

Экспериментальные методы исследований

доктор физико-математических наук

Власова Ольга Леонардовна

Санкт-Петербург

Рентгеноструктурный анализ биомакромолекул

Литература:

- В.А. Жемков, А.А. Болгов, О.Л. Власова, И.Б. Безпрозванный. Биофизические и биохимические методы экспериментальной нейробиологии: современные представления. В 3 ч. Ч.3: учеб.пособие. – СПб.: ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2020. – 100 с.

- **Структурная биология** как область знаний обязана своим появлением становлению метода рентгеноструктурного анализа (РСА). Кристаллографический анализ занимал до недавнего времени лидирующее место в качестве метода для установления атомной структуры биомакромолекул. На настоящий момент определены более 130 000 структур биополимеров и это число продолжает расти. Являясь неотъемлемой частью научных исследований в современной биологии, рентгеноструктурный анализ способен предоставить детальную информацию, например, не только о структуре белковых молекул, механизмах их функционирования, (но и) о молекулярных механизмах взаимодействия фермент-субстратных и белок-белковых комплексов, структурных перестройках при активации рецепторов.

- Интересно отметить, что начиная с 1901 г. по 2016 г., 67 Нобелевских премий получили структурные биологи (28 премий по химии и 39 по физиологии и медицине).
- Нобелевской премией 2017 года по химии отметили уже создателей криоэлектронной микроскопии.

- Это Ричард Хендерсон (Великобритания), Йоахим Франк (США) и швейцарец Жак Дебуши. Как объявил в среду в Стокгольме специальный Нобелевский комитет Королевской академии наук Швеции, "награда присуждена за разработку криоэлектронной микроскопии для определения структуры молекул с высоким разрешением в растворе". За этой формулировкой сравнительно новый метод электронной микроскопии, при котором образец исследуют при очень низких температурах. Как объясняют сами ученые, метод крио-ЭМ наиболее востребован в структурной биологии, потому что "позволяет наблюдать за образцами в их естественной среде". И это выгодно отличает его от рентгеновской кристаллографии, при которой требуется кристаллизация образца или помещение его в нефизиологическую среду. При исследовании биообъектов это во многих случаях неприемлемо.

- Первым этапом РСА является **получение кристалла интересующего вещества, или этап кристаллизации**. В этом этапе кроется еще одно отличие кристаллографии биомакромолекул от структурных исследований минералов. Многие минералы сами по себе являются крупными одиночными кристаллами, т. е. образцами, которые могут быть непосредственно подвергнуты (РСА). Многие неорганические соединения кристаллизуются в результате упаривания, понижении температуры горячего раствора, химической реакции, росте из расплава, росте из газовой фазы и т. д. В случае лабильных биомакромолекул **этап получения качественных белковых кристаллов является одним из самых сложных и длительных**. При наличии достаточных материальных и человеческих ресурсов в большинстве случаев можно получить кристалл белка. Однако, в некоторых случаях этого не получается сделать и тогда переходят к кристаллизации белков-гомологов и мутантных форм. Для получения дифракционной картины **кристалла он монтируется на гониометрической головке дифрактометра**, которая позволяет точно регулировать повороты кристалла.

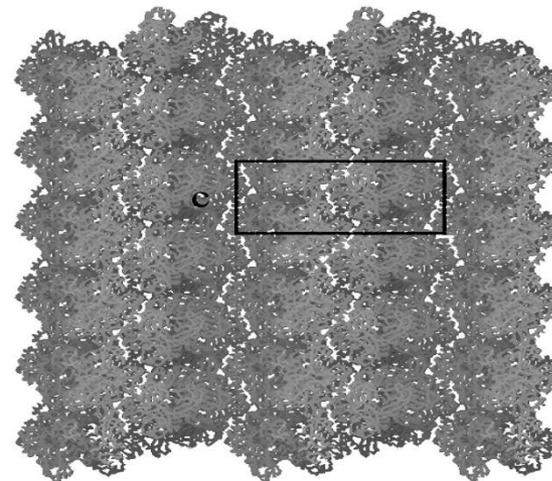
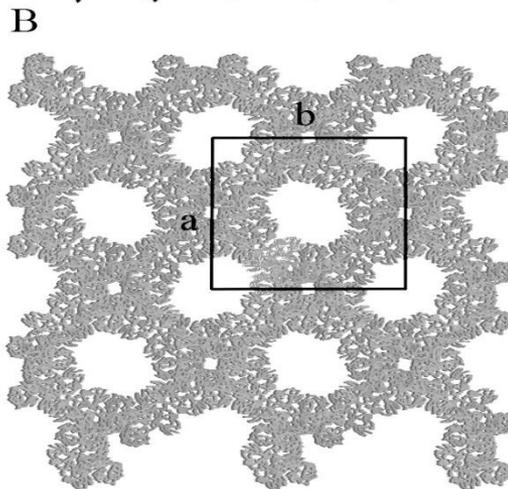
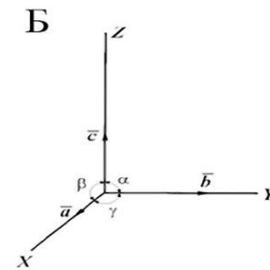
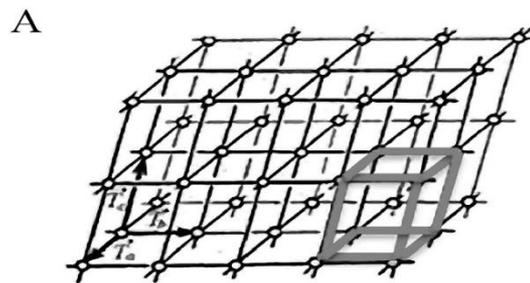
Особенности дифракции белковых кристаллов по сравнению с кристаллами малых молекул

Параметр	Кристаллы малых молекул	Белковые кристаллы
Характерные размеры элементарных ячеек	Небольшие для кристаллов неорганических соединений ($<10 \text{ \AA}$), средние для кристаллов органических соединений	Большие для белков среднего размера (десятки \AA), огромные для вирусов, белковых комплексов (сотни \AA)
Симметрия кристаллов	Кристаллы от низкой до высокой категорий, возможны высокосимметричные кристаллы кубической сингонии	Как правило, кубическая симметрия не встречается
Содержание воды	–	Высокое процентное содержание воды (до 80 %)
Твердость	Твердые	Хрупкие
Интенсивность дифракционных максимумов	Сравнимая с белками для органических соединений, интенсивная дифракция при наличии многоэлектронных атомов	Состоят из «легких» атомов, слабо рассеивающих (РИ)
Дифракционный предел	Для совершенных кристаллов могут наблюдаться дальнеугловые рефлексy	Дифракционный предел ограничен, как правило, 2 \AA

Симметрия кристаллов

- Понятие *симметрии* лежит в основе кристаллографии.
- Суть симметрии заключается в возможности произвести *преобразование объекта, совмещающее его с самим собой в новом положении.*
- *Элементами симметрии* называются геометрические образы (плоскости, прямые линии или точки).
- **Кристаллы** – твердые тела, обладающие трехмерно-периодической пространственной атомной структурой. Практически, это трехмерная сетка, в узлах которой располагаются атомы (в случае белков – молекулы).

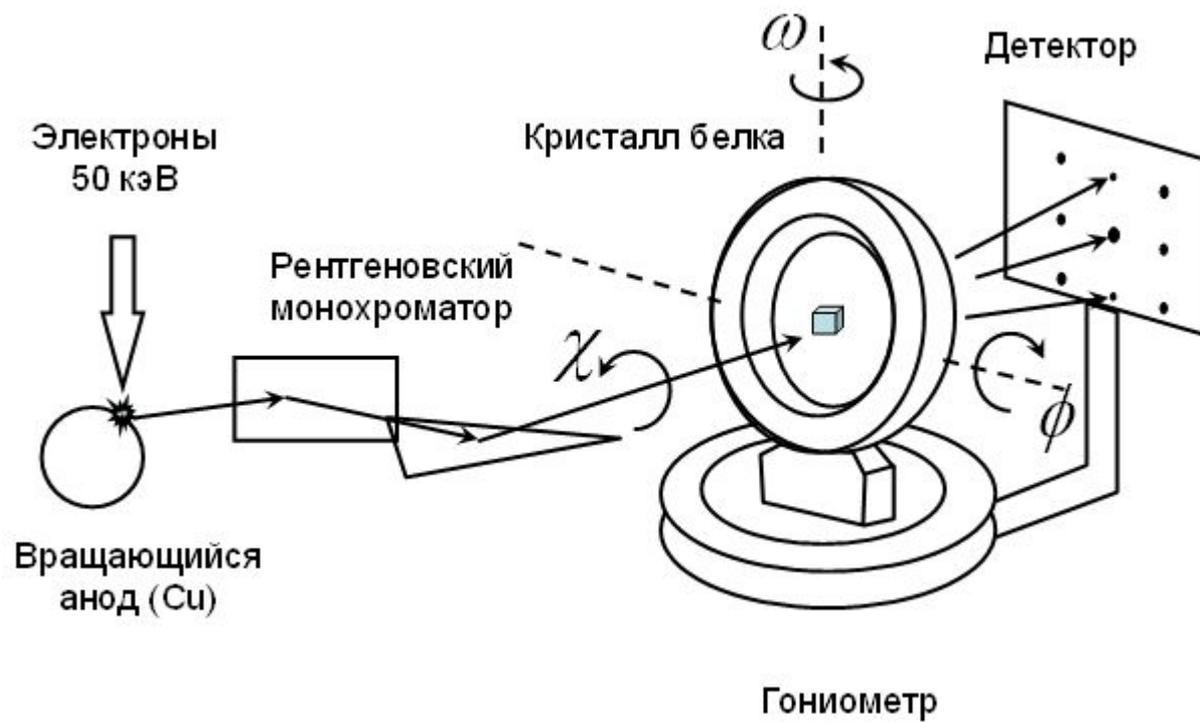
- Может быть выбрана *элементарная ячейка* кристалла — параллелепипед минимального объема, имеющий симметрию ту же, что и сам кристалл, и *трансляцией* которого в трех направлениях можно восстановить всю кристаллическую структуру.



- *Сингония*, или *кристаллическая система* позволяет классифицировать кристаллы с одинаковой совокупностью углов между гранями.
- Кристаллы каждой сингонии характеризуются одинаковыми углами и относительными величинами отрезков по трем координатным осям; и обладают подобным набором элементов симметрии – осями и плоскостями.
- Например:
 1. Все ребра не равны и все углы не равны – триклинная сингония;
 2. Все ребра не равны, два угла 90 градусов, третий – любой – моноклинная сингония.

- **Рентгеновский дифрактометр** состоит из источника рентгеновского излучения, рентгеновского гониометра, в который помещают исследуемый образец, детектора излучения и электронного измерительно-регистрирующего устройства. Детектором в рентгеновском дифрактометре служит не фотоплёнка, как в рентгеновской камере, а счётчики квантов (сцинтилляционные, пропорциональные, полупроводниковые счётчики или Гейгера — Мюллера счётчики). Дифракционную картину образца в рентгеновском дифрактометре получают последовательно: счётчик перемещается в процессе измерения и регистрирует попавшую в него энергию излучения за определённый интервал времени.

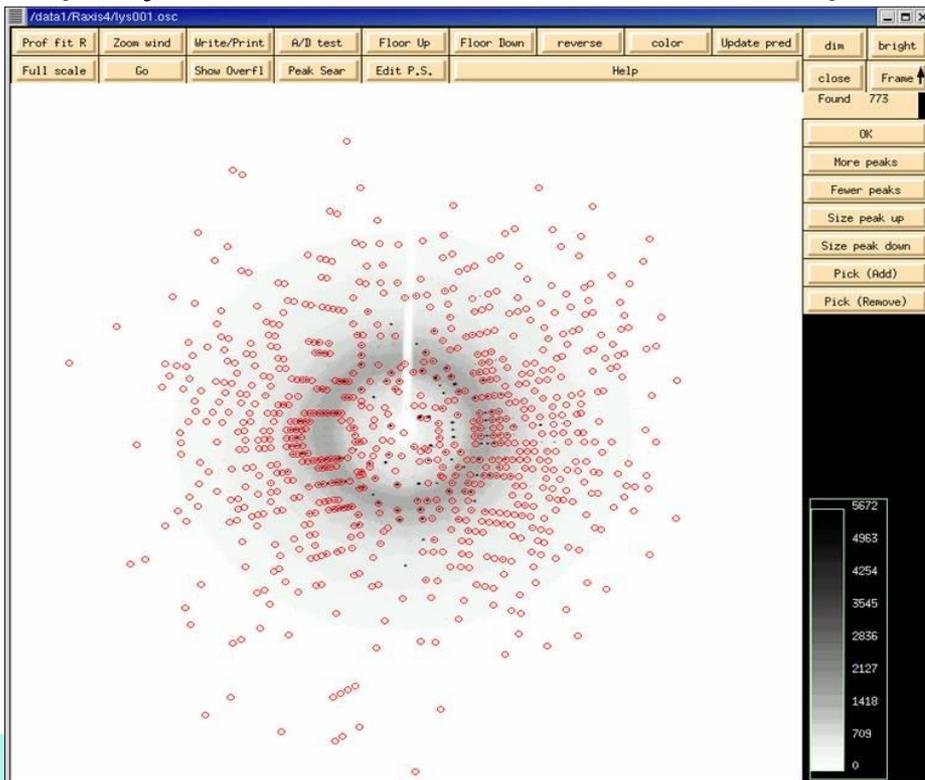
Рентгеновский дифрактометр



- Обработка результатов рентгеновского эксперимента базируется на мощном математическом аппарате. Когда монохроматический рентгеновский луч падает на определенным образом ориентированный кристалл, то рассеяние происходит в дискретных направлениях, определяемых кристаллической решеткой. Дифракционная картина, возникающая на пленке детектора, представляет собой набор пятен, или рефлексов. Измерив **интенсивность рефлексов**, можно получить значения модулей т.н. **структурных факторов** (комплексных чисел), описывающих распределение электронной плотности в кристалле. Но чтобы однозначно определить электронную плотность, нужно знать еще и соответствующие значения **фаз этих факторов**, информация о которых не содержится в дифракционной картине. Если для какого-либо кристалла фазы определены, то расчет положений атомов этого кристалла не составляет принципиальных трудностей. Проблема фаз – центральная проблема РСА.
- Записанная серия двумерных дифракционных картин, каждая из которых соответствует разной ориентации кристалла, преобразуется в трехмерную модель электронной плотности; преобразование использует математический метод преобразования Фурье.

Индексирование

Обработка данных начинается с индексации отражений. Это означает определение размеров элементарной ячейки и того, какой пик изображения соответствует какому положению в обратном пространстве. Побочным продуктом индексации является определение симметрии кристалла.



Поиск пиков и
индексирование в HKL2000

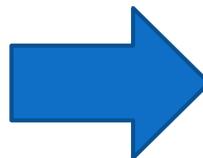
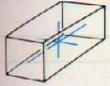
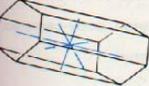


Table 16-1

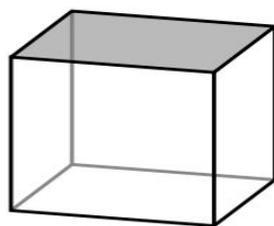
Seven Crystal Systems			
	Lengths of the Unit Cell Axes all equal	Angles Between the Unit Cell Axes all = 90°	Crystal System cubic
	2 equal 1 unequal	all = 90°	tetragonal
	3 equal 1 unequal	1 = 90° 3 = 60°	hexagonal
	all equal	all ≠ 90°	rhombohedral
	all unequal	all = 90°	orthorhombic
	all unequal	2 = 90°, 1 ≠ 90°	monoclinic
	all unequal	all ≠ 90°	triclinic

Определение кристаллической
системы, симметрии

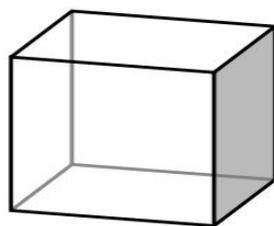
Индексы Миллера

- **Индексы Миллера** — кристаллографические индексы, характеризующие расположение атомных плоскостей в кристалле. Индексы Миллера связаны с отрезками, отсекаемыми выбранной плоскостью на трёх осях кристаллографической системы координат (не обязательно декартовой). Таким образом, возможны три варианта относительного расположения осей и плоскости:
 - плоскость пересекает все три оси
 - плоскость пересекает две оси, а третьей параллельна
 - плоскость пересекает одну ось и параллельна двум другим
- Индексы Миллера выглядят как три взаимно простых целых числа, записанные в круглых скобках: (111), (101), (110)...

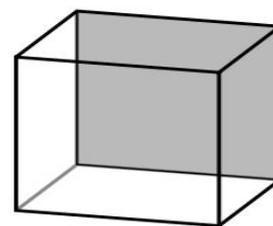
- Плоскости с различными индексами Миллера в кубических кристаллах



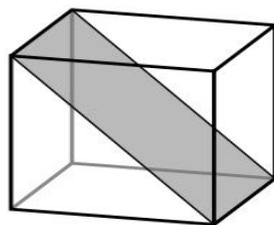
(001)



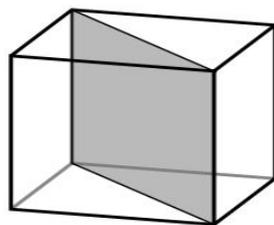
(100)



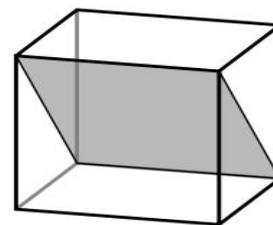
(010)



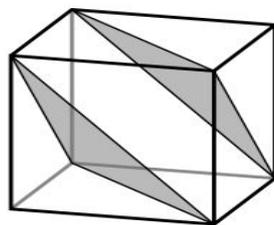
(101)



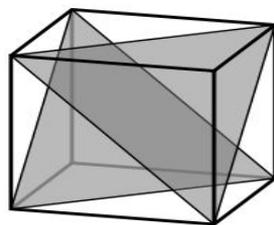
(110)



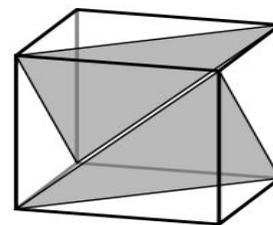
(011)



(111)



(11 $\bar{1}$)



($\bar{1}$ 11)

Шкалирование

Интенсивности дифракционных максимумов зависят от условий эксперимента (время экспозиции, напряжение на трубке и т.д.). Таким образом, необходимо привести интенсивности, полученные в нашем эксперименте, к стандартной шкале. Процедуру называют **шкалированием**, или приведением к стандартной шкале.

Решение проблемы фаз

В ходе эксперимента измеряются интенсивности дифрагированных лучей. Основной проблемой РСА является принципиальная невозможность измерения разности фаз между падающей и отраженной волной. Как мы увидим далее, для решения кристаллической структуры необходимо знание двух величин: **интенсивности** отраженной волны в каждом конкретном направлении и ее **фазы**. Таким образом, из данных дифракционного эксперимента мы можем получить только половину необходимой информации. Эта проблема получила название **проблемы фаз**.

Фазовая проблема

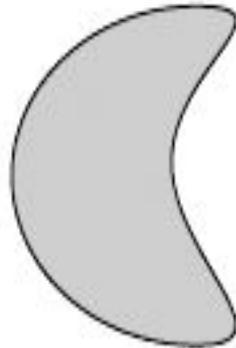
Подходы к решению проблемы:

- *Изоморфное замещение*
- *Использование эффекта аномального рассеяния*
- *Метод молекулярного замещения*
- *«Прямые» методы*

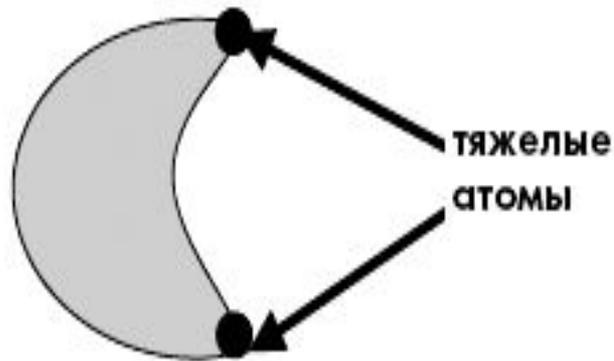
Изоморфное замещение

Можно попытаться внедрить в молекулы кристалла некую метку – один или несколько тяжелых атомов (например, ионы тяжелых металлов), которые могут быть либо добавлены к нативной структуре, либо могут замещать часть ее атомов .

нативный белок



изоморфное производное



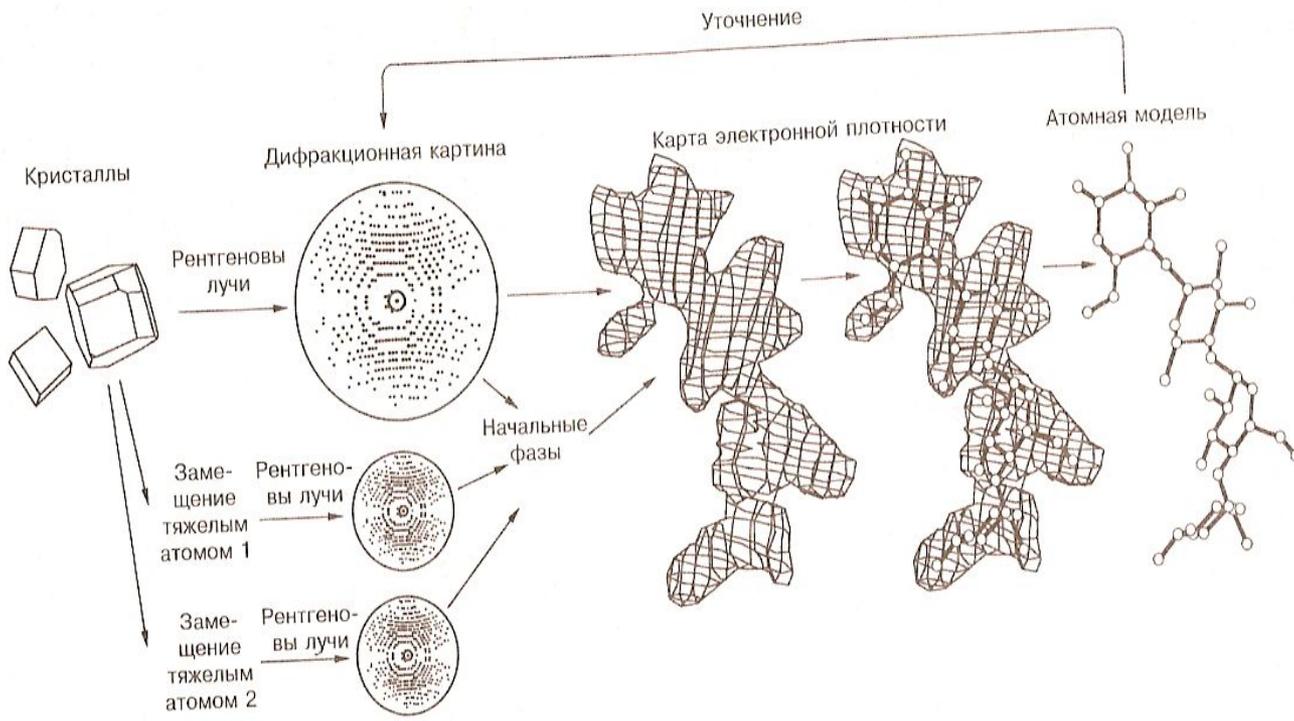
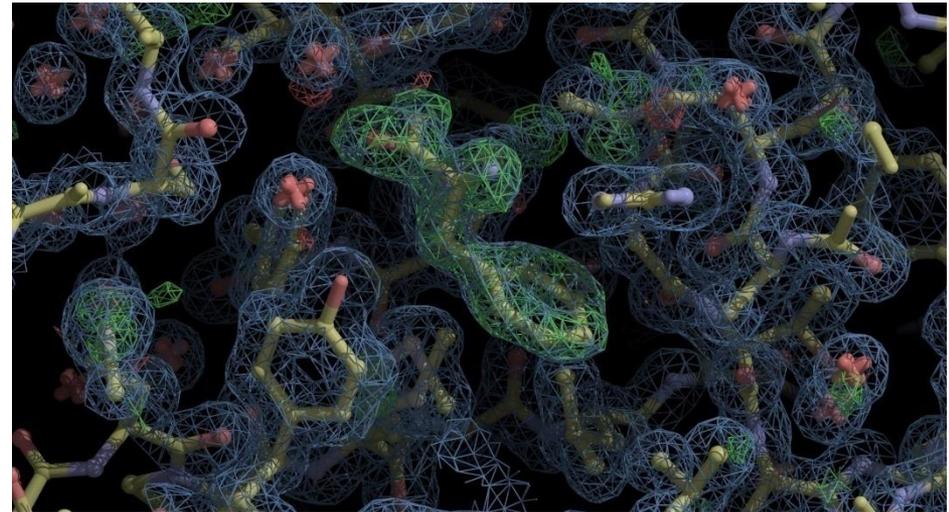
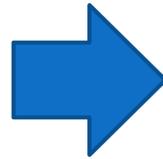
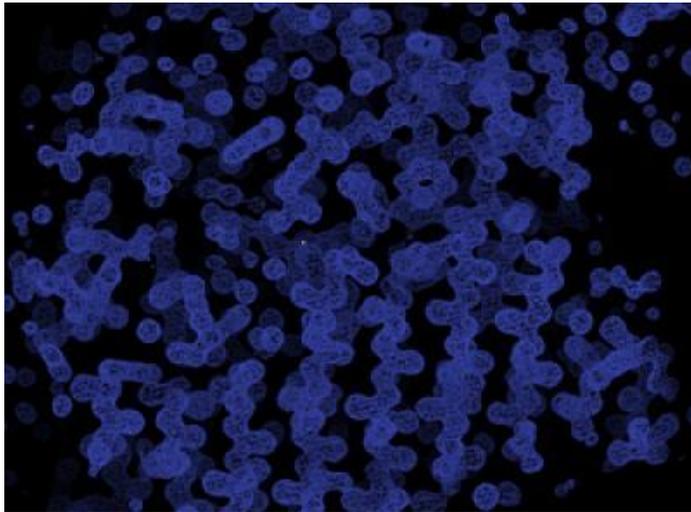


Рис. 4.13. Основная схема рентгенокристаллографического анализа белков. Из измерений дифракционной картины нативного кристалла, а если нужно, то и кристалла, замещенного тяжелым атомом, вычисляется электронная плотность, и строится атомная модель. Исходная модель уточняется, например, путем ее модификаций до тех пор, пока вычисленная дифракционная картина не совпадет с измеренной картиной.



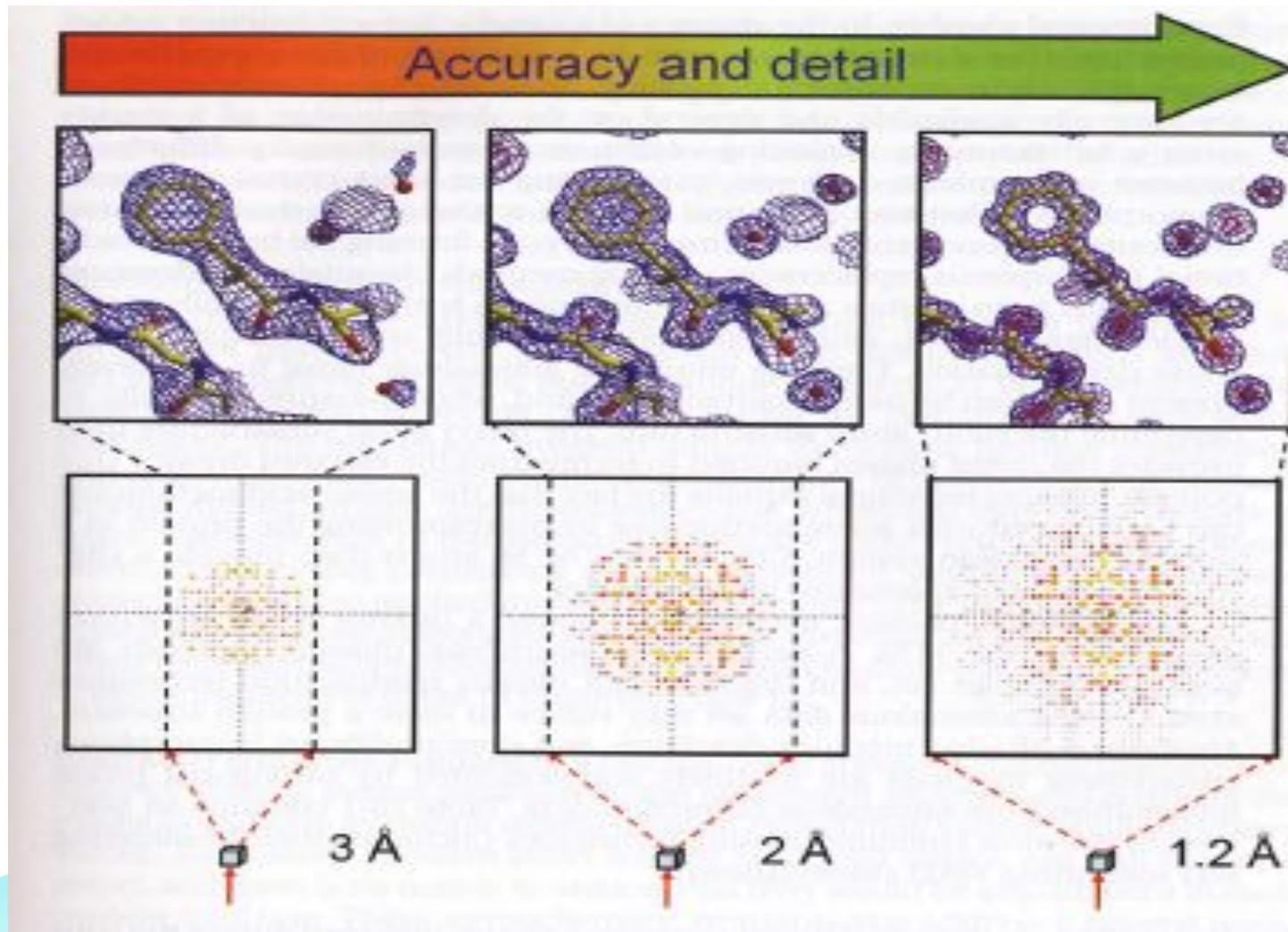
Модель, вписанная в карту электронной плотности

Построение модели белка



После расчета карты электронной плотности становится возможным **построение модели**, в нашем случае – модели белка. Модель – наша **интерпретация** карты электронной плотности.

Понятие разрешения имеет в РСА тот же смысл, что и при образовании изображения в оптическом микроскопе. Разрешение 6 \AA низкое, а 2 \AA – высокое. Оно зависит от предельной величины межплоскостного расстояния.

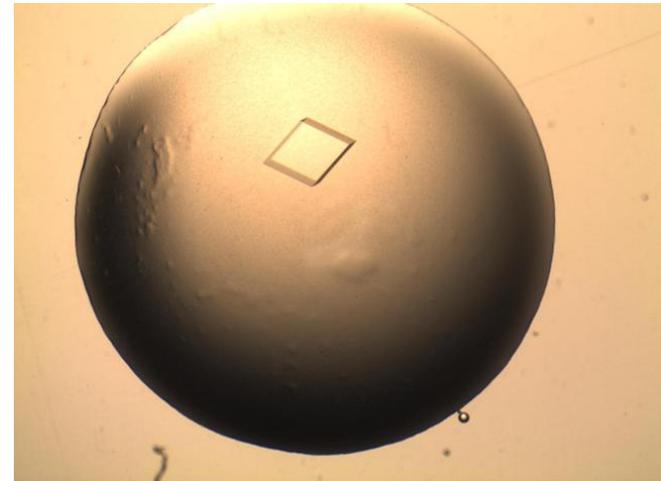
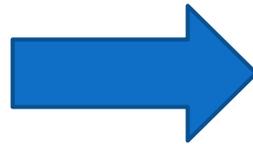


Уточнение модели белка

После построения модели необходимо ее **уточнение**.
Уточнение основано на **сравнении** интенсивностей дифракционных максимумов, *которые бы давала наша модель*, если бы она существовала в кристалле, с интенсивность максимумов, измеренных нами в эксперименте. Понятно, что в случае идеальной модели расхождение равнялось бы нулю. В реальности это не так, и при варьировании углов, длин связей в модели добиваются максимальной сходимости этих двух величин.

Кристаллизация

В случае лабильных биомакромолекул этап получения качественных белковых кристаллов является **одним из самых сложных**. В большинстве случаев при наличии достаточных материальных и человеческих ресурсов можно получить кристалл белка. В некоторых случаях это **не получается сделать** и тогда переходят к белкам-гомологам и мутантным формам.



Кристаллизация

Получение пересыщенного раствора:

- *Испарение - постепенное удаление растворителя из раствора*
- *Понижение растворимости в процессе охлаждения*
- *Использование солей, либо органических растворителей, понижающих растворимость*
- *Растворимость белков и нуклеиновых кислот сильно зависит от рН раствора*

Выделение и очистка белка

Для получения нужного белка используют различные биохимические методы

- *Гомогенизация - измельчение биологического материала*
- *Экстракция - извлечение из него белков или перевод белков в растворенное состояние*
- *Очистка - выделение исследуемого белка из смеси других белков, и получение индивидуального белка.*

Источники излучения

- Рентгеновские трубки
- Источники синхротронного излучения
(синхротроны, лазеры на свободных электронах)

Источники рентгеновского излучения



Rigaku R-Axis IV



Advanced Photon Source
in Argonne Lab

- В качестве источника рентгеновских лучей в настоящее время стараются использовать **синхротронный ускоритель**. Это довольно дорогое сооружение. Лабораторные рентгеновские установки тоже используются, но синхротронное излучение имеет существенные преимущества.
- Во-первых, это мощность пучка. Здесь два плюса. Первый понятен – сокращается время эксперимента. Второй – биологические кристаллы имеют тенденцию разрушаться под действием рентгеновского излучения. Процесс разрушения занимает определенное время, и если пучок мощный, то можно успеть зарегистрировать нужную картину, пока кристалл не разрушился.

Определение первых структур белков

- 1920-е – работа с фибриллярными белками (фиброин шелка, коллаген)
- 1930-е – 1940-е – У. Астбери предположил наличие альфа и бета форм фибриллярных белков, что объясняло их физические свойства
- М. Хаггинс предложил количественные геометрические параметры, которым должны удовлетворять модели полипептидных цепей белков. Придал решающее значение **водородной связи** в формировании структуры полипептидов.

Модели Полинга и Кори 1951 г

- Решающее обстоятельство, которое отличает их работу от всех предшествующих, состоит в том, что помимо строгих геометрических ограничений Полинг и Кори допустили, что спираль может содержать **нецелое** число остатков на виток. Структуры, предложенные Полингом и Кори, удовлетворяли всем известным в то время экспериментальным данным, в т.ч. рентгеновской дифракции. Дальнейшие доказательства модели альфа-спирали были найдены при изучении **синтетических полипептидов**.

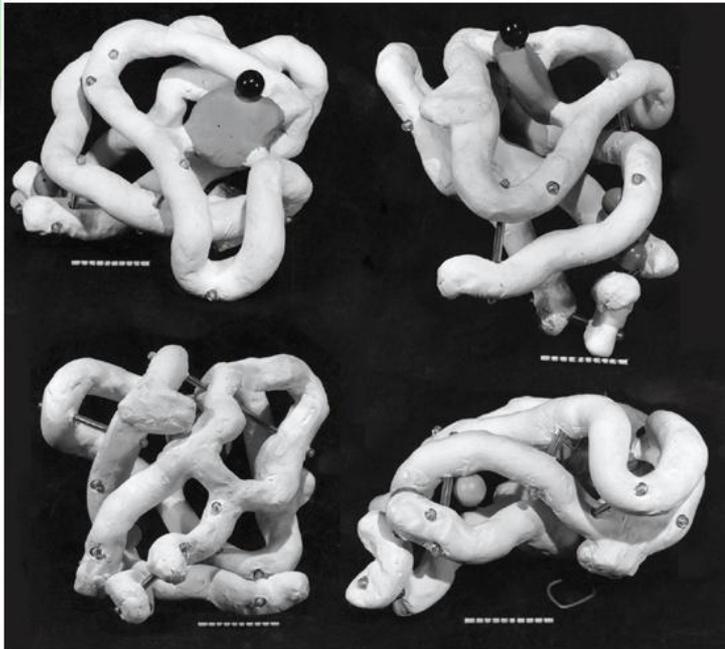
Глобулярные белки

- **Кристаллизация** белков использовалась как метод очистки в биохимии задолго до появления такой области, как кристаллография белка. Однако наблюдать дифракционную картину не получалось.
- 1934 г. – Дж. Бернал, Д. Кроуфут (Ходжкин) – съемка увлажненных в маточном растворе кристаллов (пепсин).

Структура гемоглобина и миоглобина

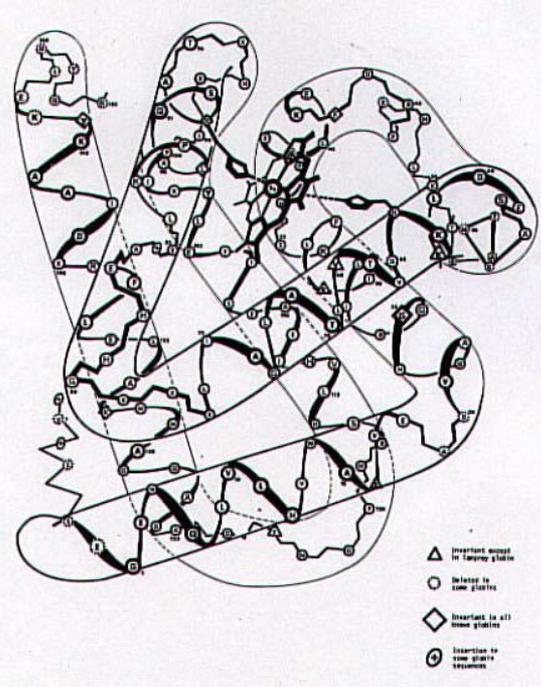
- 1937г. – начало работы М. Перутца над установлением структуры гемоглобина
- 1953г. – Перутцем успешно применен первый практический метод решения проблемы фаз для белков – метод тяжелоатомных производных
- 1958г. – определение структуры миоглобина Дж. Кендрю (работа была начала в 1948г.). Структура определена с разрешением 6 А.
- 1960г. – определение структуры миоглобина с разрешением 2А и гемоглобина с разрешением 5А

Структуры первых белков

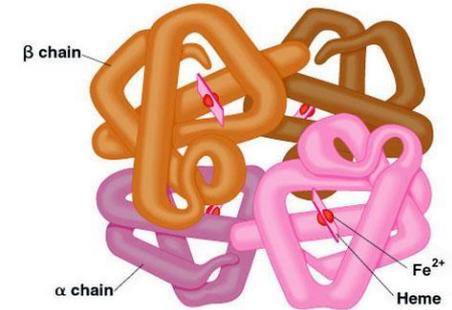


Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Структура миоглобина
с разрешением 6 Å

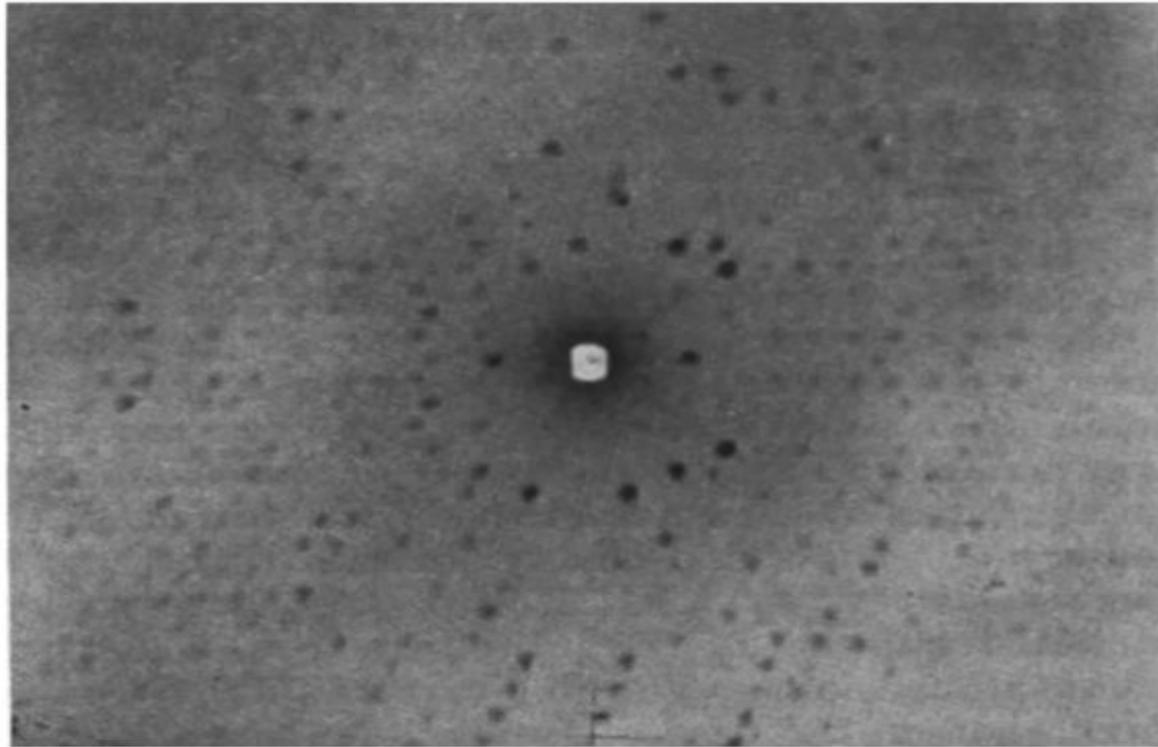


Структура
миоглобина
высокого
разрешения



Структура
гемоглобина

Кристалл гемоглобина



Haemoglobin crystal -1938 (wet)

Image: Bernal, Frankuchen, Perutz (1938) *Nature*, **141**, 523-4

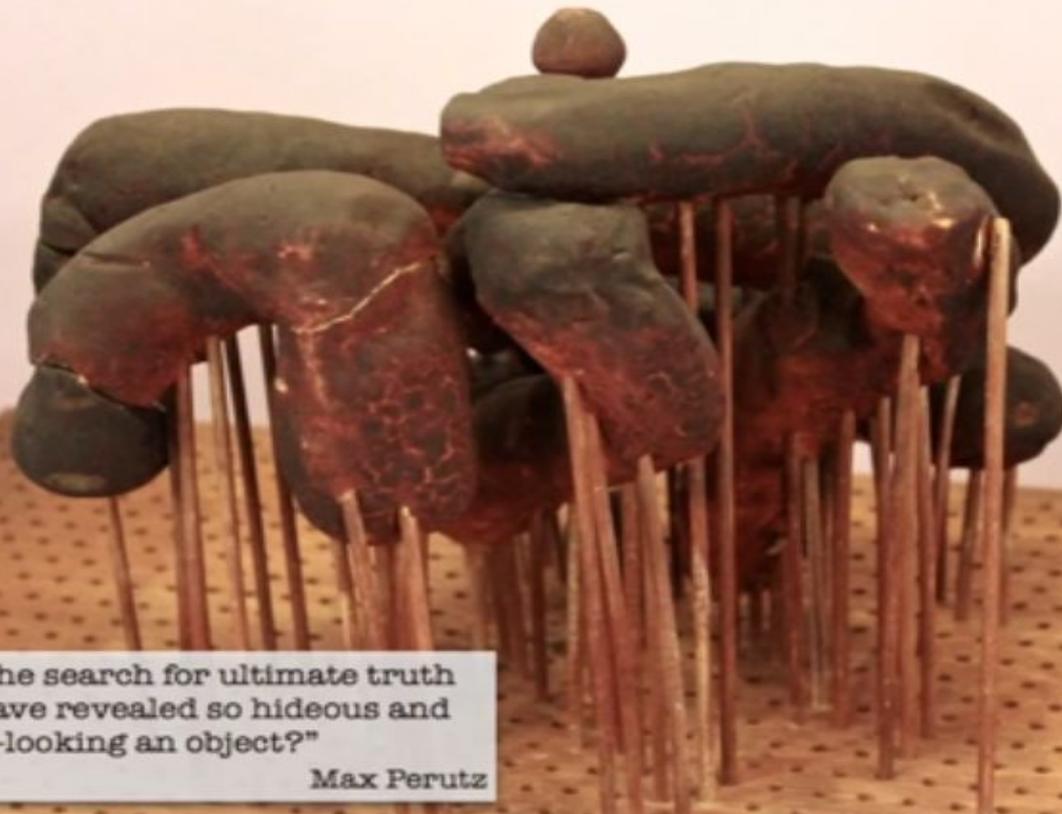
Структура миоглобина

Myoglobin structure (1959)

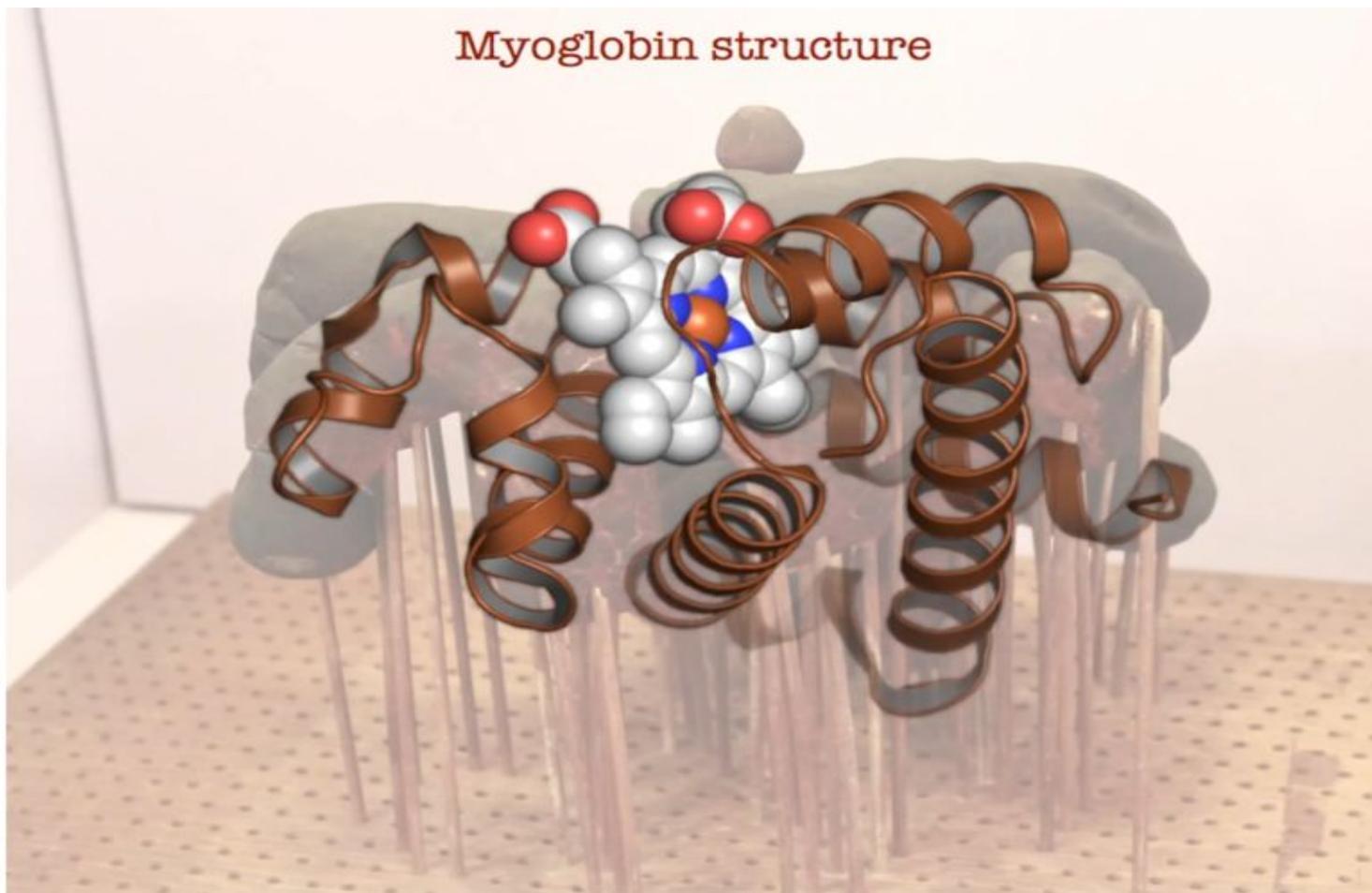
Photographed at London's Science Museum

"Could the search for ultimate truth
really have revealed so hideous and
visceral-looking an object?"

Max Perutz

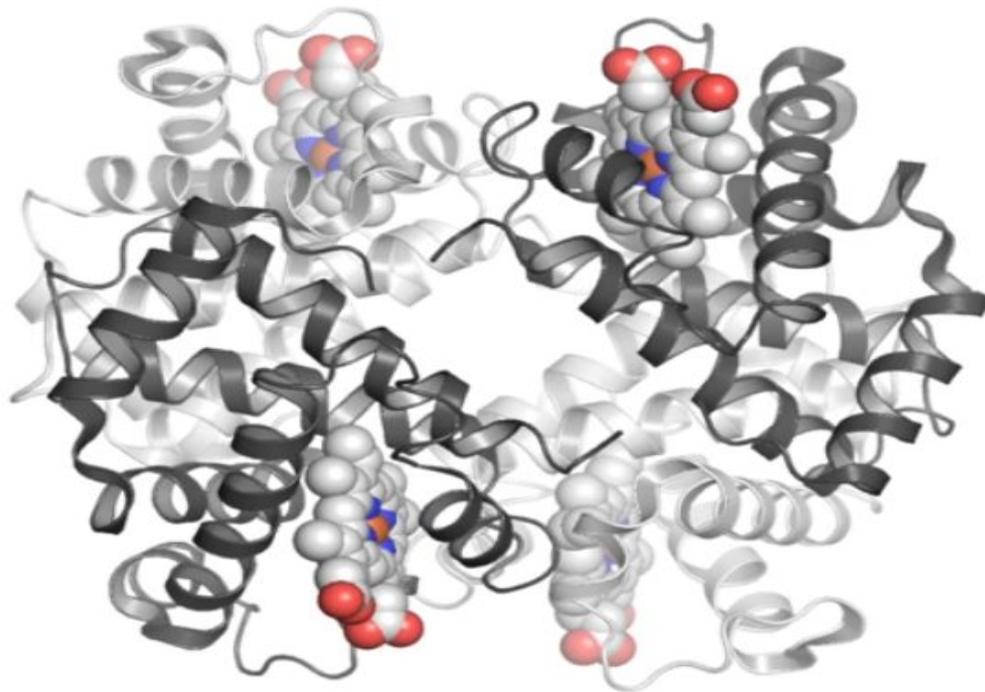


Структура миоглобина



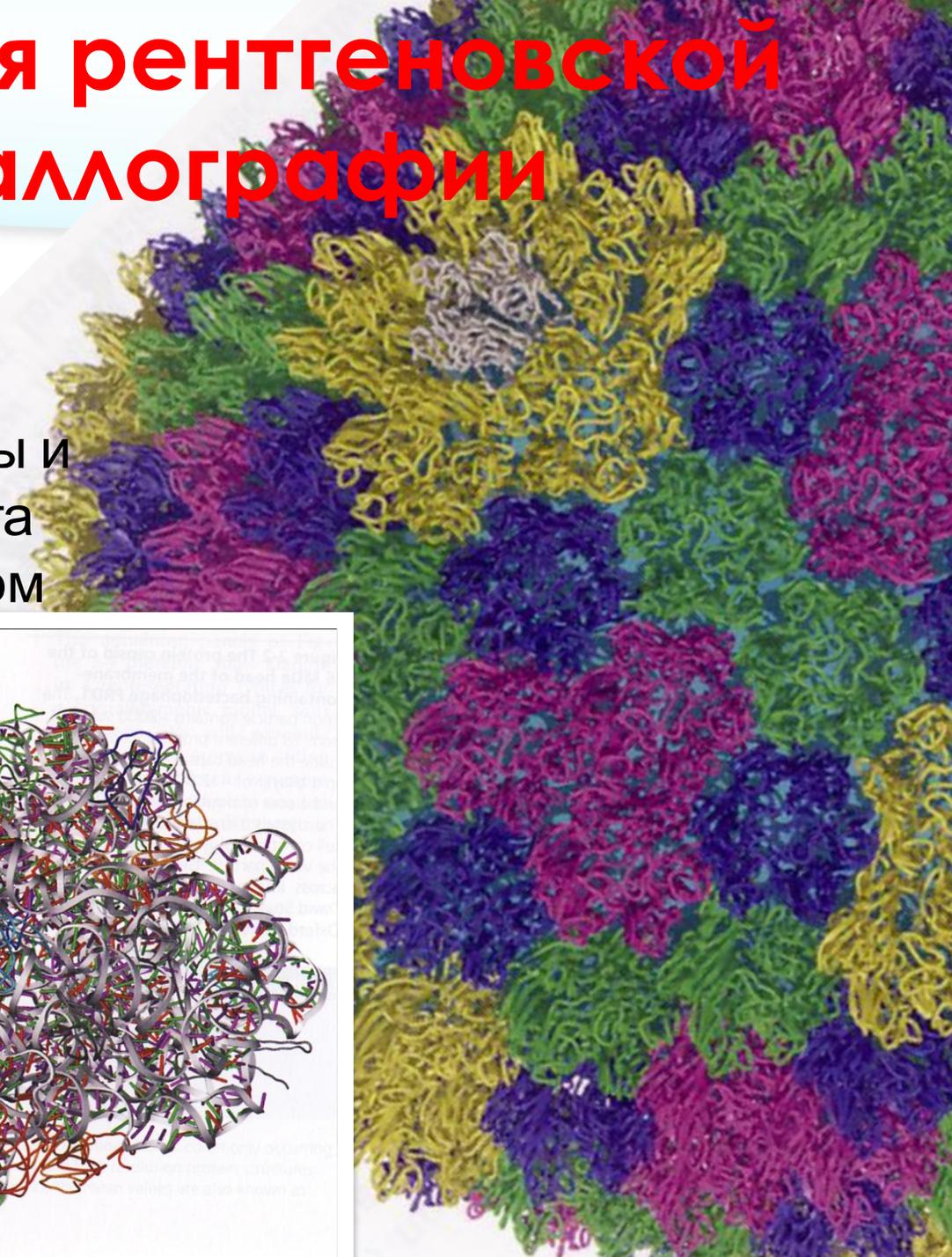
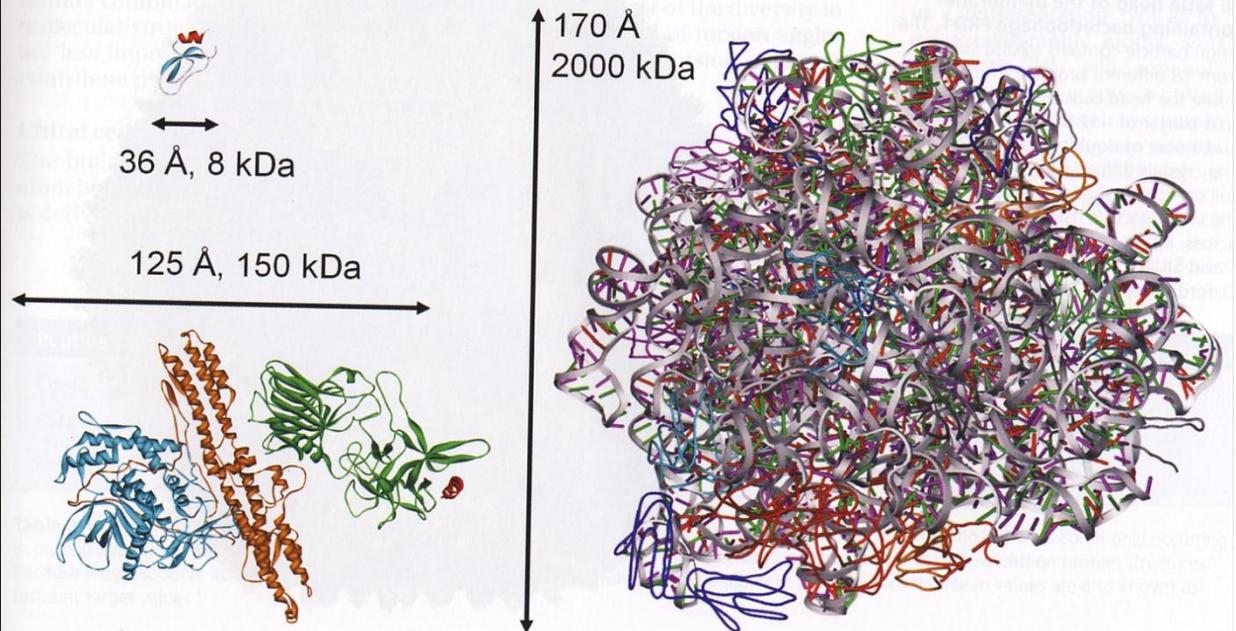
Структура гемоглобина

Haemoglobin structure



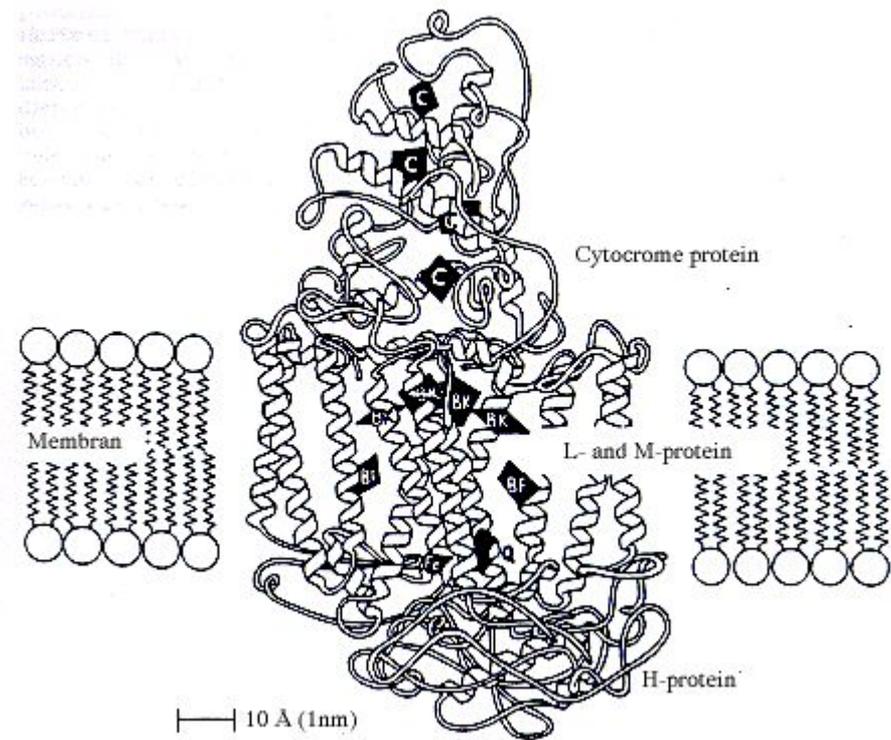
Достижения рентгеновской кристаллографии

8 кДа ингибитор трипсина,
150 кДа ботулотоксин,
2 МДа 50S субъединица
прокариотической рибосомы и
66 МДа капсид бактериофага
PRD1, изображенные в одном
масштабе



Кристаллизация мембранных белков

Одно из самых значительных достижений РСА последних десятилетий состоит в начавшейся расшифровке трехмерных структур **мембранных белков**. Мембранные белки ответственны за превращение энергии, выступают в качестве **рецепторов** и ферментов, образуют **каналы** активного и пассивного транспорта молекул и различных ионов через мембраны, охраняют организм от проникновения чужеродных антигенов.

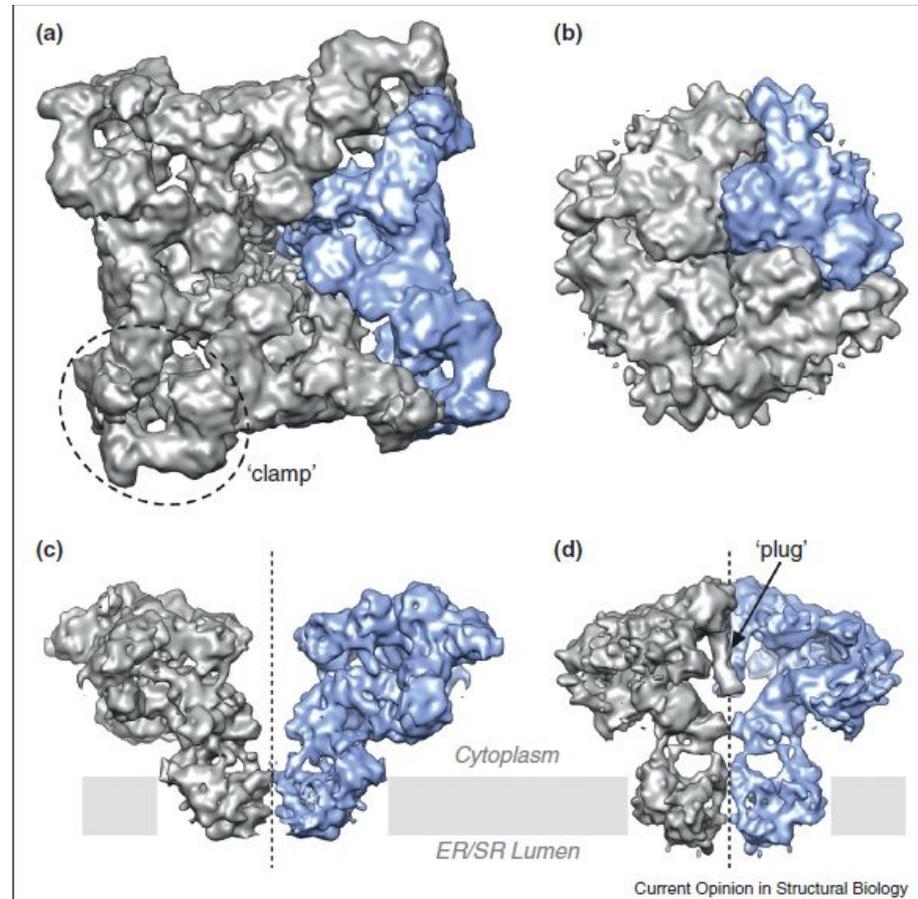


Фотосинтетический реакционный центр – первый мембранный белок, структура которого была установлена с атомным разрешением

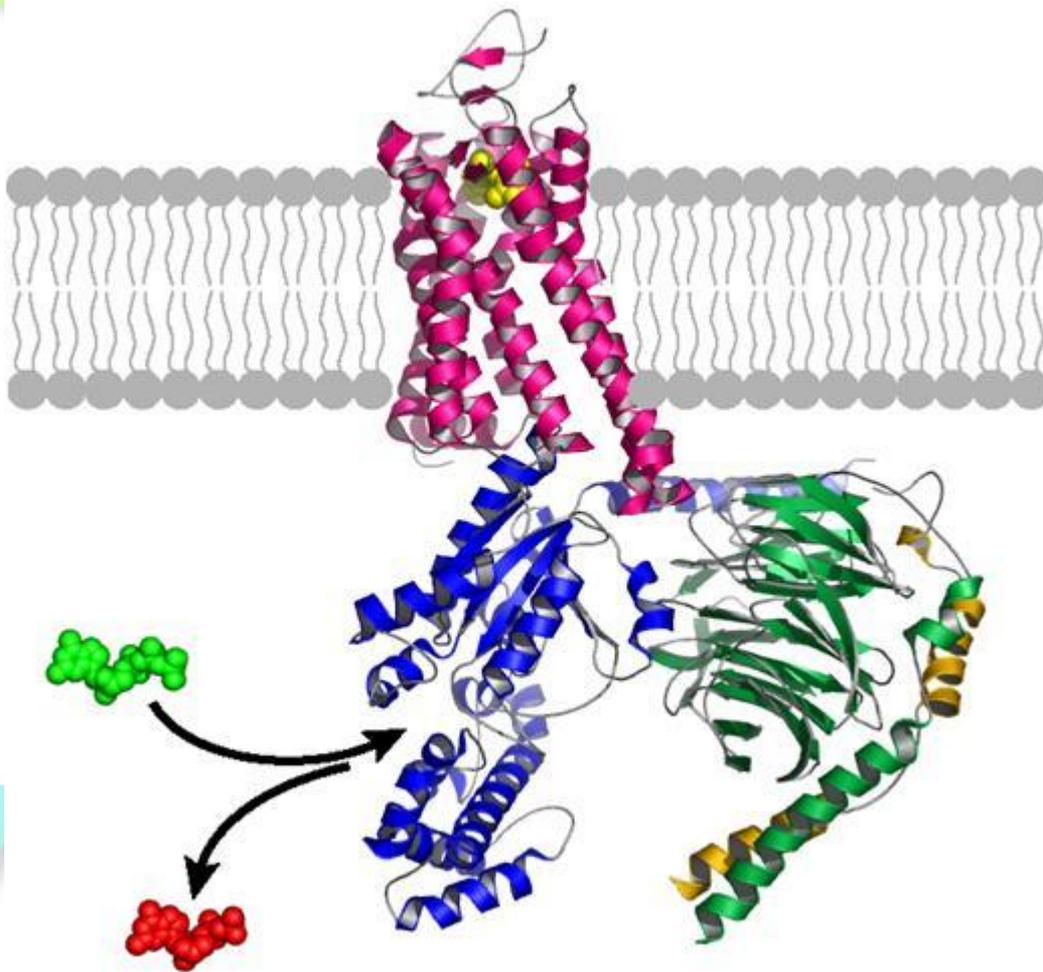
Криоэлектронная микроскопия

RyR1

IP3R1



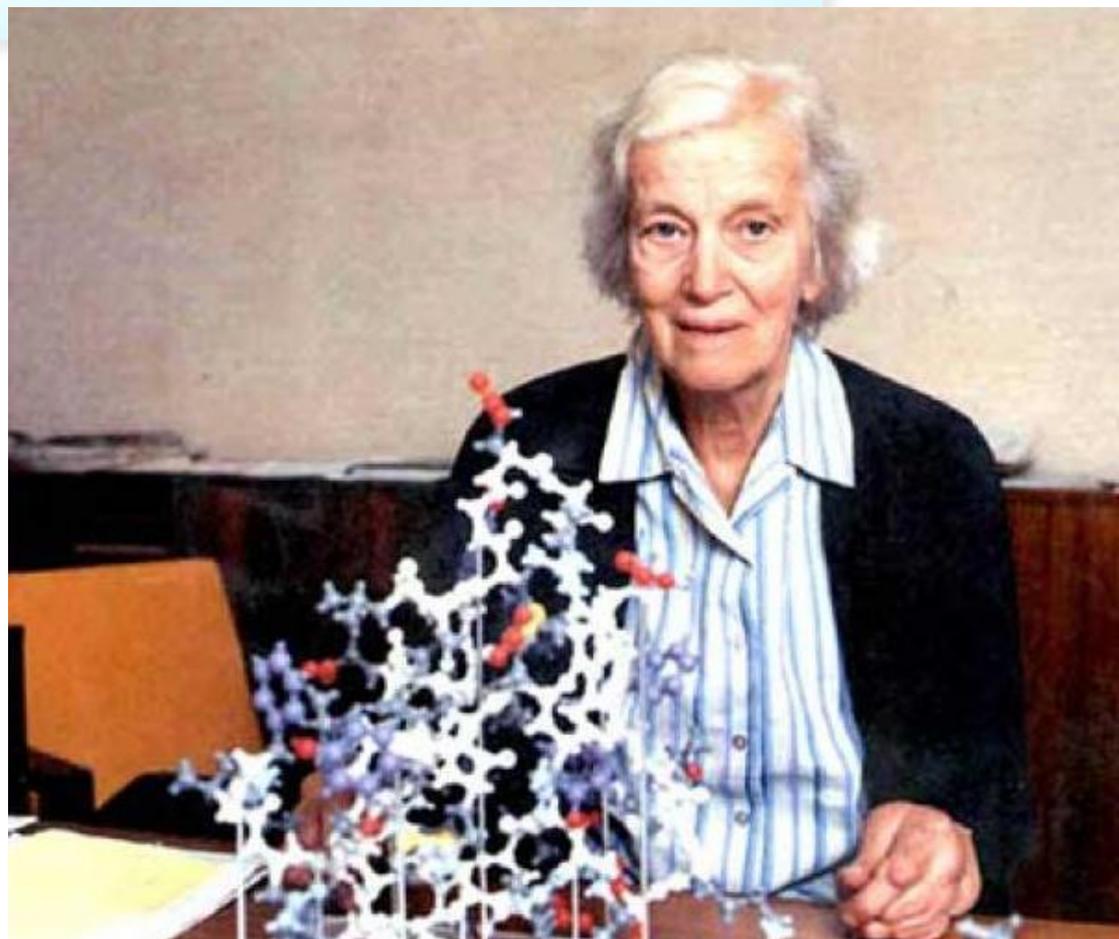
Рецепторы, сопряженные с G-белками



Three-dimensional structure of a G protein-coupled receptor or GPCR (magenta) embedded in a cell membrane, with its loosely attached G protein, consisting of three subunits: alpha (blue), beta (dark green) and gamma (gold). When a neurotransmitter, hormone or other ligand (bright yellow, at top) binds to its GPCR, the receptor changes shape in a way that catalyzes the release of guanosine diphosphate or GDP (red) from the alpha subunit. GDP, an organic molecule involved in intracellular energy exchange, is replaced by the higher energy guanosine triphosphate or GTP (bright green). That, in turn, causes the alpha subunit to break apart from the beta and gamma subunits. The subunits then interact with other intracellular proteins to transmit signals down two independent pathways. Within a few seconds, GTP is converted back to GDP, the subunits recombine, and the signals are “turned off.”

Достижения кристаллографии

- Холестерол
- Пенициллин
- Витамин В12



Дороти Ходжкин и макет
витамина В12

Витамин В12

Vitamin B12 (1954)

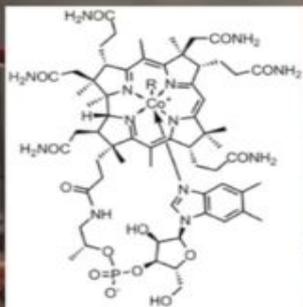
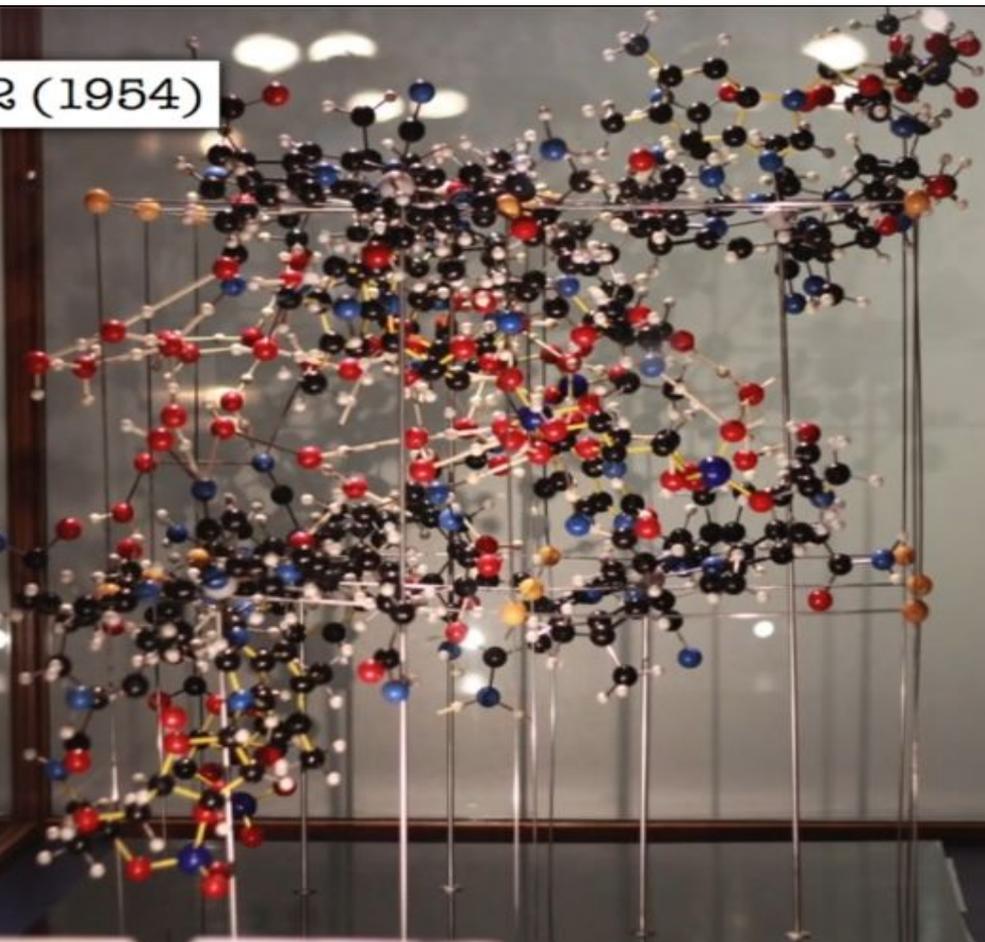
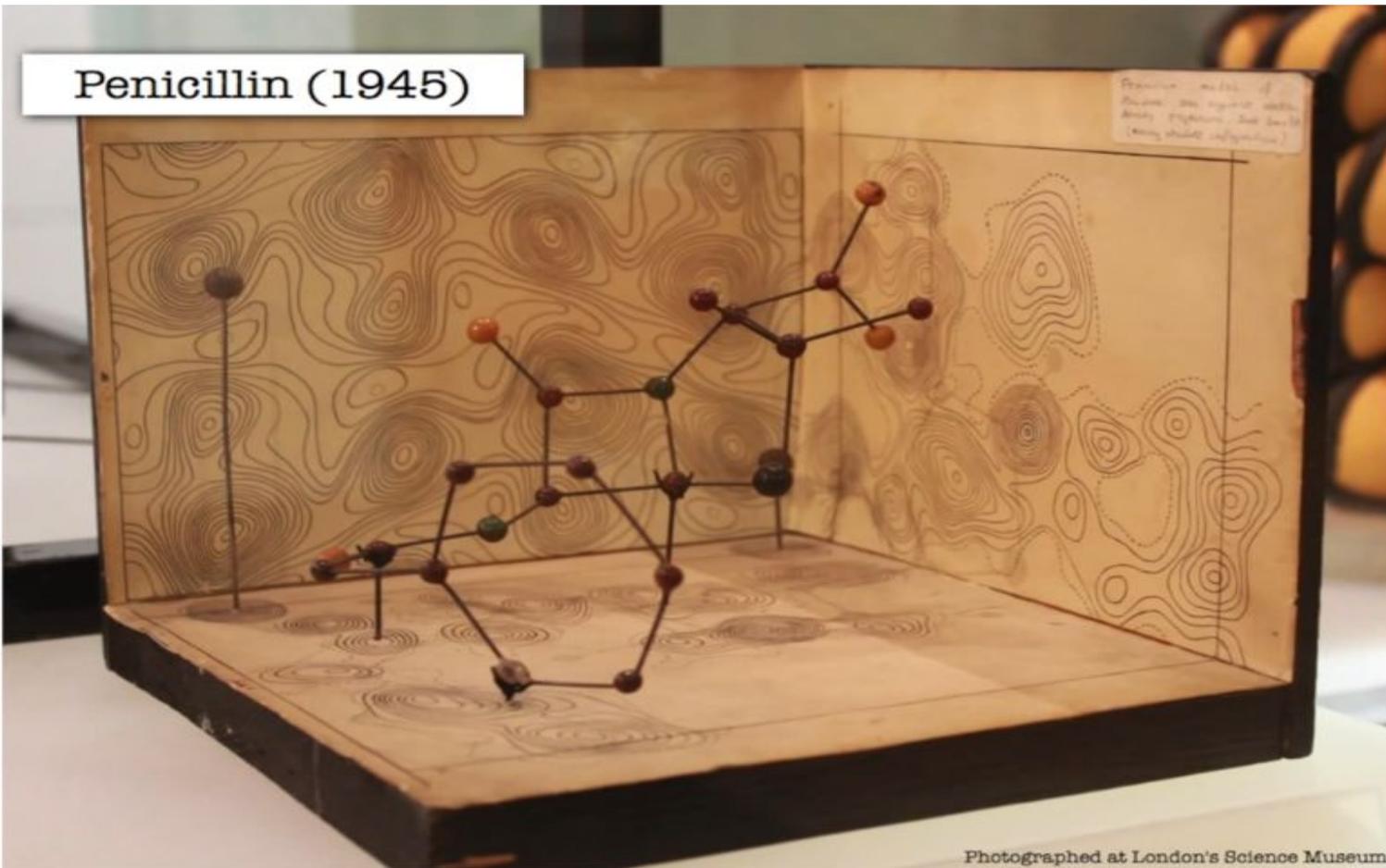


Image: Ymwang42
(Wikimedia commons)



Photographed at London's Science Museum

Пенициллин



- «За определение с помощью рентгеновских лучей структур биологически активных веществ», пенициллина и витамина В₁₂ **Ходжкин в 1964 г. получила Нобелевскую премию по химии.** При презентации член Шведской Королевской академии наук Гуннар Хегг сказал: «Знание структуры соединения является абсолютно необходимым для того, чтобы интерпретировать его свойства и реакции и решить, как можно его синтезировать из более простых соединений. При этом определение структуры пенициллина явилось поистине изумительным стартом новой эры кристаллографии... Определение же структуры витамина В₁₂ следует понимать как триумф рентгеноструктурного анализа кристаллов с точки зрения химической и биологической значимости результатов при огромной сложности структуры».

ДНК

Biological crystallography



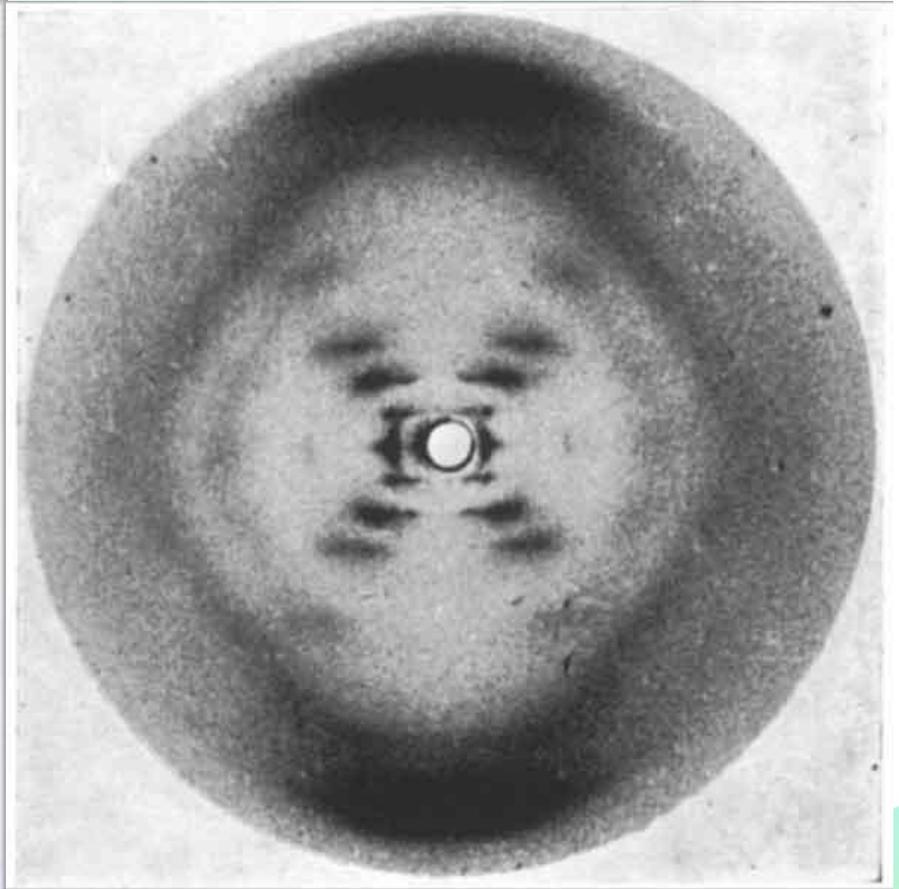
Bill Astbury & Florence Bell



DNA diffraction pattern (circa 1938)

1938. Получена первая рентгенограмма ДНК. У. Астбери показано, что азотистые основания расположены в определенном порядке – одно над другим.

ДНК



Английский биофизик и учёный-рентгенограф, занималась изучением структуры ДНК. Розалинд Франклин известна в большей степени своей работой над получением рентгенограмм структуры ДНК. Сделанные ею снимки отличались особой чёткостью и подготовили почву для выводов о структуре ДНК, сделанных Джеймсом Уотсоном и Фрэнсисом Криком.

Protein data bank

Информация, полученная методами рентгеновской кристаллографии или ЯМР-спектроскопии занесена в банк данных 3-D структур белков и нуклеиновых кислот, который содержит на данный момент около 100 000 макромолекул. Каждой структуре присваивают уникальный идентификационный номер, по которому ее можно быстро найти. Эта база данных носит название PDB (Protein Data Bank – банк белковых структур). Она доступна через Интернет по адресу <http://www.rcsb.org>.

- РДВ постоянно пополняется. Чтобы поместить в РДВ новую расшифрованную структуру, нужно отправить туда не только полученные для нее координаты атомов, но и множество дополнительной информации (параметры кристаллической ячейки, разрешение, при котором проводился эксперимент, полученные для конечной модели значения R-факторов, сведения об авторах и статьях, в которых опубликованы результаты, и т. д.). В РДВ полученную информацию анализируют, и, если возникают какие-то вопросы, их уточняют по электронной почте.
- В конечном итоге структура оказывается в базе данных и становится доступной любому исследователю.