

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

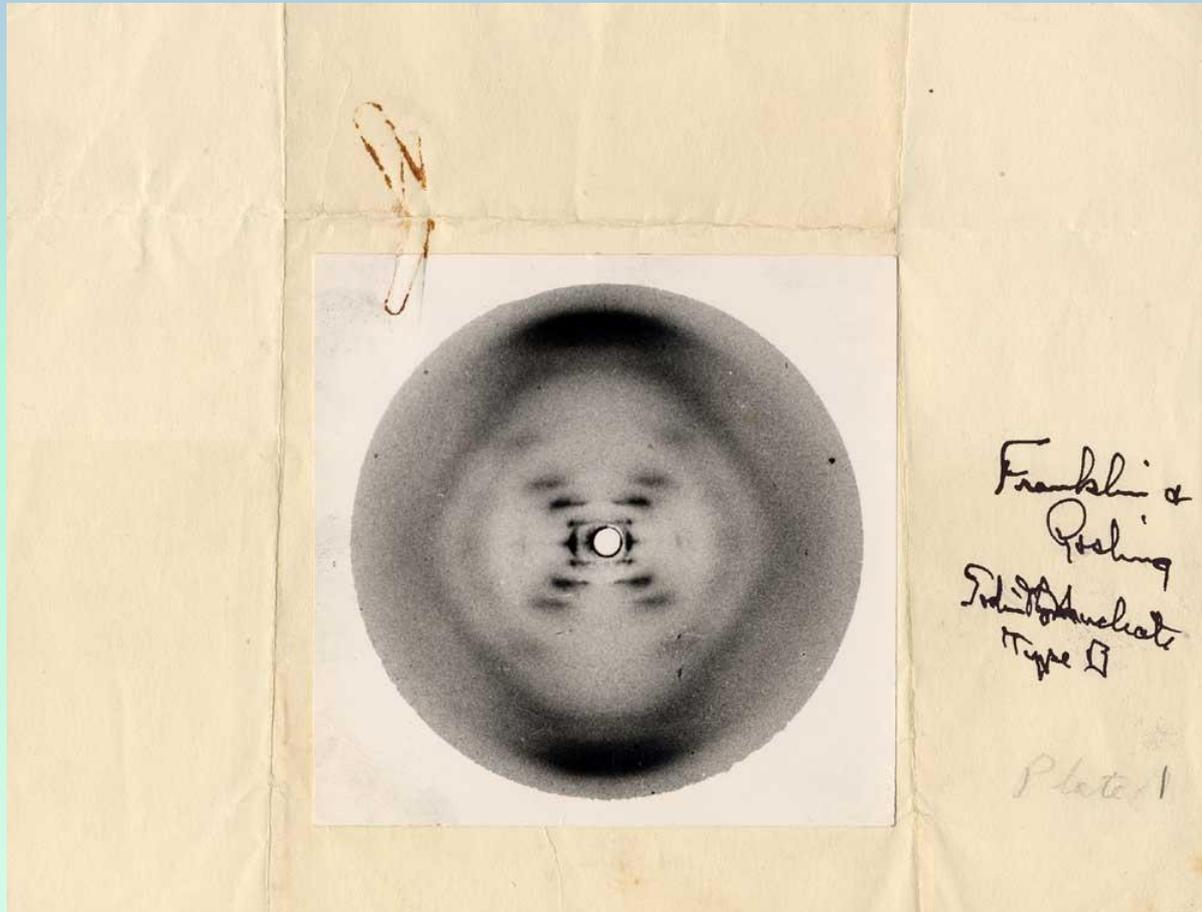
СПЕЦИФИКА БИОМАКРОМОЛЕКУЛ

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**

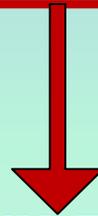
Первые
рентгенограммы
белков получены
еще в 30-х годах (**У.
Астбюри, Л.Полинг,
Р.Кори**).

РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ

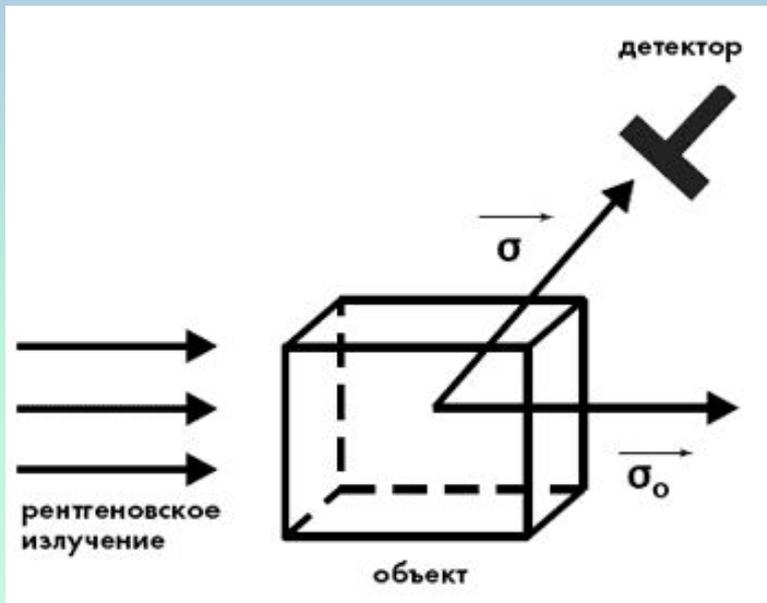
- ПРЯМОЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ
- ПОЗВОЛЯЕТ ОПРЕДЕЛИТЬ РАСПОЛОЖЕНИЕ ВСЕХ АТОМОВ В ТРЕХМЕРНОМ ПРОСТРАНСТВЕ
- ИМЕЕТ ОГРАНИЧЕНИЯ

Рентгеновский структурный анализ

Взаимодействие рентгеновского излучения с
электронами вещества.



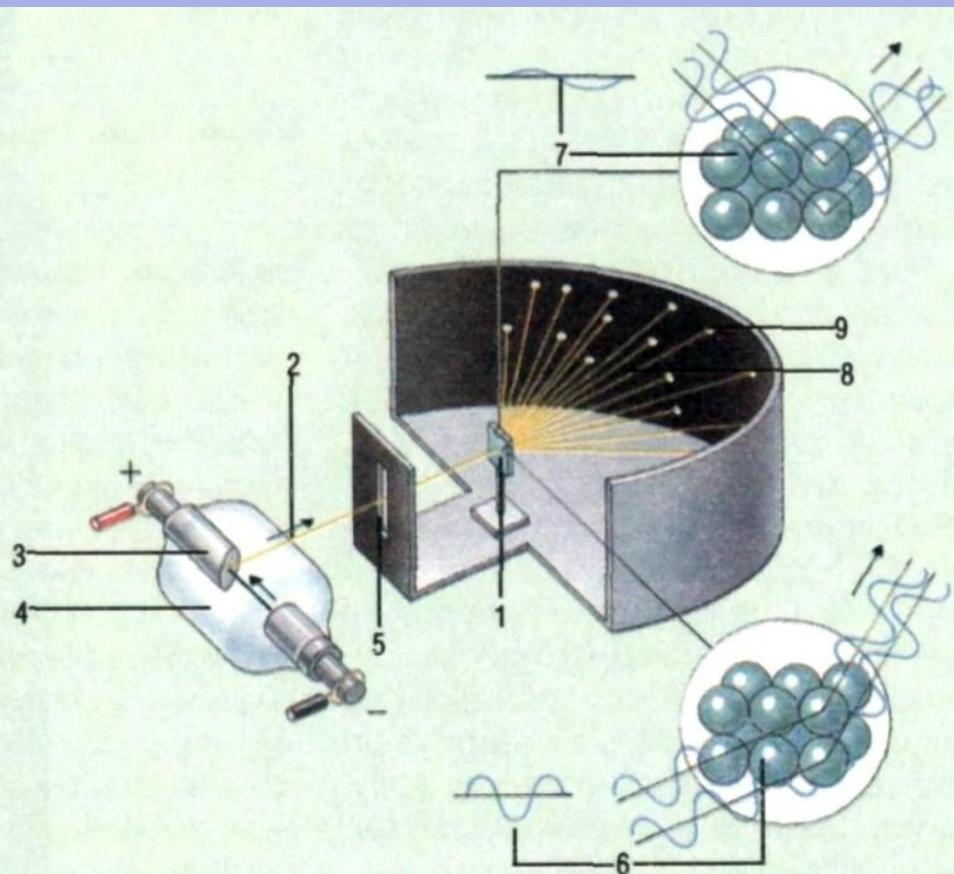
~~Дифракция рентгеновских лучей~~ (рассеяние пучка
рентгеновских лучей атомной структурой кристалла).



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

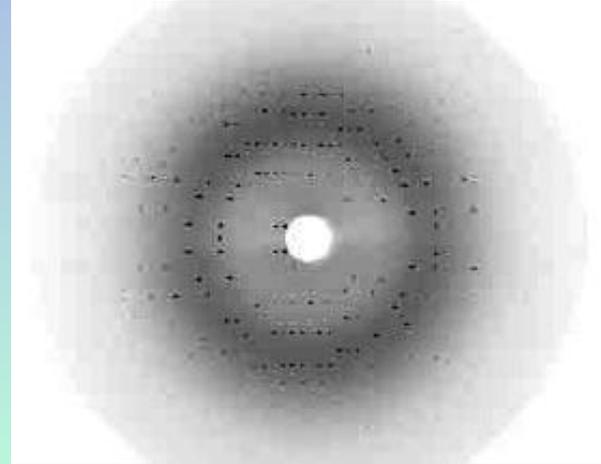
Основные положения

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.



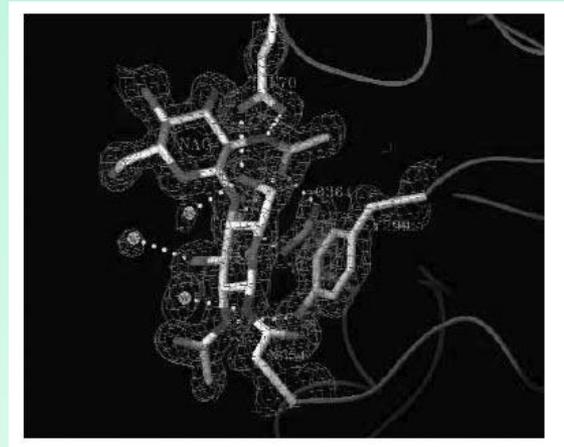
Принципиальная трудность: невозможность получить из эксперимента всю информацию, необходимую для восстановления исследуемой структуры.

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



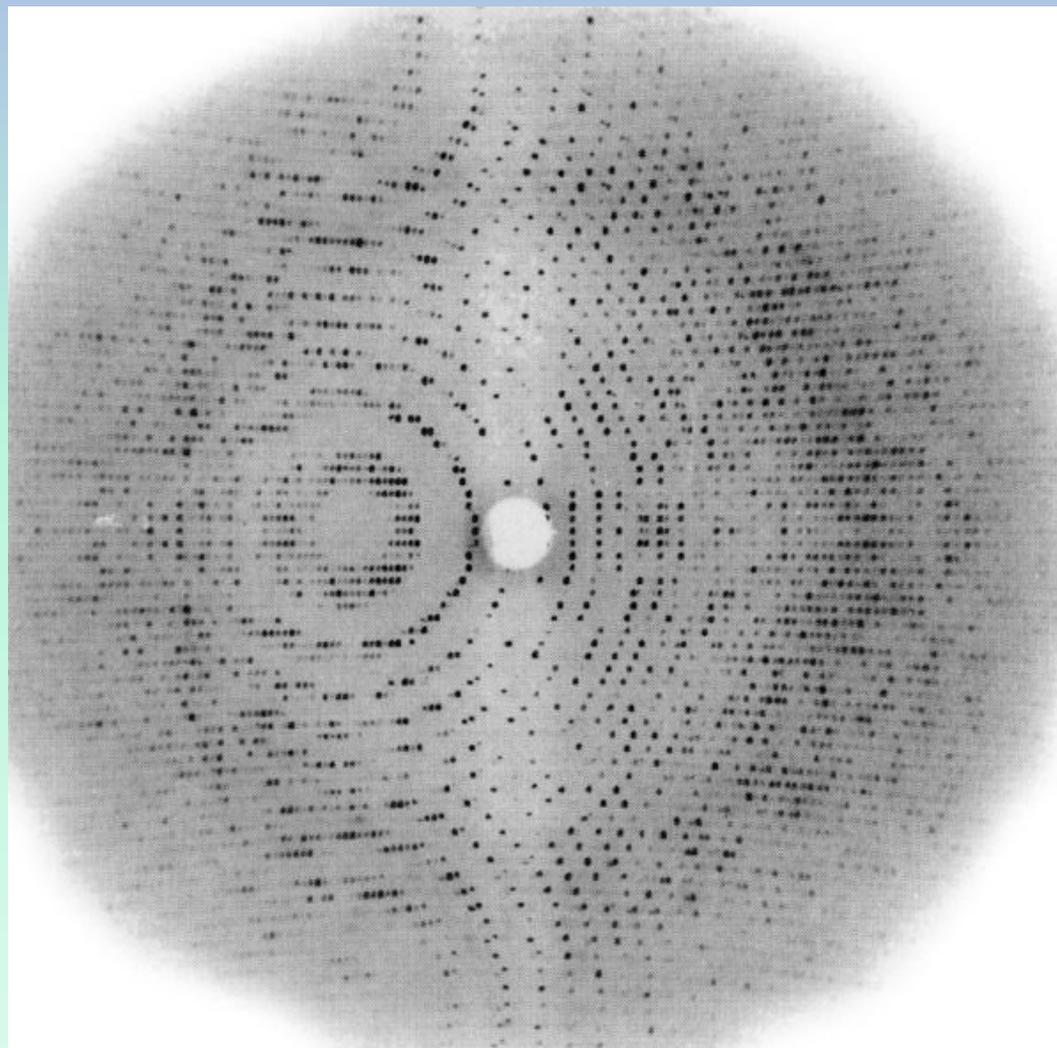
Основные этапы определения структуры белка

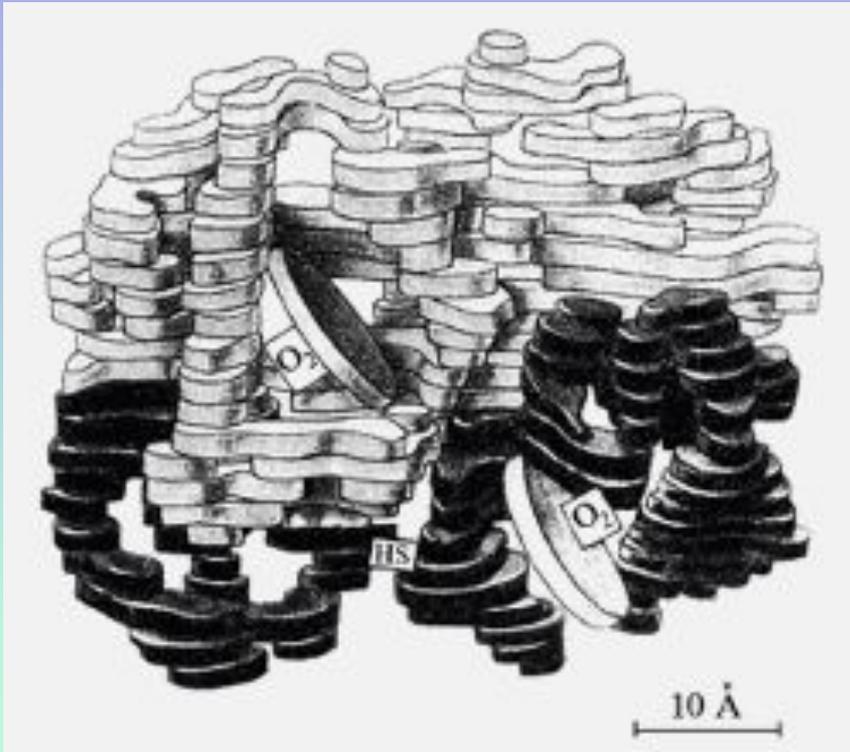
□Выделение, очистка

□Кристаллизация

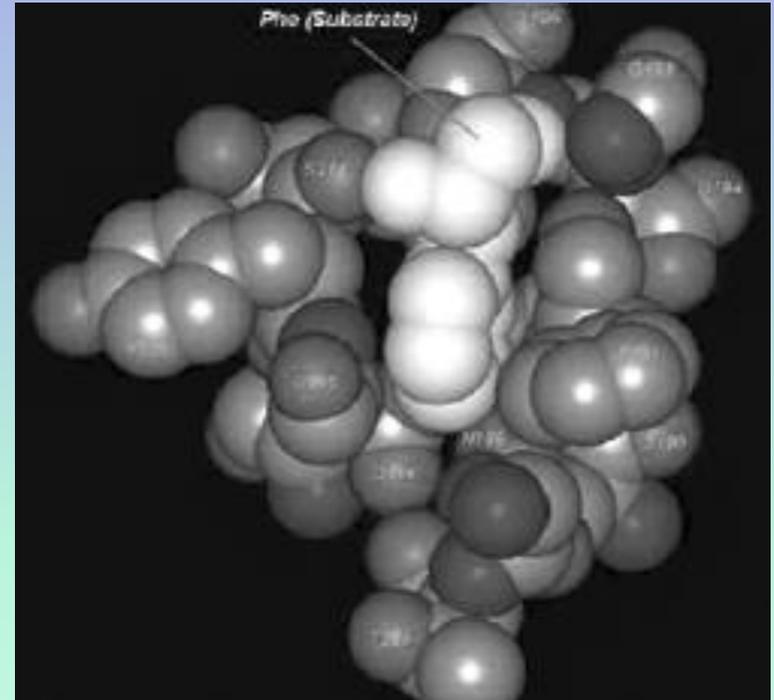
***□Рентгеновский эксперимент, обработка
результатов***

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

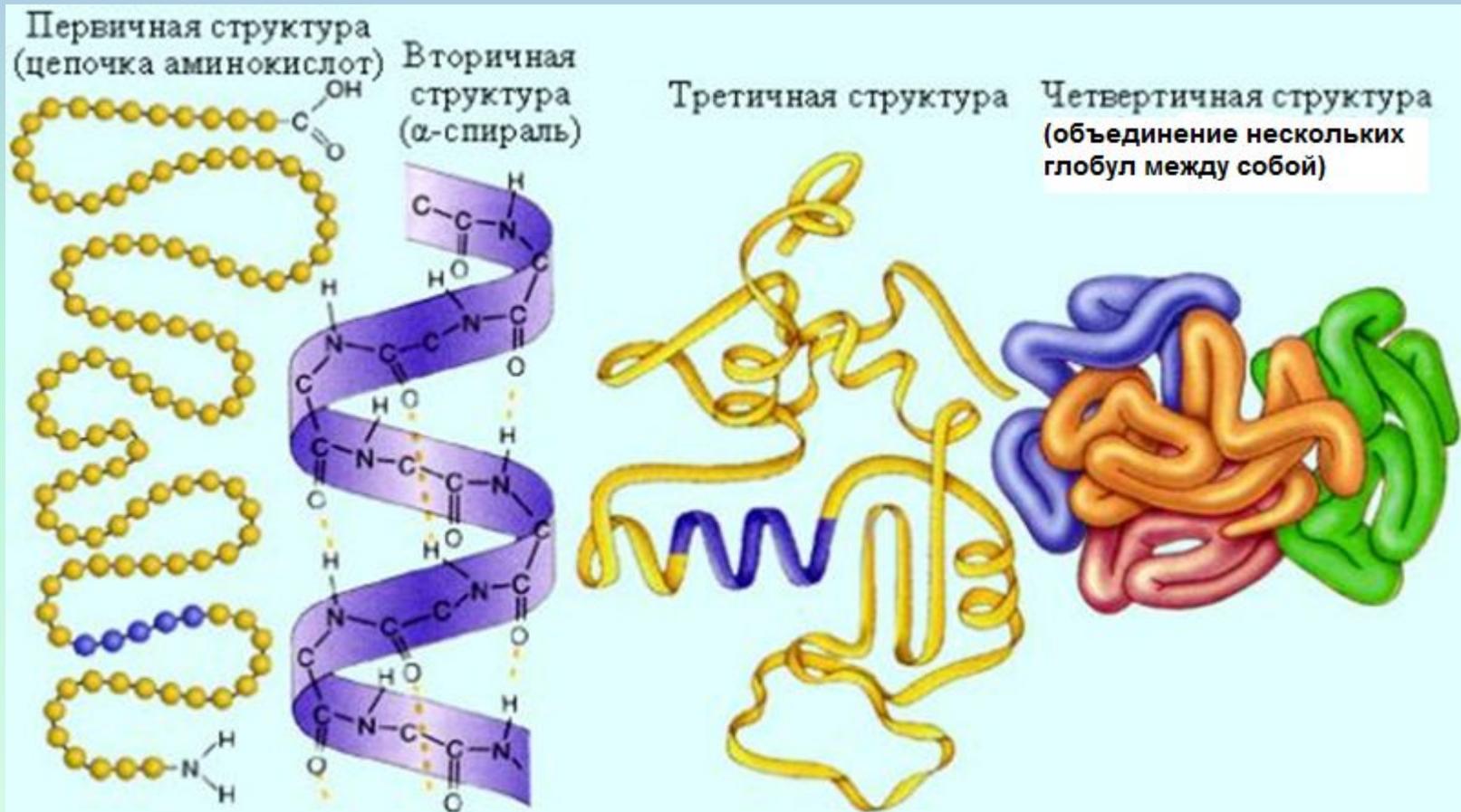
- **ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ**
- **ЯМР**
- **ЭПР**

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

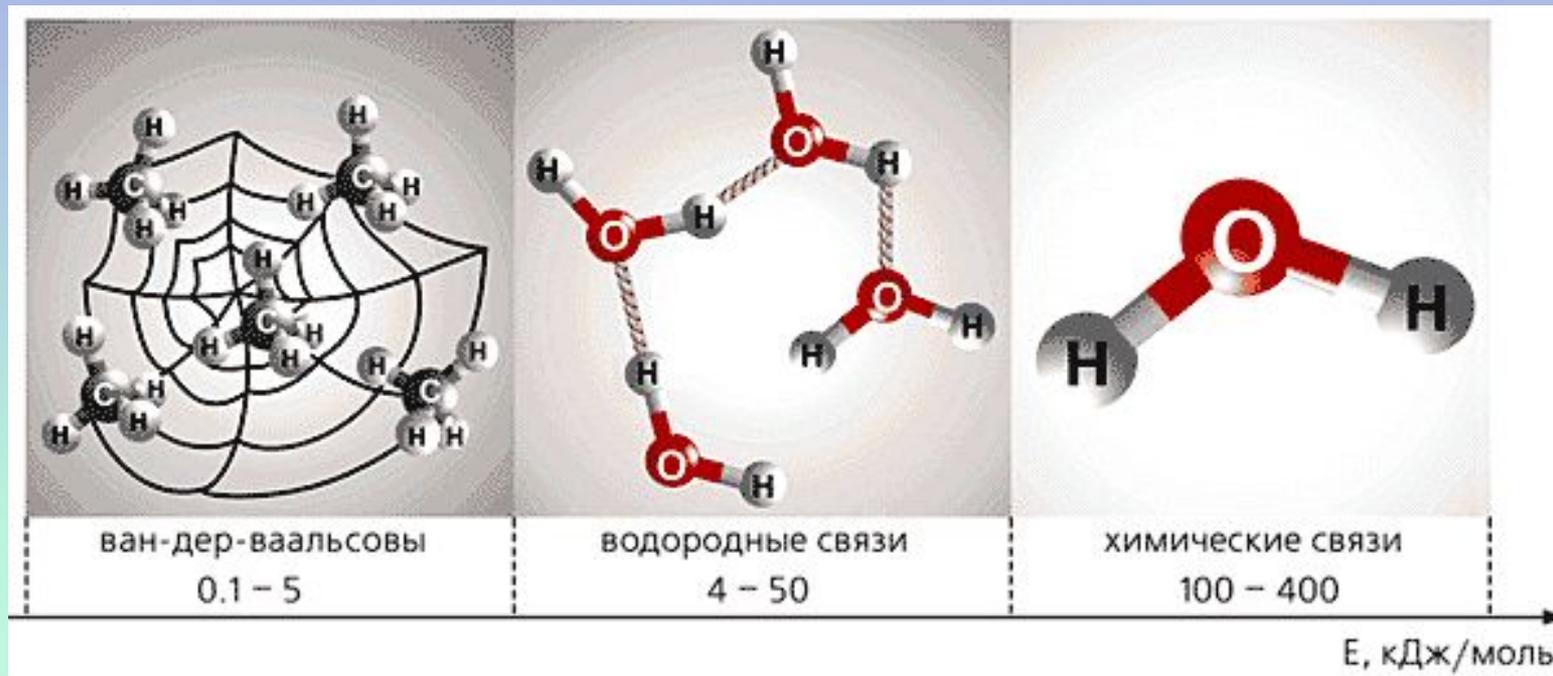
- КОВАЛЕНТНЫЕ
- ИОННЫЕ

ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ СВЯЗИ

- ВОДОРОДНЫЕ

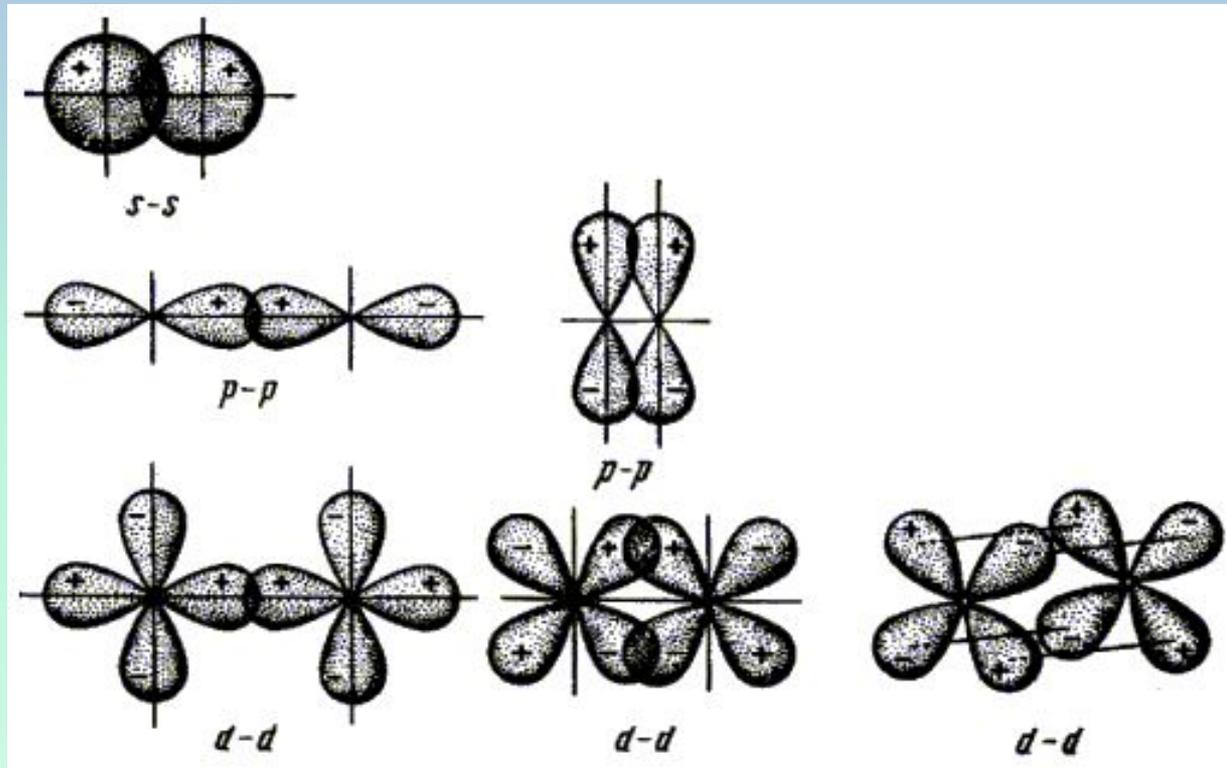
СЛАБЫЕ СВЯЗИ

- ВАН-ДЕР-ВААЛЬСОВЫ
- ГИДРОФОБНЫЕ

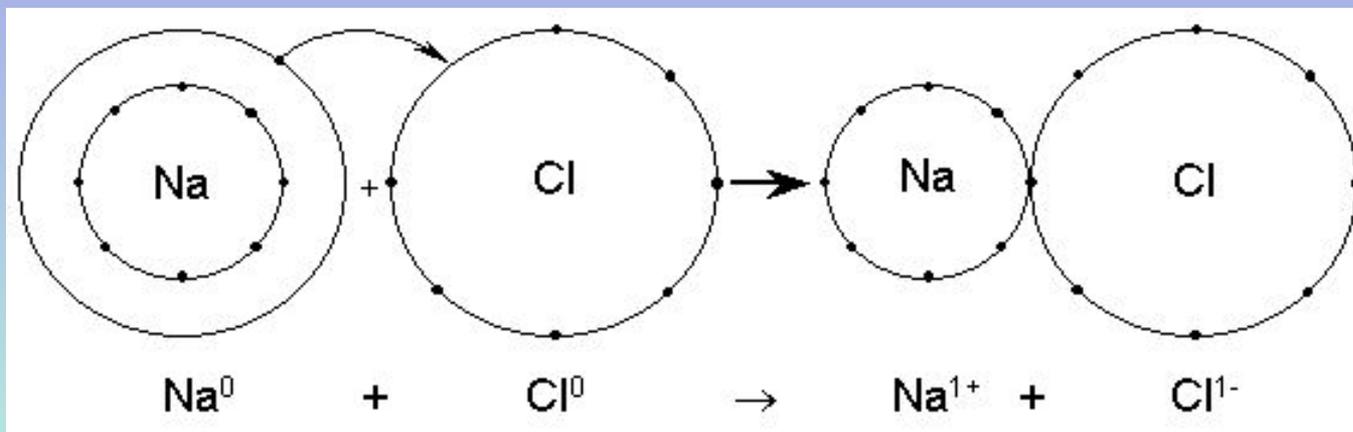


ЭНЕРГИЯ ТЕПЛОВЫХ КОЛЕБАНИЙ – 2,5 кДж/моль

КОВАЛЕНТНЫЕ СВЯЗИ

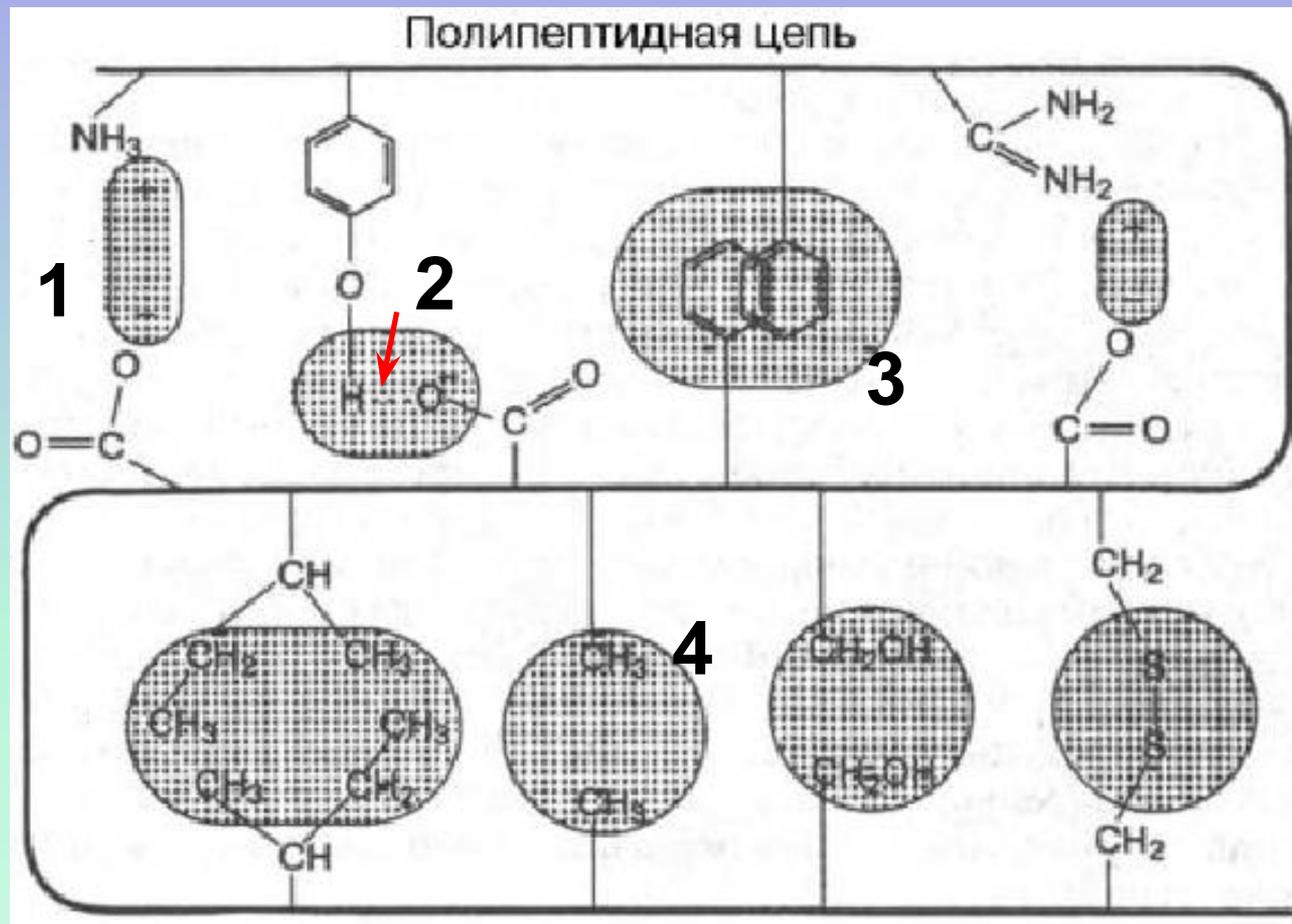


Схемы перекрывания орбиталей при образовании s -, p -, d -связей



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

$$W_{\text{эл}} = \frac{1}{4\pi\varepsilon_0} \frac{q_1 q_2}{\varepsilon r}$$

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

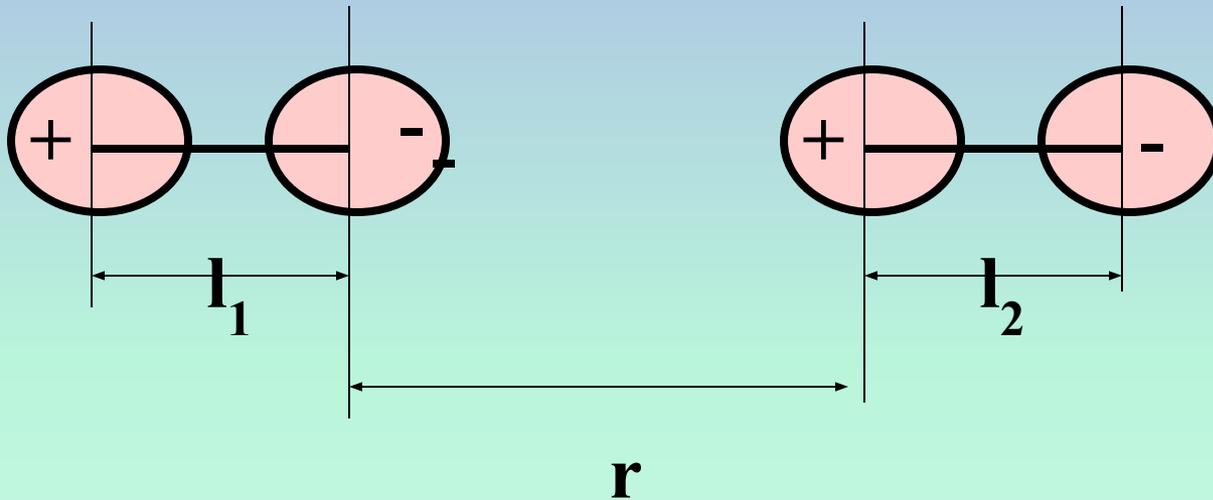
q_1 и q_2 – электрические заряды; ε - диэлектрическая проницаемость; ε_0 – электрическая постоянная ($8,85 \cdot 10^{-12}$ Кл/В · м)



ВАН-ДЕР-ВААЛЬСОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

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

ОРИЕНТАЦИОННОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ



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

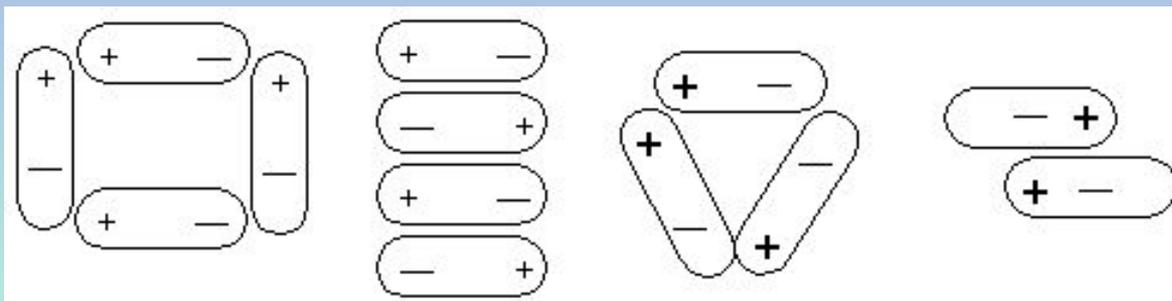
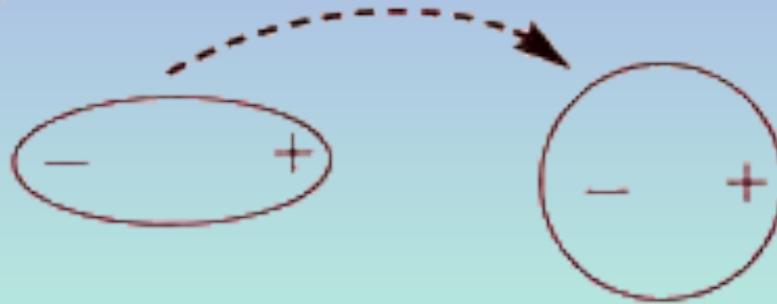


Схема взаимодействия между полярными молекулами

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.

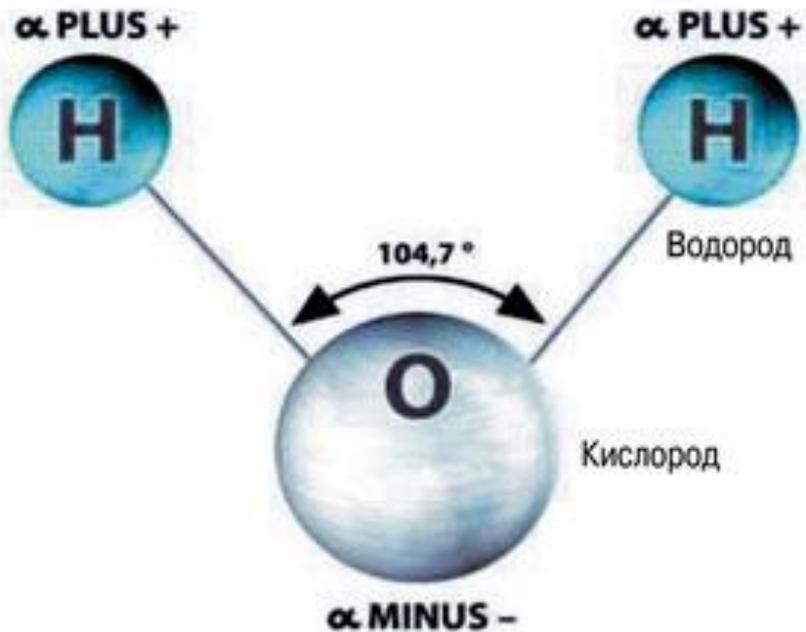
АНОМАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ВОДЫ:

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

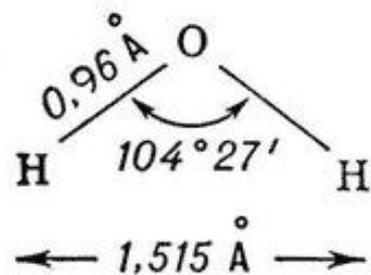
для сравнения: O_2 кипит при 90К и
замерзает при 54К.

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

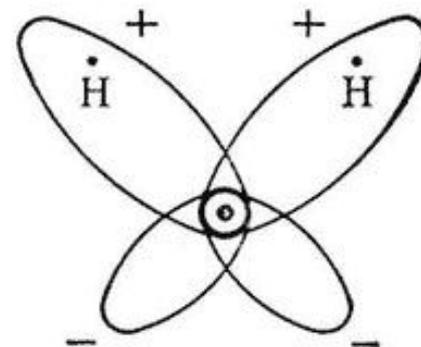
Строение молекулы воды



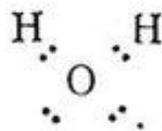
o8ode.ru



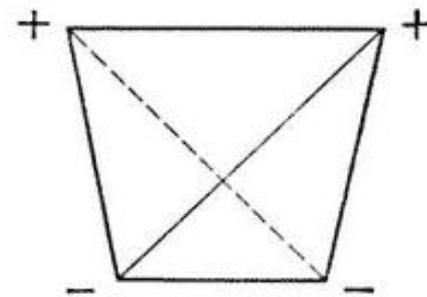
а



б

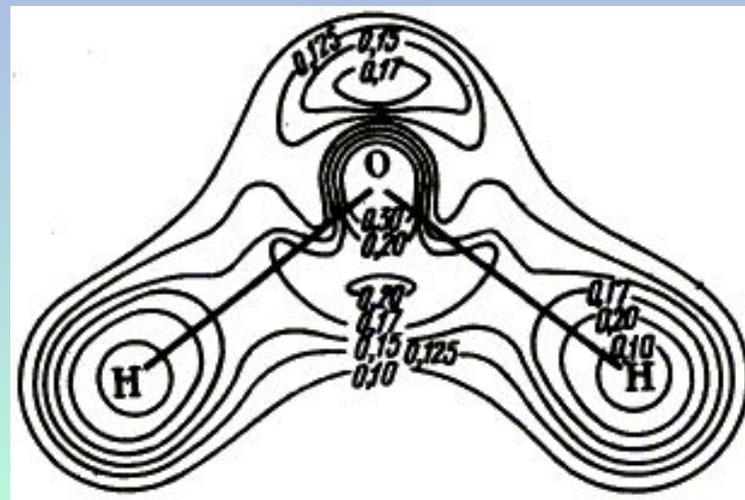
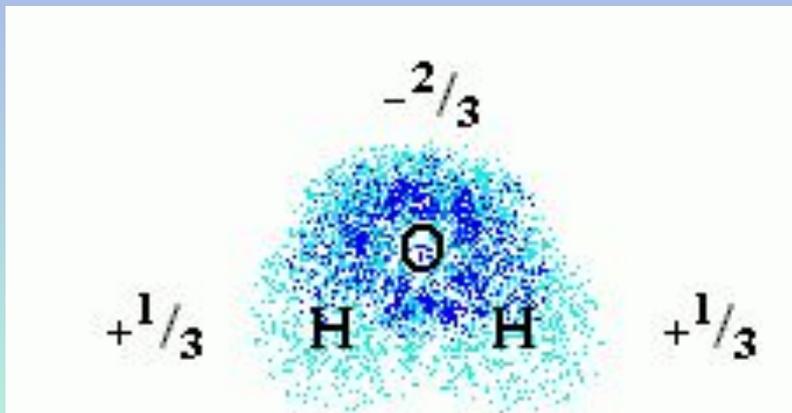


в



г

Распределение зарядов и электронной плотности в молекуле воды



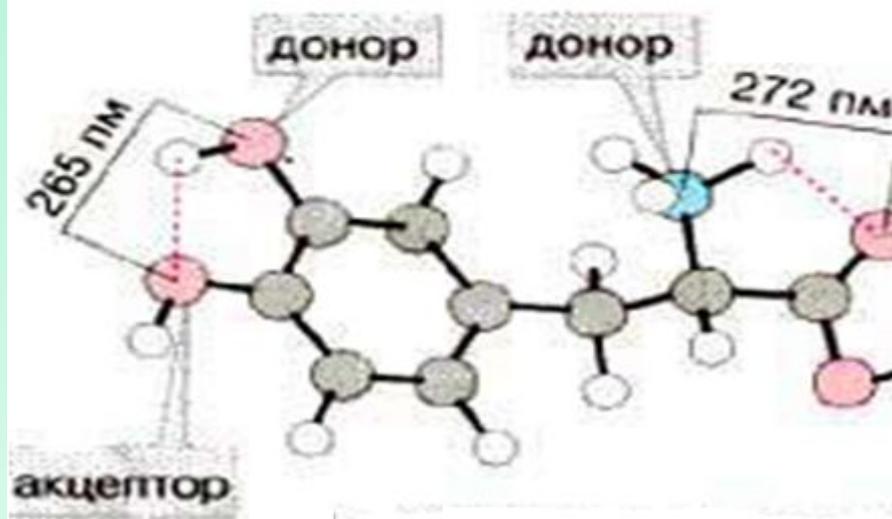
В 1999 г. было экспериментально показано, что водородная связь между молекулами воды во льду имеет частично (на 10%) ковалентный характер [Isaacs E. D., et al., 1999].

Водородные связи

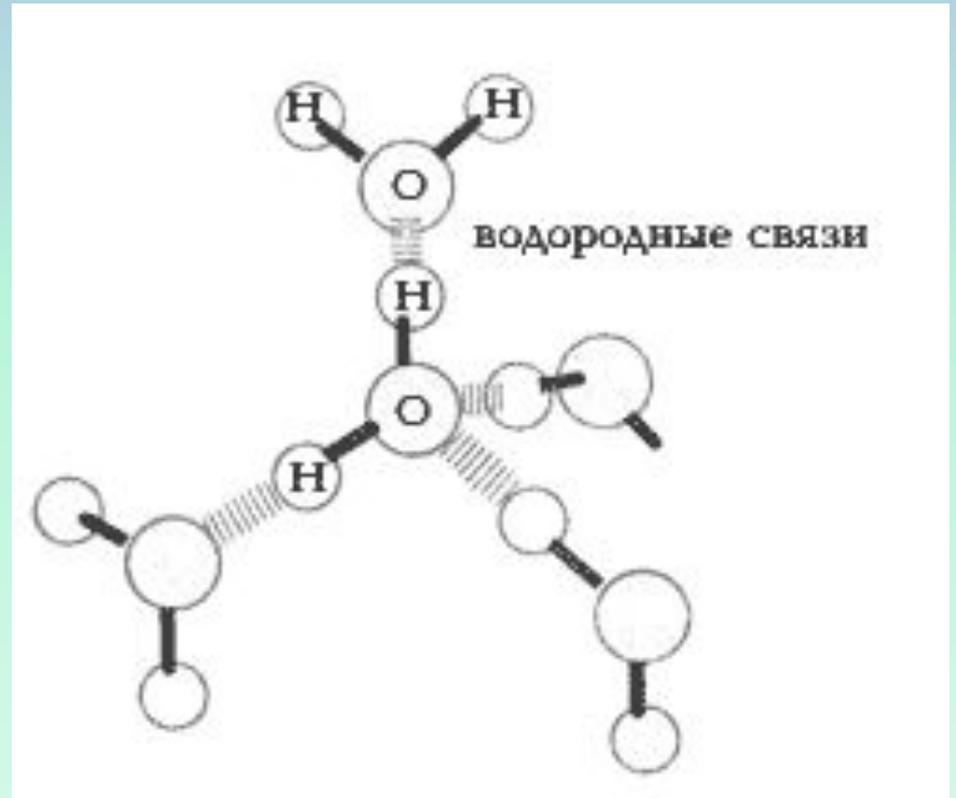
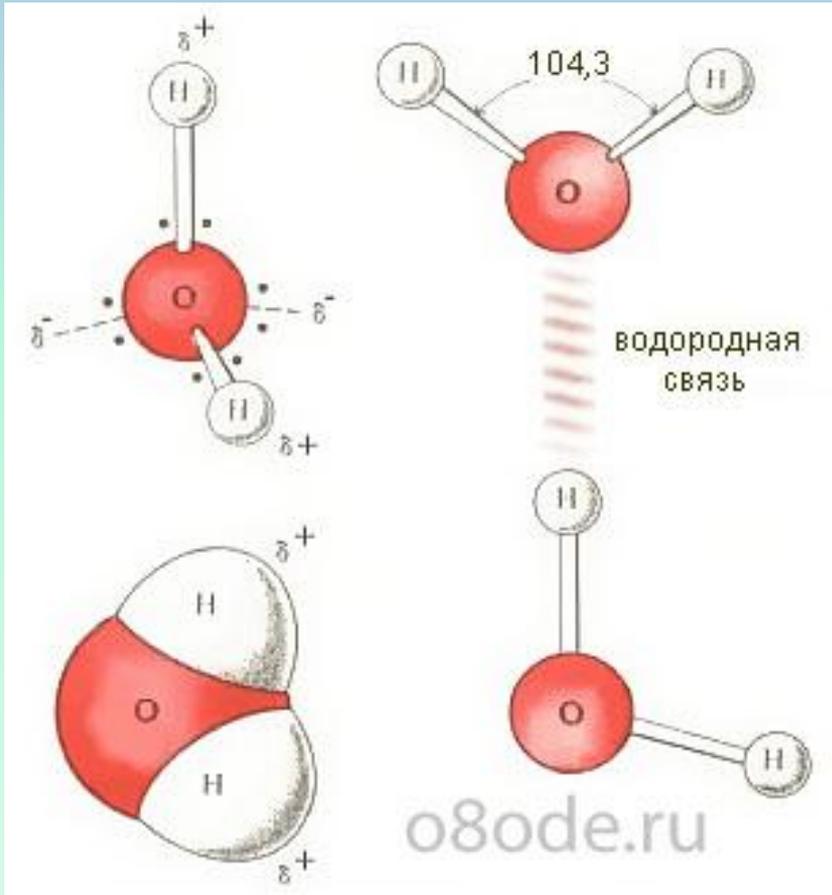
Доноры: $-O-H$, $>N-H$

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

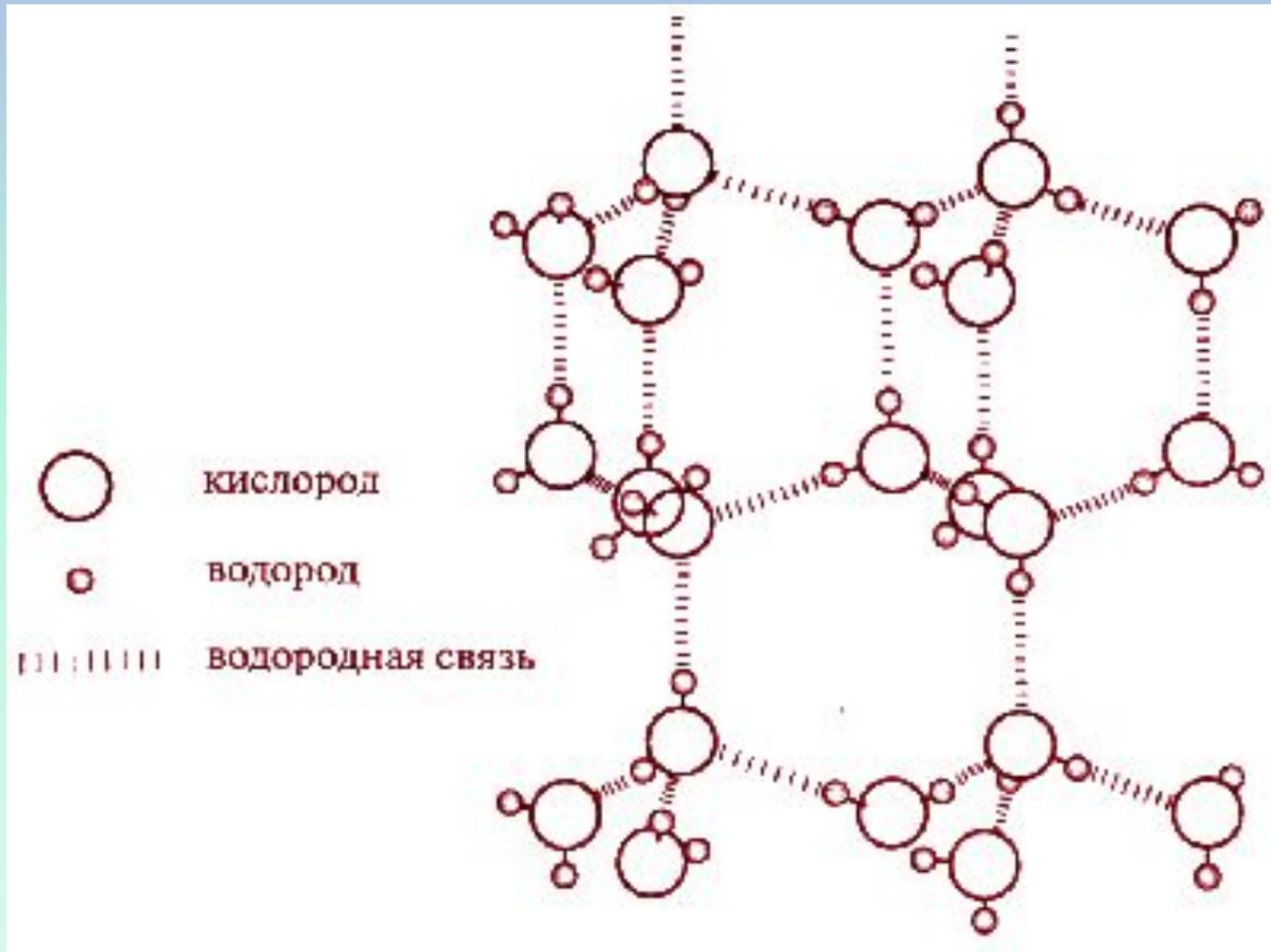
Длина : 260 - 320 пм

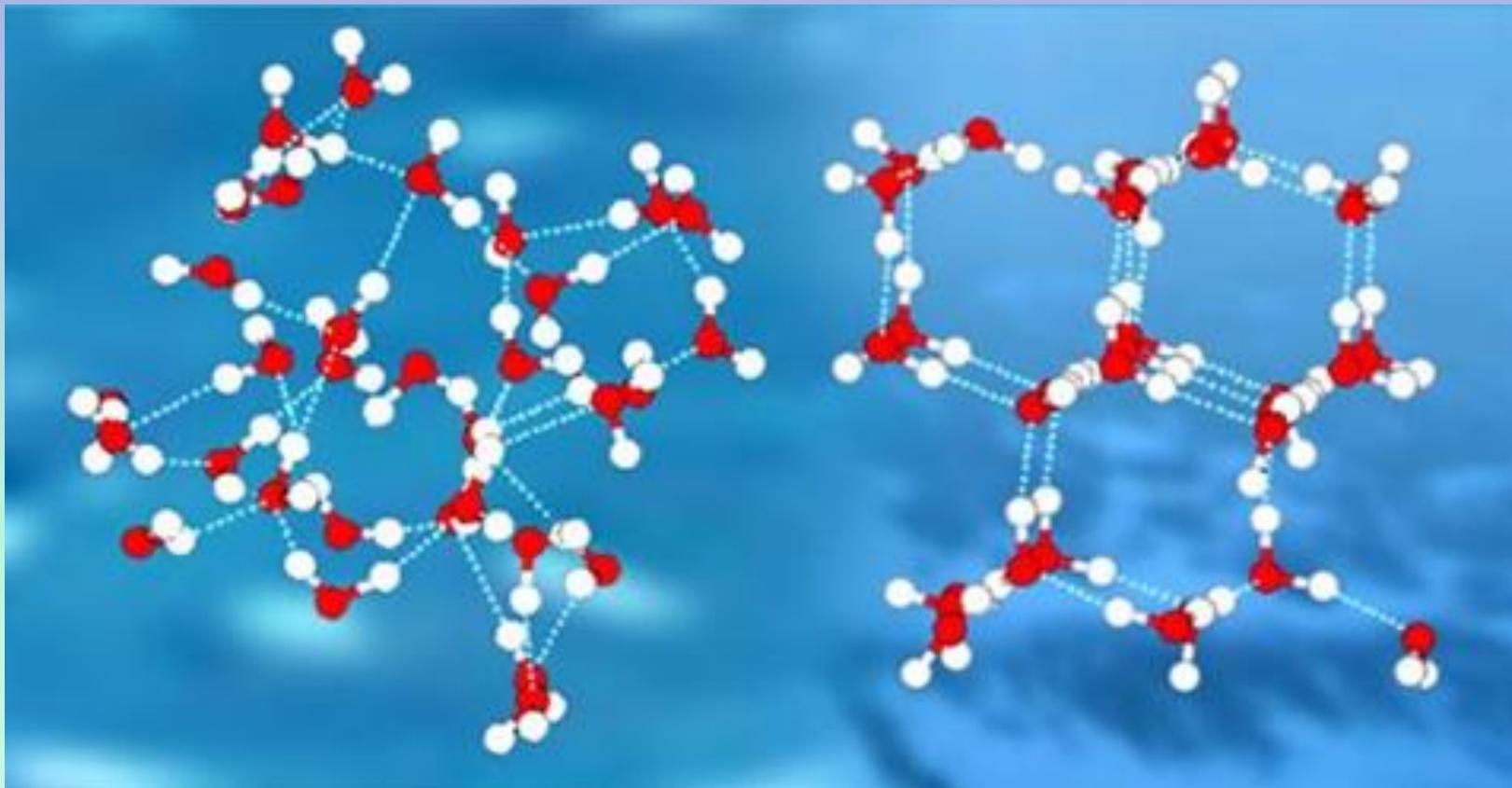


Водородные связи между молекулами воды



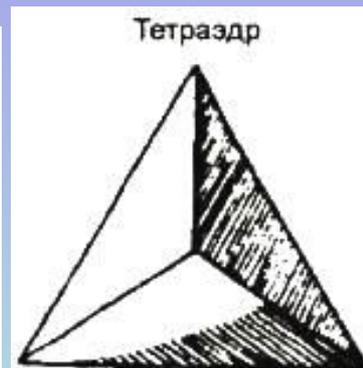
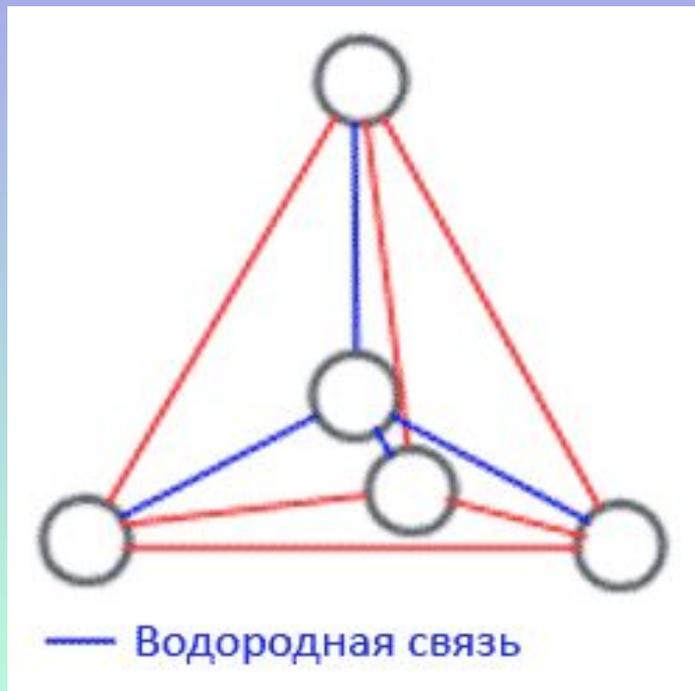
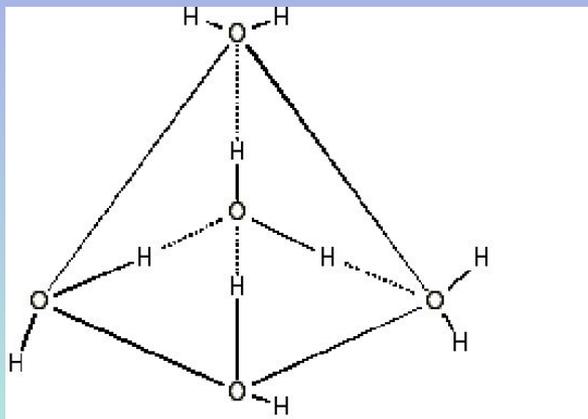
Водородные связи между молекулами воды (лед)





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

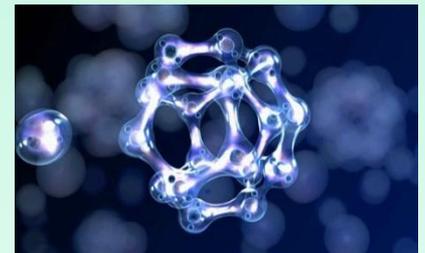
Впервые идея о том, что вода имеет сложную структуру появилась **в конце XIX века**.

20-е годы XX века: установлена структура льда.

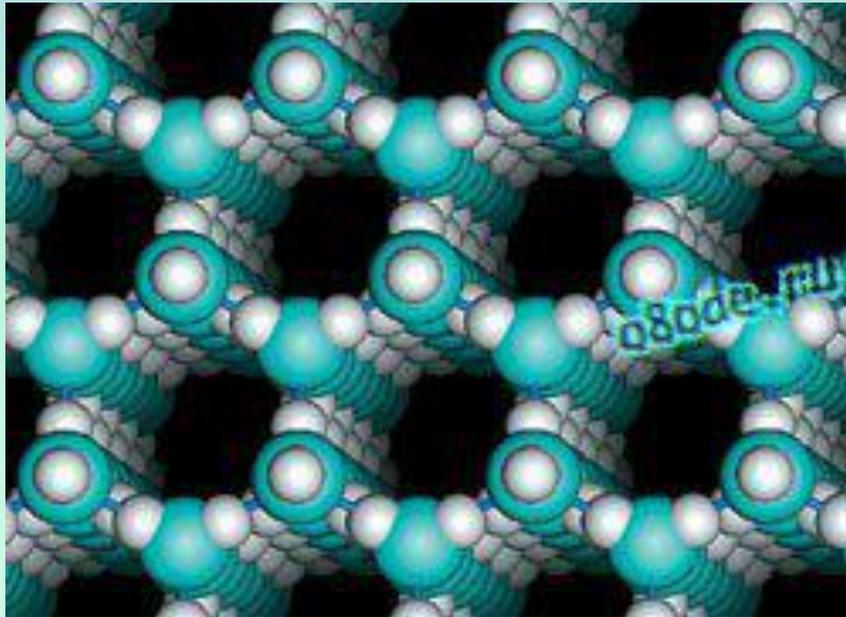
30-е годы XX века: предположение, что подобная трехмерная сетка присутствует и в жидкой воде.

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

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

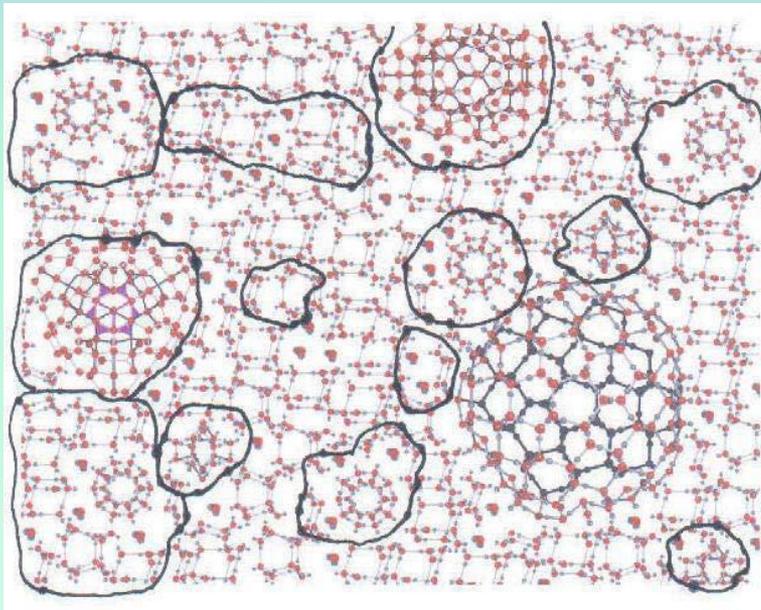


Модель непрерывной структуры воды (континуальная модель).



КЛАСТЕРНЫЕ МОДЕЛИ

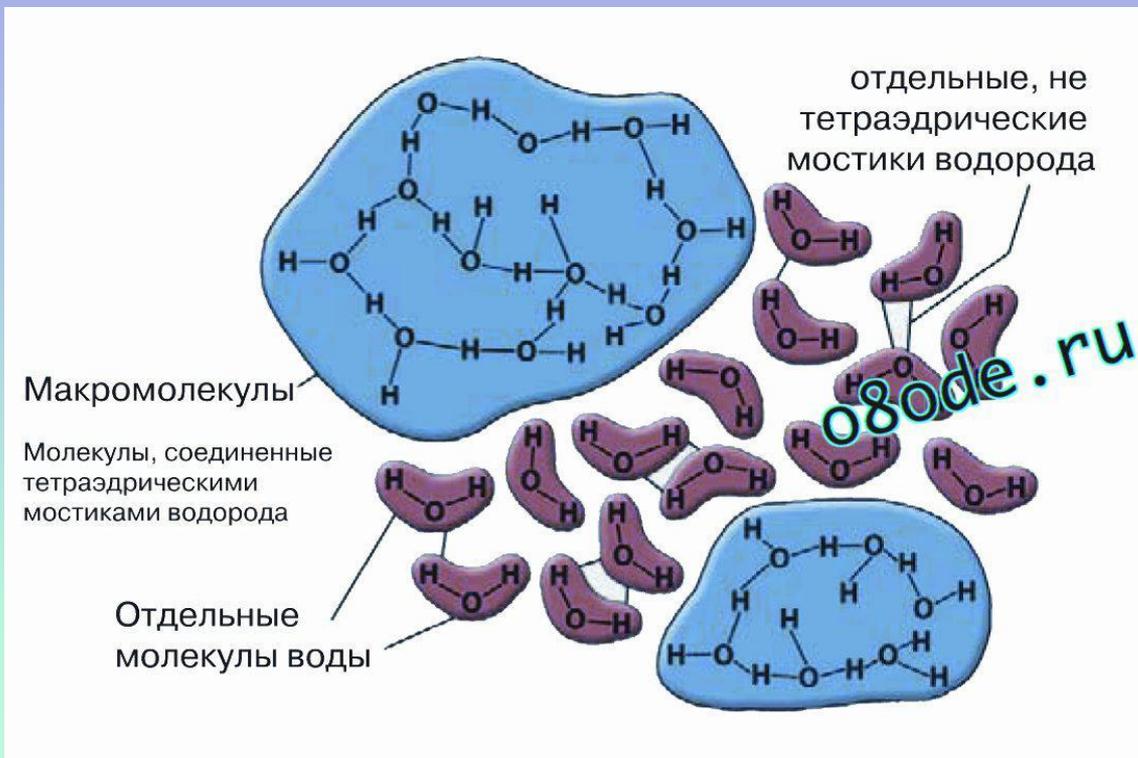
ВОДА В ВИДЕ **КЛАСТЕРОВ** ИЗ МОЛЕКУЛ, СОЕДИНЕННЫХ ВОДОРОДНЫМИ СВЯЗЯМИ, КОТОРЫЕ ПЛАВАЮТ В МОРЕ МОЛЕКУЛ, В ТАКИХ СВЯЗЯХ НЕ УЧАСТВУЮЩИХ



МОДЕЛЬ Г. НЕМЕТИ И Х. ШЕРАГИ

Кластеры связанных молекул, которые плавают в море несвязанных молекул

Модель мерцающих кластеров, Фрэк и Уэн, 1957 г.



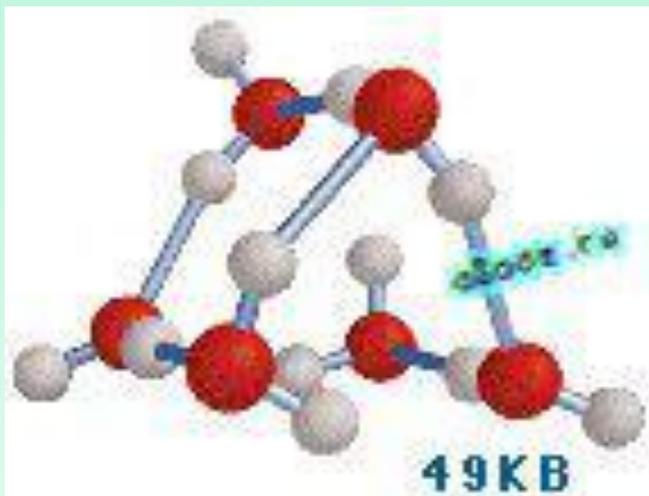
Водородные связи в воде непрерывно образуются и рвутся, причем эти процессы протекают кооперативно в пределах короткоживущих групп молекул воды, названных “мерцающими кластерами”. Их время жизни оценивают в диапазоне от 10^{-10} до 10^{-11} с.

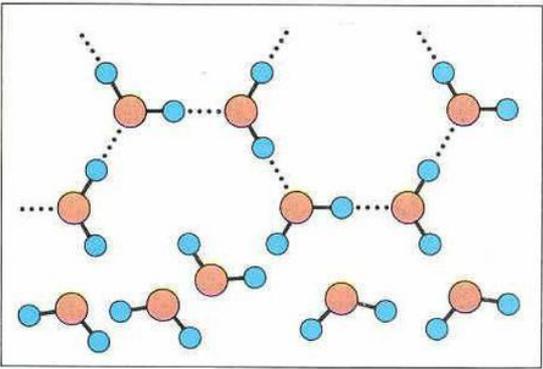
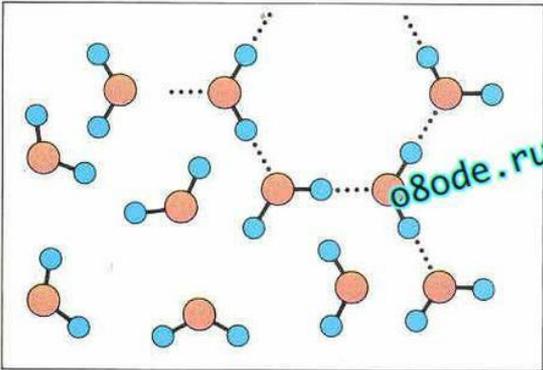
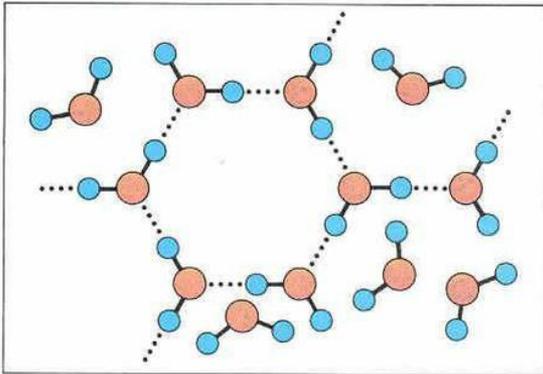
КЛАТРАТНАЯ МОДЕЛЬ ВОДЫ

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.

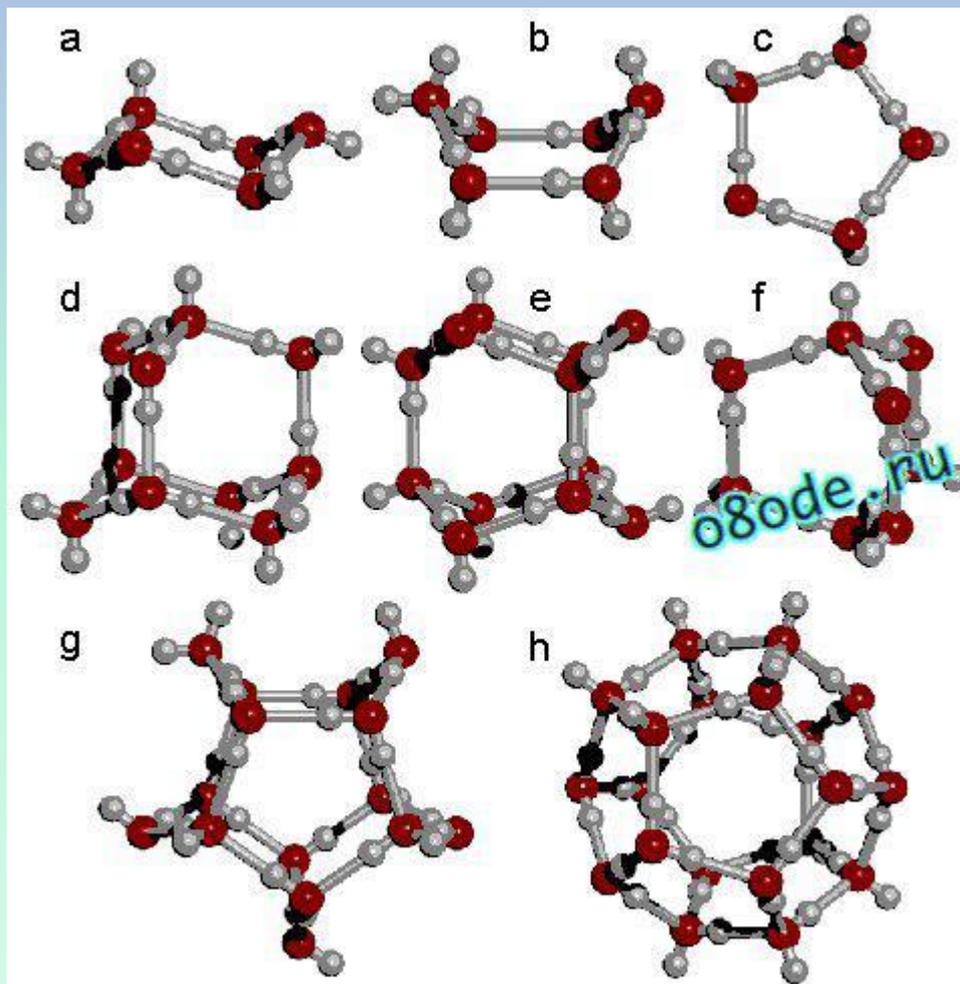




Структура жидкой воды.

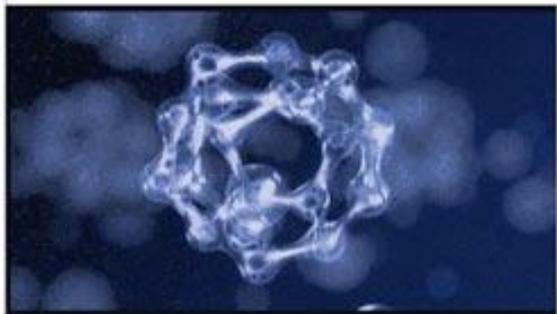
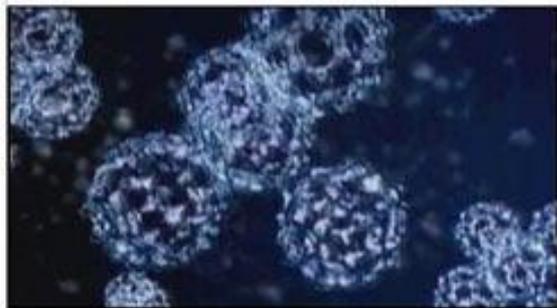
В воде кластеры периодически разрушаются и образуются снова. Время перескока составляет 10^{-12} секунд.

Некоторые возможные структуры кластеров воды



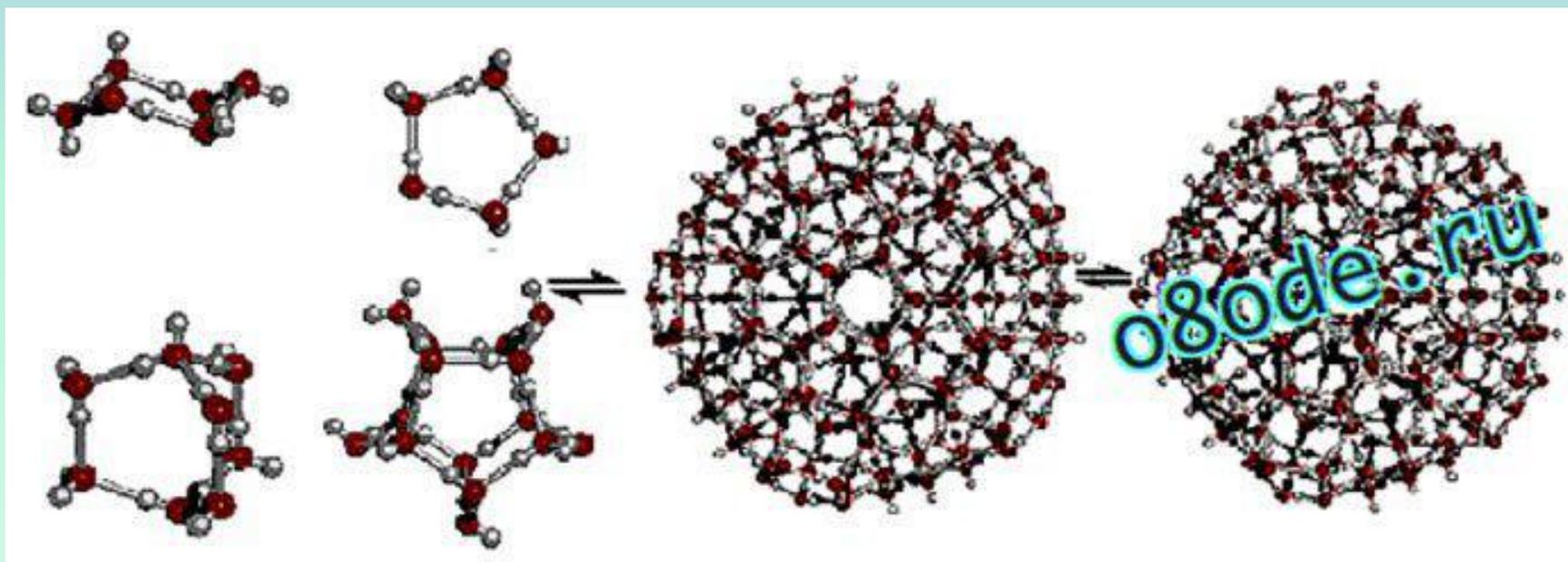


obode.ru



*Формирование отдельного
кластера воды
(компьютерное
моделирование)*

Объединяясь друг с другом, кластеры могут образовывать более сложные структуры



ГИДРОФОБНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

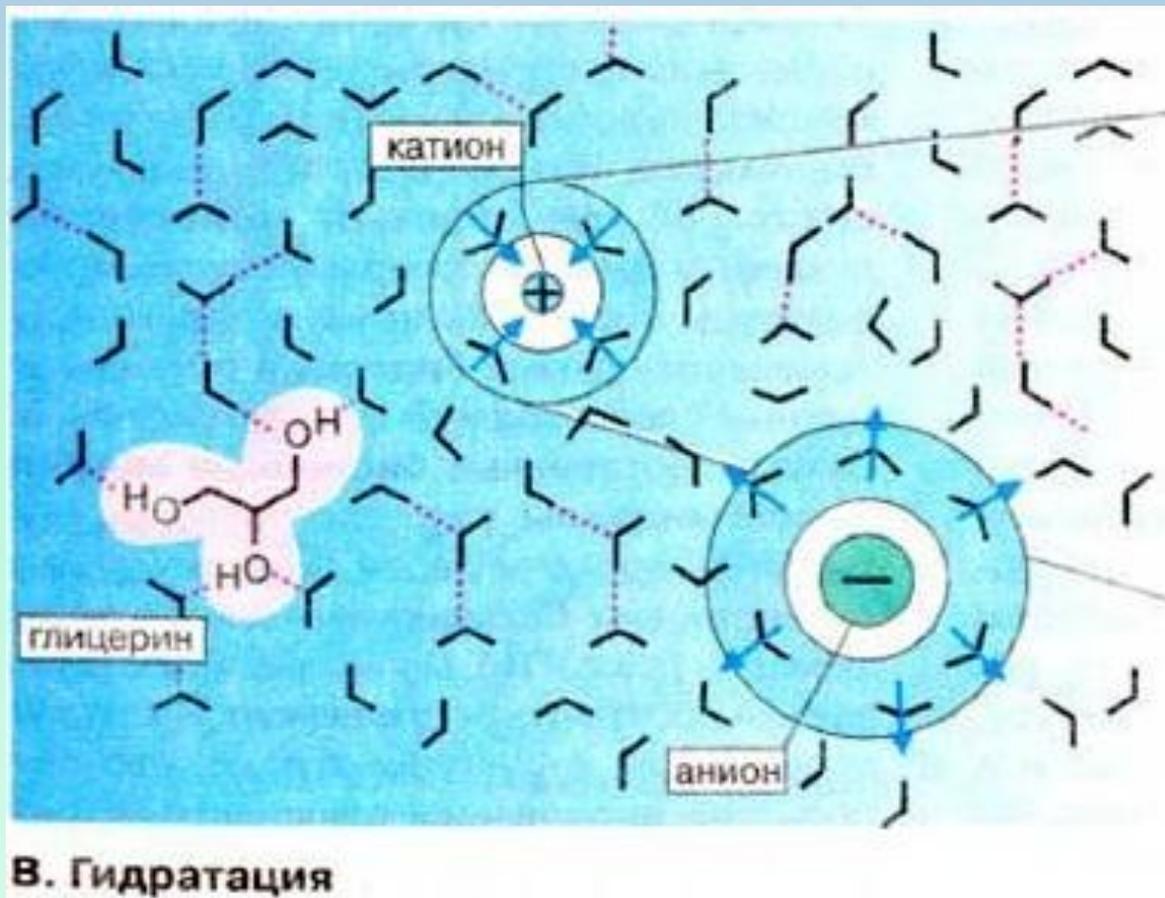
ЭНТРОПИЙНАЯ ПРИРОДА ГИДРОФОБНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

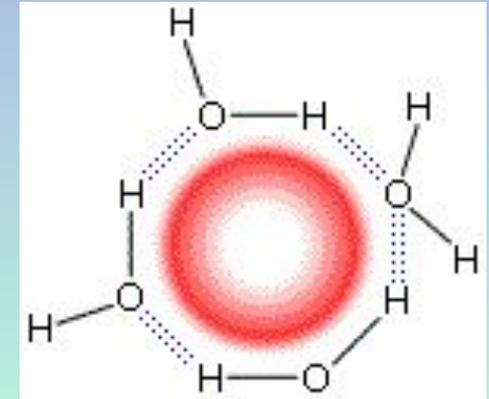
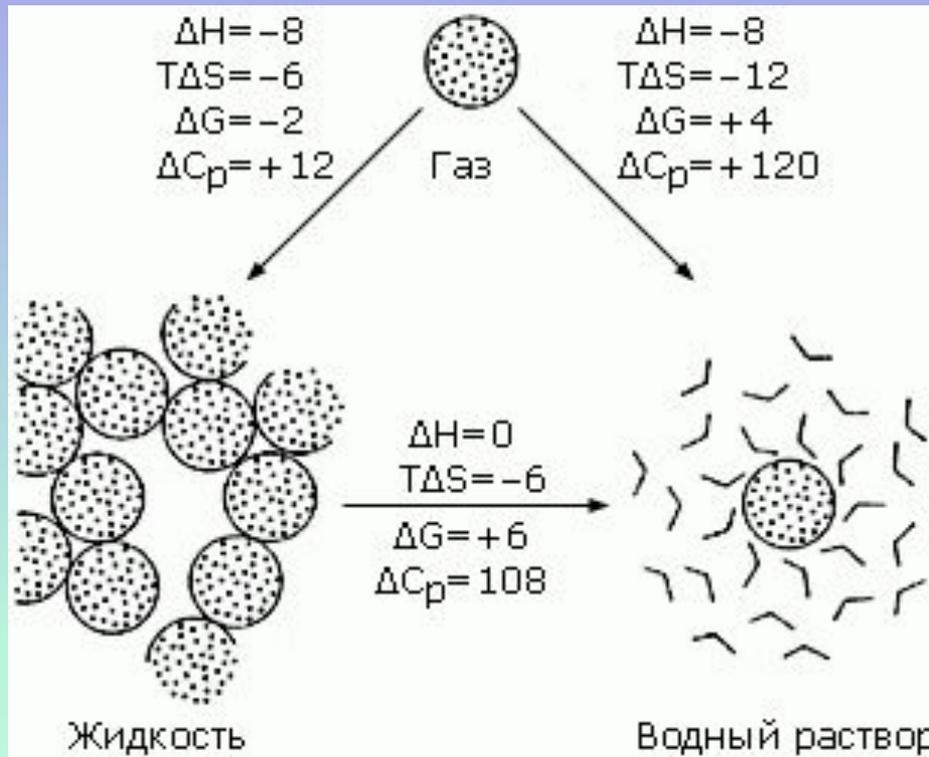
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

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

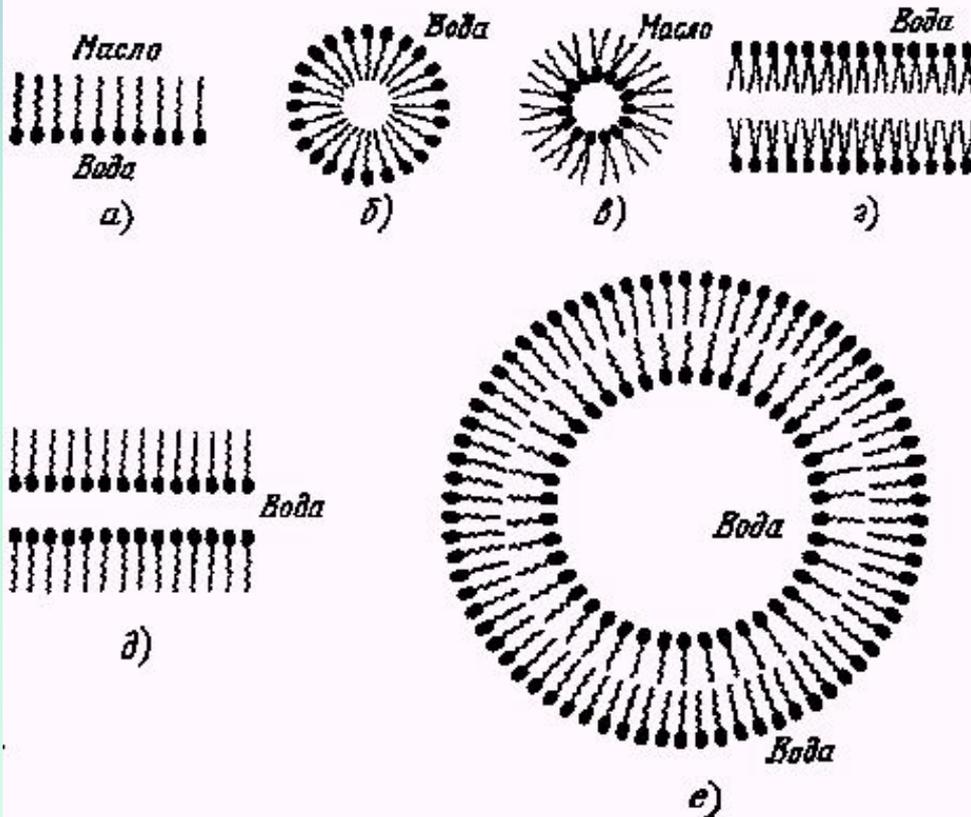


Рис. 2. а) Гиббсовский монослой на поверхности раздела жирной и полярной сред; б) сферическая мицелла, образованная АФ молекулами в полярном растворителе; в) обращенная сферическая мицелла в жирной среде; г) ламелла (бислой) в полярной среде (аналогичное строение имеют клеточные мембраны); д) обращенная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