

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт белка
Российской академии наук

Направление подготовки 06.06.01 – Биологические науки

Рабочая программа по дисциплине

«Рентгеноструктурный анализ белков»

Составитель курса:

доктор химических наук

А.Д. Никулин

Пушино 2022

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Курс предназначен для освоения базовых принципов и понятий рентгеноструктурного анализа биологических объектов, наработки компетенций в области анализа пространственных структур макромолекул с возможностью применения полученных навыков в области биотехнологии, включая целенаправленный дизайн молекул белков и нуклеиновых кислот, анализа их взаимодействия с лигандами (субстратами, ингибиторами и т.п.). Рассмотрены вопросы состояния современных методов определения структур макромолекул, основы химической кристаллографии, физических принципов дифракции от кристаллов и рентгеноструктурного анализа, современные методы определения структур белков с помощью рентгеноструктурного анализа, проведение оценки надежности структур белков в банке данных, проведения анализа структур белков с использованием программ молекулярной графики.

Программа курса:

Тема 1. Место и особенности структурной биологии в современной молекулярной биологии. Первичная, вторичная, третичная и четвертичная структура белков. Использование знаний о пространственных структурах белков для нужд биотехнологии. Соотнесение понятий модели и структуры белка. Способы моделирования взаимодействий белков с другими белками и лигандами. Понятие рационального дизайна структур белков в области биотехнологии. Использование знаний о структуре белков для изменения активности и стабильности ферментов.

Тема 2. Введение в современные методы исследования структур макромолекул. Современные методы структурной биологии. Ограничения световой и флуоресцентной микроскопии. Метод реконструкции структуры крупных макромолекулярных комплексов с помощью криоэлектронной микроскопии и томографии. Использование явления ядерного магнитного резонанса для определения структур белков и анализа их взаимодействия с партнерами. Ограничения малоуглового рассеяния рентгеновских лучей при исследовании растворов белков. Белковая кристаллография и рентгеноструктурный анализ. Достоинства и ограничения методов исследования структур макромолекул.

Тема 3. Кристаллизация белков, нуклеиновых кислот, их комплексов. Белки тоже могут образовывать кристаллы. Особенности кристаллизации белков. Фазовая диаграмма растворимости. Методы кристаллизации белков: сидячая капля, висючая капля, бэтч-кристаллизация. Особенности кристаллизации белков в условиях невесомости. Роботы для кристаллизации и детекции роста кристаллов. Фабрики по кристаллизации.

Тема 4. Современное оборудование для рентгеноструктурного анализа. Применение синхротронного излучения и рентгеновских лазеров на свободных электронах. Современные микрофокусные рентгеновские трубки. Генераторы с вращающимся анодом и с жидким носителем. Понятие установок класса «мегасайенс». Синхротронные источники рентгеновского излучения. Рентгеновские лазеры на свободных электронах. Особенности использования каждого класса приборов. Применение источников синхротронного излучения в белковой кристаллографии и в смежных областях исследования материи. Возможности и перспективы использования рентгеновских лазеров на свободных электронах при исследовании структур белков. Возможности установок класса «мегасайенс» для биотехнологии.

Тема 5. Кристаллы. Отличие кристаллов от других состояний вещества. Симметрия в кристаллах.

Определение кристалла. Отличия кристалла от не-кристалла. Особенности кристаллической решетки. Элементарная часть решетки кристалла. Параметры решетки кристалла. Условия выбора решетки. Сингонии или кристаллические системы. Решетки Бравэ. Морфология кристаллов. Плоскости кристаллической решетки. Индексы Миллера. Операции симметрии в кристалле. 230 пространственных групп кристаллов. Ограничения пространственных групп для кристаллов белков. Нарушения в кристаллах. Двойникование и дислокации. Плотность белковых кристаллов. Параметр Мэттьюза.

Тема 6. Явления дисперсии, отражения, дифракции. Дифракция видимого света, электронов, рентгеновских лучей.

Оптические явления на прозрачных и непрозрачных объектах. Возникновение дисперсии. Коэффициент преломления среды. Условия возникновения дифракции. Дифракция света на отверстиях, шаре, тонкой щели. Интерференционная картина дифрагированных волн. Дифракционная решетка и её параметры. Разложение белого света на дифракционной

решетке. Дифракция электронов и рентгеновских лучей. Зависимость дифракционной картины от количества отверстий (шариков) и расстояний между ними.

Тема 7. Дифракция рентгеновских лучей на кристаллах. Обратное пространство и структурный фактор.

Особенности дифракционной картины от кристаллов. Представление трехмерной решетки кристалла как трёхмерной дифракционной решетки. Математическое описание волны. Нахождение параметров суммарной волны. Векторный способ сложения волн. Диаграмма Аргана. Упругое рассеяние волн от системы электронов. Рассеяние атомом и атомный фактор рассеяния. Рассеивание элементарной ячейкой кристалла и кристаллом целиком. Структурный фактор. Условия Лауэ и закон Вульфа-Брэгга. Обратное пространство и его использование для описания системы дифракционной картины от кристалла.

Тема 8. Расчет карт электронной плотности. Фазовая проблема в рентгеновской кристаллографии. Функция Паттерсона.

Уравнение электронной плотности. Проблема нахождения фаз в рентгеноструктурном анализе и пути её решения. Функция Паттерсона. Применение функции Паттерсона для решения структур малых молекул. Сечения Харкера.

Тема 9. Определение структур макромолекул методом молекулярного замещения: принципы, алгоритмы, реализация.

Метод молекулярного замещения в белковой кристаллографии. Критерии выбора исходной модели. Функция вращения и функция трансляции. Реализация метода молекулярного замещения в программе AMORE. Программа MOLREP. Более строгая оценочная функция максимального правдоподобия и её использование в программе молекулярного замещения PHASER. Критерии оценки правильности решения задачи молекулярного замещения. Программы высокопроизводительного молекулярного замещения. Комплекс MORDA.

Тема 10. Определение структур макромолекул методом изоморфного замещения: принципы, алгоритмы, реализация.

Если нет подходящей исходной гомологичной модели белка? Определение структуры белка «с нуля». Понятие изоморфного производного. Способы их получения. Оценка изоморфности кристаллов. Расчёт фаз в методе изоморфного замещения. Фазовая диаграмма Харкера. Оценка вклада «тяжелого атома» на интенсивность рефлексов на дифракционной картине от кристалла белка. Нахождение координат «тяжелых атомов» по функции Паттерсона и прямым методом.

Тема 11. Определение структур макромолекул с использованием аномального рассеяния: принципы, алгоритмы, реализация.

Неупругое рассеяние рентгеновских лучей кристаллами белков – аномальное рассеяние. Флуоресценция и край поглощения. Диаграмма Аргана при аномальном рассеянии. Изменение атомного фактора рассеяния при аномальном рассеянии. Оптимизация условий аномального рассеивания. Биоветовы или Фриделевские пары структурных факторов. Аномальная карта Паттерсона. Аномальная разностная карта. Комбинация изоморфного замещения и аномального рассеяния. Метод многоволновой аномальной дифракции.

Тема 12. Уточнение структур белков. Молекулярная графика.

Необходимость уточнения найденных фаз. Построение моделей белков, описывающих экспериментальную карту электронной плотности. Программы автоматической интерпретации карт электронной плотности: применение, достоинства, недостатки, ограничения. Уточнение моделей белков относительно экспериментальных данных. Уточнение с «ограничениями» по стереохимическим параметрам и «без ограничений».

Использование стереохимических параметров белков при уточнении. Уточнение модели как «твердого тела». Уточнение модели с «молекулярным отжигом». Использование некристаллографической симметрии при уточнении. Уточнение температурного В-фактора атомов. Изотропный и анизотропный В-фактор. Уточнение величины замещения для лигандов и ионов. Программы молекулярной графики: возможности и применение.

Тема 13. Проверка структур на соответствие стереохимическим ограничениям: стандарты, возможные отклонения.

Ошибки и промахи при построении и уточнении структур белков. Критерии оценки «правильности» структуры белков, статистические, энергетические и стереохимические. Программы и сервисы по проверке пространственных структур белков. Отбраковка ошибок и способы их исправления. Использование библиотек стандартов при построении моделей белков.

Тема 14. Банк данных пространственных структур. Поиск структур, использование, оценка применимости имеющихся в БД данных.

Банк пространственных структур белков и нуклеиновых кислот Protein Data Bank. Интерфейс пользователя. Поиск по ключевым словам и по задаваемым параметрам. Вывод результатов поиска. Оценка «правильности» структур с помощью встроенных и сторонних инструментов. Программы анализа структур и создания иллюстраций. Использование анализа структур белков для биотехнологических целей.

Основная литература

И. Сердюк Методы в молекулярной биофизике: структура, функция, динамика: учебное пособие в 2 т. Т. 2 / И. Сердюк, Н. Заккаи, Дж. Заккаи; [науч. ред. И. Сердюк]. – М.: КДУ, 2010. – 736 с.

Ю. В. Ворошилов, В. И. Павлишин Основы кристаллографии и кристаллохимии. Рентгенография кристаллов: Учебник. – К.: КНТ, 2011. – 568 с.

Дж. Каули Физика дифракции. – М.: Мир, 1979, - 432 с.

J. Drenth Principles of Protein X-ray Crystallography 3rd edition: - Springer, 2007. - 332 с.

Дополнительная литература

М. П. Шаскольская. Кристаллография: Учебник для вузов. - М.: Высшая школа, 1976. – 392 с.

International Tables for Crystallography, Brief Teaching Edition of Volume A: Space Group Symmetry 5th Edition. Theo Hahn (Editor) – Springer, 2002. – 160 с.

E. E. Lattman, P. J. Loll Protein crystallography: a concise guide. – The John Hopkins University press, 2008. – 136 с.

• Перечень лицензионного программного обеспечения

Для проведения семинаров и самостоятельных работ рекомендуется пользоваться СПО комплекса CCP4 в комплексе с программой COOT (<https://www.ccp4.ac.uk/>).

• Перечень профессиональных баз данных и информационных справочных систем

Банк данных пространственных структур макромолекул Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>, <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/>).

- Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет» (при необходимости)

Рекомендуются обучающие ресурсы на следующих сайтах:

<http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/index-en.html>
<https://www.bioxfel.org/resources/659>
<https://www.epfl.ch/schools/sb/research/iphys/teaching/crystallography/#applets>
<http://www.chem.msu.su/rus/books/2007/fetisov/welcome.html>

ВОПРОСЫ К ЭКЗАМЕНУ ПО КУРСУ «Рентгеноструктурный анализ белков»

Билет 1.

1. Соотнесение первичной и пространственной структуры белка.
2. Банк данных пространственных структур макромолекул. Интерфейс пользователя и предоставляемая информация.

Билет 2.

1. Понятие рационального дизайна в области биотехнологии и медицины.
2. Типичные ошибки и промахи при определении структур белков.

Билет 3.

1. Достоинства и недостатки световой микроскопии.
2. Критерии оценки «правильности» структуры белков, статистические, энергетические и стереохимические.

Билет 4.

1. Основы криоэлектронной микроскопии. Сравнение с методом рентгеноструктурного анализа.
2. Этап построения моделей белков в экспериментальной электронной плотности.

Билет 5.

1. Метод малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и его место в структурной биологии.
2. Использование стереохимических параметров белков при уточнении.

Билет 6.

1. Современные подходы к кристаллизации белков.
2. Уточнение модели с «молекулярным отжигом». Использование некристаллографической симметрии при уточнении.

Билет 7.

1. Современные источники рентгеновского излучения, используемые в белковой кристаллографии.
2. Определения положения воды, ионов и лигандов в электронной плотности. Уточняемые параметры и проверка.

Билет 8.

1. Кристаллическое состояние вещества, его отличительные черты. Понятие кристаллической решетки.
2. Неупругое рассеяние рентгеновских лучей кристаллами белков – аномальное рассеяние.

Билет 9.

1. Элементарная часть решетки кристалла, её параметры. Сингонии кристаллов.
2. Диаграмма Аргана при аномальном рассеянии. Изменение атомного фактора рассеяния при аномальном рассеянии.

Билет 10.

1. Решётки Бравэ. Связь с морфологией кристалла. Индексы Миллера. Операции симметрии в кристаллах и ограничения на операции симметрии в кристаллах белков.
2. Биоветовы или Фриделевские пары структурных факторов. Аномальная разностная карта.

Билет 11.

1. Понятия дисперсии, дифракции и интерференции. Дифракция на тонкой щели и дифракционной решетке.
2. Понятие изоморфного производного. Способы их получения. Расчёт фаз в методе изоморфного замещения.

Билет 12.

1. Особенности дифракционной картины от кристаллов. Условия возникновения дифракции. Условия Лауэ и закон Вульфа-Брэгга.
2. Оценка вклада «тяжелого атома» на интенсивность рефлексов на дифракционной картине от кристалла белка. Нахождение координат «тяжелых атомов» по функции Патерсона и прямым методом.

Билет 13.

1. Математическое представление волны. Векторный способ сложения волн. Диаграмма Аргана.
2. Метод молекулярного замещения в белковой кристаллографии. Функция вращения и функция трансляции.

Билет 14.

1. Взаимосвязь сечений кристалла и рассеяния рентгеновских лучей от кристалла.
2. Уравнение электронной плотности. Её упрощение в виде функции Паттерсона.