

Программа «Структурная биология»

Курс « Оптическая спектроскопия»

Алексей Валерьевич Феофанов

**Кафедра биоинженерии
Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова**

**Лаборатория оптической микроскопии и спектроскопии
биомолекул
ИБХ РАН**

Лекция 4

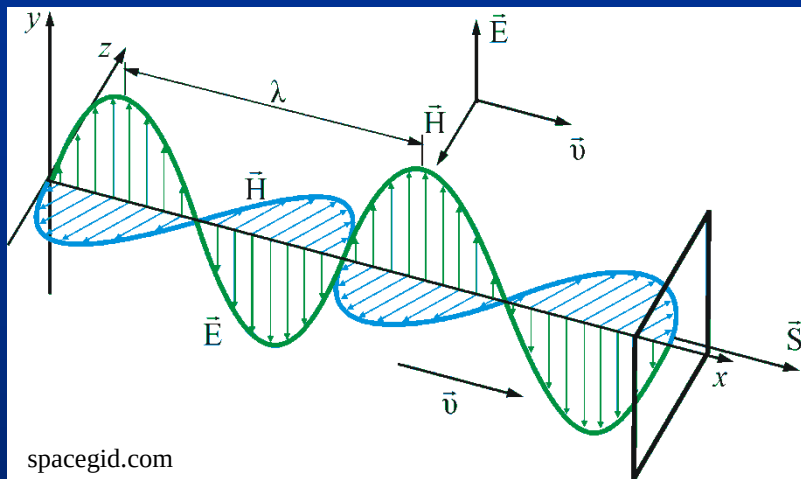
Цель изучения дисциплины: получение базовых знаний о методах оптической спектроскопии, о возможностях и способах их применения к решению задач структурной биологии

Методы оптической спектроскопии:

- Молекулярная спектроскопия электронного поглощения света
- Молекулярная флуоресцентная спектроскопия
- Флуоресцентная спектроскопия с временным разрешением
- Поляризационная флуоресцентная спектроскопия
- Флуоресцентная спектроскопия на основе Фёрстеровского резонансного
- переноса энергии
- Флуоресцентная спектроскопия одиночных молекул
- Спектроскопия кругового дихроизма
- Инфракрасная (ИК) спектроскопия молекул
- Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) света и ее разновидности

Поляризация световой волны (поляризация света)

Для световых (электромагнитных) волн поляризация — это направленное колебание вектора напряжённости электрического поля $\vec{E}$ (или напряжённости магнитного поля $\vec{H}$)



$$E = E_0 \cos(\omega t - kx + \varphi)$$

интенсивность света:

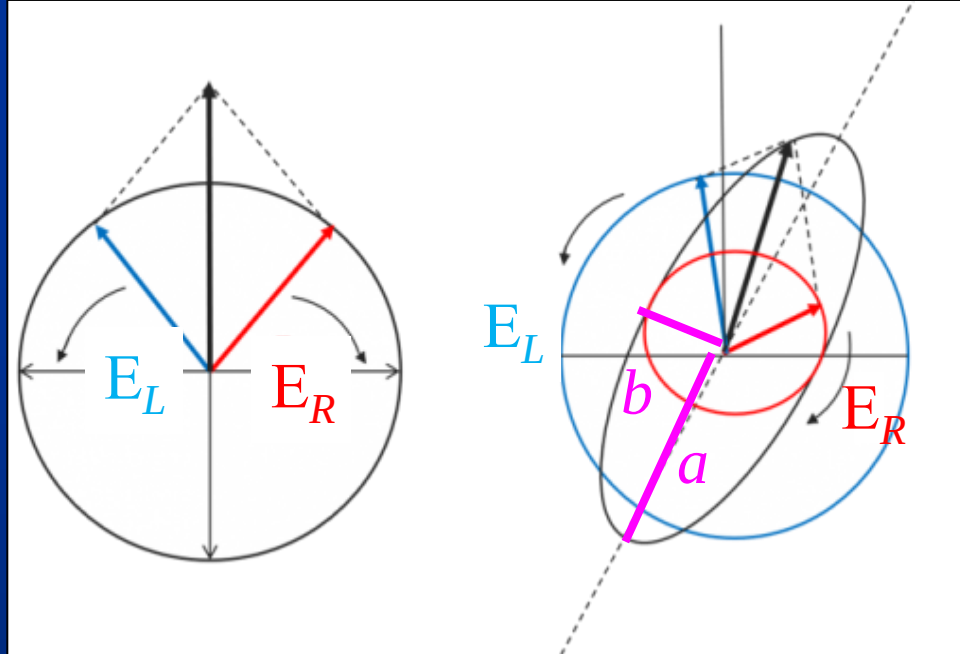
$$I \sim E^2$$

Если конец вектора $\vec{E}$ описывает в плоскости перпендикулярной направлению распространения света эллипс - это эллиптическая поляризация.

Эллиптическая поляризация в зависимости от направления вращения вектора $\vec{E}$ бывает положительной (правой) и отрицательной (левой).

Частные случаи эллиптической поляризации: линейная (*плоско-поляризованная волна*) и круговая (циркулярная) поляризации

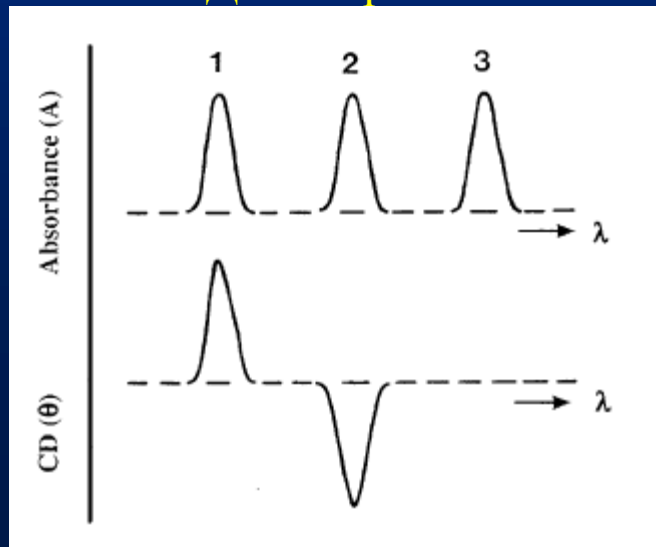
Волны света имеют разную поляризацию – свет не поляризован



Плоскополяризованную волну можно рассматривать как сумму двух волн L и R одинаковых по амплитуде и частоте, но поляризованных по кругу в левую и правую сторону.

Когда L и R волны поглощаются молекулой по разному, то возникает эффект кругового дихроизма, а прошедший свет становится эллиптически поляризованным. Разное поглощение L - и R - поляризованного по кругу света характерно для хиральных хромофоров.

Круговой дихроизм — это эффект, связанный с различным поглощением света с право-круговой (R) и лево-круговой (L) поляризацией хиральными хромофорами. Сигнал КД — это разность поглощений L - и R - поляризованных компонентов света



$$\Delta A = A_L - A_R \sim 3 \times 10^{-4}$$

Спектр КД - это зависимость величины кругового дихроизма от длины волны.

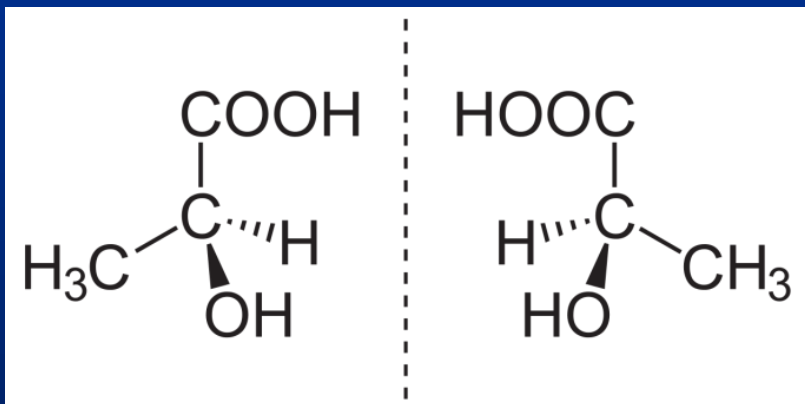
Величина КД представляется в виде эллиптичности θ в градусах.

$$\Theta = \arctg(b/a) \sim 10 \text{ мград} \quad \Theta = 32.98 \Delta A$$

Хиральность это свойство, отмечающее невозможность совместить в пространстве молекулу и ее зеркальное отражение.

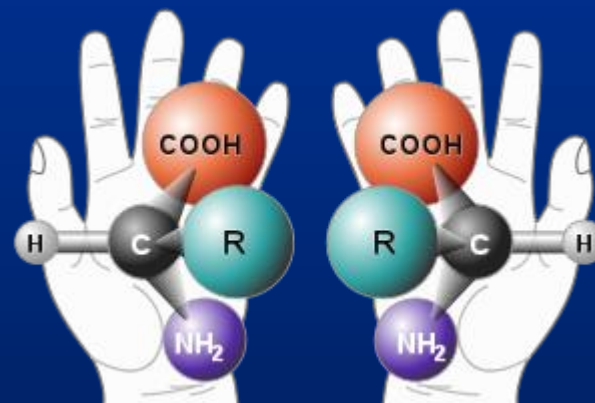
Энантиомеры - пара стереоизомеров, представляющих собой зеркальные отражения друг друга, не совмещаемые в пространстве.

Энантиомеры имеют одинаковые химические и физические свойства, кроме способности вращать плоскость поляризации плоскополяризованного света на одинаковую величину угла, но в противоположных направлениях.

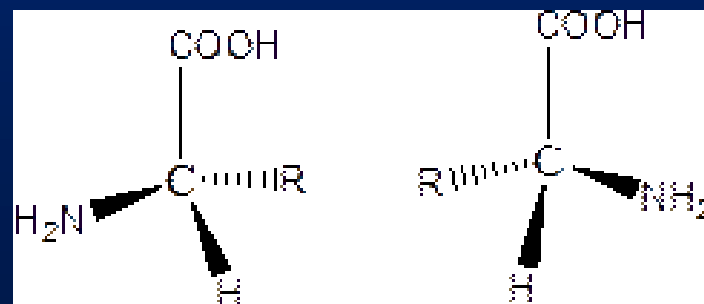


(S)-(+)-Молочная
кислота

(R)-(-)-молочная
кислота



Аминокислоты - хиральные молекулы



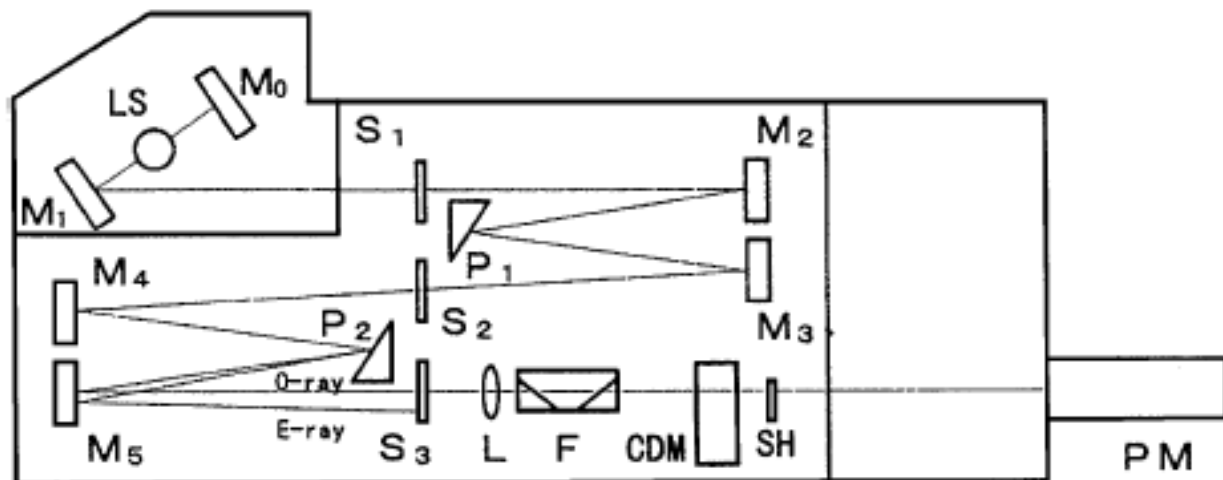
L -аминокислота

D -аминокислота

Сигнал КД наблюдается, если хромофор:

1. хиральный по своей структуре;
2. ковалентно связан с хиральным центром в молекуле;
3. находится в асимметричном окружении вследствие 3D-структуры молекулы.

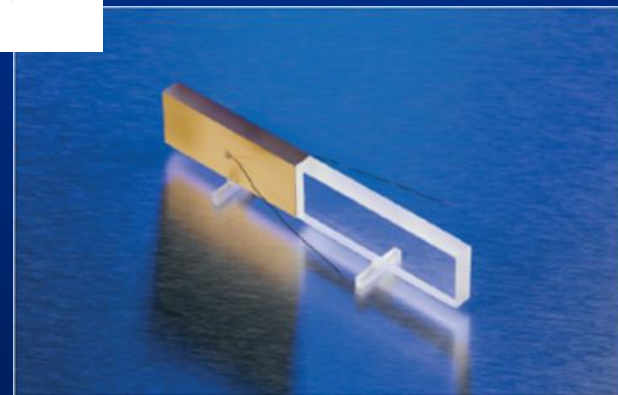
Оптическая схема спектрополяриметра (на примере Jasco J-810)



Призмы P₁ и P₂ раскладывают свет в спектр и делают его линейно поляризованным.

Модулятор CDM пропускает на образец попеременно свет L - и R- круговой поляризации.

ФЭУ измеряет разность поглощения образцом света L - и R- круговой поляризации, пересчитывая ее в эллиптичность



Фотоупругий модулятор (CDM) - пьезоэлектрический кварцевый кристалл, соединенный с пластинкой плавленого кварца. Преобразует линейно поляризованный свет в свет, поляризованный по кругу с переключением L - и R- круговой поляризации.

Оптически- активные хромофоры в белках

Пептидная связь (<240 нм);

Боковые цепи ароматических аминокислот (260-320 нм);

Дисульфидные связи (~ 260 нм)

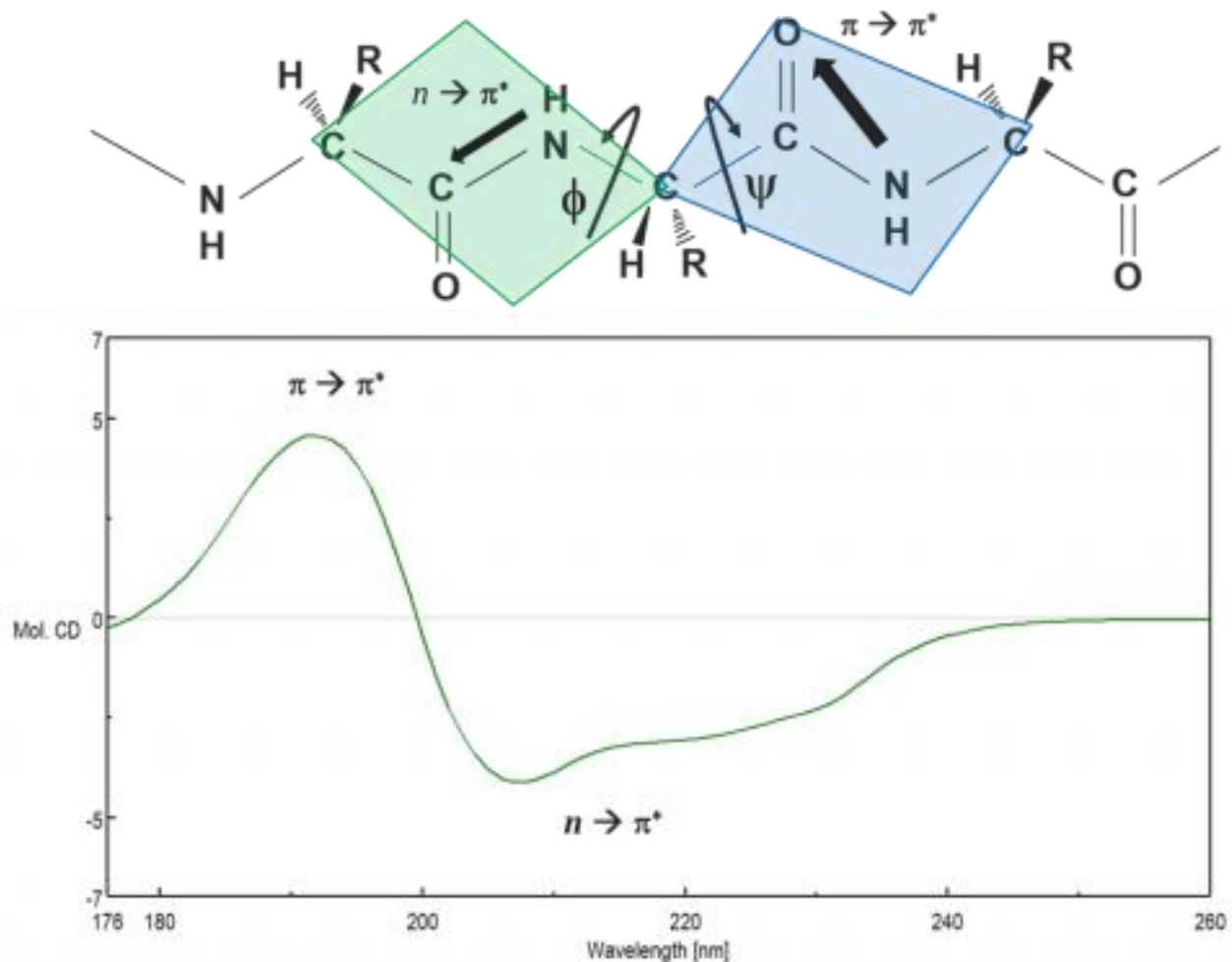
Небелковые кофакторы:

Пиридоксаль-5'-фосфат (~ 330 нм)

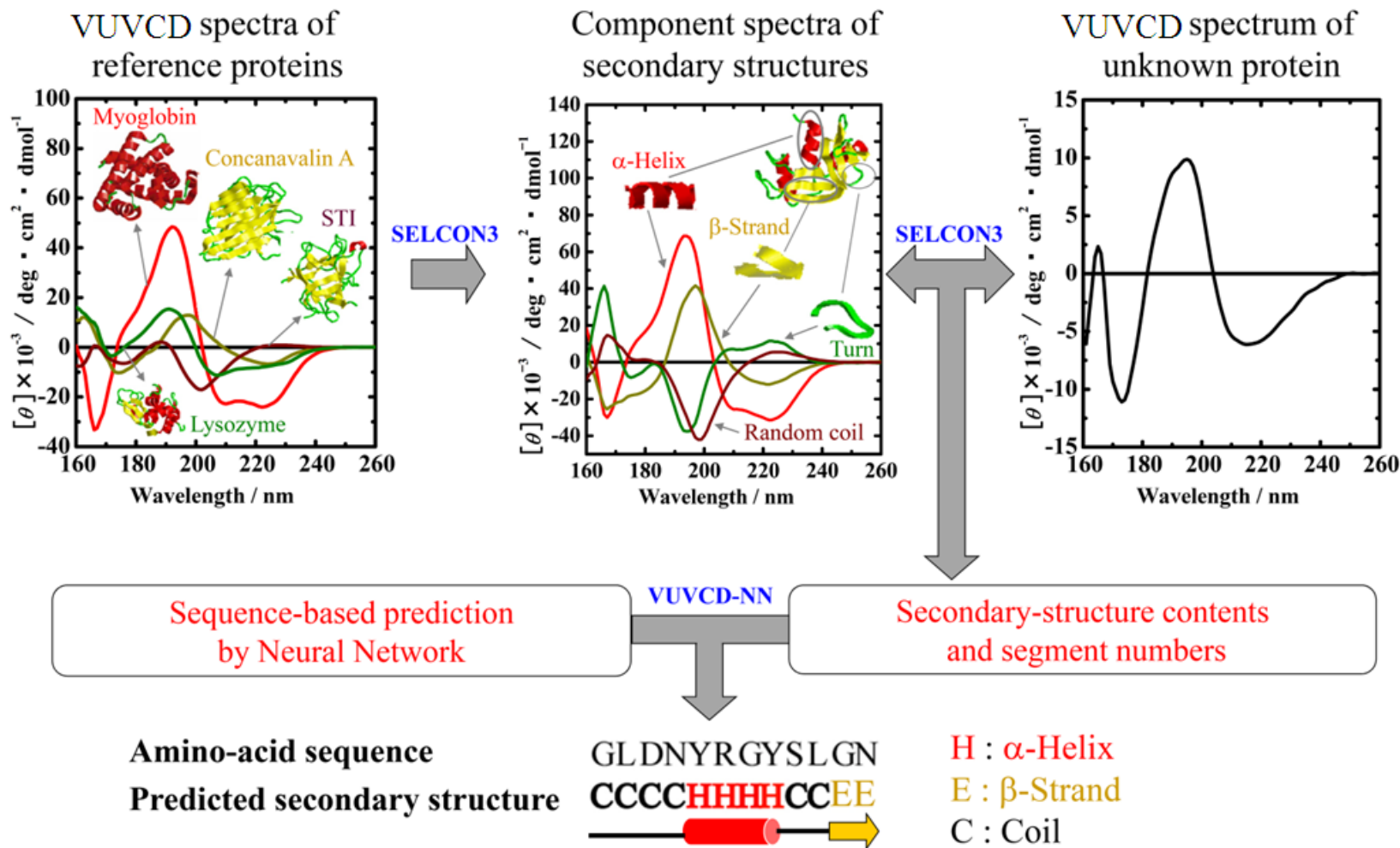
Флавины (300-500 нм, в зависимости от состояния окисления);

Гем-группа (интенсивно 410 нм и 350-600 нм в зависимости от спинового состояния и координации центрального атома Fe)

Производные хлорофилла – видимый и ближний ИК диапазон.



Пептидная связь, электронные переходы в УФ области и спектр КД в области этих переходов

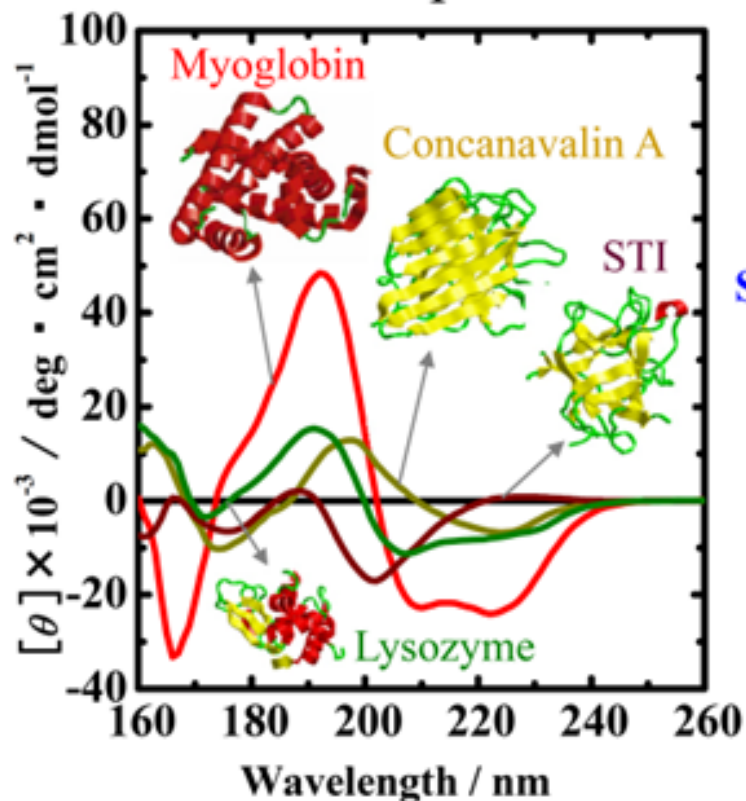


Расчет вторичной структуры белков выполняют на основе базисного набора спектра белков с известной структурой, используя различные алгоритмы.

Олигопептиды не входят в базисный набор – анализ спектров пептидов с ограничениями.

Онлайн сервер для расчета структуры белков - DICHROWEB

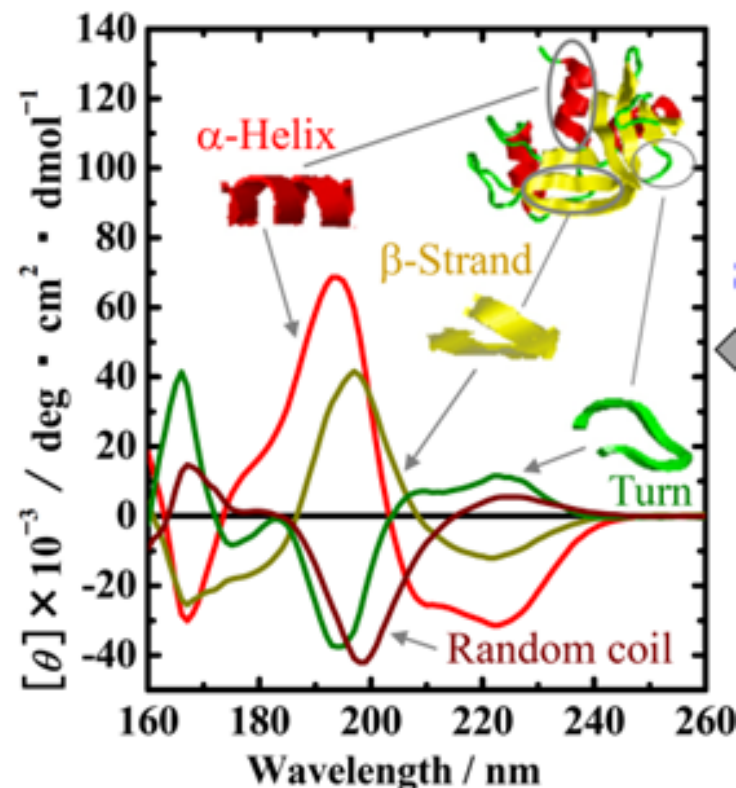
VUVCD spectra of reference proteins



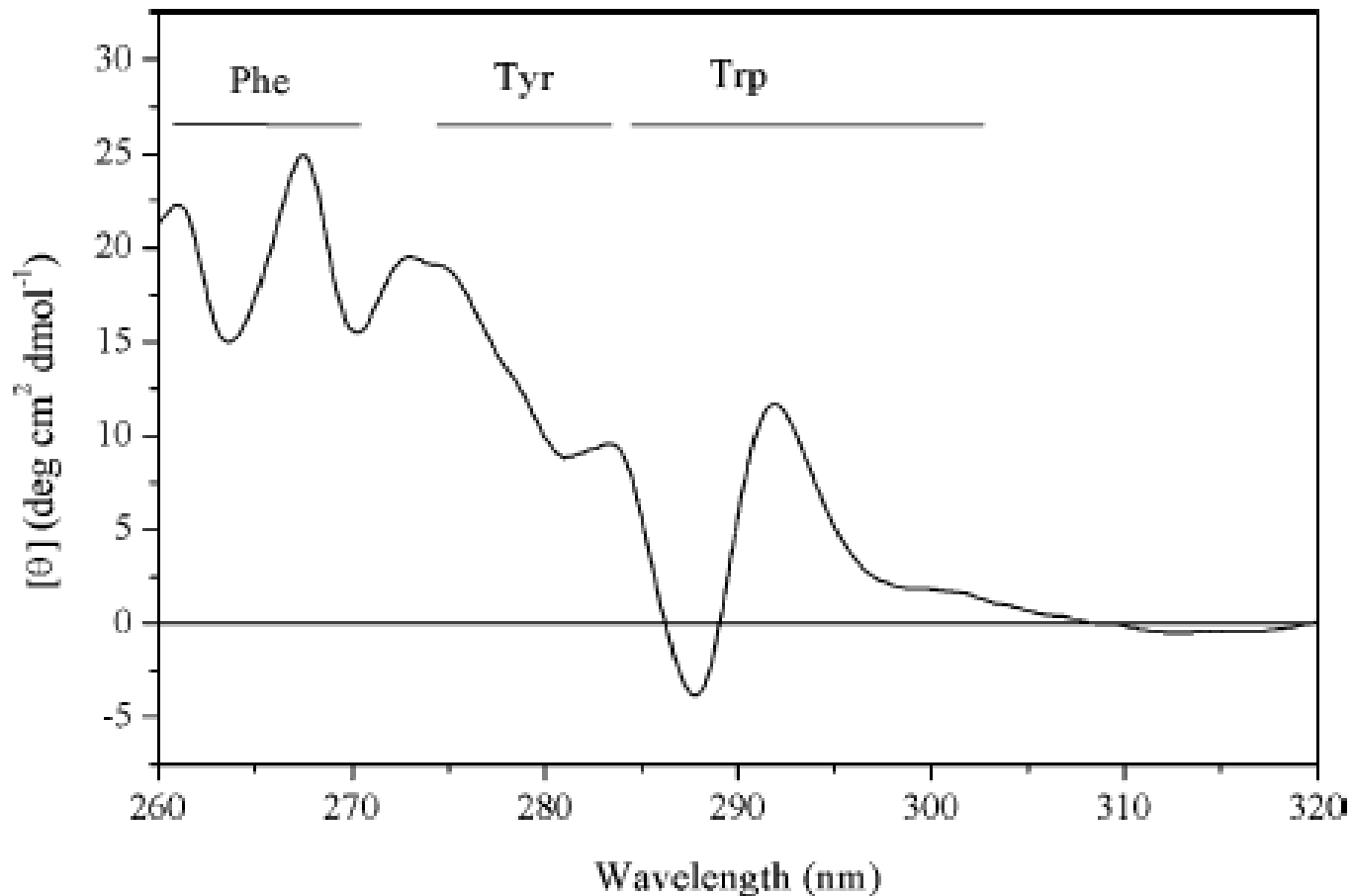
SELCON3



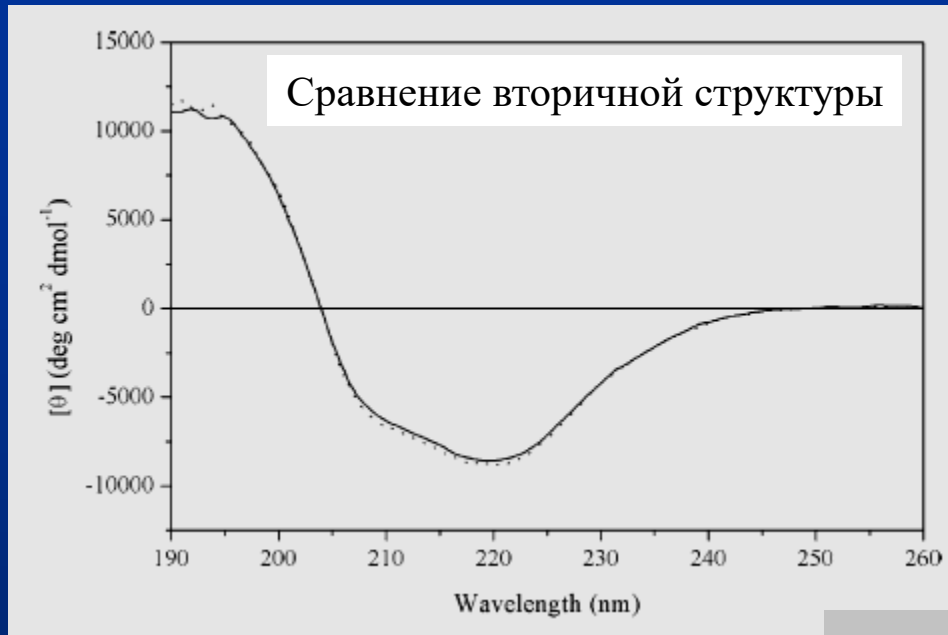
Component spectra of secondary structures



Вид КД-спектра белка в области сигналов
ароматических аминокислотных остатков

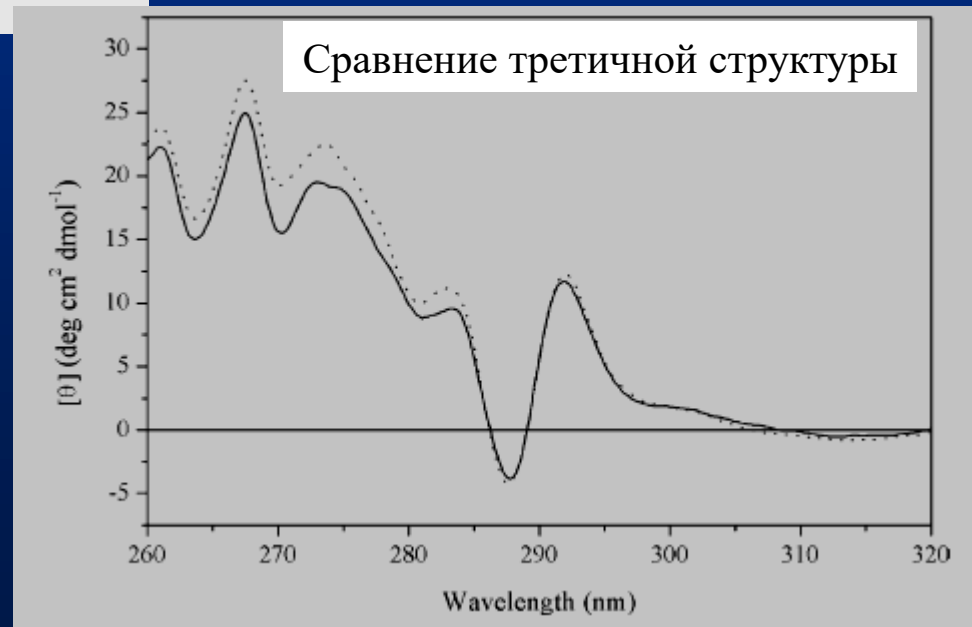


Wild type and mutant (R23Q) type II dehydroquinase from *Streptomyces coelicolor*



Спектры КД хорошего качества могут быть получены от 0,1 мг (дальний УФ) или 1 мг (ближний УФ и видимый диапазон) белка за 30 мин или меньше,

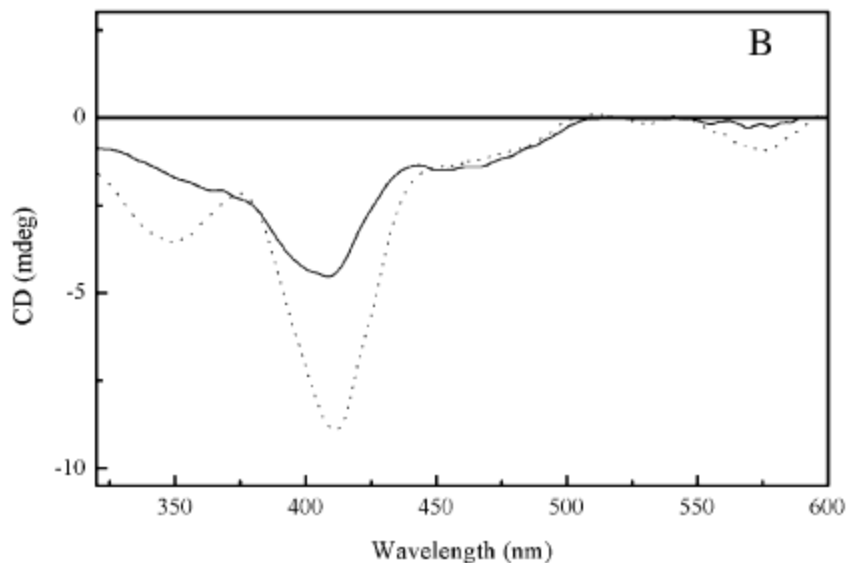
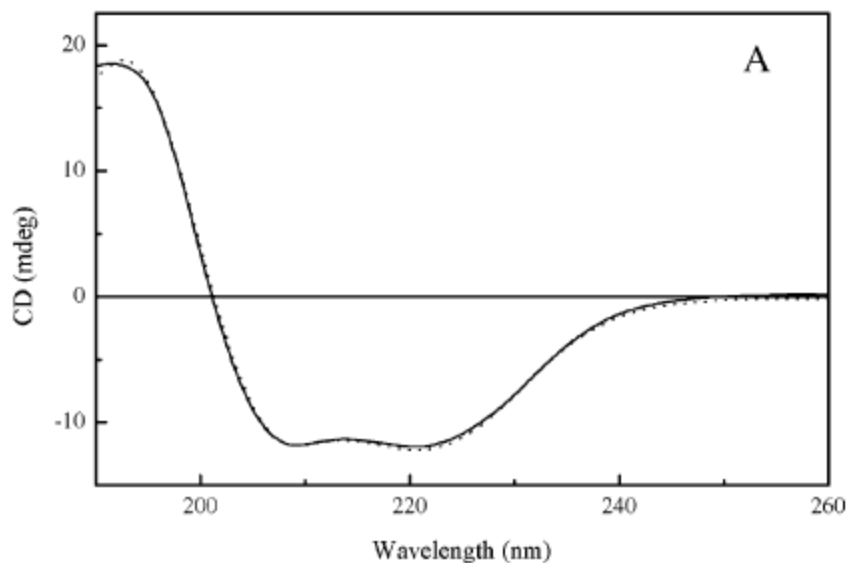
метод неразрушающий



Применения КД-спектроскопии:

- Определение структуры новых белков и пептидов;
- Сравнение структурных особенностей между нативными и рекомбинантными белками, а также между диким типом и мутантными белками;
- Подтверждение целостности экспрессируемых доменов многодоменного белка, что существенно перед детальными структурными исследованиями, например, с помощью рентгеновской кристаллографии.
- Количественная оценка стабильности структуры нативного (рекомбинантного) белка путем измерения температурной зависимости изменений в спектрах КД.

Анализ сохранности сайтов связывания кофакторов



Спектры CD интактного цитохрома P450 BM3 из *Bacillus megaterium* (сплошная линия) и смеси составляющих его доменов (P450 и редуктазного доменов) (пунктирная линия).

вторичные структуры индивидуальных доменов в интактном ферменте сохраняются,

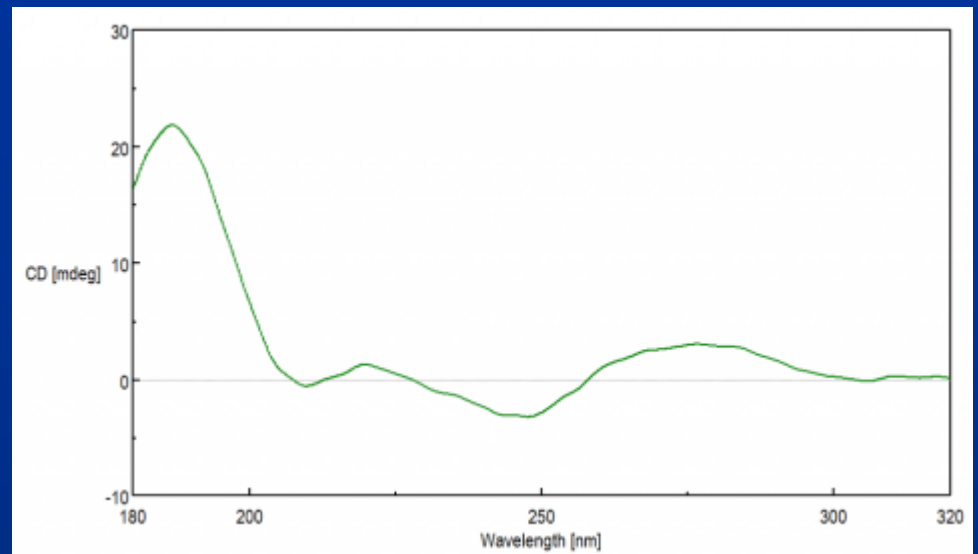
а вот окружение гем-группы (сигнал при 410 нм) изменено в интактном ферменте.

При выборе растворителя для измерений спектров КД следует учитывать следующие условия:

- (1)растворимость,
- (2) прозрачность в исследуемом диапазоне длин волн,
- (3)оптическую неактивность и
- (4)стабильность образца.

Детальные структурные исследования мембранных белков можно проводить только после их экстракции из мембран детергентами.

Спектры КД ДНК дают информацию о вторичной структуре молекулы, которая зависит от ориентации укладки пар оснований.

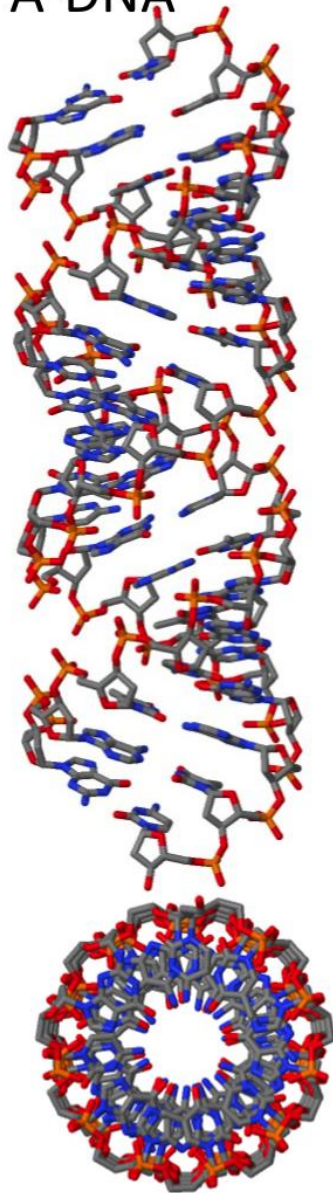


Спектр КД ДНК из тимуса телят.

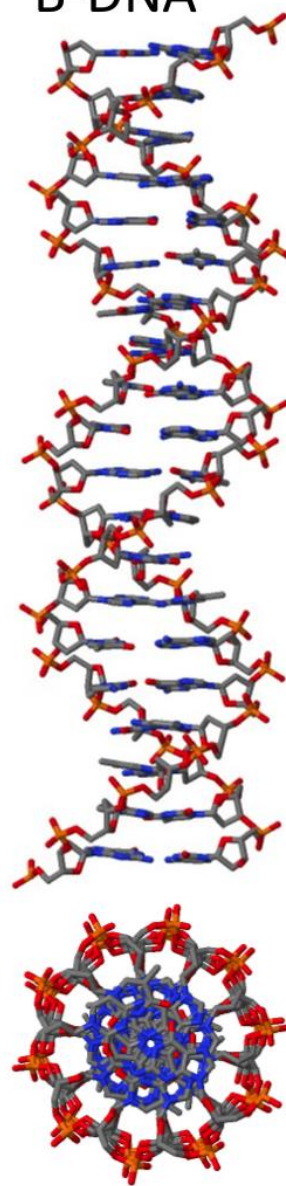
Сами пары оснований не являются хиральными и не дают сигнал КД .

Но они ковалентно связаны с основной цепью ДНК, состоящей из сахарных фрагментов. Хиральность сахаров индуцирует сигнал КД в парах оснований, задействуя электронный переход $\pi \rightarrow \pi^*$, наблюдаемый в диапазоне 200-300 нм.

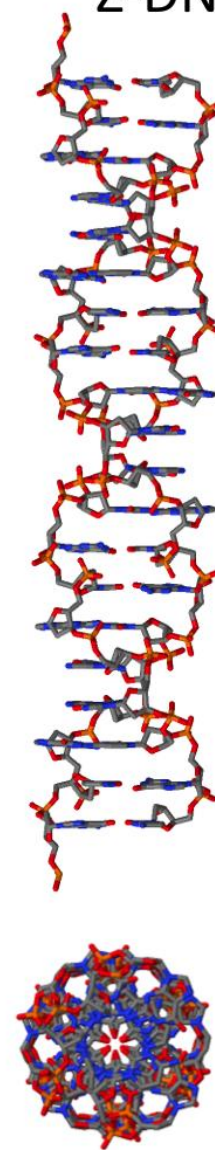
A-DNA



B-DNA



Z-DNA



Каждая конформация ДНК дает определенный спектр КД.

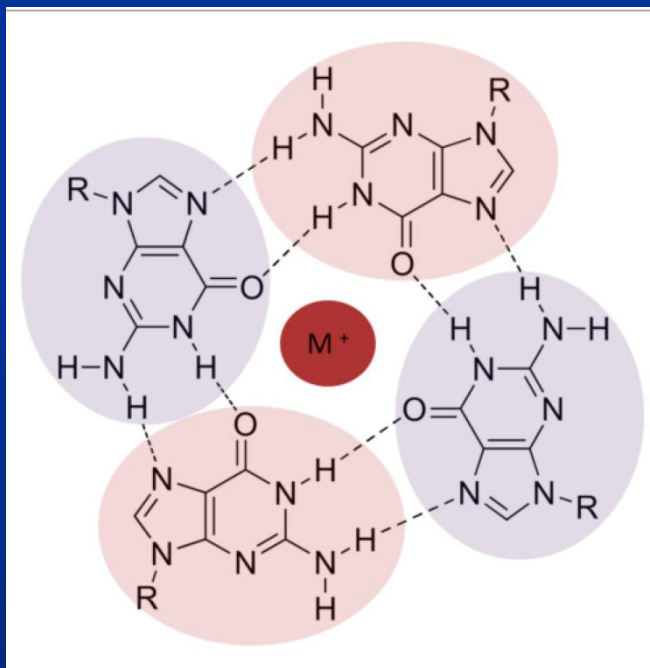
В-форма: положительный максимум 290 нм, отрицательный максимум ~ 245 нм и широкий положительный пик между 260 и 280 нм

А-форма: дает положительный пик 260 нм и отрицательный пик 210 нм.

Z-форма: отрицательная полоса 290 нм, положительный пик 260 нм и отрицательный максимум ~200 нм.

G-квадруплекс с параллельной структурой – положительная полоса 260 нм;

G-квадруплекс с антипараллельной структурой – отрицательная полоса 260 нм и положительный пик 290 нм.



G-квадруплекс - четырёхцепочечная спираль, где четыре гуаниновых основания из разных цепей образуют плоскую структуру, удерживаемую парными взаимодействиями G-G

