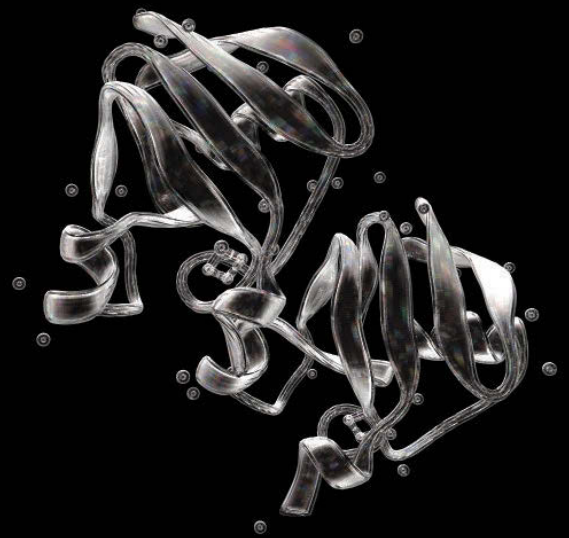


1 2
3 4



ХИМИЯ

МИГНО- ВЕННЫЕ РЕАКЦИИ

Новые фильмы о воздействии лекарственных средств на белки и о процессе фотосинтеза, снятые за миллионные миллиардной доли секунды, объясняют, как работают — или не работают — молекулы

Джон Спенс и Петра Фромм

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

■ Белки находятся в постоянном движении, участвуя в химических реакциях, которые составляют основу жизни. Это движение осуществляется на молекулярном и субмолекулярном уровнях так быстро, что его невозможно увидеть в микроскоп.

■ Используя импульсы рентгеновского лазера, которые длятся всего лишь миллионные миллиардной доли секунды (10^{-15} с), ученые создали «молекулярные фильмы», которые демонстрируют, как меняется структура белков при их взаимодействии.

■ Такие фильмы могут показать биологические реакции в беспрецедентных деталях и продемонстрировать, почему лекарства не всегда воздействуют на белки-мишени, а также каким образом в процессе фотосинтеза в растениях создается чистая энергия.

ОБ АВТОРАХ

Джон Спенс (John C.H. Spence) — профессор физики Аризонского университета, директор по науке Научно-технического центра «Биология с использованием рентгеновских лазеров» (BioXFEL).



Петра Фромм (Petra Fromme) — профессор, руководитель Центра прикладных структурных исследований Аризонского университета.



подземной лаборатории, расположенной в глубоком тоннеле в предгорьях рядом с Пало-Алто, Калифорния, шли последние приготовления к серии взрывов. Цель: взорвать крошечные кристаллы белков, чтобы раскрыть одну из самых тщательно охраняемых тайн природы — как в процессе фотосинтеза в растениях свет превращается в химическую энергию. Ожидаемый результат: шаг к получению неограниченной чистой энергии.

Это было в декабре 2009 г. Команда из исследователей и студентов Национальной ускорительной лаборатории SLAC (Стэнфордского центра линейного ускорителя) без сна и отдыха работала над постановкой эксперимента с использованием самого мощного рентгеновского лазера в мире — LCLS (Linac Coherent Light Source, Линейный ускоритель — источник когерентного излучения), который ускоряет электроны почти до скорости света. Одна группа лихорадочно настраивала инжекторы, которые должны выстреливать кристаллы в пучок рентгеновского излучения, другая закрепляла и заправляла инжектор свежими кристаллами белкового комплекса, выполняющего ведущую роль в процессе фотосинтеза, — фотосистемы I.

В конце тоннеля ускорителя длиной 3,2 км кристаллы начинали свой путь в интенсивном излучении лазера. Но до того как они разрушатся, с помощью нового научного метода получали изображение каждого кристалла. Сегодня этот метод обещает перевернуть наши представления о биологии на молекулярном и субмолекулярном уровнях, так как теперь мы можем смонтировать быструю последовательность таких кадров, полученных за фемтосекунды (миллионные миллиардной доли секунды, или 10^{-15} с), в фильм.

Однажды физик Ричард Фейнман сказал: «Все, что делают живые организмы, можно представить в виде вибраций и колебаний атомов». Но раньше никогда не удавалось непосредственно увидеть колебания атомов и молекул в живых организмах на такой скорости. Наш метод, называемый серийной фемтосекундной кристаллографией (SFX),

позволяет наблюдать высокоскоростные молекулярные «танцы», которые определяют, как лекарства воздействуют на больные клетки, а также как образом происходит превращение энергии в различные формы в ходе химических реакций.

Сейчас уже во всем мире группы исследователей используют SFX для выявления тонких механизмов регуляции кровяного давления экспериментальными лекарствами, создавая основу для более эффективного лечения гипертензии. С помощью SFX была определена структура фермента, который разрушает красные клетки крови при сонной болезни — смертельном заболевании, вызываемом паразитами. Этот же метод позволил увидеть начальные этапы фотосинтеза, когда происходит расщепление воды на водород и кислород.

Тогда же, в подземной лаборатории в 2009 г., когда импульсы рентгеновского излучения начали уничтожение наших тщательно сформированных кристаллов, ставки были высоки: многие ученые утверждали, что SFX не будет действовать, и отклоняли наши заявки на финансирование. И вот под наши радостные возгласы на компьютерных мониторах появились прекрасные изображения рассеянных рентгеновских лучей — свидетельство того, что родилось новое направление рентгеноструктурного анализа.

Рентгеновское зрение

Еще до появления SFX ученые добились большого прогресса в регистрации изменений, происходящих в определенных химических структурах, но они не могли непосредственно наблюдать

Кинопроизводство на молекулярном уровне

Фотосинтез в результате превращения солнечного света в химическую энергию создает условия для жизни на Земле. Новое направление молекулярного кино предоставило ученым возможность впервые посмотреть на процесс в действии. Чтобы инициировать реакции фотосинтеза, исследователи используют

видимый свет, искусственно воспроизводя поглощение листом солнечного света, затем воздействуют на белки мощным рентгеновским лазером, чтобы за доли секунды до разрушения этих белков получить кадры происходящих в них изменений. Кадры снимают в пять этапов (внизу) и монтируют в фильм.

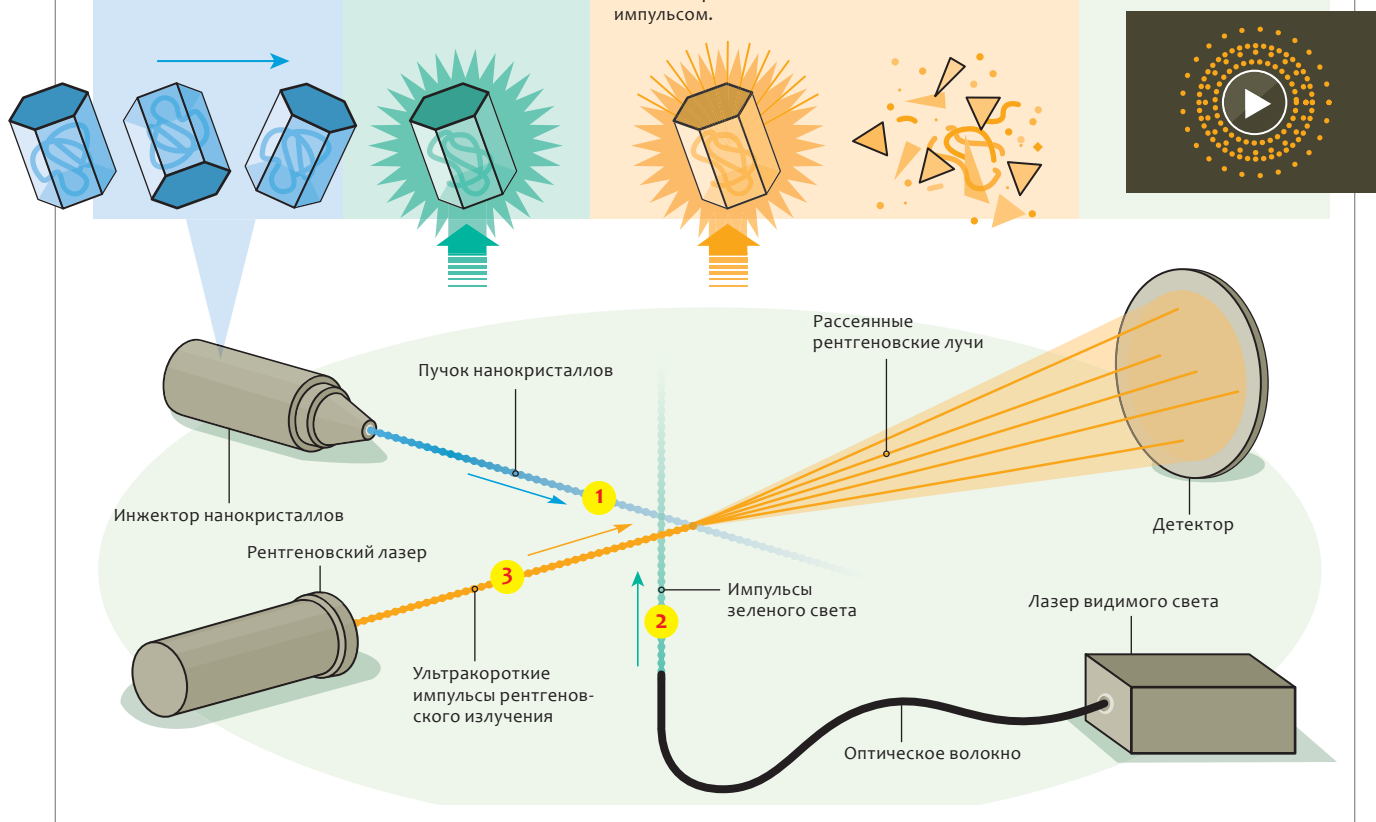
1 Из светочувствительного белка (фотосистемы) формируют крошечные кристаллы, в которых молекулы расположены в строгом порядке, поэтому можно определить их структуру. Через инжектор проходят сотни тысяч таких кристаллов в секунду.

2 Импульсы зеленого света, имитируя солнечный свет, поглощенный листом растения, запускают изменения в молекулах в составе нанокристаллов. Этот начальный этап фотосинтеза длится в течение фемтосекунд, то есть всего лишь миллионные миллиардной доли секунды (10^{-15} с).

3 Затем на кристаллы воздействуют мощным импульсом рентгеновского излучения. Когда рентгеновские лучи попадают в нанокристаллы, они рассеиваются определенным образом, создавая в этот момент снимок структуры молекулы. Для того чтобы получить следующий кадр в фильме, эксперимент повторяют с большим интервалом между импульсом зеленого света и рентгеновским импульсом.

4 Импульс рентгеновского излучения длится всего 50 фс, но это излучение настолько мощное, что уничтожает белок.

5 Компьютерная программа составляет из десятков тысяч 2D-снимков одно 3D-изображение белковой молекулы. В ходе химической реакции получают следующие кадры и сшивают их в фильм.



за самыми хрупкими и сложными биомолекулами в действии. Например, в 1980-х гг. химик Ахмед Зевайл (Ahmed H. Zewail) изобрел метод наблюдения за движением атомов во время химических реакций с использованием ультраскоростных импульсов лазера видимого излучения. Однако длина волны видимого света слишком велика, чтобы различить мельчайшие детали в структуре белка. Позднее существенные достижения в микроскопии позволили получить изображения белков и вирусов с почти атомным разрешением. Но из-за

недостаточно высокой скорости с помощью этих методов нельзя «поймать» быстротекущие реакции, такие как фотосинтез.

Мы решили использовать рентгеновское излучение, которое имеет необходимые скорость и разрешение, чтобы зафиксировать биологические реакции в действии. Ключевым моментом в нашей работе была разработка технологии, которая бы позволяла сформировать изображения молекул за мгновение до того, как их уничтожит рентгеновское излучение. При традиционном подходе для

того, чтобы определить положение атомов в молекулах, ученым приходится тщательно выращивать большие кристаллы белков и других молекул. Затем на кристаллы воздействуют рентгеновским излучением и получают картину рассеяния, или дифракции, рентгеновских лучей. Поскольку в кристалле молекулы располагаются в строго организованном порядке, то рассеяние рентгеновских лучей происходит прогнозируемым образом, что позволяет ученым идентифицировать атомы и их положение. Этот метод называется рентгеновской кристаллографией, и в методе фемтосекундной кристаллографии для определения атомной структуры используется тот же принцип, но все происходит гораздо быстрее.

Тем не менее рентгеновские лучи в конце концов разрушают молекулы, которые мы пытаемся увидеть. Согласно распространенному мнению, использование лазера рентгеновского излучения, в котором высокоэнергетические рентгеновские лучи сконцентрированы в мощный пучок, должно было бы только усилить повреждающий эффект. Мощное излучение такого лазера пробивает дыру в стали. Следовательно, можно предположить, что у хрупкой биомолекулы нет шансов. Было необходимо опередить повреждающее действие рентгеновского излучения и получить изображение за фемтосекунды. Для сравнения: между одной фемтосекундой и одной целой секундой такая же разница, как между одной секундой и 32 млн лет.

Ключевой момент для метода SFX — именно это неуловимо малое время, которое происходит с момента попадания пучка лазера в молекулу до выбивания электронов из ее атомов под воздействием энергии рентгеновского излучения. Лишенные электронов положительно заряженные остатки атомов отталкиваются друг от друга, заставляя молекулы расширяться и в конечном итоге взрываться.

Вот как это работает. Сначала молекулы заставляют формировать крошечный кристалл. Затем кристалл обстреливают мощным пучком рентгеновского излучения сверхкороткими импульсами, длительности которых как раз достаточно, чтобы часть рентгеновских лучей рассеялась кристаллом до того, как энергия пучка разорвет молекулу. Наконец, детектор улавливает рассеянные рентгеновские лучи, и по полученной дифракционной картине можно судить о типе и положении атомов в белке.

Изображения, собранные во время прохождения потока кристаллов белка под разным углом через пучок рентгеновского излучения, позволяют воссоздать трехмерную структуру (в 3D). В результате можно получить изображения на разных стадиях химической реакции и соединить их в определенной последовательности — как кадры в киноленте.

Кристаллизованный вид

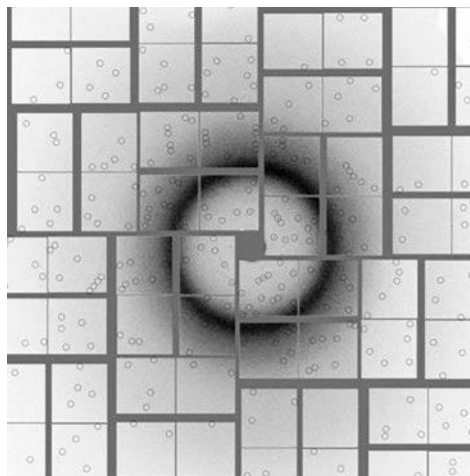
Первый шаг к производству таких молекулярных фильмов был сделан в 2000 г., когда биофизики Янош Хайду (Janos Hajdu) и Рихард Нойтце (Richard Neutze) из Уппсальского университета вычислили, что до взрыва молекул после воздействия рентгеновского излучения должно пройти около 10 фс. Следовательно, ученым было необходимо получить снимок еще быстрее. В 2006 г. Генри Чепмену (Henry Chapman), ныне работающему на Немецком электронном синхротроне (DESY), с коллегами удалось

благодаря применению подхода «рассеивание, а не уничтожение» получить снимок низкого разрешения двух крошечных фигурок и солнца, вытравленных в мембране из нитрида кремния.

Но применим ли этот подход к хрупким биологическим молекулам? Многие из научного сообщества скептически отнеслись к нашему предложению попробовать. Наши первые десять попыток получить грант на исследования были отклонены. Скептики говорили, что у рентгеновского лазера недостаточно короткие импульсы; что белковые кристаллы слишком малы, чтобы ответ можно было зарегистрировать; что мы никогда не сможем определить точную ориентацию кристалла в тот момент, когда в него попадает рентгеновский пучок, а это информация, которая необходима для определения структуры кристалла.

Но мы предполагали, что если можно получить изображения других молекул, как доказал Чепмен, то можно снять и биомолекулы тоже. Петра Фромм и ее команда решили продемонстрировать SFX на одном из самых трудных образцов — фотосистеме I. К настоящему времени фотосистема I, состоящая из 36 белков и более 300 улавливающих свет зеленых и оранжевых пигментов, — одна из самых сложных белковых структур, проанализированных с помощью рентгеновского излучения.

Фромм детально знакома с фотосистемой I, так как в течение многих лет работала над выращиванием



Точно в цель: серые точки на снимках, полученных с помощью серийной фемтосекундной кристаллографии, показывают рассеяние (дифракцию) рентгеновских лучей после столкновения с кристаллами, раскрывая структуру белка

ее кристаллов и определением структуры с использованием других методов. Мы также предположили, что большой размер этого биомолекулярного комплекса — его преимущество, поскольку даже при небольшом количестве дифракционных картин можно будет получить легко распознаваемое изображение низкого разрешения. И это нам удалось сделать в подземной лаборатории в 2009 г.

Малое прекрасно

Чтобы получить требуемое изображение, нам сначала нужны были кристаллы фотосистемы I. В обычной кристаллографии для воссоздания структуры белков необходимо вырастить большие кристаллы, чтобы добиться достаточного рассеяния рентгеновских лучей. Но на выращивание больших высокоструктурированных кристаллов некоторых белков могут уйти годы экспериментов. А для некоторых белков это практически невозможно, и фотосистема I — один из них.

В SFX, наоборот, применяются нанокристаллы, которые намного легче вырастить в лаборатории. Но использование нанокристаллов в свою очередь связано с определенными сложностями. Мы должны не только получить достаточно сильный сигнал от маленького кристалла. Перед нами встают базовые физические проблемы: как обнаружить кристаллы, которые не видны под микроскопом? Более того, как поместить нанокристаллы перед рентгеновским импульсом? И как выполнять эту последовательность действий 120 раз в секунду?

Сначала нам нужно было придумать новые способы увидеть нанокристаллы. Один из методов, которые мы применили, называется SONICC (*second-order nonlinear imaging of chiral crystals*, «нелинейное отражение второго порядка хиральными кристаллами»): кристаллы превращают два ультрабыстрых импульса инфракрасного света в один фотон зеленого света, который освещает нанокристаллы, как светлячков в ночи, поэтому их можно обнаружить.

Другое изобретение позволяет мгновенно помещать кристаллы в импульс рентгеновского лазера. Один из нас (Джон Спенс) вместе с физиками из Аризоны Уве Вейерсталлом (Uwe Weierstall) и Брюсом Доуком (Bruce Doak) предложили использовать устройство, которое выбрасывает струю раствора с нанокристаллами сквозь пучок рентгеновского излучения и напоминает по принципу работы струйный принтер. Инжектор стреляет нанокристаллами настолько точно, что они проходят сквозь пучок в ряд друг за другом.

Чтобы предотвратить засорение инжектора, которое может привести к прекращению потока нанокристаллов, Вейерсталл разработал широкую насадку, сохранив способность инжектора генерировать узкий поток. Для этого наружный конец

насадки окружают потоком гелия, фокусирующим пучок нанокристаллов толщиной меньше крошечной доли человеческого волоса, тогда как размеры самой насадки раз в десять больше.

Когда аппаратура была готова, мы столкнулись с еще одной проблемой: как обработать целую гору данных. В результате одного эксперимента получают до 100 Тбайт данных — количество, достаточное, чтобы заполнить жесткие диски 25 перовоклассных настольных компьютеров. А для того чтобы сконструировать 3D-изображение, необходимо сначала найти правильную ориентацию кристаллов на десятках тысяч снимков, а потом объединить эти снимки. Поэтому мы с Ричардом Кирианом (Richard Kirian) и Томасом Уайтом (Thomas White), которые тогда работали вместе с Чепменом в DESY, разработали специальную компьютерную программу, превращающую нашу гору данных в точные 3D-изображения молекулы.

Постепенно мы совершенствовали наш метод и к 2014 г. в реальном времени смогли взглянуть на перенос электронов между двумя основными участниками фотосинтеза: большой улавливающей солнечный свет фотосистемой I и белком ферредоксином.

Поглощенный свет в фотосистеме I превращается в электроны, которые затем ферредоксин переносит для использования в процессе преобразования CO_2 в биомолекулы. Как только ферредоксин начинает перенос электронов, кристаллы белка быстро растворяются, поэтому за дальнейшим ходом реакции трудно наблюдать. Только благодаря супербыстрому процессу SFX можно увидеть скоростные изменения.

Следующий шаг в данном направлении и основная тема исследований Петры Фромм как биохимика: выяснить, как в растении вода расщепляется на водород и кислород с использованием только солнечного света и распространенных металлов. Расщепляя воду так, как это делают растения, можно было бы получать в качестве топлива для автомобилей и электростанций дешевый малотоксичный водород — давняя мечта для развития экономики возобновляемой энергетики.

Нам удалось собрать первые кадры с низким разрешением процесса расщепления воды и увидеть начальные признаки значительных структурных изменений, происходящих в участвующем в процессе белковом комплексе — фотосистеме II. Совсем недавно группа Цзянь-Жэнь Шэня (Jian-Ren Shen) в Окаямском университете использовала метод SFX, чтобы получить такое же изображение процесса с большей детализацией. Следующий этап в развитии данной технологии — научиться создавать фильмы высокого разрешения, чтобы продемонстрировать все стадии процесса на атомном уровне в деталях и раскрыть тайну фотосинтеза.

Разработка лекарств

Теперь, когда ученые начали снимать кино с помощью *SFX*, создаваемые нами фильмы могут привести не только к будущим открытиям, но и к разработке новых и совершенных лекарств уже сегодня. Мы обнаружили эту возможность, когда изучали блокаторы рецептора ангиотензина II (БРА). Эти лекарства взаимодействуют с клеточным рецептором гормона ангиотензина II, который вызывает сужение кровеносных сосудов. БРА используются для лечения повышенного кровяного давления (гипертензии) — основной причины инсультов и сердечной недостаточности в США. Несмотря на доказанное действие первого поколения таких лекарств, они слабо связываются с рецепторами-мишенями, поэтому их надо принимать в высоких дозах, что усиливает побочные эффекты, проявляющиеся в виде головных болей и головокружений, а иногда и более серьезно — спровоцировав отек лица или гортани.

Наше исследование выявило причину слабого связывания: на самом деле лекарства не соответствуют рецептору так, как должно быть, поэтому часть молекул не действует. Установление более точного строения рецепторов может привести к созданию новых БРА, которые будут контролировать кровяное давление более эффективно. Уже разработано одно из таких лекарств — *ZD 7155*.

Подобные уточнения могут помочь в усовершенствовании и других лекарств. Рецепторы ангиотензина II принадлежат к большой и важной группе клеточных рецепторов — сопряженных с G-белком. Эти молекулы, расположенные на клеточной поверхности, позволяют клетке воспринимать сигналы из внешней среды и отвечать на них. За открытие структуры и механизма функционирования этого класса рецепторов в 2012 г. Роберт Лекфовиц (Robert Joseph Lefkowitz) и Брайан Кобилка (Brian Kobilka) получили Нобелевскую премию по химии. Благодаря особой роли в выживании и росте клетки рецепторы, сопряженные с G-белком, становятся важнейшей мишенью для новых лекарств. Возможность увидеть, каким образом изменяется структура рецепторов, поможет химикам-фармацевтам разрабатывать лекарства, точно совпадающие с рецепторами в активном состоянии, и таким образом снизить побочные эффекты.

«Мы показали, что во всех предыдущих молекулярных моделях предположения о том, как рецептор и молекула лекарства соответствуют друг другу, оказались неверны во многих важных деталях», — рассказывает Вадим Черезов из Университета Южной Каролины, который возглавлял эксперимент. Например, *SFX* выявила различия в структуре рецепторов, связанных с G-белком, при комнатной температуре и криогенных температурах, обычно используемых в кристаллографии. Это означает, что лекарства, разработанные для рецепторов, находящихся в замороженном

состоянии, не будут точно совпадать с рецепторами при температуре человеческого тела.

Иногда лекарства обладают слишком широким спектром действия. Так происходит с препаратами, которые применяют для лечения сонной болезни. Наши кинокартины продемонстрировали, что лекарства взаимодействуют одинаковым образом как с белками паразита, вызывающего заболевание, так и с клеточными белками человека. Более точные изображения дают химикам возможность создать препарат, который будет влиять только на белок паразита.

Светочувствительные белки

Восхищает, как другие исследователи используют разработанные нами методы *SFX* для решения различных задач.

Например, Мариус Шмидт (Marius Schmidt) из Висконсинского университета в Милуоки с коллегами недавно использовали молекулярные фильмы, чтобы объяснить механизм зрения. Хотя бактерии обычно не относят к организмам, которые способны видеть, у них есть светочувствительные белки — предшественники белков зрительной системы человека. Делая мгновенные кадры, исследователи создали замедленное видео сверхскоростных событий и показали, как бактериальный белок реагирует на свет.

Исследователи использовали *SFX*, чтобы за время, составляющее меньше триллионной доли секунды, получить изображения кристаллизованного белка, когда тот реагирует на свет. Более того, ученые отобразили атомы белка в движении в то мгновение, когда под влиянием света происходит превращение молекулы желтого пигмента, скрытой в толще белка. Впервые была определена структура желтого пигмента сразу после поглощения им света (до начала реакции). Поглощение света — основной этап в процессе восприятия света во всех живых организмах, в том числе у бактерий и растений, и начальный этап зрительного восприятия у человека.

Наблюдение за тем, как бактериальный белок отвечает на воздействие света, помогает понять не только то, как появилось зрение. Нам предоставляется также беспрецедентная возможность увидеть, как происходят биологические реакции в сверхскоростном промежутке времени. «Это максимально приближает нас к пониманию химии всего живого», — считает Шмидт.

Мы убеждены, что будущее кристаллографии белков, так же как и наши знания о природе, заключается в методе *SFX*. И кто знает, возможно, в течение ближайших десяти лет структура половины всех известных белков предстанет не в статичных картинках на странице учебника, а в 3D-фильмах. ■

Перевод: С.М. Левензон