

Физико-технический Институт им. А.Ф. Иоффе

Методы колебательной спектроскопии в науках о жизни

Сергей Германович Лушников



2. Вторичная структура



3. Третичная структура

Лизоцим: 129 а.к. ост. 13 930 Да (1 Да=1,67*10⁻²⁷ кг) [C.C.F. Blanke et al., Nature 206 (1965) 757] регулярная А) α-спираль
 Б) β-складчатый
 слой
 нерегулярная структура
 А) Расположение атомов
 остова полипептидной цепи
 относительно оси α-спирали.



Функции биополимеров непосредственно связаны с их структурой

Структура биополимера определяет набор колебаний, составляющих колебательный спектр

Известные (на настоящий момент) виды колебаний биополимера:

Релаксационные (логарифмический вид распределения ширины) акустические (от 1 до 100 ГГц)

фрактоны (от 100 ГГц)

бозонный пик (600-800 ГГц)

возбуждения на соответствующих химических связях молекул и групп молекул (>1000 ГГц)



Колебательная спектроскопия



Колебательная спектроскопия



• Information: $E \rightarrow V_s$ (sound speed) linewidth \rightarrow Atenuation

Неупругое рассеяние нейтронов

В экспериментах используются S(Q, w) изменения как момента, так и энергии для характеризации колебаний системы: решеточных, магнитных и т.д.. 1 meV = 8.6 1/cm1 1/cm=30 ГГц



Mitchell et. al, Vibrational Spectroscopy with Neutrons (2005)

Упругое рассеяние нейтронов





Mitchell et. al, Vibrational Spectroscopy with Neutrons (2005)

- Determine length scales and differentiate between nano-, micro-, and macrosystems.
- Utilizes position and momentum correlation.

Pynn, Neutron Scattering: A Primer (1989)

Оптическая спектроскопия



Рассеяние света

- Упругое рассеяние: Rayleigh
 Inhomogeneities: vacancies, interstitials, etc...
 I_{Rayleigh}~10⁻³I₀
- Неупругое рассеяние:
 Acoustic waves: Brillouin Scattering
 Other waves: Raman scattering
 I_{Rayleigh}~10⁻⁹-10⁻¹²I₀

Интенсивность рассеянного света



Колебательная спектроскопия



가장 사람이 있는 것이 있는 것이 있는 것이 있는 것이 있는 것이 가지 않는 것이 같은 것이 있는 것이 있는 것이 있었다. 것이 있는 같은 것이 같은 것이 있는 것이 같은 것이 있는 것이 있다. 것이 있는 것이 같은 것이 있는 것이 있는 것이 같은 것이 있는 것이 있는 같은 것이 같은 것이 같은 것이 있는 것이 있는 것이 있는 것이 있는 것이 같은 것이 같은 것이 같은 것이 같은 것이 없다. 것이 같은 Физические методы исследования изменений конформации биополимеров

- Анализ структуры (большие установки коллективного пользования, расположены в Англии, Франции, Швейцарии, Германии, Россия, США доступ ограничен):
- Малоугловое рассеяние нейтронов анализ изменений третичной, вторичной и первичной структур, на уровне да/нет, никаких структурных деталей, форма образования агрегатов, дополнительных структур
- Рентгеноструктурный анализ
- ЯМР
- Анализ динамики (расположены в лаборатории, высокое разрешение, разумная стоимость):
- Бриллюэновское рассеяние света
- Рамановское рассеяние света

позволяет определить точки (температурные, концентрационные и т.д.) изменения динамики, а значит и структурных (конформационных) превращений. Выделяют особенности структурных изменений – какие именно элементы структуры исчезли или появились.

- Рамановское рассеяние света
- Бриллюэновское рассеяние света

разумная стоимость):

Анализ динамики (расположены в лаборатории, высокое разрешение,

Тетрагональные кристаллы лизоцима



[А.В. Сванидзе, С.Г. Лушников, Л.А. Шувалов, Кристаллография 50 (2005) 789]



Фазовые переходы в белковых кристаллах

1. Jolles P., Berthou J. *A Phase Transition in a Protein Crystal: The example of Hen Lysozyme* // FEBS Lett. 1972. V. 23. №. 1. P. 21.

2. Berthou J., Jolles P. *High Temperature Crystallization of Lysozyme: An example of Phase Transition*. // Biochim. Biophys. Acta. 1974.
V. 336. P. 222.



<u>Фазовый переход в кристаллах лизоцима при</u>

дегидратации...

I. Dobrianov et al., Acta Cryst. D57 (2001) 61

Dynamic response of tetragonal lysozyme crystals to changes in relative humidity: implications for post-growth crystal treatments

- KNO3 (93% RH), KCl (86%), KBr(83%), NaCl (75%)...

<u>При RH < <mark>88 %</mark>:</u>

- ухудшение разрешения $(1.6\text{\AA} \rightarrow 3.7\text{\AA})$
- изменение мозаичности $(0.06^{\circ} \rightarrow 1.9^{\circ})$
- параметр элементарной ячейки *с* уменьшается на ~ 9 %



S. Speziale et al., Biophys. J. 85 (2003) 3202 Sound Velocity and Elasticity of Tetragonal Lysozyme Crystals by Brillouin Spectroscopy



FIGURE 3 Brillouin spectra for phonons propagating in the [110] direction in tetragonal lysozyme crystals at different relative humidities. The dots indicate the raw data. The lines are a fit to a model for the mechanical coupling of the acoustic phonon to a relaxation mode of hydration water.

FIGURE 4 Sound velocity of tetragonal lysozyme along the [110] and [001] directions as a function of RH. There is a discontinuous increase of both velocities and an inversion of the velocity ratio in the 93%–87% RH range.

Для сенетоэлектриков и ряд других соединений...



Зависимость частоты от влажности Raman активной моды в Na-ДНК при переходе из A в B форму

16/102023

<u>Спектр МБР света в тетрагональных кристаллах лизоцима</u>



[А.В. Сванидзе, С.Г. Лушников, С. Коджима, Письма в ЖЭТФ 84 (2006) 646]

<u> Температурные зависимости скорости и восприимчивости</u>

поперечного ТА2 фонона в кристалле лизоцима,

Температурная зависимость теплоемкости



Фаза «расплавленной глобулы» и золь-гель переход в окрестности тепловой денатурации лизоцима



Бычий сывороточный альбумин (БСА)



Бычий сывороточный альбумин:

- •M = 69 кDa
- •607 аминокислотных остатка
- •3 домена
- •50-68% α-спиральность
- •Концентрация в плазме составляет 35-55 мг/мл.
- •Играет транспортную роль в организме

Фазовая диаграмма БСА



Температурная зависимость относительного изменения сдвига дублета МБ в БСА



[K. Murayama, M. Tomida, Biochemistry 2004; 43, 36.]

Температурная зависимость интенсивности дублета МБ в БСА



7.5 7.0 Фбласть mean-squared displacement денатурации 4.5 4.0 330 340 350 320 300 310 360 370 Temperature / K Температурная зависимость среднеквадратичного отклонения для БСА

Температурная зависимость интенсивности дублета МБ в белковом растворе

[M. Grimaldo, F.Roseen-Runge, M. Henning et.al. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**; 17, 6.]

16

Lysozyme denaturation induced by GdnHCl





GdnHCI-induced lysozyme denaturation, fluorescence data. [W. Liu et al., Biotech. Bioengin. 2004]



Thermal transition of lysozyme as a function of GdnHCl concentration, CD at 230 nm

[B.A. Vemaglia et al., Biomacromolec. 2004]

Lysozyme denaturation induced by GdnHCl

<u>Gdm⁺-Gdm⁺ interactions ~30 ps</u>



Formation of GdnHCl clusters in water. [P. E. Mason et al., J. Am. Chem. Soc. 2004]

[P.E. Mason et al., Biophys. J. 2007]



FIGURE 1 Atom density of Gdm⁺ around melittin side chains $\operatorname{Arg}^{22}(\operatorname{\mathit{left}})$ and $\operatorname{Trp}^{19}(\operatorname{\mathit{right}})$, displayed using VMD (20). The Gdm⁺ contours are displayed at a number density of 4.4-times the bulk number density of Gdm⁺ for both figures.

╋

X-ray structural crystallography of lysozyme crystals with GdnHCl [S.C. Mande et al., Prot. Eng. 2000] [A.C.W. Pike et al., Prot. Sci.1994]

ооооо Релаксационная мода

Gdm⁺-protein interactions ...??



[P.E. Mason et al., Biophys. J. 2007]



Bovine Serum Albumin (Sigma-Aldrich)

<u>Ivophilized, without deuteration</u> <u>g of water / g of H₂O = 0.04</u> (TGA)

583 a.a. residues 66 463 Да (1 Да=1,67 \cdot 10⁻²⁷ kg) prolate ellipsoid shape with dimensions: 140 x 40 x 40 Å³

Details of neutron scattering experiment:

- FOCUS, SINQ; resolution ~ 100 μeV (τ ~ 10 ps)
- wavelength λ = 4.3 Å
- temperature variation from 200 K up to 340 K
- data analysis in DAVE: self-shielding correction
 vanadium used for data normalization

correction for AI sample holder



Dynamic structure factor of BSA



Protein dynamics: Boson peak

ELSEVIER

Fitting of Boson peak by lognormal distribution:

Modeling of protein properties using <u>random elastic network</u>

For acoustic waves: $\omega \propto k \propto \frac{1}{\lambda}$

 $\lambda \sim L$ - localization length due to structural disorder

distribution of quasi-localization lengths topological properties



[M. Nöllmann, P. Etchegoin, Physica A 2001]

Physica A 294 (2001) 44-50

Origin of the lognormal shape in the boson-peak of globular proteins

M. Nöllmann^a, P. Etchegoin^{b,*}



www.elsevier.com/locate/physa

Protein dynamics: Boson peak



Dynamic structure factor of BSA at different temperatures.

Temperature dependence of boson peak maximum frequency for BSA.

7

Protein dynamics: Boson peak



Low-frequency Raman spectrum of lysozyme, h=0.4, T=250 K. [S. Khodadadi et al., Biochim. Biophys. Acta 2010]

Temperature variation of boson peak frequency for lysozyme.

[S. Khodadadi et al., Biochim. Biophys. Acta 2010]
VOLUME 45, NUMBER 17

PHYSICAL REVIEW LETTERS

27 October 1980

Phys. Rev. B 21, (1980), and to be published. ⁹E. L. Evans and J. M. Thomas, J. Solid State Chem. 14, 89 (1975).

¹⁰N. Kambe, M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus,

 S. Basu, A. R. McGhie, and J. E. Fischer, Mater.
Sci. Eng. <u>40</u>, 1 (1979).
¹¹A. D. Novaco and J. P. McTague, Phys. Rev. Lett. <u>38</u>, 1286 (1977).

Fractal Form of Proteins

H. J. Stapleton, J. P. Allen, C. P. Flynn, D. G. Stinson, and S. R. Kurtz Department of Physics and Materials Research Laboratory, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois 61801 (Received 20 March 1980)

Electron spin relaxation measurements on low-spin Fe^{3+} in several proteins show that they occupy a space of fractal dimensionality $d = 1.65 \pm 0.04$, in conformity with the dimensionality $d = \frac{5}{3}$ of a self-avoiding random walk. Analysis of myoglobin x-ray data independently confirms this fractal dimension.

PACS numbers: 87.15.By, 63.50.+x, 76.30.-v

It is possible to use the fractal approach for description

M (r) \propto r^{Df}

of protein structure

 $D_f - \underline{\text{fractal}}$ dimension

For protein $2.25 < D_f < 2.75$



Schematic representation of a massive self-avoiding linear fractal chain [J.S. Helman, 1984]



Cross section of the protein 1A4G [M.B. Enright and D.M. Leitner, 2005]



Nakayama, Yakubo and Orbach, Rev.Mod.Phys.66 (1996)

Daniel ben-Avraham, Vibration normal-mode spectrum of globule proteins // Phys. Rev. B 47 (1993) 14 559

$$g(\omega) \sim \omega^{d_s}$$

 d_s – fracton dimension



FIG. 1. Density of vibrational normal modes, $g(\omega)$, of g actin (\bigcirc) lysozyme (\triangle), ribonuclease I (\blacktriangle), BPTI (∇), and crambin (\bullet) as a function of frequency.



Неупругое рассеяние нейтронов в лизоциме

- Samples: hen egg white lysozyme (Fluka):
 - protonated
 - deuterated
- <u>Inelastic neutron scattering</u> inverse-geometry time of flight spectrometer KDSOG-M (JINR, Dubna, Russia)
- **Temperatures 280 K, 311 K, 200 K**
- Density of vibrational states G(ω)

$$G(\omega) = \frac{\omega}{n(\omega) + 1} \frac{\mathbf{k}_0}{\mathbf{k}_1} \frac{1}{Q^2} \left(\frac{d^2 \sigma}{d\Omega d\omega'}\right)_{\text{incoh}}$$

 \mathbf{k}_0 и \mathbf{k}_1 -wave vectors of incident and scattered neutrons, $\mathbf{Q}=\mathbf{k}_0-\mathbf{k}_1$ – scattering wave vector, $\mathbf{n}(\boldsymbol{\omega})$ – Bose-Einstein factor.

 $\left(\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega'}\right)_{incoh}$ - the double differential cross section for incoherent scattering

Фрактон в низкочастотной области колебательного спектра <u>лизоцима</u>

ω >> ω_{co}





Направления действий:

- Только комбинация обсуждаемых здесь (и ряда других) методов дает возможность полностью восстановить картину динамики биополимера.
- Должны реализовываться как структурный, так и динамический подходы

Спасибо за внимание!

21



16/10/2023



In <u>real physical systems</u> : **a<<L<<Lo**,

a - the length that forms the lattice spacing of the original network,
Lo - the length corresponds the description of the
fractal object as a homogeneous system





Description of protein dynamic and structure from the one point of view

Crossover from phonons to fractons

Dispersion relations for fracton

$$\omega \propto \begin{cases} \upsilon k & npu \ \omega << \omega_c \\ k^{D_f/\tilde{d}} & npu \ \omega >> \omega_c \end{cases}$$

$$\omega \propto \Lambda(\omega)^{-D_f/\tilde{d}}$$

 ω_c - crossover frequency

 $\Lambda(\omega)$ - frequency-dependent length scale

$$D_f / \widetilde{d} \approx 1.92 \pm 0.05$$

Малоугловое рассеяние нейтронов, эксперимент

- <u>Образец</u>: hen egg white <u>lysozyme</u> (Fluka):
 - C_{lys} =50 mg/ml and 250 mg/ml,
 - NaAc buffer (pH=4.6, D₂O), T range: 300 347.5 K
- <u>Установка</u>: "Yellow Submarine " (Budapest neutron center)





$$\frac{\left\langle \frac{d\sigma}{d\Omega} \right\rangle = \iint_{VV'} \rho(\vec{r}) \rho(\vec{r}') \frac{SinQ\left|\vec{r} - \vec{r}'\right|}{Q\left|\vec{r} - \vec{r}'\right|} d\vec{r} d\vec{r}' \text{ Debye формула}}$$

Results of investigation of lysozyme by SANS





Change of fractal dimension of lysozyme at thermal denaturation,

results of SANS



Для сенетоэлектриков и ряд других соединений...



Raman активной моды в Na-ДНК при переходе из А в В форму

14/11/2013

<u>Фазовые переходы</u>



Elastic softening in BiVO₄ and LaNbO₄. [Y. Ishibashi et al., Physica B&C 150(1988) 258]

Собственная низкочастотная динамика ДНК *agnts3*





Возможные локальные конформации Berlin и agn^{ts3}



Зависимость интенсивности релеевской (упругой) компоненты от температуры



ФТИ 201600000

Структура мутантной ДНК и ее изменения при повышении температуре, квантово-химические расчеты

17

ДНК



Возможные локальные конформации Berlin и agn^{ts3}



Зависимость скорости звука при структурном фазовом переходе



Собственная низкочастотная динамика ДНК *agn^{ts3}* и Berlin



Зависимость интенсивности релеевской (упругой) компоненты от температуры *agn*^{ts3}



«Чистая» динамика ДНК при плавлении и

ДНК

денатурации

Нормированное на буфер изменение Скорости гиперзвука vs температура в ДНК Поведение скорости LA фонона при сегнетоэластическом фазовом переходе

16



14/11/2013

Цель работы:

Исследование низкочастотной динамики биополимеров при фазовых превращениях. Изучение связи между структурой и динамикой биополимеров

Фазовые превращения в биополимерах:

динамический (стекольный) фазовый переход (при T<240K)</p>

денатурация (при Т> 340К)

• конформационная динамика



Активный белок

Hen Egg White Lysozyme:

globular structure 129 a.a. residues 13 930 Да (1 Да=1,67·10⁻²⁷ kg) 4 S-S bonds [C.C.F. Blanke et al., Nature 1965]

Факторы, приводящие к денатурации белков:

- ▶ <u>температура</u>
- сильные кислоты и щелочи
- ▶ хаотропные агенты(urea,

guanidine hydrochloride

▶ давление и *т.*д.

Anna Svanidze	14/11/2013

денатурированный

Тепловая денатурация лизоцима



[D.R. Booth et al., Nature 1997]





Excess thermal capacity thermograms at different lysozyme concentrations. [S. Raccosta et al., Eur. Biophys. J. 2010]

Раствор лизоцима в оптическом микроскопе при концентрации (а) 50 µМ и (b) 334 µМ после выдержки при 81 °C. [S. Raccosta et al., Eur. Biophys. J. 2010]

14/11/2013

Методы исследований:

- Мандельштам-бриллюэновское рассеяние света
- Рамановское рассеяние света
- ИК-спектроскопия
- Малоугловое рассеяние нейтронов
- Неупругое рассеяние нейтронов
- Квазиупругое рассеяние нейтронов
- Монте-Карло моделирование, квантово-химические расчеты

14/11/2013

3

ФТИ 2016 ОООО Тепловая денатурация лизоцима 11



Anna Svanidze

14/11/2013

ФТИ 2016 ОООО Тепловая денатурация лизоцима 12



Anna	Svan	idz
------	------	-----



<u>Sow-Hsin Chen, Jose Teixeira, Structure of protein-detergent complexes.</u> // Rhys. Rev. Lett. 57 (1986) 2583


Поведение интенсивности мандельштам-бриллюэновского дублета



 I_0 - incident light intensity, ρ – density, V - scattering volume, v - sound velocity, $R_{sc}(\rho)$ - constant of scattering from adiabatic density fluctuations, σ - extinction coefficient, r - distance from the scattering volume to the observation point, l - light propagation distance in the medium, q - scattering vector, η , ζ - coefficients of shear and volume viscosity

5/09/2012

Example of Brillouin spectrum and fitting



Anna Svanidze

Conclusions

- The pronounced anomalies in the behavior of Brillouin peaks at sol-gel transition accompanied lysozyme thermal denaturation have been found.
- The model for the description of Brillouin peak intensities in the critical region has been developed.
- There exists a temperature region before sol-gel transition where the anomalies in hypersound velocity appear that probably correspond to the intermediate state at thermal denaturation.

Модельная структура ДНК





Модели различных известных структур ДНК: В- ДНК: диаметр 23.7 Å высота витка спирали 34 Å А-ДНК: диаметр 25.5 Å высота витка спирали 25 Å Z-ДНК: левозакрученная Модель В-ДНК [R. Wing et al., Nature 287 (1980) 755] и химическая структура двойной спирали ДНК [R.E. Dickerson, Sci. Am. 249 (1983) 94]



Конформационная динамика ДНК

Локальные структуры: пузыри, шпильки, триплексы, квадруплексы, перекрестия Холлидея, крестообразные структуры



Изменение крест-формы ДНК: а)Раскрытая b)Согнутая c)Сложенная



Кривая плавления ДНК





Задача

- Исследование поведения низкочастотной динамики ДНК при фазовых превращениях.
- Изучение влияния нуклеотидного состава ДНК на её динамику

План

- 1.Объекты
- 2.Конформационная динамика ДНК
- 3.Мандельштам-бриллюэновское рассеяние света
- 4.Результаты анализа спектров упругого и неупругого рассеяния света5.Выводы

Объекты

В качестве объектов были выбраны две последовательности ДНК полученные посредством полимеразной цепной реакции и выделенные из мух вида *Drosophila melanogaster*

Линия дикого типа Berlin

Мутантная – agnostic (agn^{ts3}), характеризующаяся резкими нарушениями обучения и памяти, что соответствует основным симптомам нейродегеративных болезней

Мутантная линия отличалась от дикого типа наличием АТ богатой вставки в 28 п.н. В измерениях использовали раствор ДНК в натрийфосфатном буфере (pH = 7,5), Кривая плавления ДНК



ФТИ 2013, Конкурс лучших работ

<u> Мягкая мода при В-А переходе в ДНК</u> Комбинационное рассеяние 93% RH Na-DNA 1000 500 0 $V - V_0$, CM^{-1} Рассеяние МБ A - DNA B - DNA 30-(cm-1) SHIFT, 0,5 25 Спектры рассеяния (схематически) и-и, см-1 ×× в двух различных спектральных интервалах × RAMAN × × Dependence of the frequency shift of the × 20 × lowest-frequency Raman active mode in × *Na-DNA on relative humidity (RH).* × T. Weidlich, et al., Phys. Rev. Lett., 1998; 50 0 100 T. Weidlich, et al., J. Phys. Chem., 1988] **RELATIVE HUMIDITY, %** 14/11/2013





Мандельштам-бриллюэновское рассеяние света



IXS: vibrational DOS

A. Bosak, M. Krisch; Phys. Rev. B 72 (2005) 224305



multiphonon contribution is estimated as 8% of the total inelastic part

Структура ДНК

4



<u>Фазовые переходы</u>



Elastic softening in BiVO₄ and LaNbO₄. [Y. Ishibashi et al., Physica B&C 150(1988) 258]

18

Brillouin spectra of GdnHCI solutions



Anna Svanidze

5/09/2012

DOS of hen egg white lysozyme obtained by our incoherent neutron scattering experiment

DOS of bovine pancreatic trypsin inhibitor obtained by incoherent neutron scattering



200

Lysozyme, T=280 K

[Smith J. et. Al., J. Chem. Phys. 93 (1990) 2974]