

Практикум по кристаллизации мембранных белков и изучению структурообразования липидов методами SAXS

К.х.н. Шевцов Михаил Борисович, к.ф.-м.н. Куклин Александр Иванович

Целью дисциплины «Практикум по кристаллизации мембранных белков и изучению структурообразования липидов методами SAXS» является формирование практических знаний в области кристаллизации мембранных белков и изучения образования липидных наноструктур методом малоуглового рассеяния (SAXS). Данный курс призван способствовать развитию практических навыков работы в лаборатории и работы на сложном и дорогом научном оборудовании. Полученные знания и навыки в дальнейшем будут способствовать развитию культуры проведения комплексных научных экспериментов.

Содержание курса:

МОДУЛЬ 1.

Кристаллизация белков

- Основные принципы и понятия
- Физико-химические основы кристаллизации макромолекул
- Технические способы кристаллизации и применение кристаллизационных китов
- Особенности кристаллизации мембранных белков
- Кристаллизационные роботы
- Модификации макромолекул, используемые при кристаллизации
- Комплексы белковые
- Точечные мутации
- Химерные белки

Получение предварительных сведений о целевом белке, работа с базами данных, поиск аналогов и наложение структур:

- <http://www.rcsb.org>
- <http://xpdb.nist.gov:8060/BMCD4/index.faces>
- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

Постановка кристаллизационных экспериментов на примере лизоцима и родопсина.

МОДУЛЬ 2.

Принципы организации белковых кристаллов:

- Элементарная ячейка
- Решетки Браве
- Элементы симметрии в белковых кристаллах
- Лауэ и пространственные группы симметрий белковых кристаллов
- Прямая и обратная решетка
- Физическое устройство кристаллов
- Мозаичность
- Доменная организация

Кристаллизация лизоцима и родопсина.

МОДУЛЬ 3.

Сбор дифракционных данных с белковых кристаллов:

- Техника эксперимента
- Стратегия и основные параметры сбора данных

- Обработка экспериментальных данных
- Определение параметров элементарной решетки, индексация кристалла
- Определение количества молекул в элементарной ячейке
- Уточнение Лауэ и пространственной группы кристалла
- Полнота набора для уточненной пространственной группы

Расчет стратегии сбора дифракционных данных.

Интегрирование дифракционных данных на примере кристаллографических данных лизоцима и родопсина.

Шкалирование данных на примере кристаллографических данных лизоцима.

МОДУЛЬ 4.

Методы решения фазовой проблемы:

- Основные понятия о фазовой проблеме
- Метод молекулярного замещения
- Выбор стартовой модели по базам данных трехмерных макромолекулярных структур
- Критические параметры при использовании функции вращения и трансляции
- Уточнение положения и ориентации модели методом твердого тела
- Метод аномального рассеяния
- определение положения атомов аномального рассеяния
- расширение набора уточнение фаз с увеличением разрешения

Решение фазовой проблемы методом молекулярного замещения на примере кристаллографических данных лизоцима и родопсина.

Решение фазовой проблемы методом аномального рассеяния на примере кристаллографических данных тауматина.

МОДУЛЬ 5.

Определение структуры макромолекулы

- Интерпретация карт электронной плотности и построение модели макромолекулы
- Методы использования графических программ
- Программы автоматического построения модели
- Уточнение модели структуры с использованием стереохимических и энергетических ограничений, параметры уточнения
- Анализ корректности геометрии и стереохимии уточненной модели структуры макромолекулы

Автоматизированное построение структур белков.

Уточнение структур лизоцима и родопсина.

Изучение карт электронных плотностей.

Валидация полученных структур.

Рекомендуемая литература

1. T. L. Blundell, L. Johnson. Protein Crystallography (Molecular Biology Series), Academic Press, 1976.
2. Шульц Г., Шиммер Р. Принципы структурной организации белков. М., Мир, 1982.
3. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Физика белка. М., КДУ, 2005.
4. Албертс Б., Брэй Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. Т.1, 2, 3. М., Мир, 1994. (См. также: Alberts B., Johnson A. et al. Molecular Biology of the Cell, 5th ed., Garland Science, N. Y. 2008).
5. Д.И. Свергун, Л.А. Фейгин, Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние, - М.: Наука, Главная редакция Физ-Мат Литературы, 1986 – 278 с.

6. Фетисов Г. В. Синхротронное излучение. Методы исследования структуры веществ. — М.: Физматлит, 2007. — 672 с.
7. Ленинджер А. Биохимия. Мир. 1975.
8. Ленинджер А. Основы биохимии. Т. 1-3. Мир. 1985.
9. Филиппович Ю.Б.. Основы биохимии, М., Высшая школа, 1993.
10. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 5th ed., W.H. Freeman & Co., N. Y., 2008
11. Волькенштейн М.В. Биофизика. Наука. 1988.
12. Рубин А.Б. Биофизика в 2-х томах. М., Книжный дом «Университет», 1999
13. Спирин А.С. Молекулярная биология: структура рибосомы и биосинтез белка. М., ВШ, 1986.
14. Спирин А.С. Молекулярная биология: структура и биосинтез нуклеиновых кислот. М., ВШ, 1990.

Интернет-ресурсы:

<http://lib.mipt.ru/catalogue/1020/> - электронная библиотека Физтеха, раздел “Биохимия и биофизика”

<http://molbiol.ru> – образовательный сайт по молекулярной биологии.

<http://biomolecula.ru> - образовательный сайт по молекулярной биологии.

<http://ncbi.nlm.nih.gov> – крупнейшая база данных статей по биологическим и медицинским наукам.

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> - база белковых структур

<http://www.ebi.ac.uk/> - база данных европейского института биоинформатики

<http://www.jove.com/video/4000/use-robot-for-high-throughput-crystallization-membrane-proteins> - видеовведение по использованию робота для автоматизации кристаллизации мембранных белков

<http://www.jove.com/video/1712/crystallizing-membrane-proteins-for-structure-determination-using> - видеовведение по использованию

<http://www.jove.com/video/4001/harvesting-cryo-cooling-crystals-membrane-proteins-grown-lipidic> - видеовведение по приготовлению кристаллов мембранных белков для дифракционного эксперимента

<http://www.jove.com.sci-hub.org/video/2501/crystallization-of-membrane-proteins-in-lipidic-mesophases> - видеовведение в кристаллизацию мембранных белков в липидной мезофазе

<http://www.ruppweb.org/Xray/101index.html> - краткий онлайн курс по белковой кристаллографии

[http://strucbio.biologie.uni-](http://strucbio.biologie.uni-konstanz.de/ccp4wiki/index.php/Crystallography_courses_on_the_web)

[konstanz.de/ccp4wiki/index.php/Crystallography_courses_on_the_web](http://strucbio.biologie.uni-konstanz.de/ccp4wiki/index.php/Crystallography_courses_on_the_web) - сборник ссылок на онлайн курсы по белковой кристаллографии

<http://ww1.iucr.org/cww-top/edu.index.html> - сайт международной кристаллографической ассоциации