬ

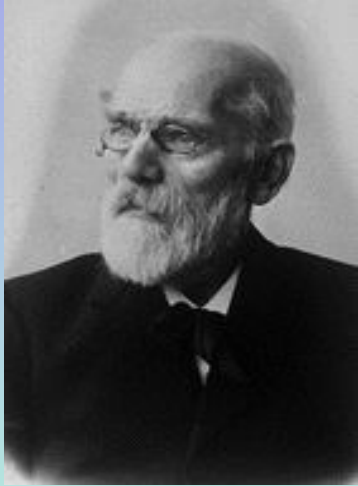
3 – ГИДРОФОБНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ

$$W_{\text{эл}} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_1 q_2}{\epsilon r}$$

**ЭНЕРГИЯ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЗАВИСИТ ОТ ВЕЛИЧИНЫ
ЗАРЯДОВ ЧАСТИЦ И РАССТОЯНИЯ МЕЖДУ
НИМИ**

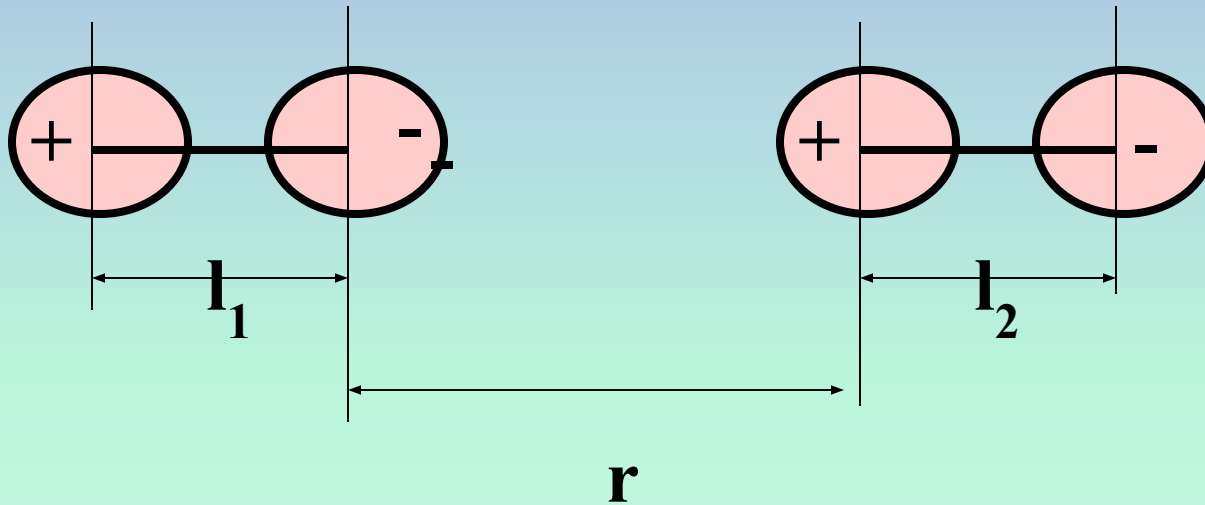
q_1 и q_2 – электрические заряды; ϵ - диэлектрическая проницаемость; ϵ_0 – электрическая постоянная ($8,85 \cdot 10^{-12}$ Кл/В · м)



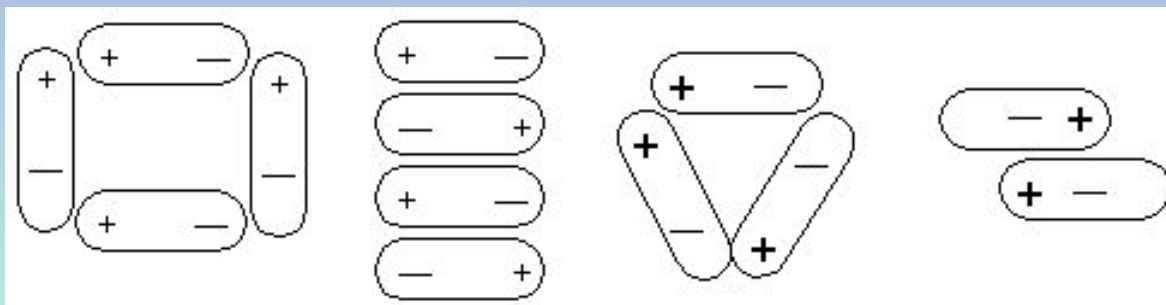
ВАН-ДЕР-ВААЛЬСОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

**Ян-Дидерик
ВАН-ДЕР-ВААЛЬС
(1837 - 1923)**

ОРИЕНТАЦИОННОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ

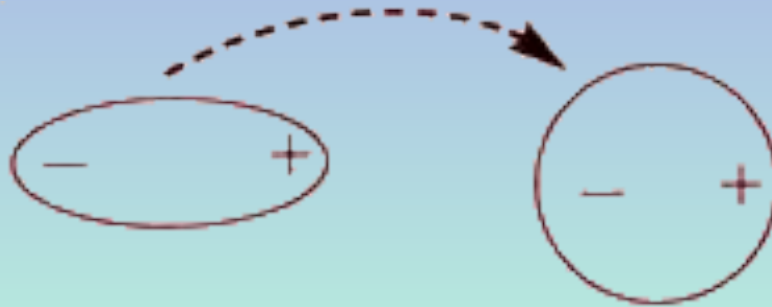


$$W_{op} = - \frac{1}{6\pi\epsilon_0 k_0 T} \frac{\mu_1^2 \mu_2^2}{\epsilon r^6}$$



**Схема взаимодействия между
полярными молекулами**

ИНДУКЦИОННОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ



$$W_{\text{инд}} = - \frac{1}{2\pi\epsilon_0} \frac{\alpha\mu^2}{\epsilon r^6}$$

α - поляризуемость,

μ - дипольный момент

ДИСПЕРСИОННОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ



$$W_{disc} = -\frac{3}{2} \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2} \frac{\alpha_1 \alpha_2}{r^6}$$

$I_1 I_2$ - потенциалы ионизации

α_1 и α_2 – поляризуемость групп

ВОДОРОДНАЯ СВЯЗЬ

ВОДОРОДНЫЕ СВЯЗИ

ВОДОРОД ХИМИЧЕСКИ СВЯЗАН С
ОДНИМ **ЭЛЕКТРООТРИЦАТЕЛЬНЫМ**
АТОМОМ

И ПРИ ЭТОМ ПРИБЛИЖАЕТСЯ К ДРУГОМУ
ЭЛЕКТРООТРИЦАТЕЛЬНОМУ АТОМУ.

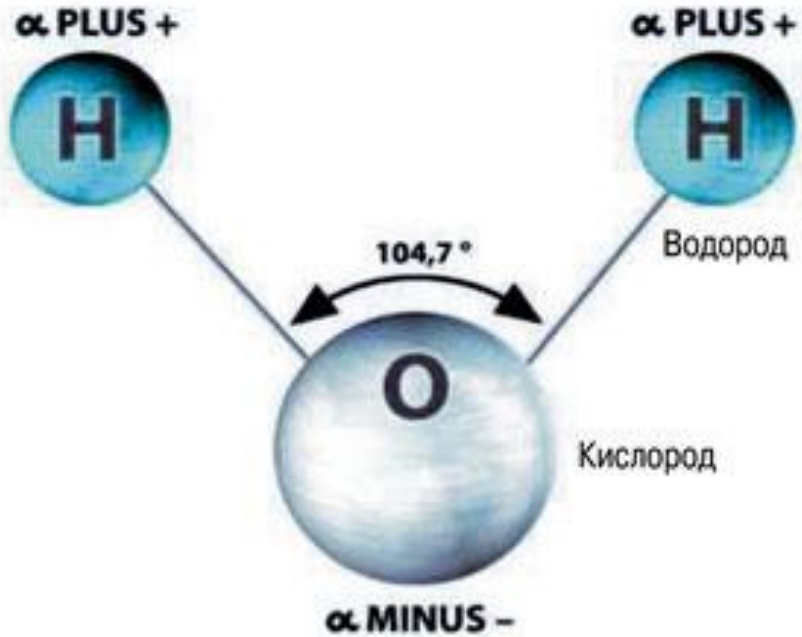
АНОМАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ВОДЫ:

- ВЫСОКАЯ ТЕМПЕРАТУРА КИПЕНИЯ (373К) И
- ТЕМПЕРАТУРА ЗАМЕРЗАНИЯ (273К) ДЛЯ ЕЕ МАЛОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЕСА.

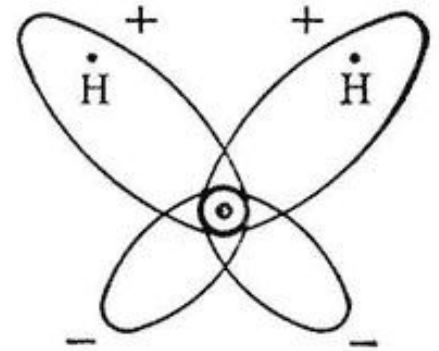
для сравнения: O_2 кипит при 90К и
замерзает при 54К.

ПРИЧИНА АНОМАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ВОДЫ –
НАЛИЧИЕ **ВОДОРОДНЫХ СВЯЗЕЙ**.

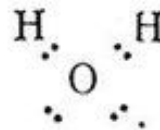
Строение молекулы воды



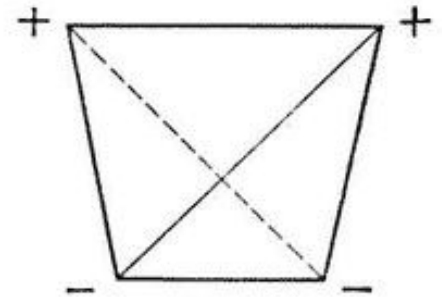
а



б

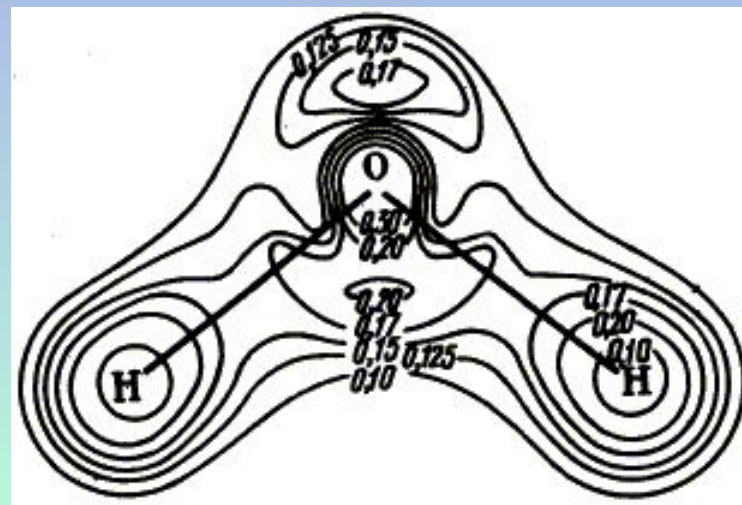
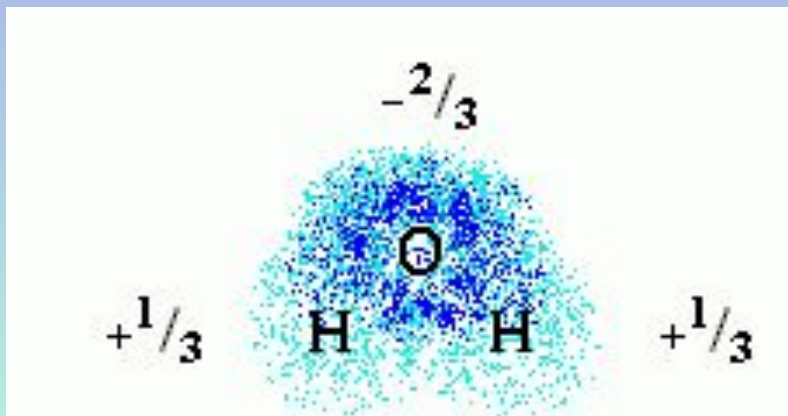


в



г

Распределение зарядов и электронной плотности в молекуле воды



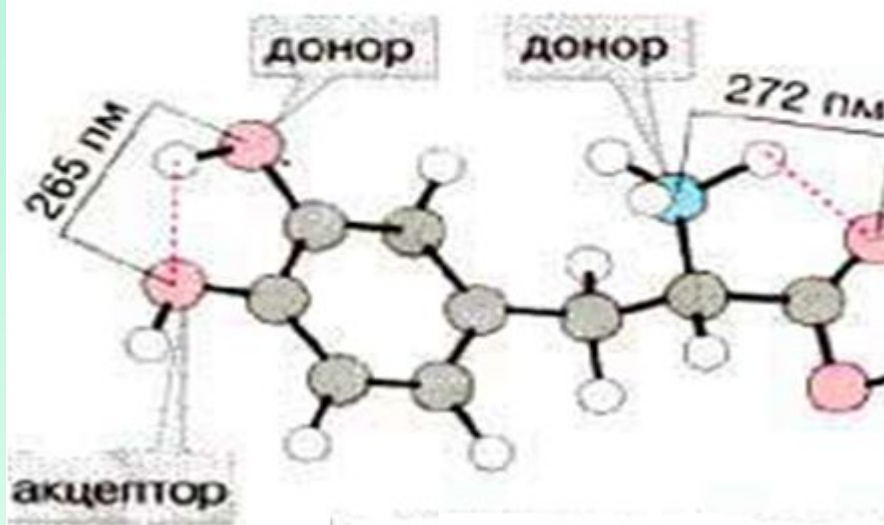
В 1999 г. было экспериментально показано, что водородная связь между молекулами воды во льду имеет частично (на 10%) ковалентный характер [Isaacs E. D., et al., 1999].

Водородные связи

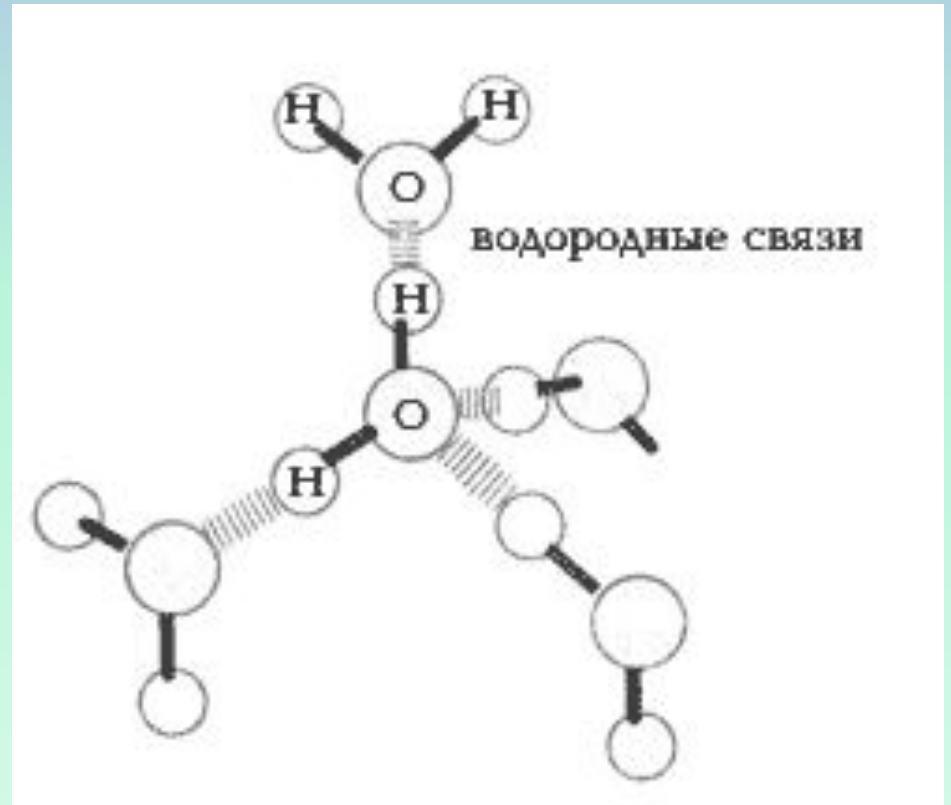
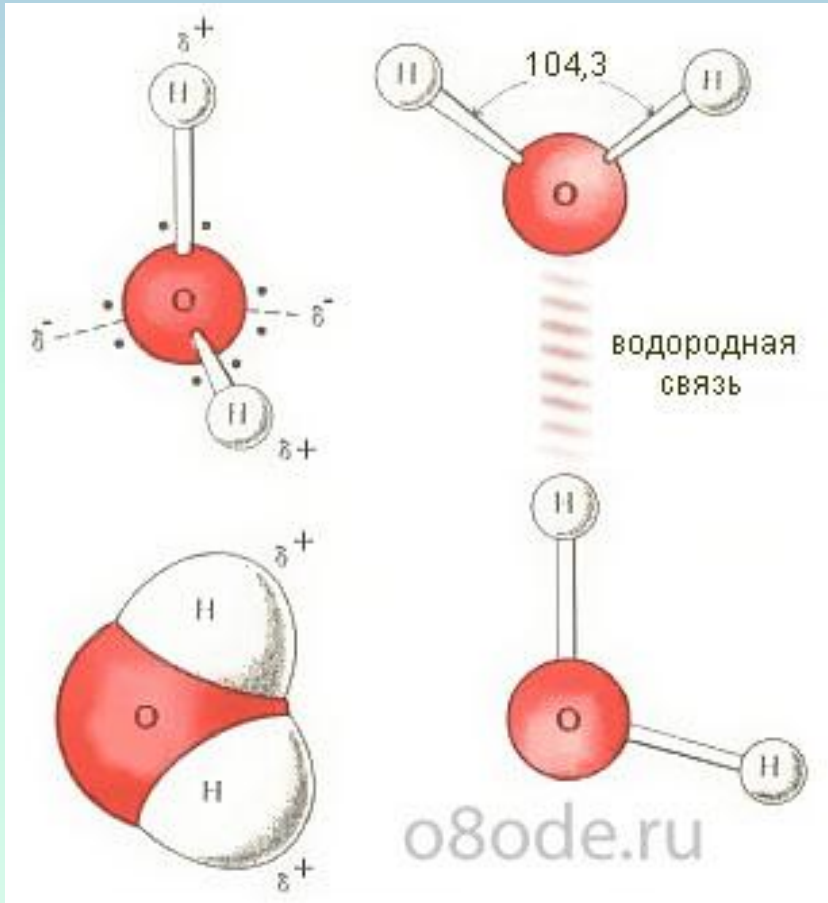
Доноры: $-O-H$, $>N-H$

Акцепторы: $-\bar{O}|$, $>\bar{N}$
 H H
 $=\bar{O}$, $=\bar{N}$, $-\bar{S}-$

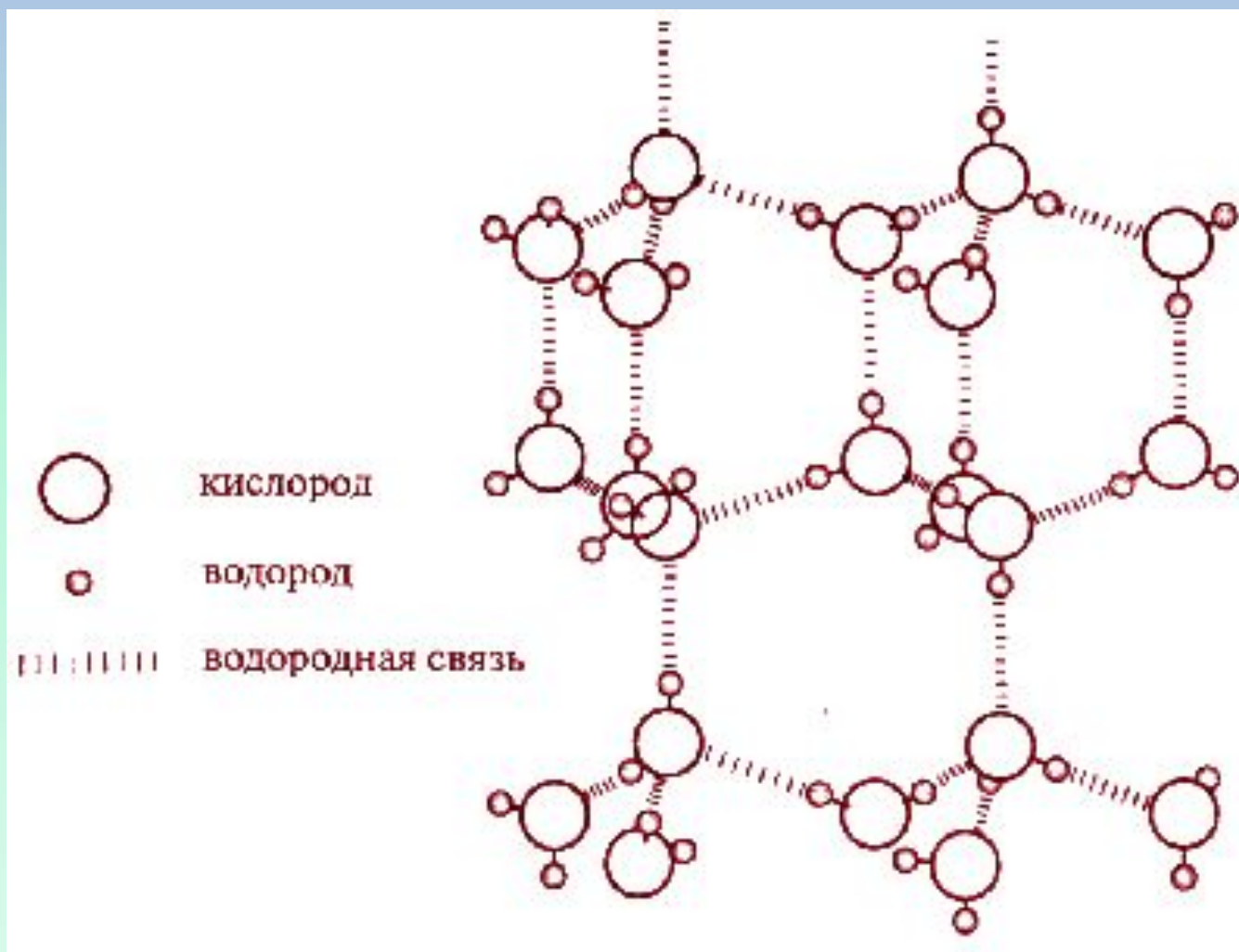
Длина : 260 - 320 пм

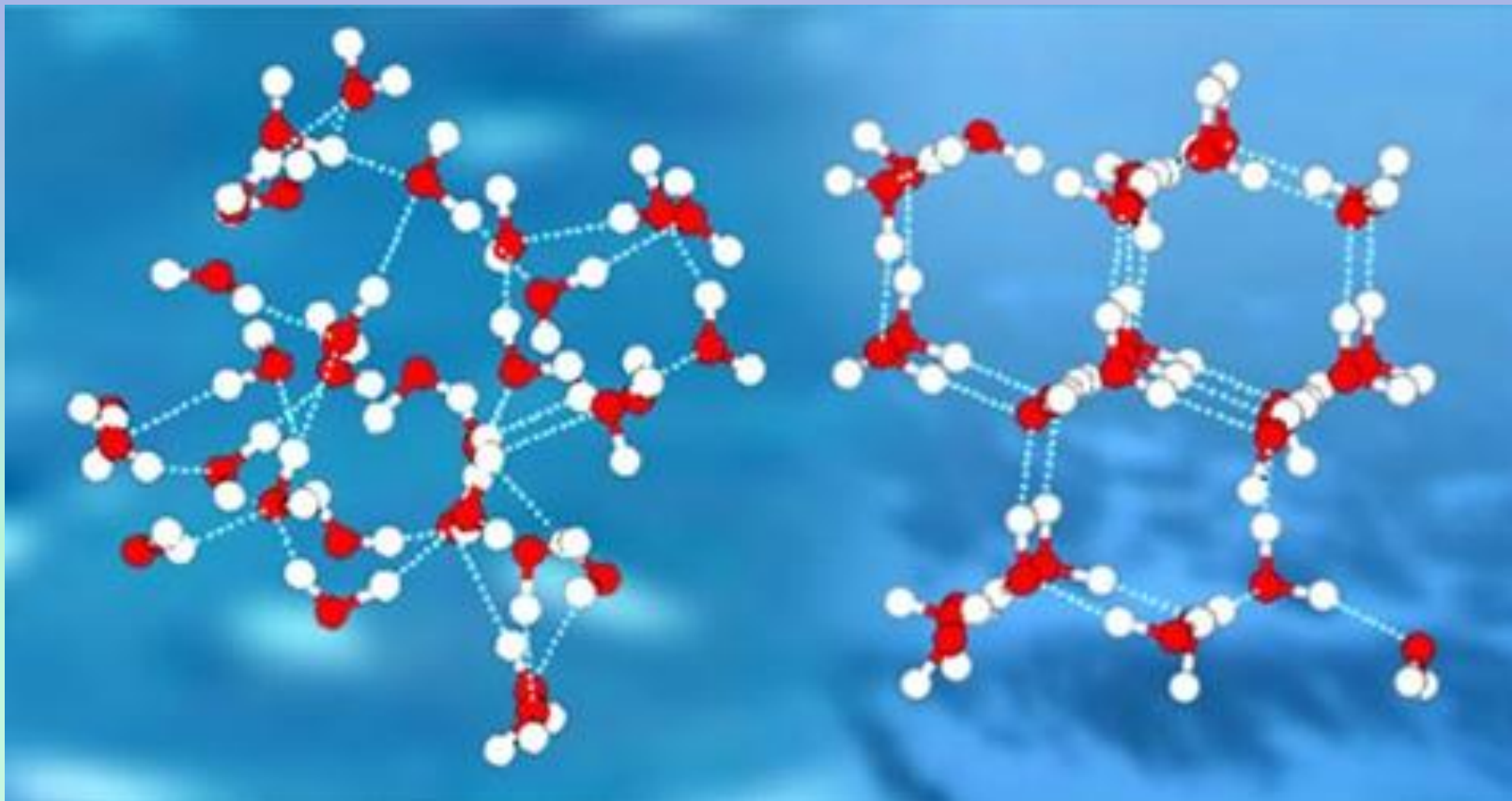


Водородные связи между молекулами воды



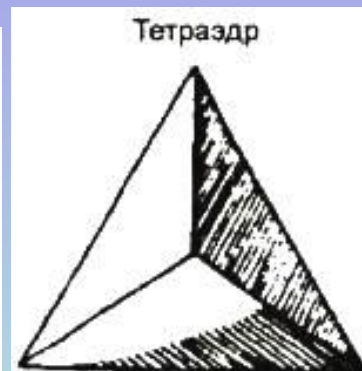
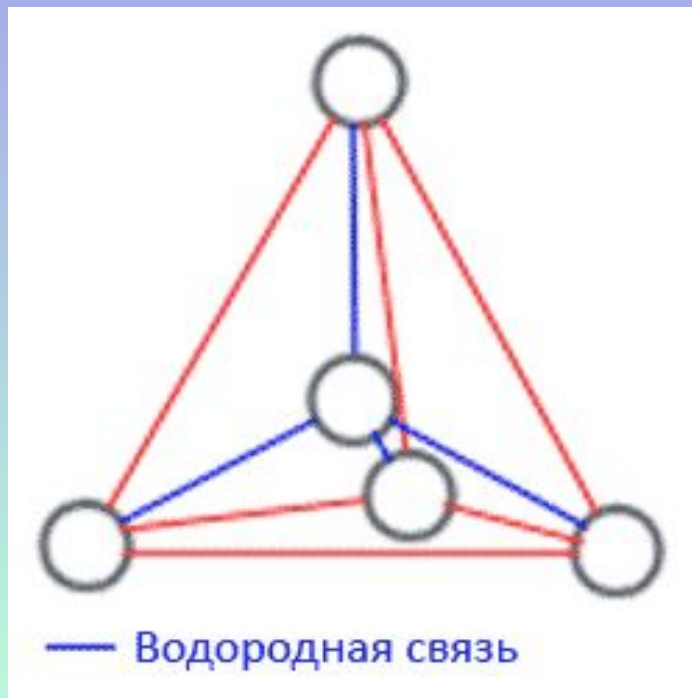
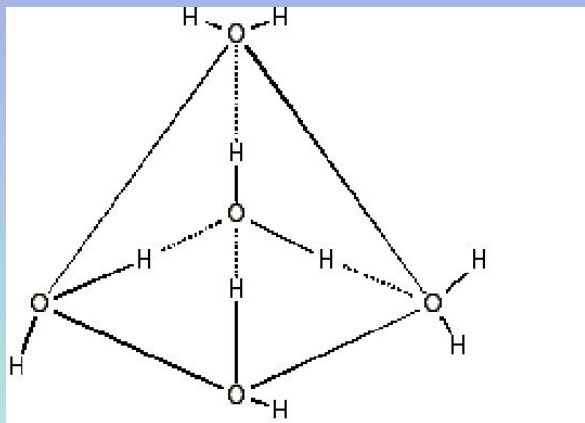
Водородные связи между молекулами воды (лед)





ЖИДКАЯ ВОДА

ЛЕД



Четыре связи каждой молекулы H_2O локально организованы в **тетраэдрическую структуру**, т.е. четыре близлежащие молекулы располагаются в вершинах трехгранной пирамиды, в центре которой находится пятая молекула воды.

ТЕОРИИ СТРУКТУРЫ ВОДЫ

Впервые идея о том, что вода имеет сложную структуру появилась **в конце XIX века**.

20-е годы XX века: установлена структура льда.

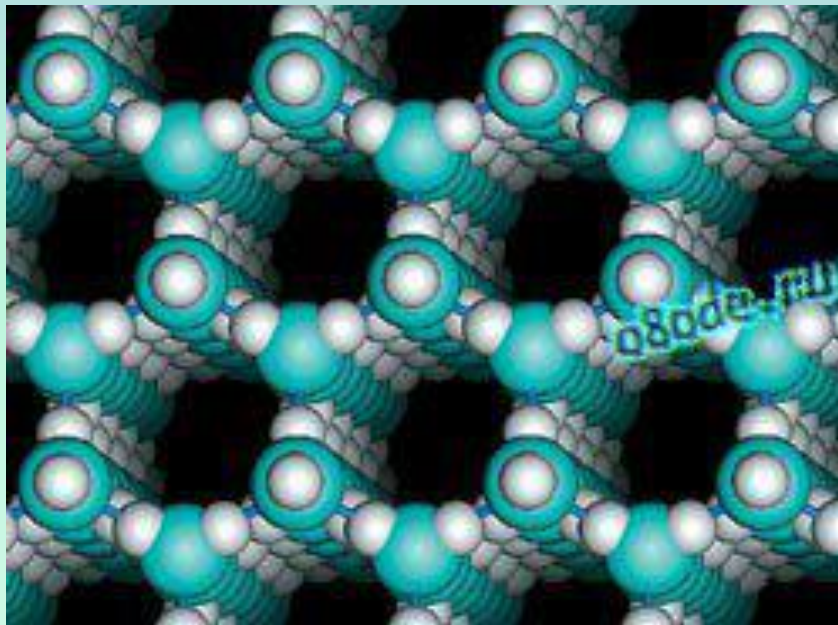
30-е годы XX века: предположение, что подобная трехмерная сетка присутствует и в жидкой воде.

1951 г: Дж. ПОПЛ создает модель **непрерывной структуры воды** (континуальная модель).

2-я половина XX века: 2 группы «смешанных» моделей – кластерная и клатратная.

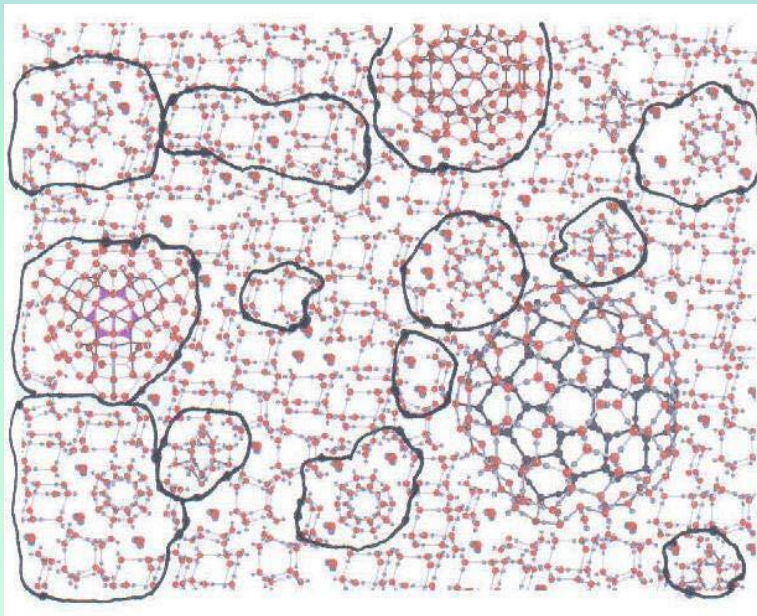


Модель непрерывной структуры воды (континуальная модель).



КЛАСТЕРНЫЕ МОДЕЛИ

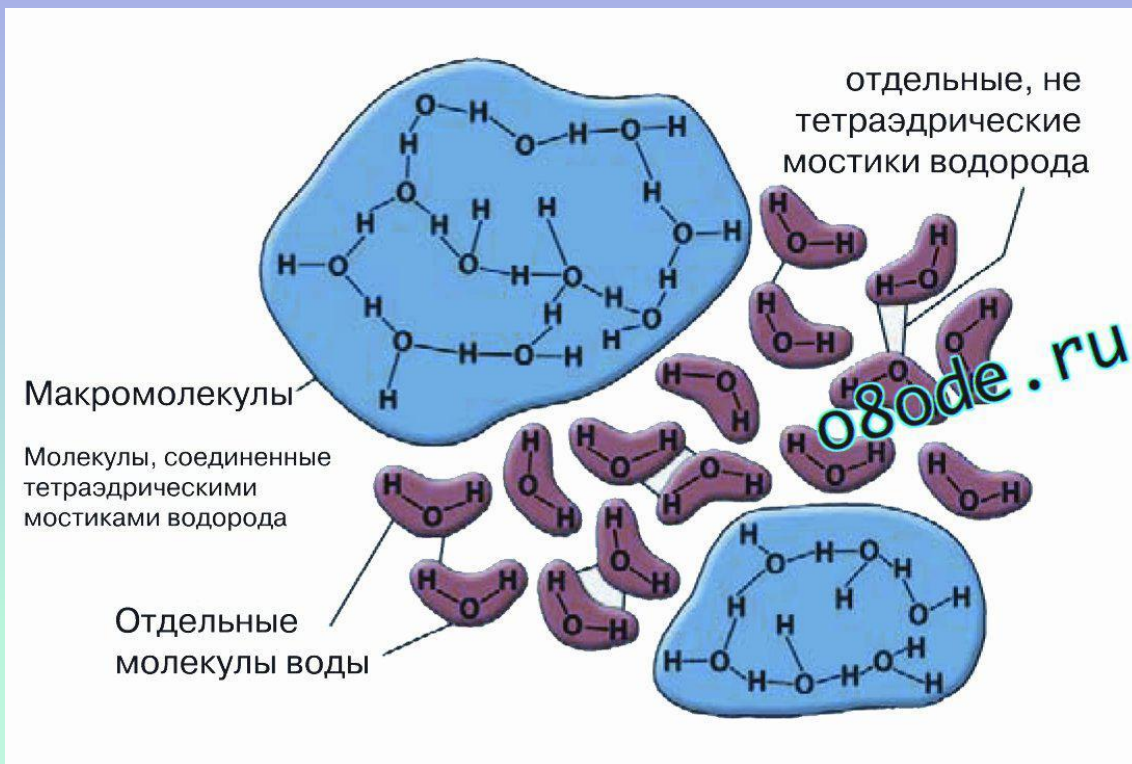
ВОДА В ВИДЕ **КЛАСТЕРОВ** ИЗ МОЛЕКУЛ, СОЕДИНЕННЫХ ВОДОРОДНЫМИ СВЯЗЯМИ, КОТОРЫЕ ПЛАВАЮТ В МОРЕ МОЛЕКУЛ, В ТАКИХ СВЯЗЯХ НЕ УЧАСТВУЮЩИХ



МОДЕЛЬ Г. НЕМЕТИ И Х. ШЕРАГИ

Кластеры связанных молекул, которые плавают в море несвязанных молекул

Модель мерцающих кластеров, Фрэк и Уэн, 1957 г.



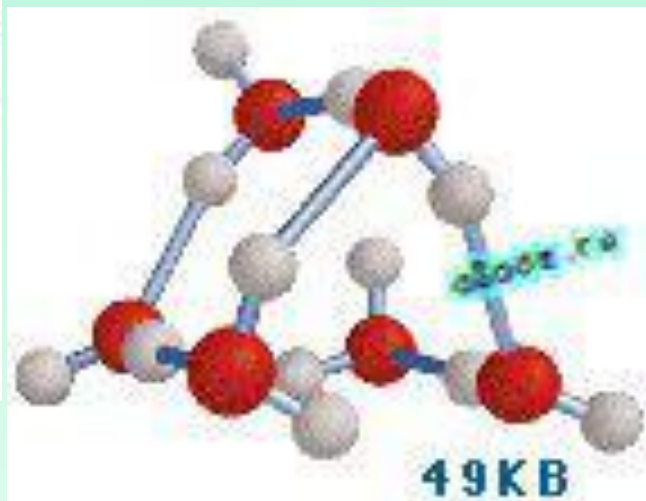
Водородные связи в воде непрерывно образуются и рвутся, причем эти процессы протекают кооперативно в пределах короткоживущих групп молекул воды, названных “мерцающими кластерами”. Их время жизни оценивают в диапазоне от 10^{-10} до 10^{-11} с.

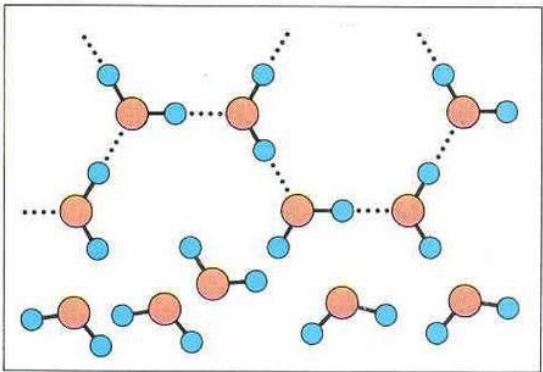
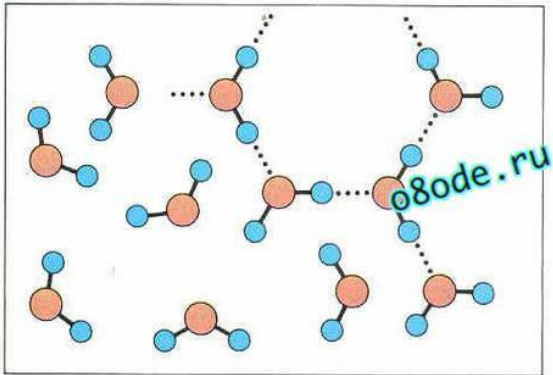
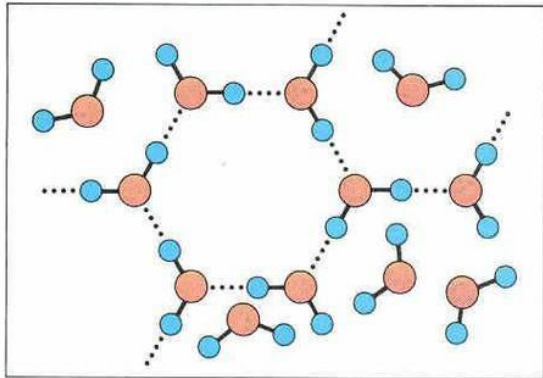
КЛАТРАТНАЯ МОДЕЛЬ ВОДЫ

ВОДА ОБРАЗУЕТ **НЕПРЕРЫВНУЮ СЕТКУ** (КАРКАС) БЛАГОДАРЯ ВОДОРОДНЫМ СВЯЗЯМ, НО **СОДЕРЖИТ ПУСТОТЫ**. В НИХ РАЗМЕЩАЮТСЯ МОЛЕКУЛЫ ВОДЫ, НЕ ОБРАЗУЮЩИЕ СВЯЗЕЙ С МОЛЕКУЛАМИ КАРКАСА.

АВТОРЫ ПЕРВЫХ ТЕОРИЙ – О.Я.САМОЙЛОВ, Л. ПОЛИНГ

В 1993 году американский химик Кен Джордан предложил свои варианты кластеров - устойчивых “ассоциатов воды”, которые состоят из **6 её молекул** [Tsai & Jordan, 1993]. Эти кластеры могут объединяться друг с другом и со “свободными” молекулами воды за счет экспонированных на их поверхности водородных связей.

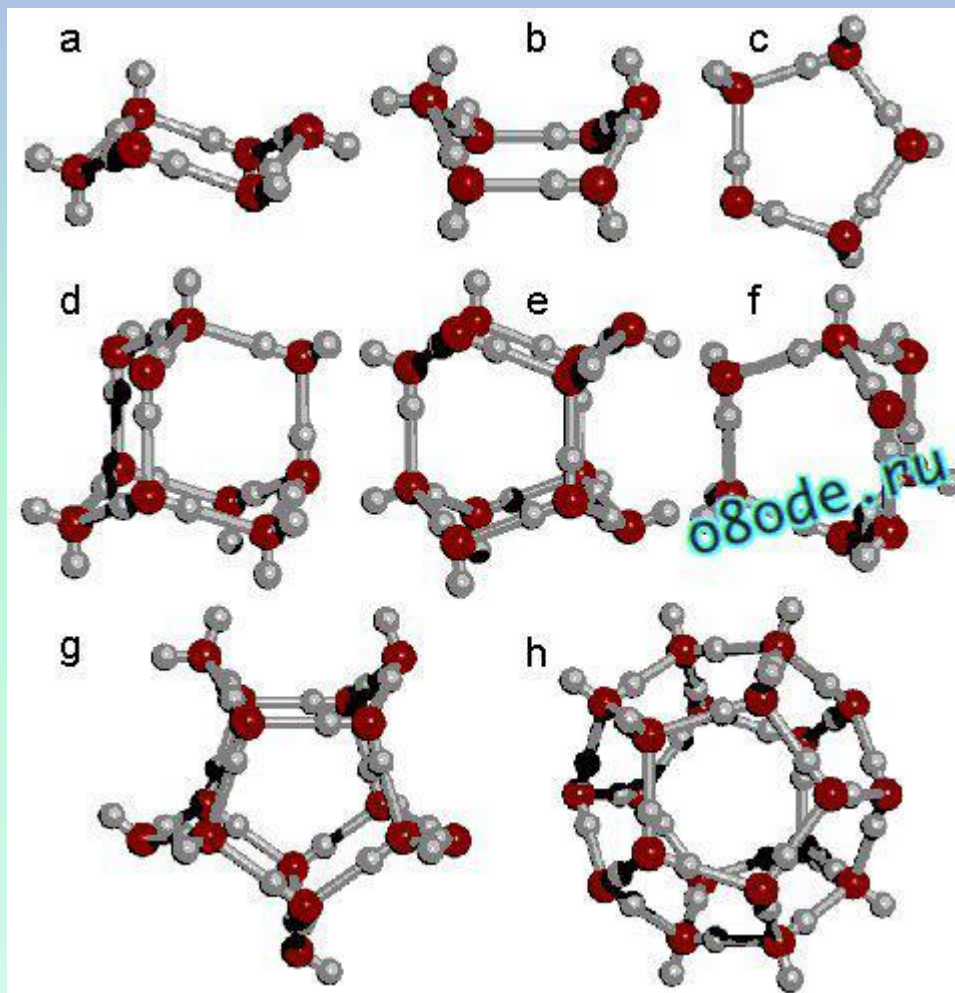


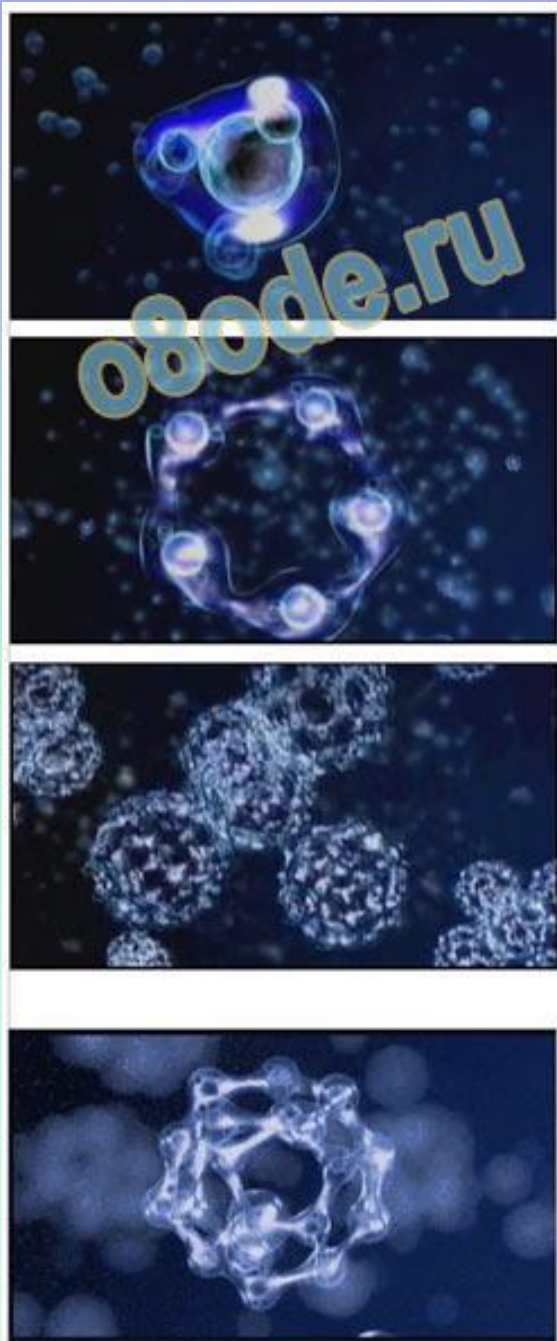


Структура жидкой воды.

В воде кластеры периодически разрушаются и образуются снова. Время перескока составляет 10^{-12} секунд.

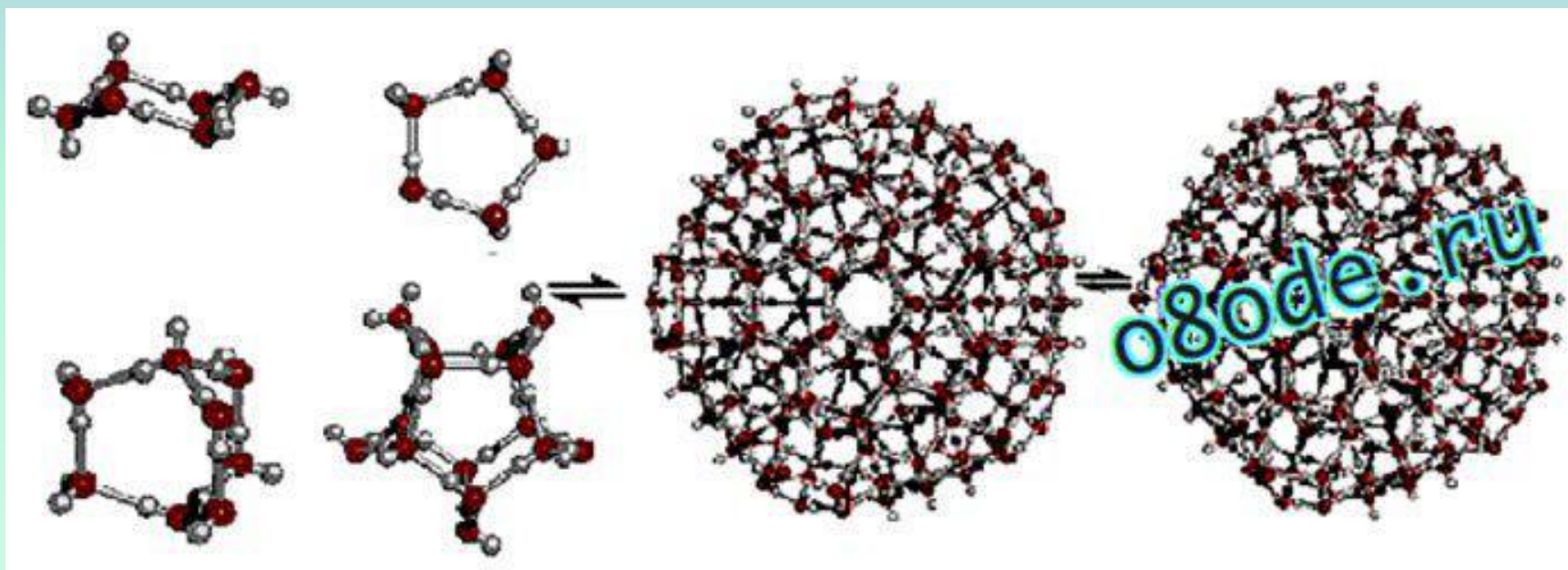
Некоторые возможные структуры кластеров воды





*Формирование отдельного
кластера воды
(компьютерное
моделирование)*

Объединяясь друг с другом, кластеры могут образовывать более сложные структуры



ГИДРОФОБНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

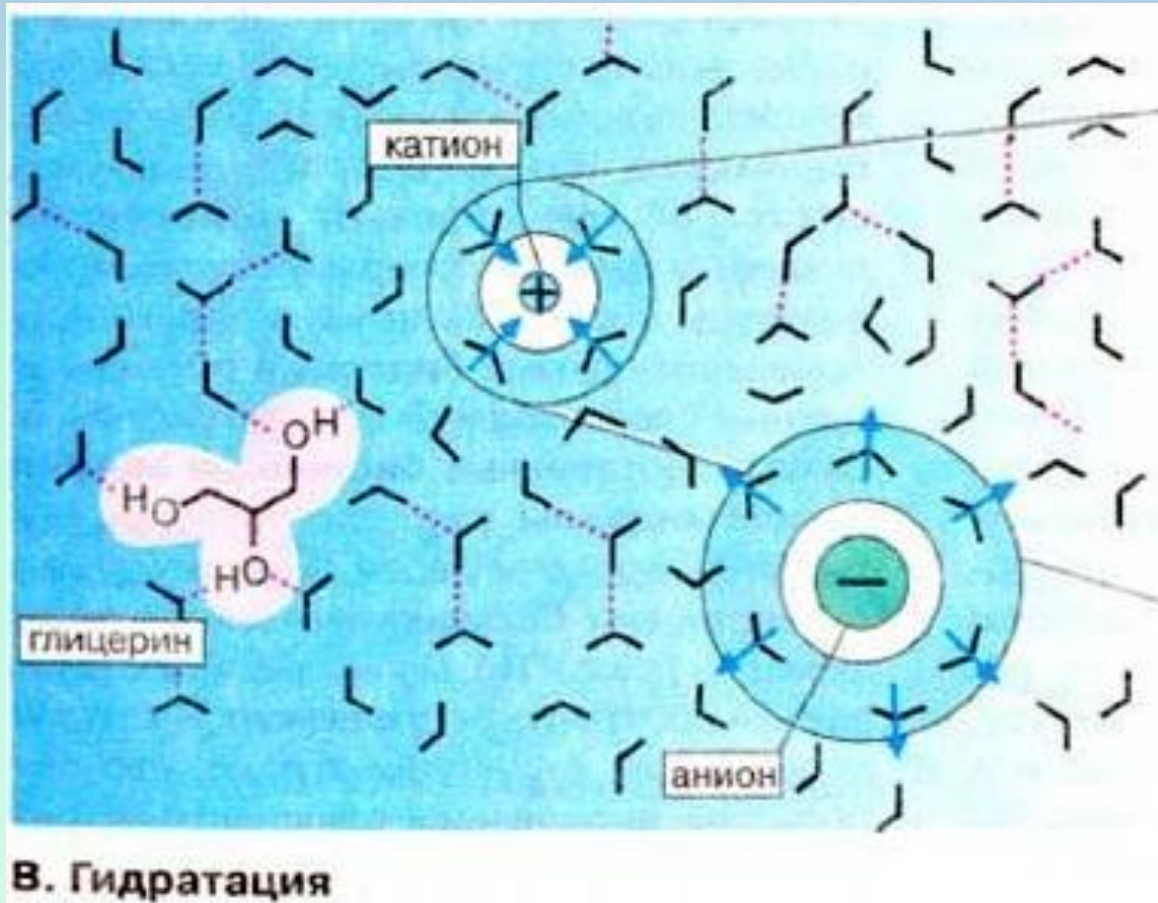
ЭНТРОПИЙНАЯ ПРИРОДА ГИДРОФОБНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

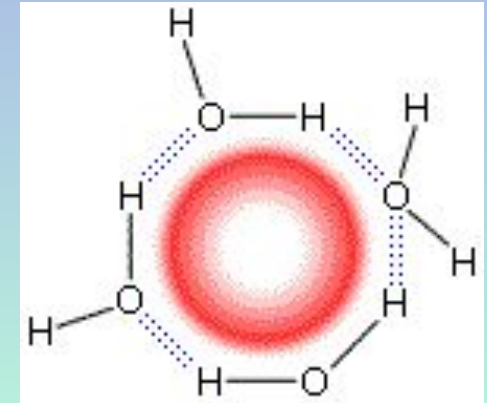
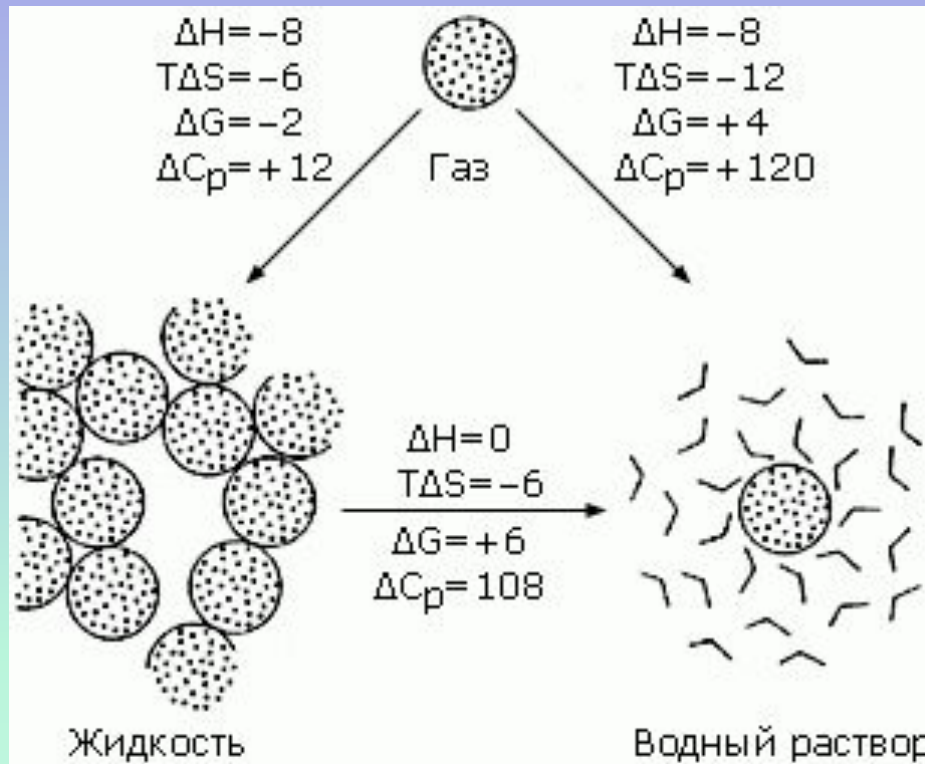
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

СНИЖЕНИЕ ЭНТРОПИИ ВЫЗЫВАЕТ УВЕЛИЧЕНИЕ
СВОБОДНОЙ ЭНЕРГИИ, НО ЭТО КОМПЕНСИРУЕТСЯ
СНИЖЕНИЕМ ЭНТАЛЬПИИ

$$|\Delta H| > |T\Delta S|$$

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВОДЫ С ПОЛЯРНЫМИ ГРУППАМИ





Термодинамика переноса типичной неполярной молекулы, циклогексана $(\text{C}_6\text{H}_{12})$, из пара (вверху) в воду (справа), а также в жидкий циклогексан (слева), и из него в воду. Цифры примерно соответствуют процессам при 25°C (т.е. при T 300°K ; при этом RT 0.6 ккал/моль).

ИЗМЕНЕНИЕ СВОБОДНОЙ ЭНЕРГИИ ПРИ РАСТВОРЕНИИ НЕПОЛЯРНЫХ ВЕЩЕСТВ

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S > 0$$

$$|\Delta H| < |T\Delta S|$$

РЕЗУЛЬТАТ: ОТТАЛКИВАНИЕ ВОДОЙ НЕПОЛЯРНЫХ ВЕЩЕСТВ, КОТОРЫМ **ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИ ВЫГОДНЕЕ** ВЗАИМОДЕЙСТВОВАТЬ ДРУГ С ДРУГОМ, А НЕ С ВОДОЙ. ЭФФЕКТ ОТТАЛКИВАНИЯ ВОДОЙ НЕПОЛЯРНЫХ МОЛЕКУЛ – **ГИДРОФОБНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ**

ГИДРОФОБНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НА ПРИМЕРЕ ЛИПИДОВ

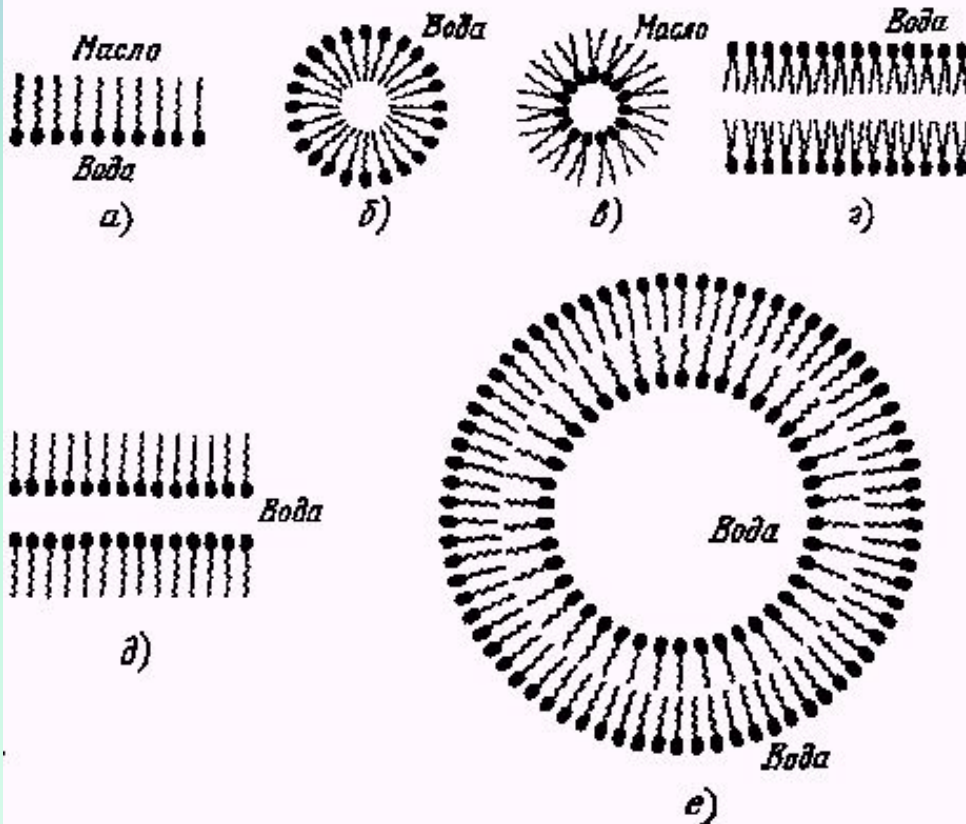


Рис. 2. а) Гиббсовский монослой на поверхности раздела жирной и полярной сред; б) сферическая мицелла, образованная АФ молекулами в полярном растворителе; в) обращенная сферическая мицелла в жирной среде; г) ламелла (бислой) в полярной среде (аналогичное строение имеют клеточные мембраны); д) обращенная ламелла (мыльная пленка); е) пузырек-везикула, образованный АФ молекулами в полярной среде.