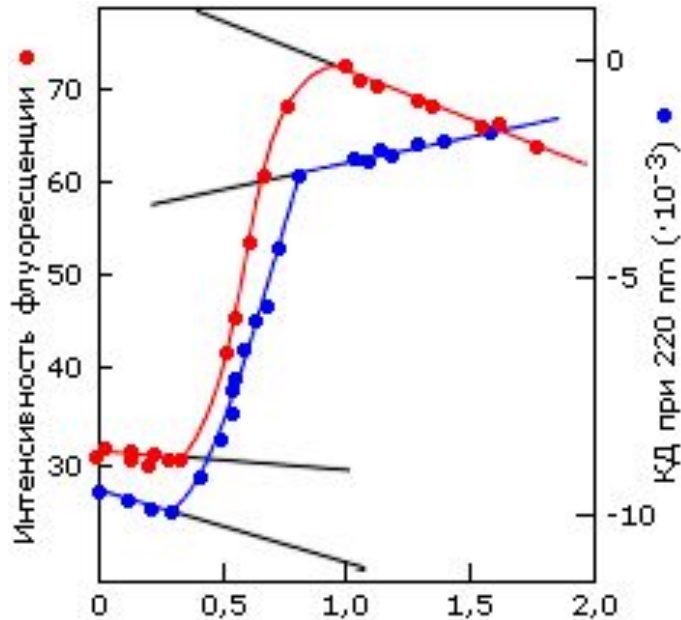
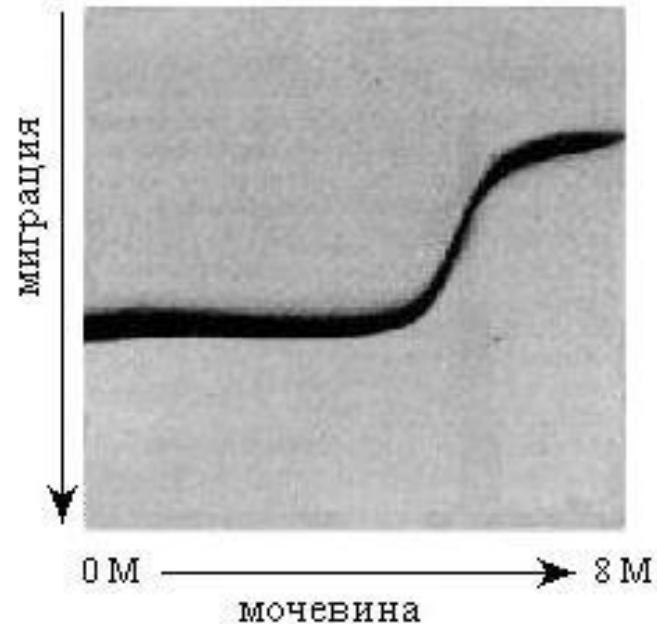


Калориметрические методы анализа биомолекул

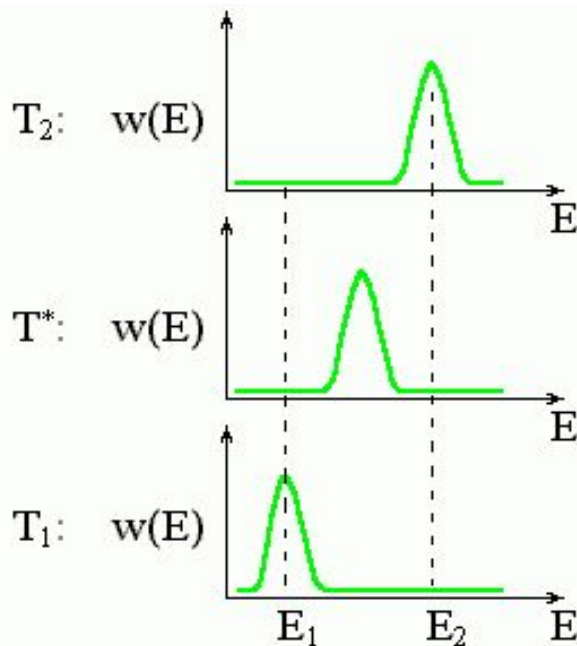
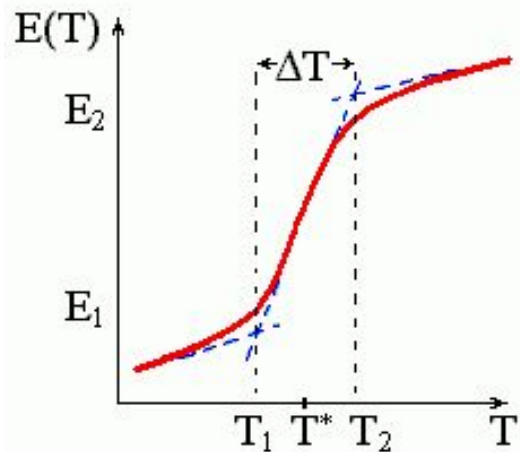
Плавление белка, как пример перехода по типу «Все или ничего»



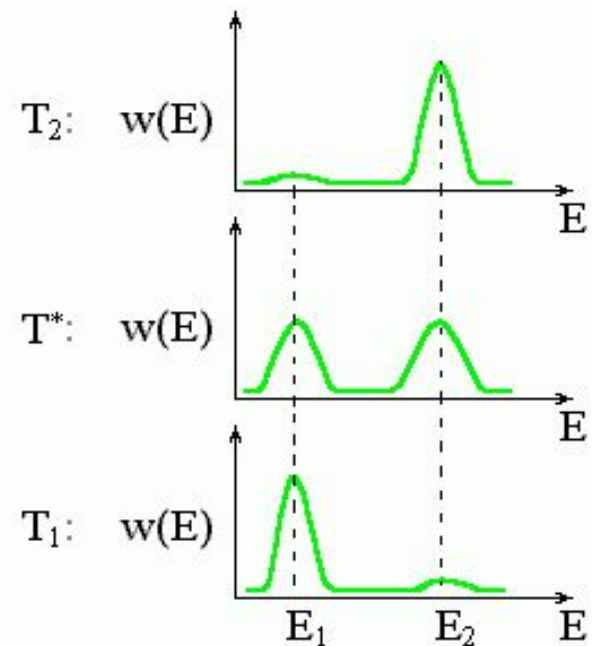
Синхронное изменение спектров триптофановой флуоресценции и кругового дишроизма при плавлении белка



Изменение подвижности белка в акриламидном геле в зависимости от концентрации мочевины



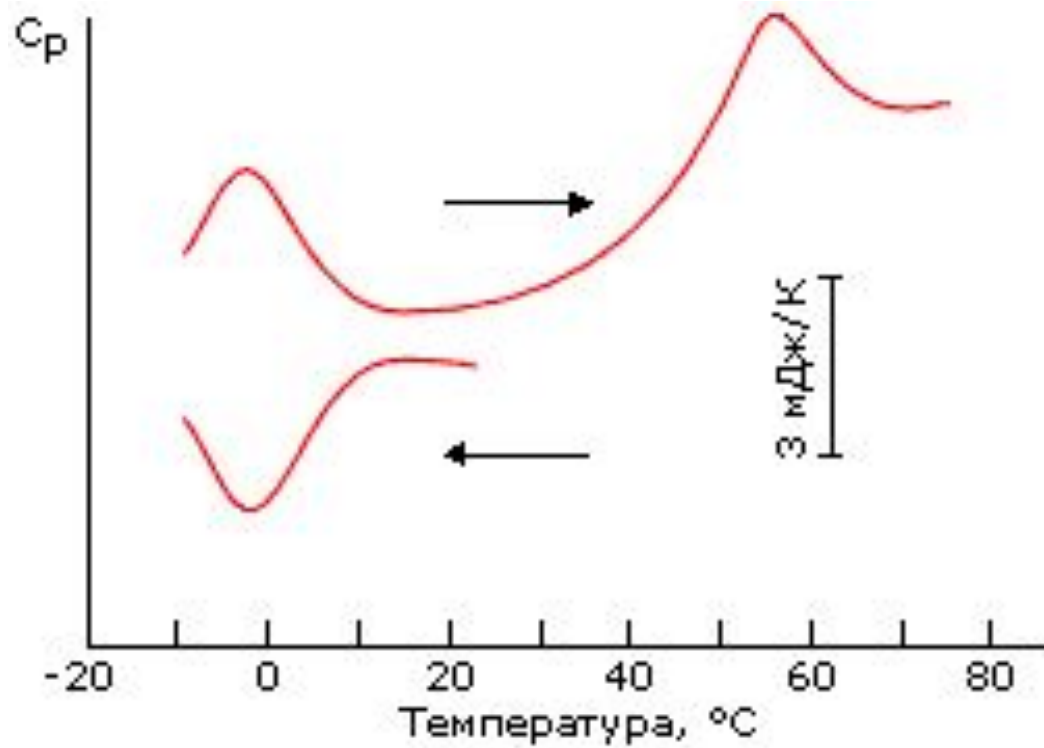
ПОСТЕПЕННЫЙ



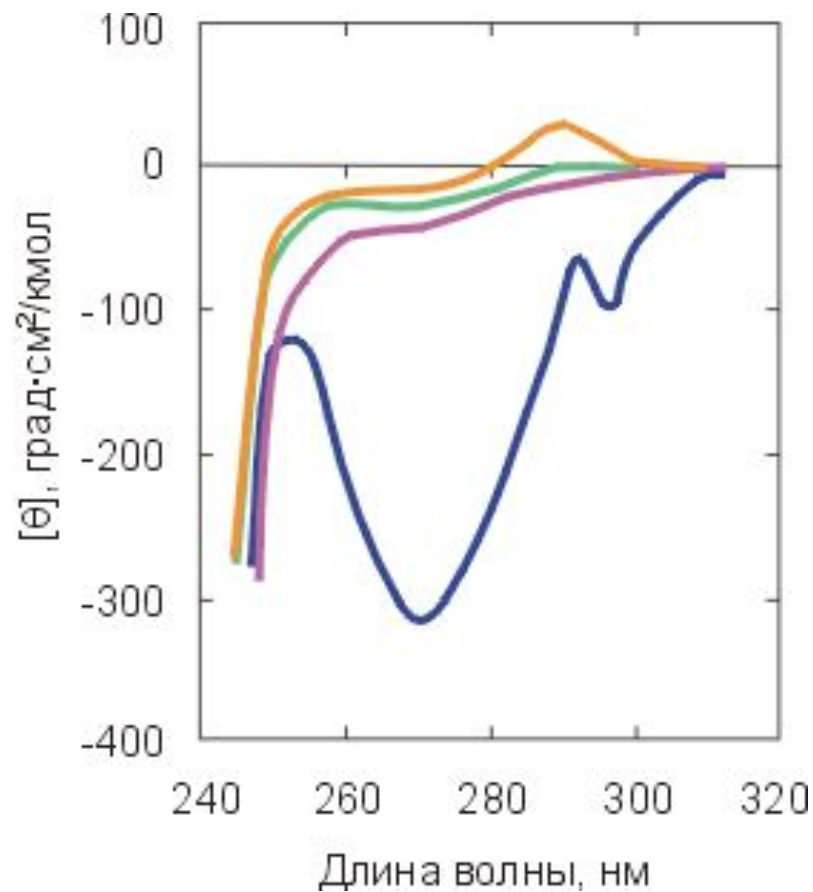
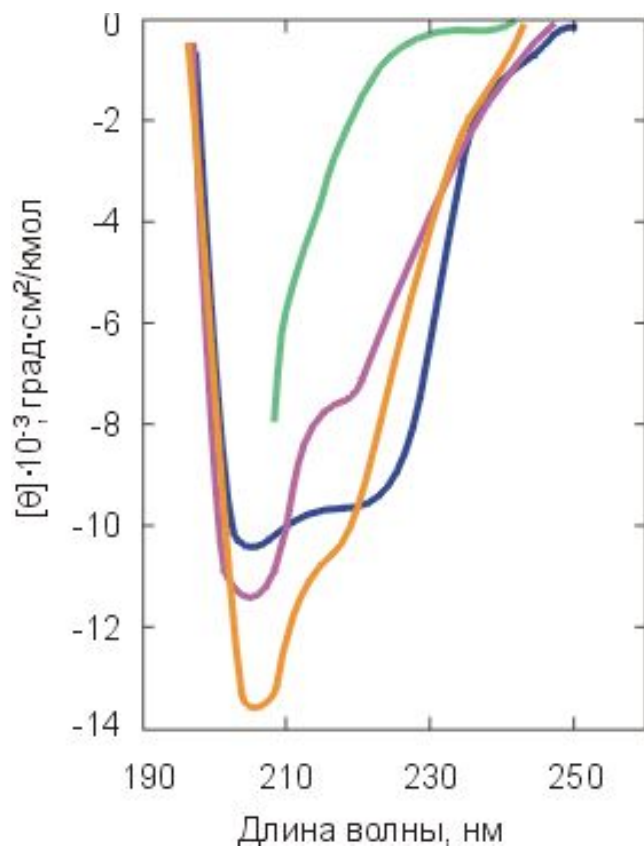
ВСЕ-ИЛИ-НИЧЕГО

Разница между «постепенным» переходом и переходом по принципу «все или ничего» отражается не в виде кривой $E(T)$, а в функции распределения $W(E)$ молекул по энергии

Холодовая денатурация

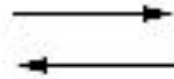
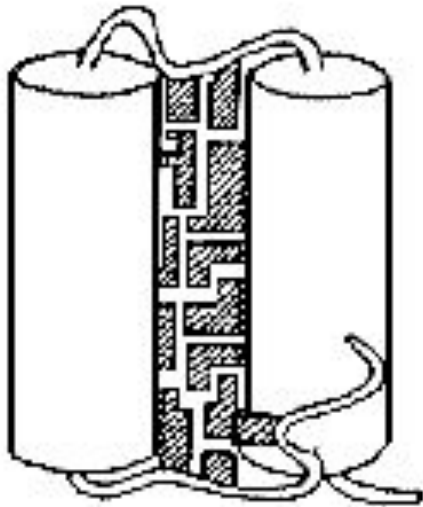


Структура белка после денатурации

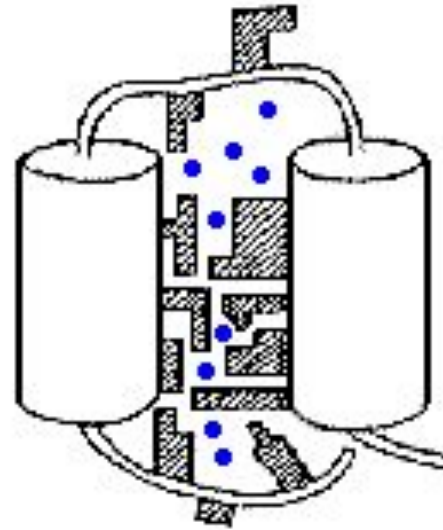


Расплавленная глобула и её свойства

Нативная глобула



Расплавленная глобула

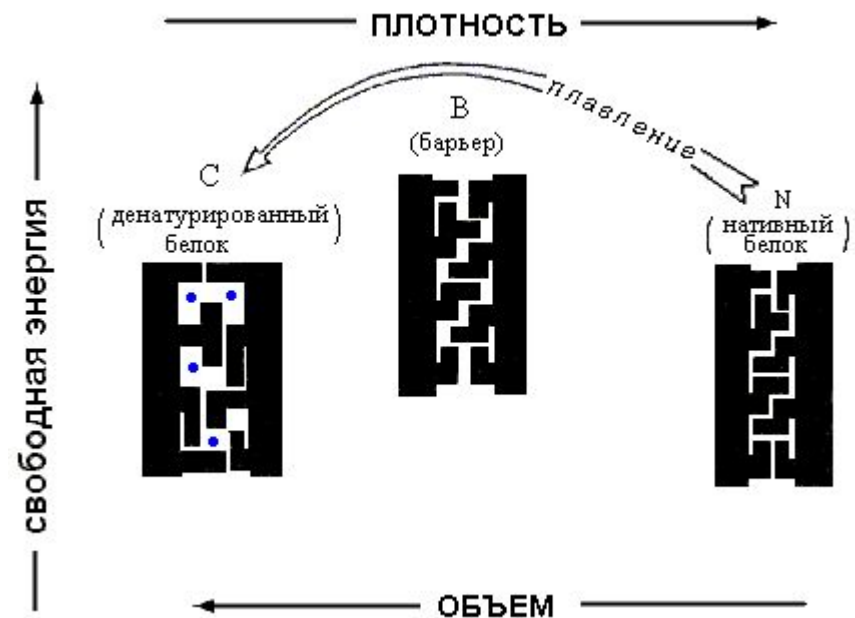
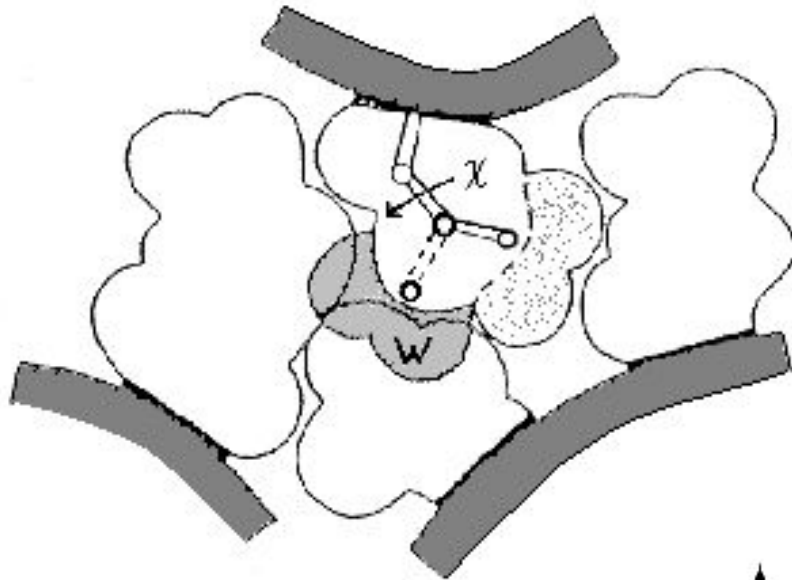


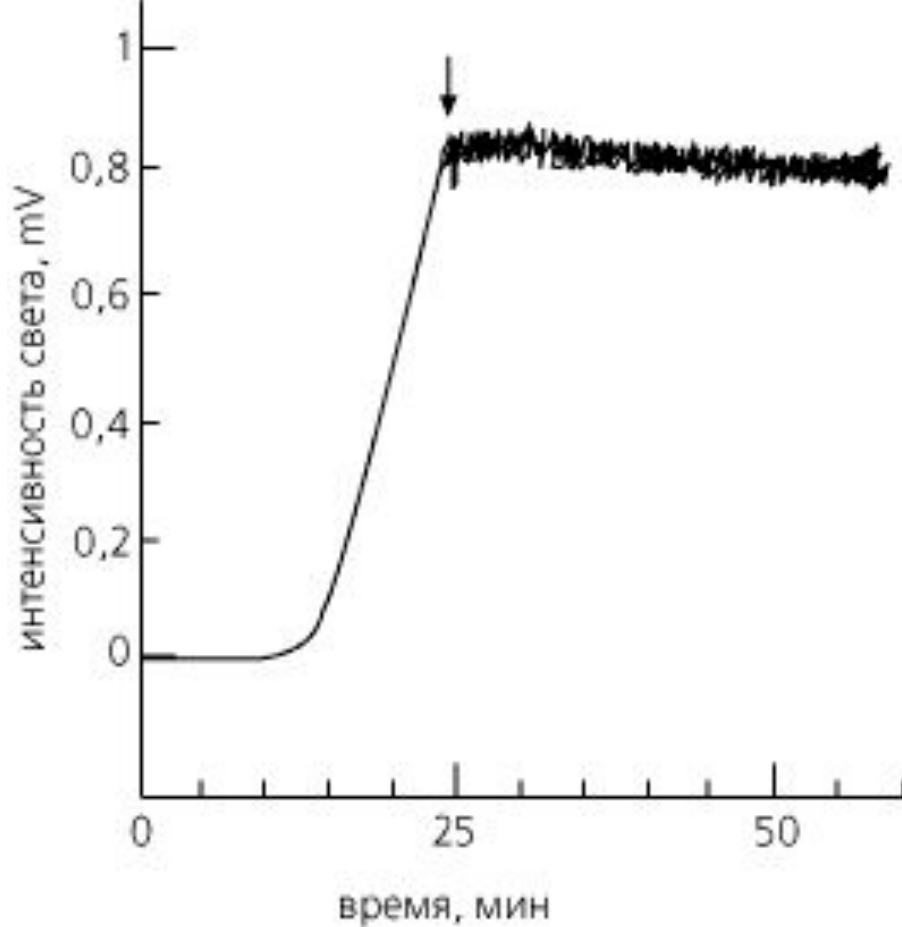
**Таблица 16/1. ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА РАСПЛАВЛЕННОЙ ГЛОБУЛЫ
и методы их регистрации**

«ГЛОБУЛА» (сходство с нативным белком)		«РАСПЛАВЛЕННАЯ» (<u>несходство</u> с нативным белком)	
Гидродинамический объем Мало- и среднеугловое рас- сеяние рентгеновских лучей	} => КОМПАКТ- НОСТЬ	КД в ближнем УФ ¹ H ЯМР спектры	} => НЕТ УНИКАЛЬ- НОЙ УПАКОВКИ БОКОВЫХ ГРУПП
Большеугловое рассеяние рентгеновских лучей	=> НАЛИЧИЕ ЯДРА	Водородный обмен, ЯМР Протеолиз	} => ФЛУКТУАЦИИ МОЛЕКУЛЫ
ЯМР (спиновое эхо)	=> ЗАЖАТОСТЬ ЧАСТИ АРОМАТИЧЕСКИХ БОКОВЫХ ГРУПП	ЯМР (спиновое эхо)	=> ПОДВИЖНОСТЬ АЛИФАТИЧЕСКИХ БОКОВЫХ ГРУПП
КД в дальнем УФ ИК спектры ЯМР с H<=>D обменом	} => ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА	Сканирующая и изотермическая микрокалориметрия	=> НЕТ (как правило) ДАЛЬНЕЙШЕГО ПЛАВЛЕНИЯ
Флуоресценция	=> ЧАСТЬ ОСТАТКОВ Trp СКРЫТА ОТ ВОДЫ	Флуоресценция	=> ЧАСТЬ ОСТАТКОВ Trp ВЫХОДИТ В ВОДУ
Двумерный ЯМР	=> СОХРАНЕНИЕ ЧАСТИ ДАЛЬНИХ ПО ЦЕПИ КОНТАКТОВ	Двумерный ЯМР	=> РАСПАД БОЛЬШИНСТВА ДАЛЬНИХ ПО ЦЕПИ КОНТАКТОВ
Хроматография (HPLC)	=> ВОЗМОЖНОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ «ПРАВИЛЬНЫХ» SS-СВЯЗЕЙ		

ОТЛИЧИЕ и от нативного, и от развернутого белка:
Усиленное связывание неполярных молекул (флуоресценция АНС)

Почему белок плавится как единое целое?

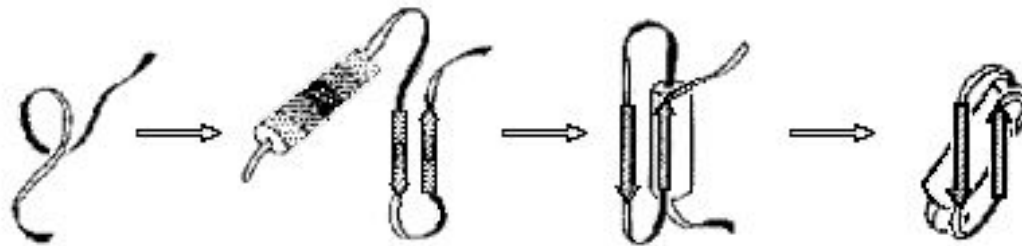




Скорость сворачивания белка при его синтезе достаточно велика. Подобная самоорганизация белковых структур относится, с физической точки зрения, к классу явлений "возникновение порядка из порядка" (по классификации Пригожина): трехмерный "апериодический кристалл" (говоря словами Шредингера) структуры белка порождается заранее фиксированным порядком звеньев в его цепи.

Парадокс Левинтала

«С одной стороны, нативная пространственная структура по всем тестам ведет себя как самая стабильная из всех структур цепи: белковая цепь попадает в нее при разных кинетических процессах [и при сворачивании на рибосоме в процессе биосинтеза, и после секреции сквозь мембрану, и при сворачивании в пробирке (ренатурации), — чем бы и как бы она ни была в этой пробирке развернута]. С другой стороны, нет никаких гарантий, что эта структура — самая стабильная из всех возможных: у белковой цепи просто нет времени на то, чтобы убедиться в этом!»



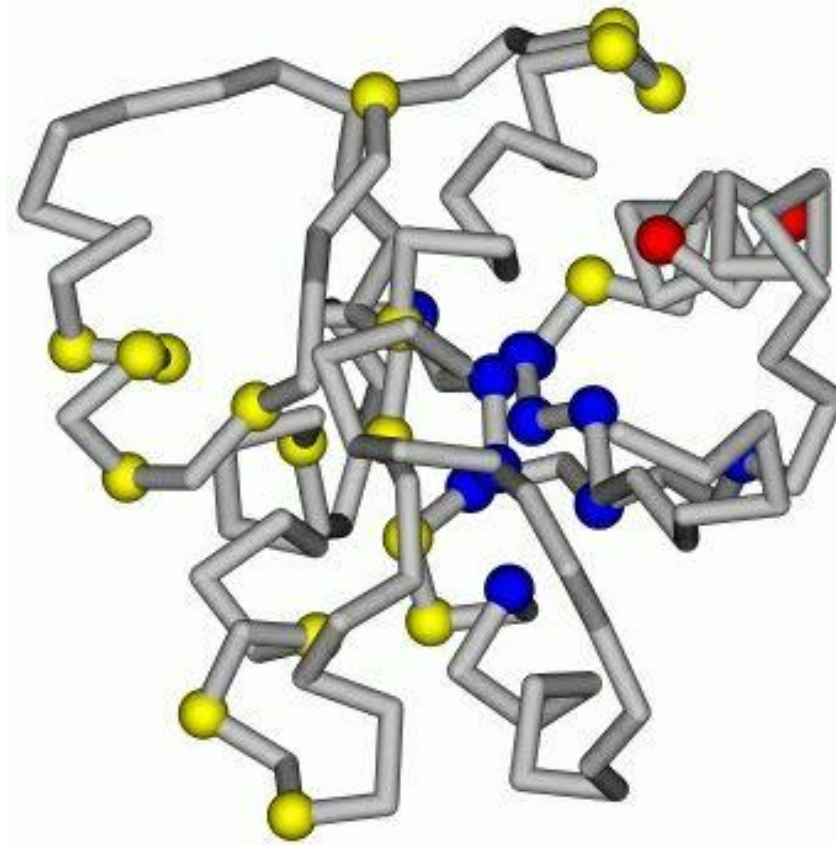
Развернутая
цепь

Вторичная
структура,
флуктуирующая
возле своего
нативного
положения

Нативоподобная
вторичная
структура
и мотив укладки
белковой цепи
положения

Нативная
пространственная
структура

Структура переходного состояния белка CheY



Клеточная машинерия, способствующая правильному сворачиванию белка

- Шапероны
- Пропилизомераза
- Дисульфидизомераза

Шапероны

Бывают двух типов:

Фолдазы (GroEL/GroES, DnaK/DnaG)

Холдазы (Hsp 33)

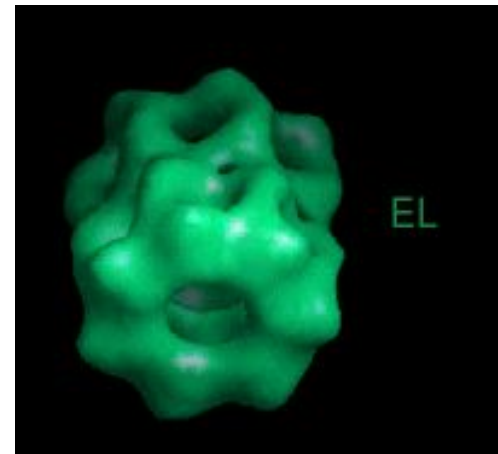
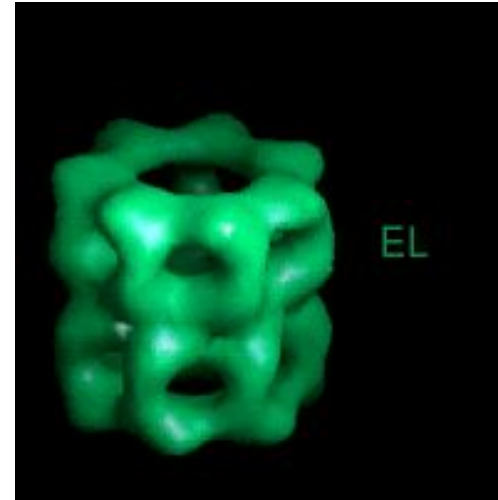
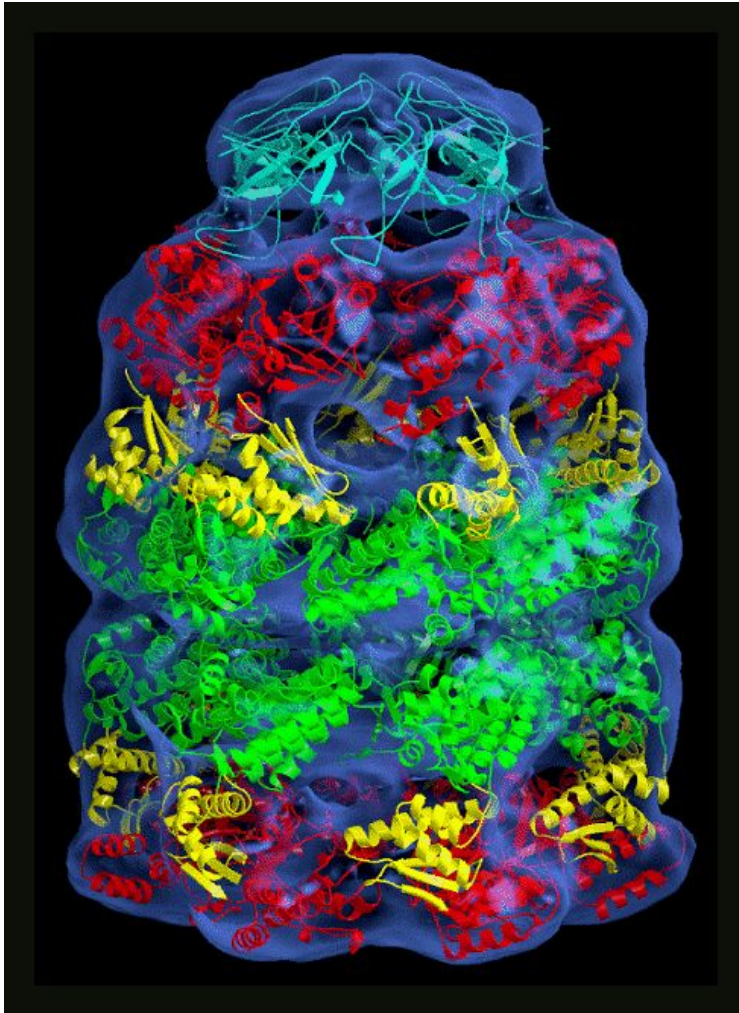
Примеры эукариотических шаперонов:

GRP78/BiP, GRP94, GRP170, кальнексин, кальретикулин, Hsp47

Примеры прокариотических шаперонов:

Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100

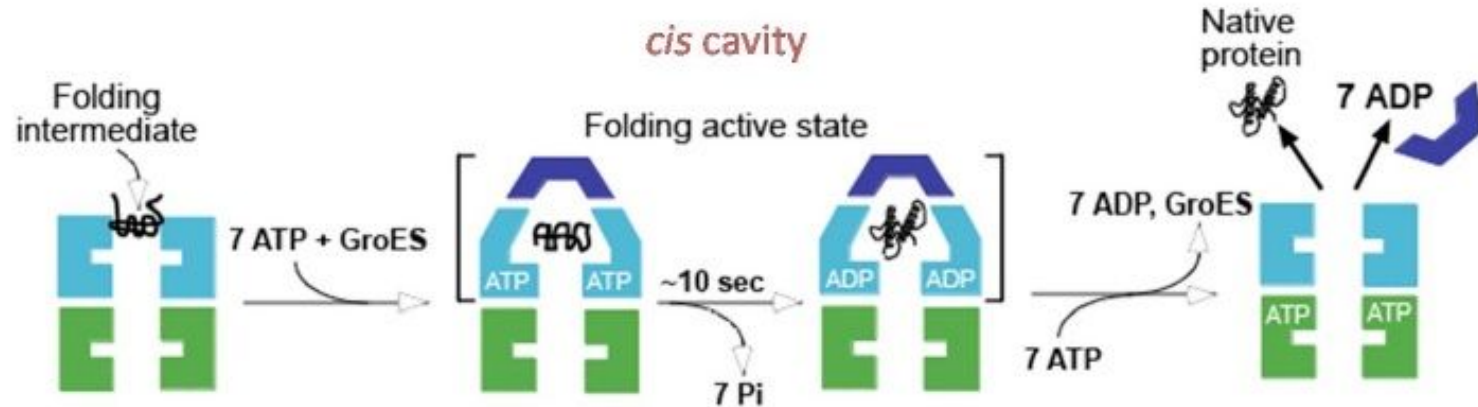
Механизм работы шаперона из класса фолдаз (на примере GroEL/GroES)



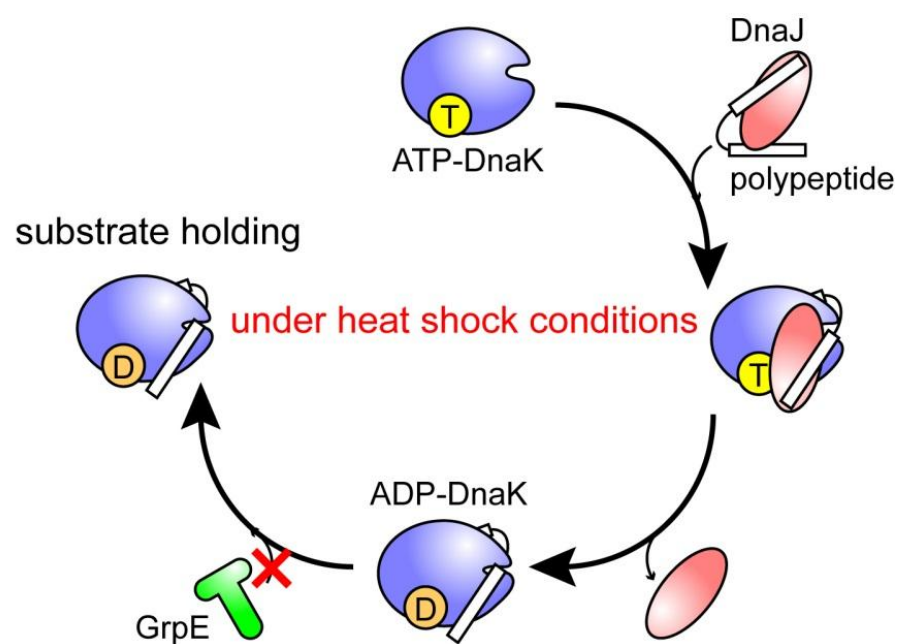
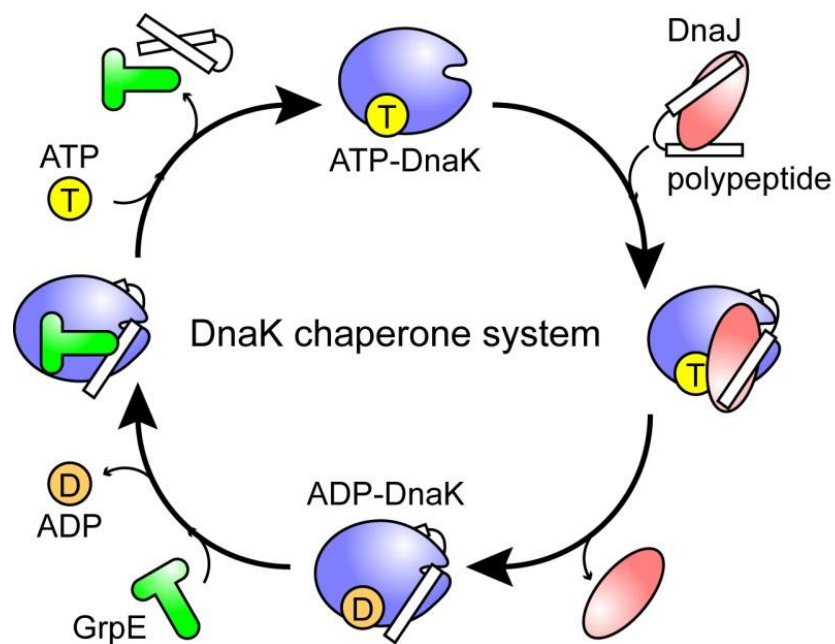


CHAPERONE ACTIVITY

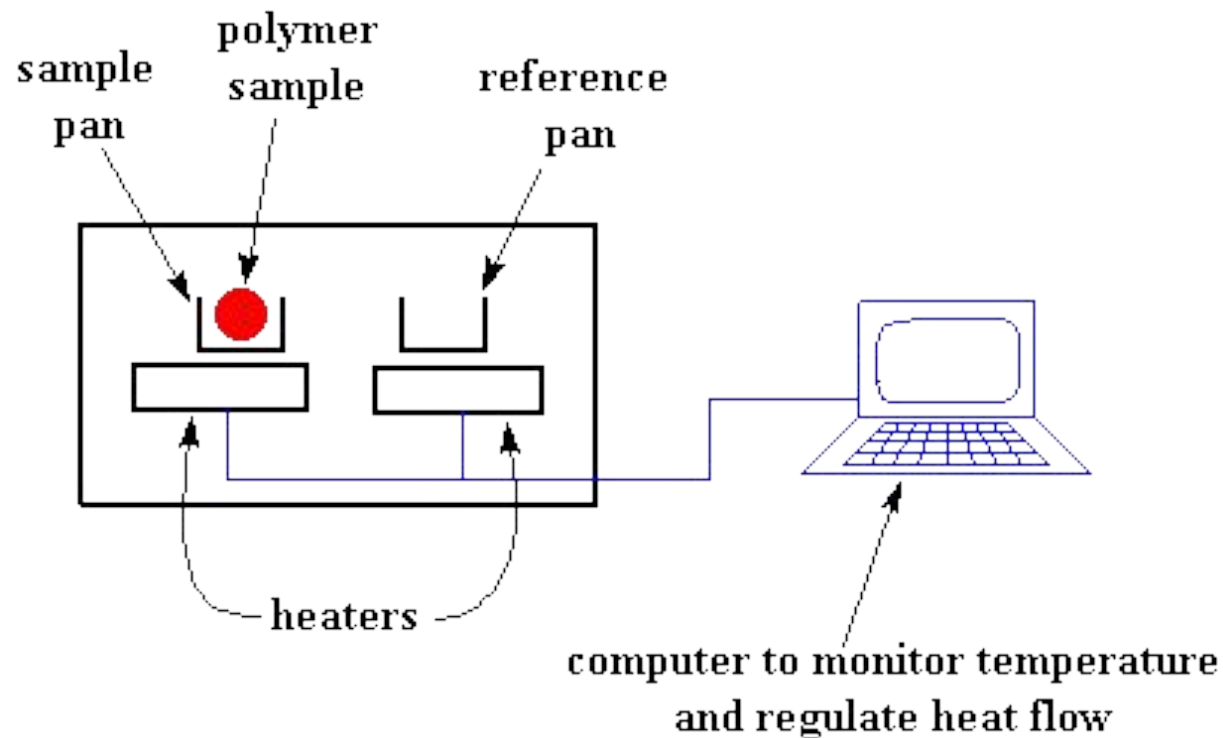
GroEL/ES (Hsp60/10)



Механизм работы шаперона из класса холдаз (на примере DnaK)



Дифференциальная сканирующая калориметрия (устройство прибора)



Дифференциальная сканирующая калориметрия (принцип метода)

$$\frac{\text{heat}}{\text{time}} = \frac{q}{t} = \text{heat flow}$$

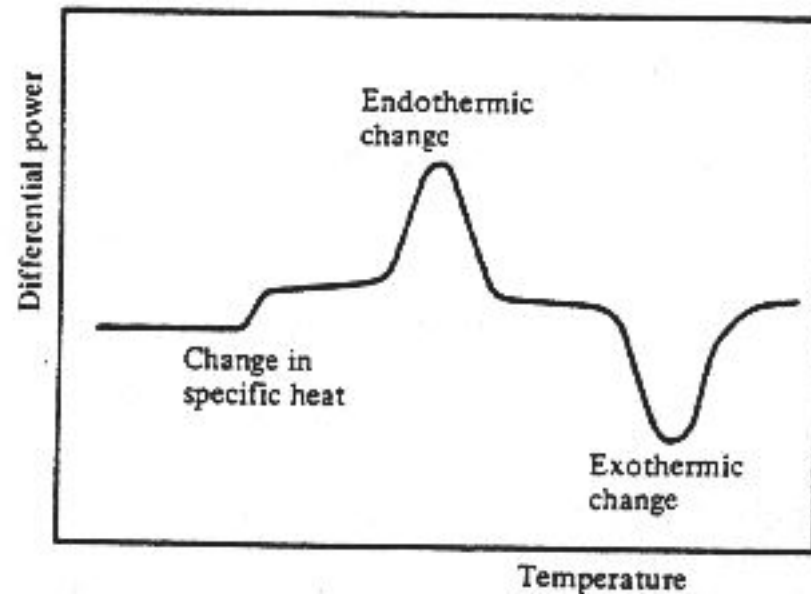
$$\frac{\text{temperature increase}}{\text{time}} = \frac{\Delta T}{t} = \text{heating rate}$$

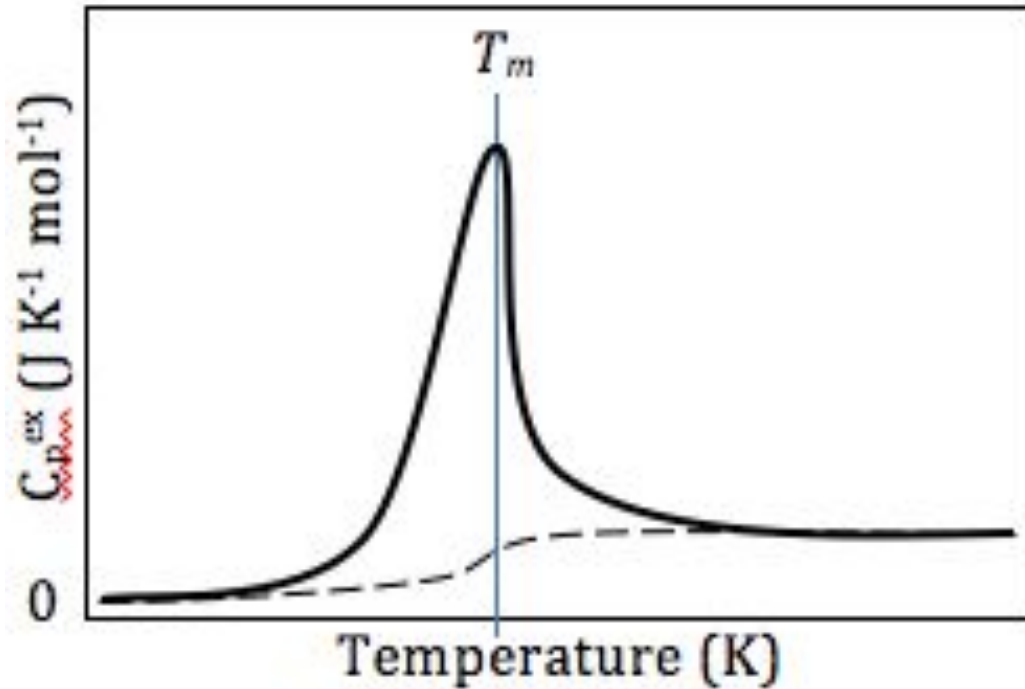
$$\frac{\frac{q}{t}}{\frac{\Delta T}{t}} = \frac{q}{\Delta T} = C_p = \text{heat capacity}$$

$$\Delta H = \int \Delta C_p(T) dT$$

$$\Delta S = \int \Delta C_p(T) / T dT$$

$$\Delta C_p = M_w \times 0.06 / C_m \times V_c \times v$$





Кривые ДСК биомолекул зависят от:

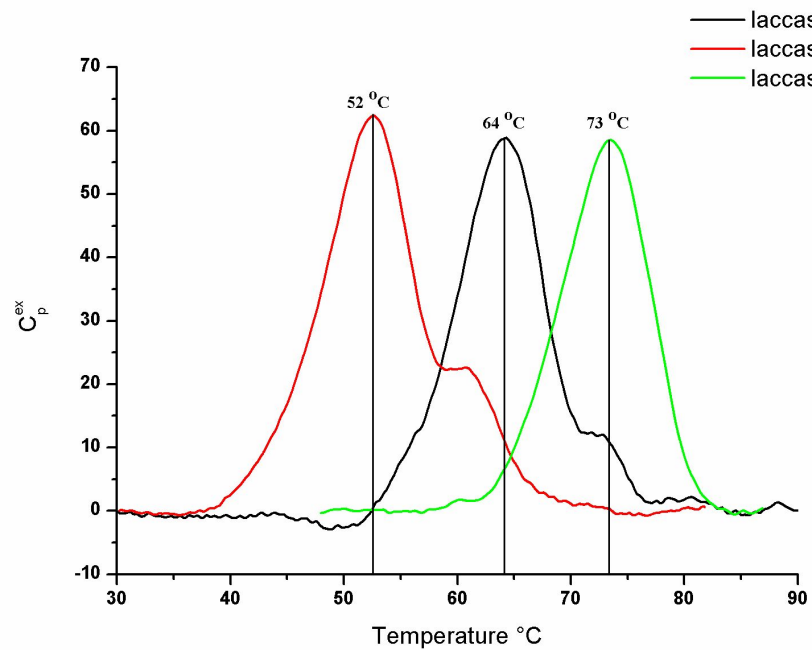
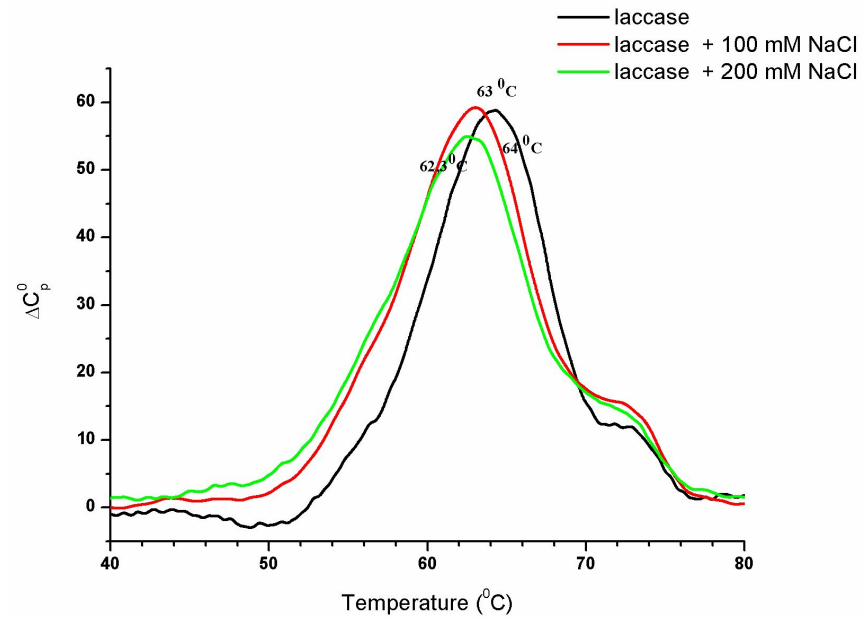
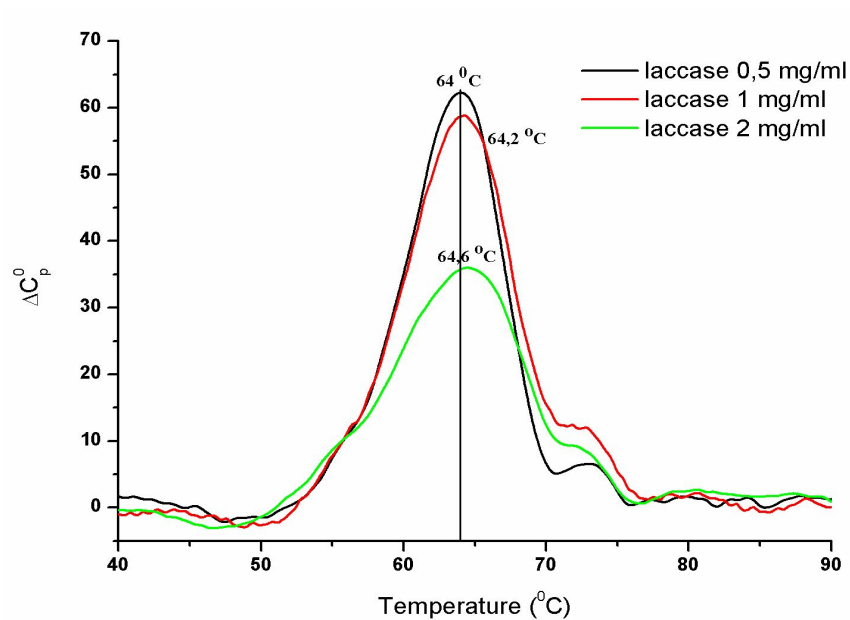
рН

Скорости нагрева

Природы растворителя

Ионной силы раствора

Концентрации вещества



Критерий Вант-Гоффа

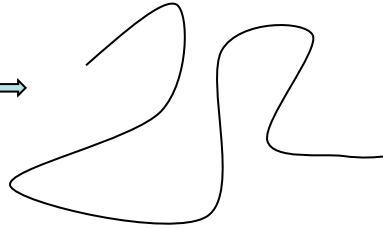
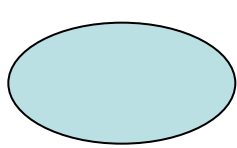
«Эффективная теплота» перехода, вычисляемая из его ширины совпадает с "калориметрической теплотой" этого перехода, т.е. с количеством тепла, поглощаемым *одной молекулой* белка в процессе плавления, следовательно, молекула плавится как единое целое.

Эффективная теплота перехода, следующая из его ширины, есть количество тепла, поглощенного одной независимой "единицей плавления". Если эффективная теплота перехода меньше калориметрической — "единица плавления" меньше, чем сама молекула, т.е. молекула плавится по частям. Если эффективная теплота перехода больше калориметрической — "единица плавления" больше молекулы, т.е. плавится не одна молекула белка, а какой-то их агрегат.

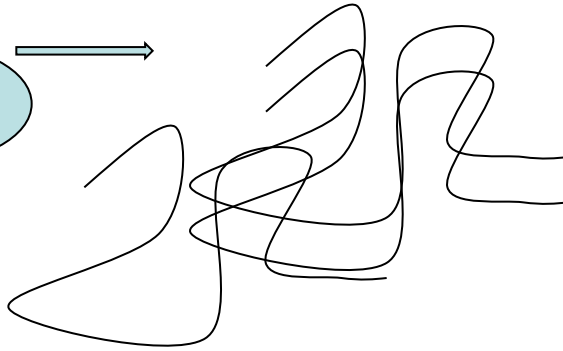
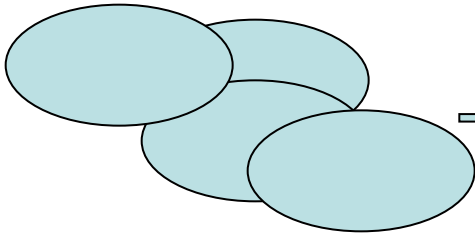
$$\Delta E = 4kT_0^2/\Delta T.$$

Калориметрическая теплота плавления целого белка рассчитывается как $\Delta H/N$, где ΔH количество тепла, поглощенного всеми имеющимися в калориметре N молекулами белка.

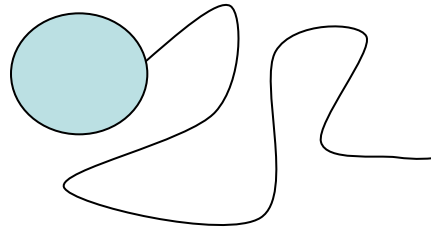
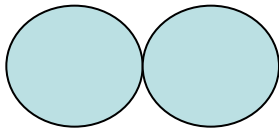
$$\Delta E = \Delta H/N$$



$$\Delta H_{v-g} = \Delta H_{cal}$$

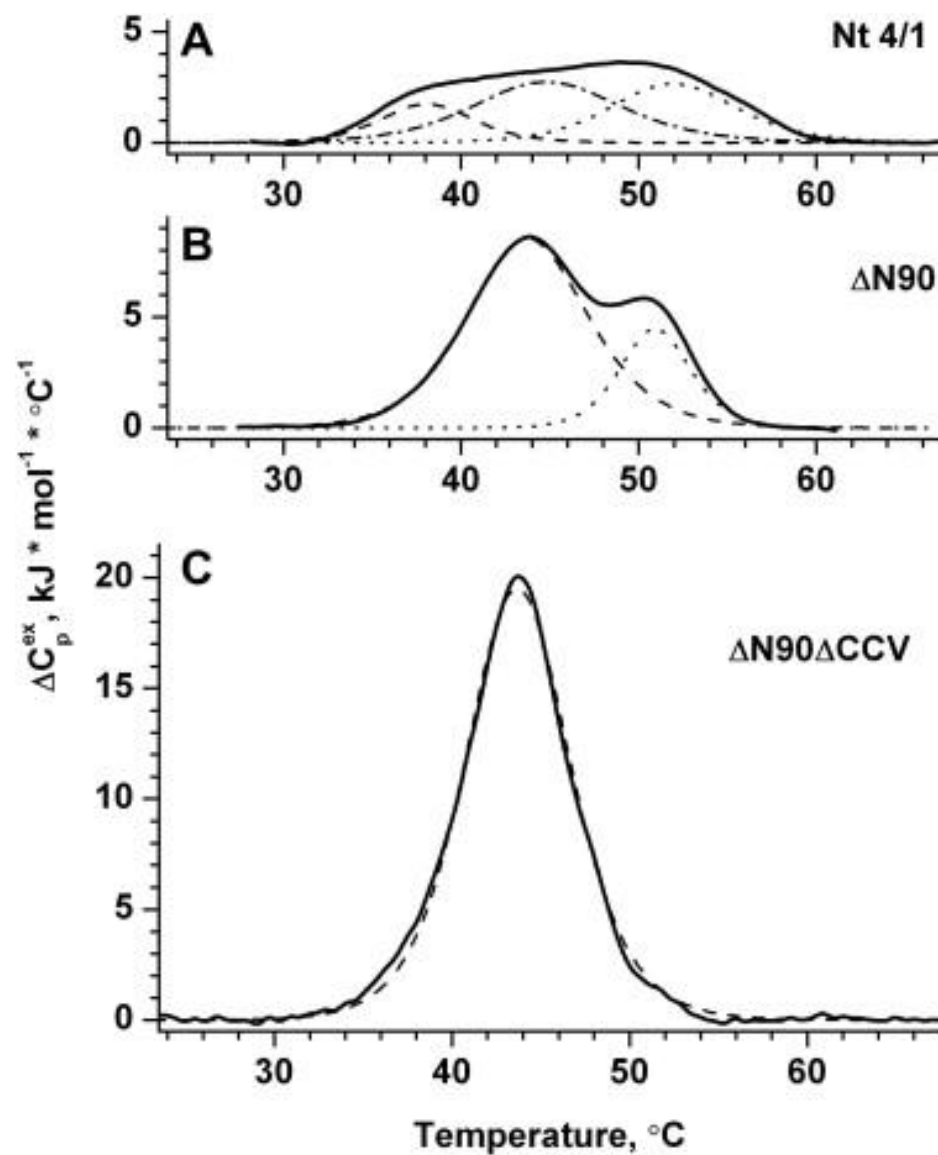


$$\Delta H_{v-g} = 4 \times \Delta H_{cal}$$

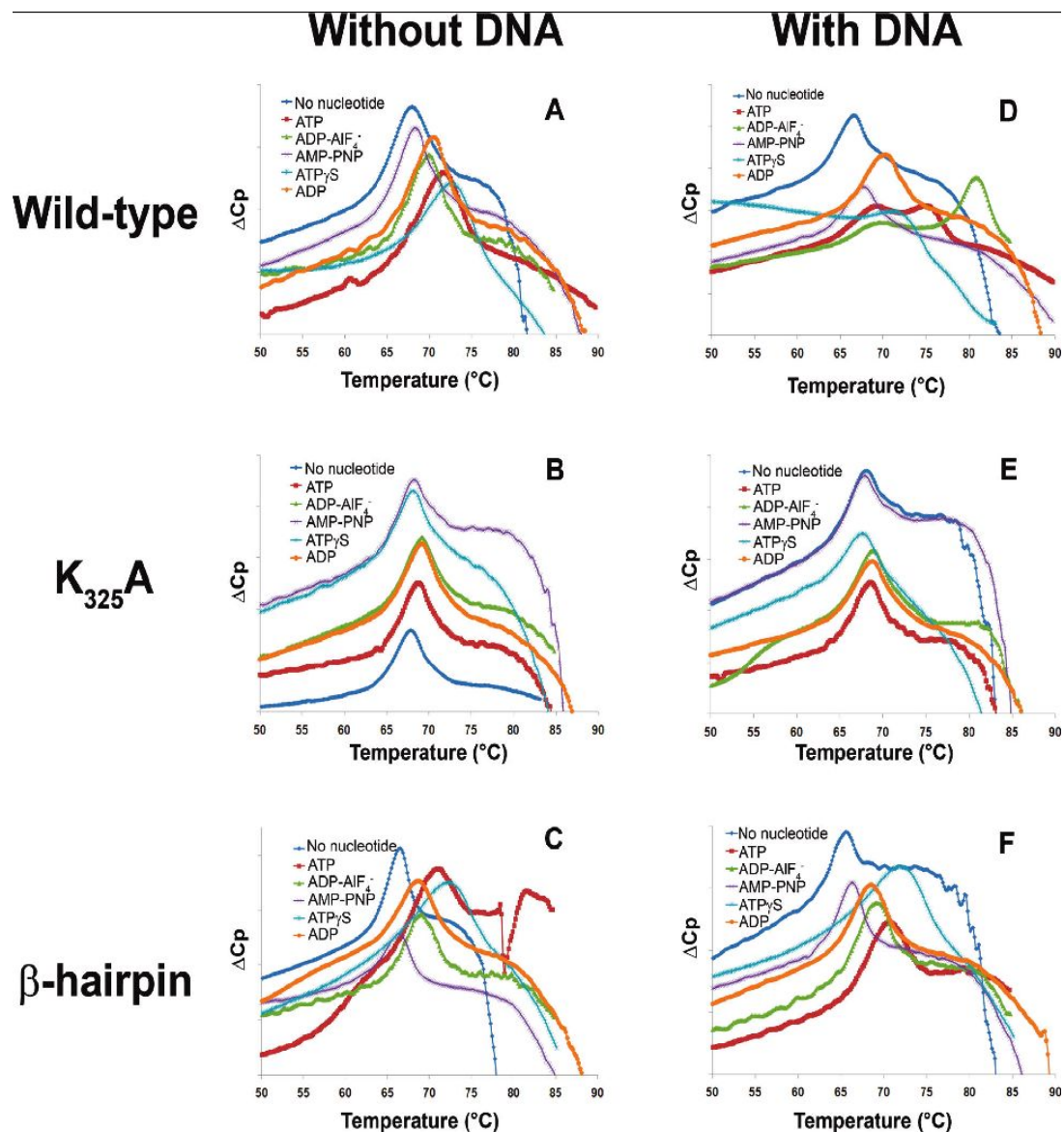


$$\Delta H_{v-g} = 0.5 \times \Delta H_{cal}$$

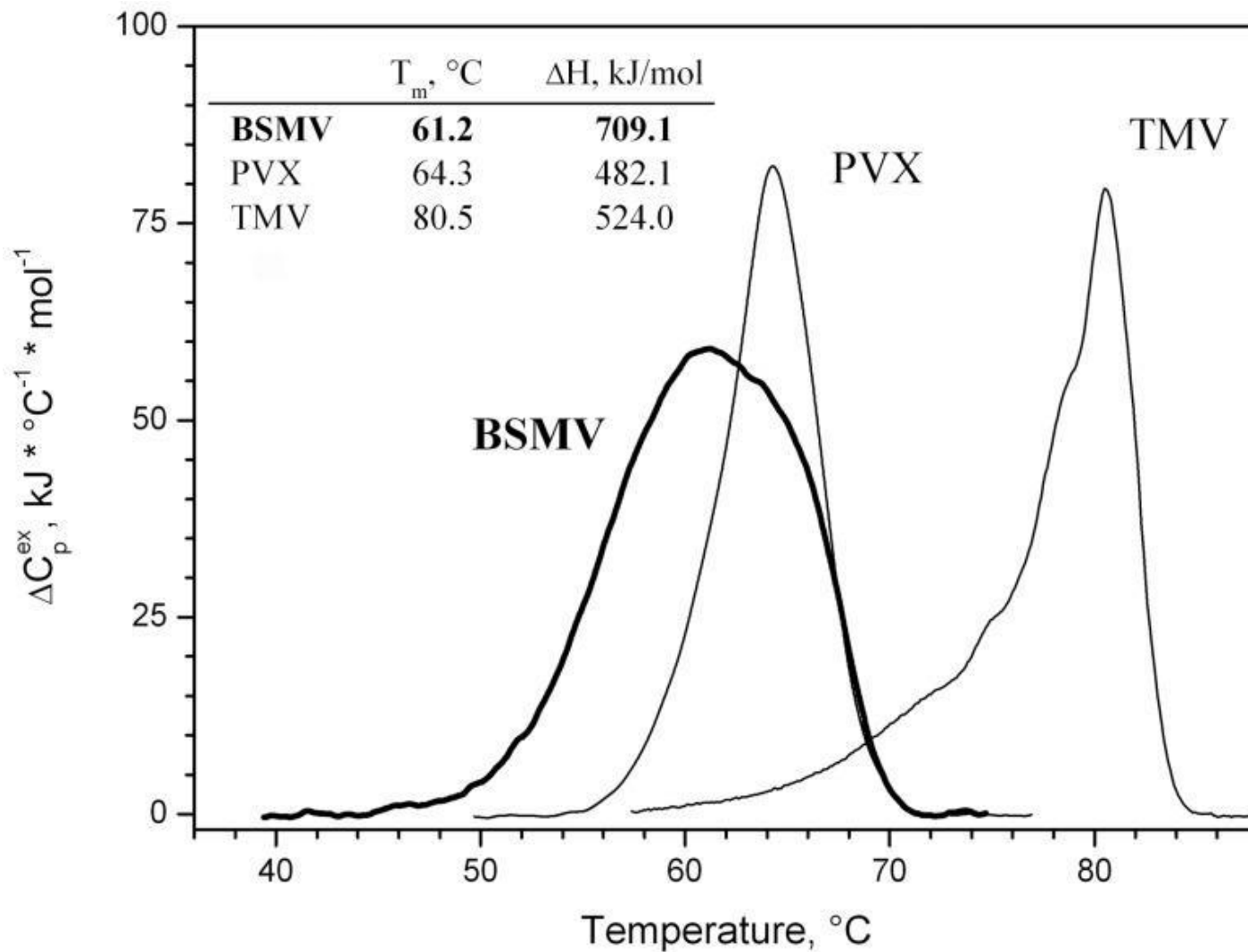
Калориметрия мультидоменных белков



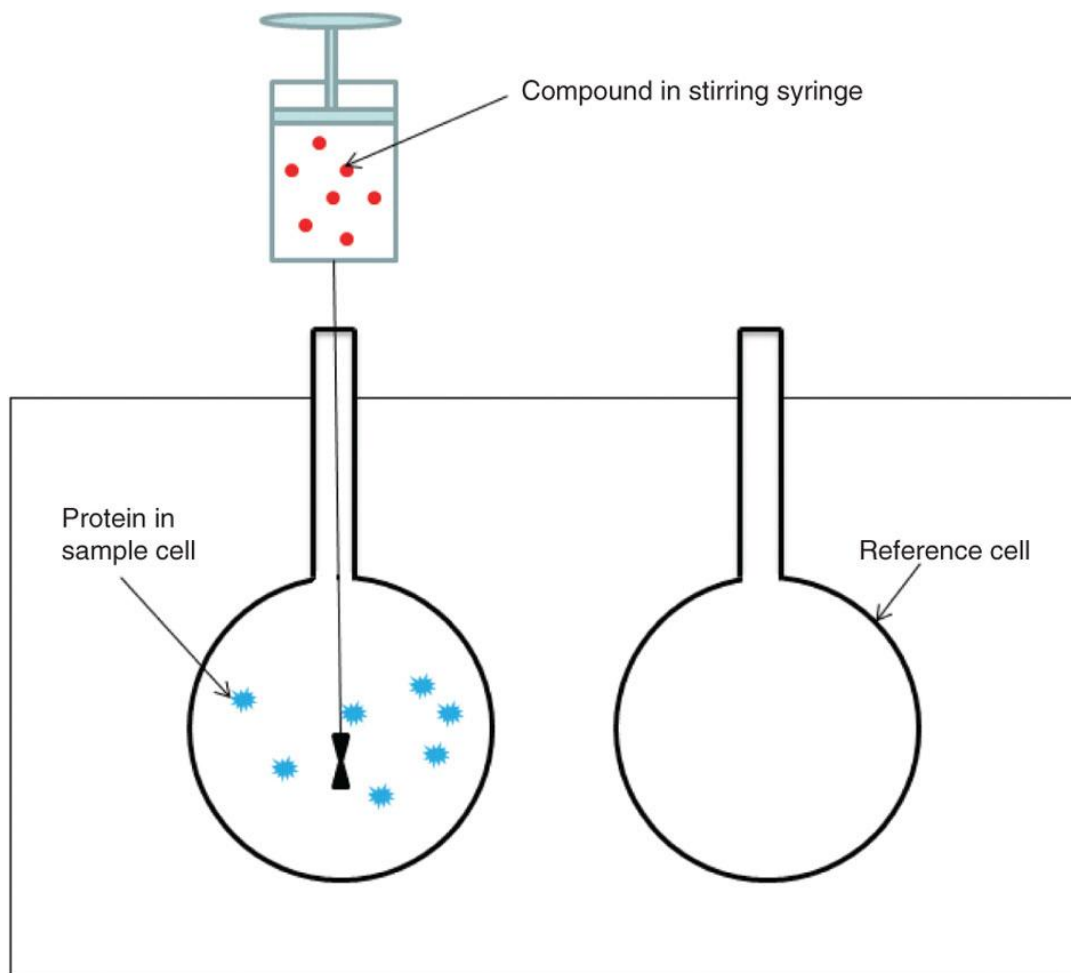
Определение стабильности белков с помощью ДСК



Что еще можно узнать из спектров ДСК белков?

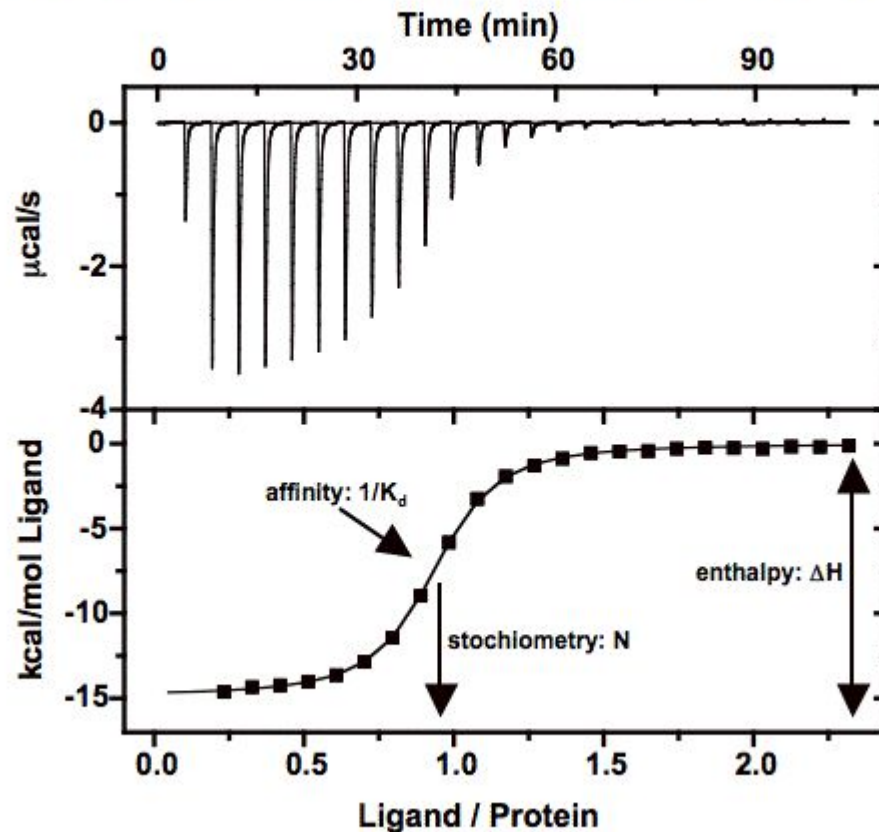


Изотермическая калориметрия титрования (устройство прибора)



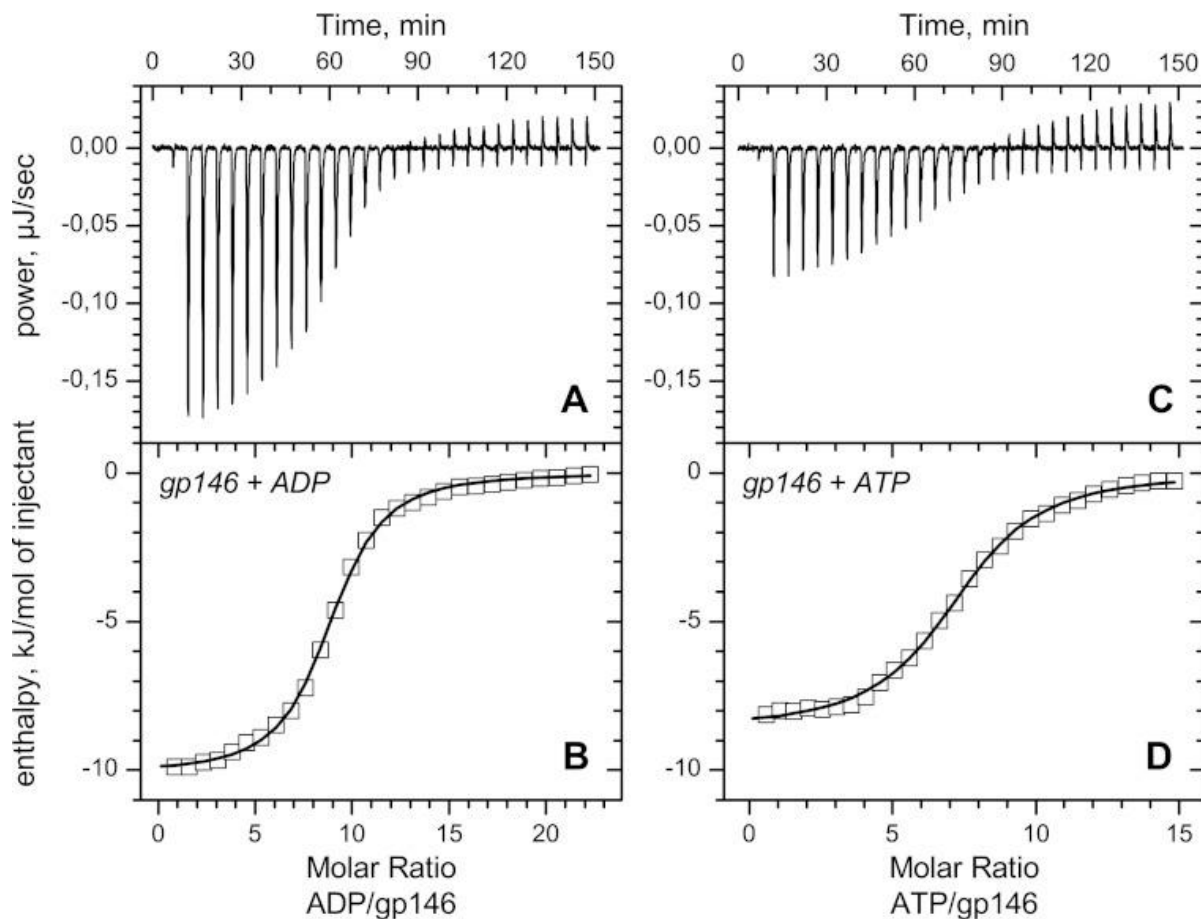
Изотермическая калориметрия титрования (принцип метода)

$$\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T\Delta S$$



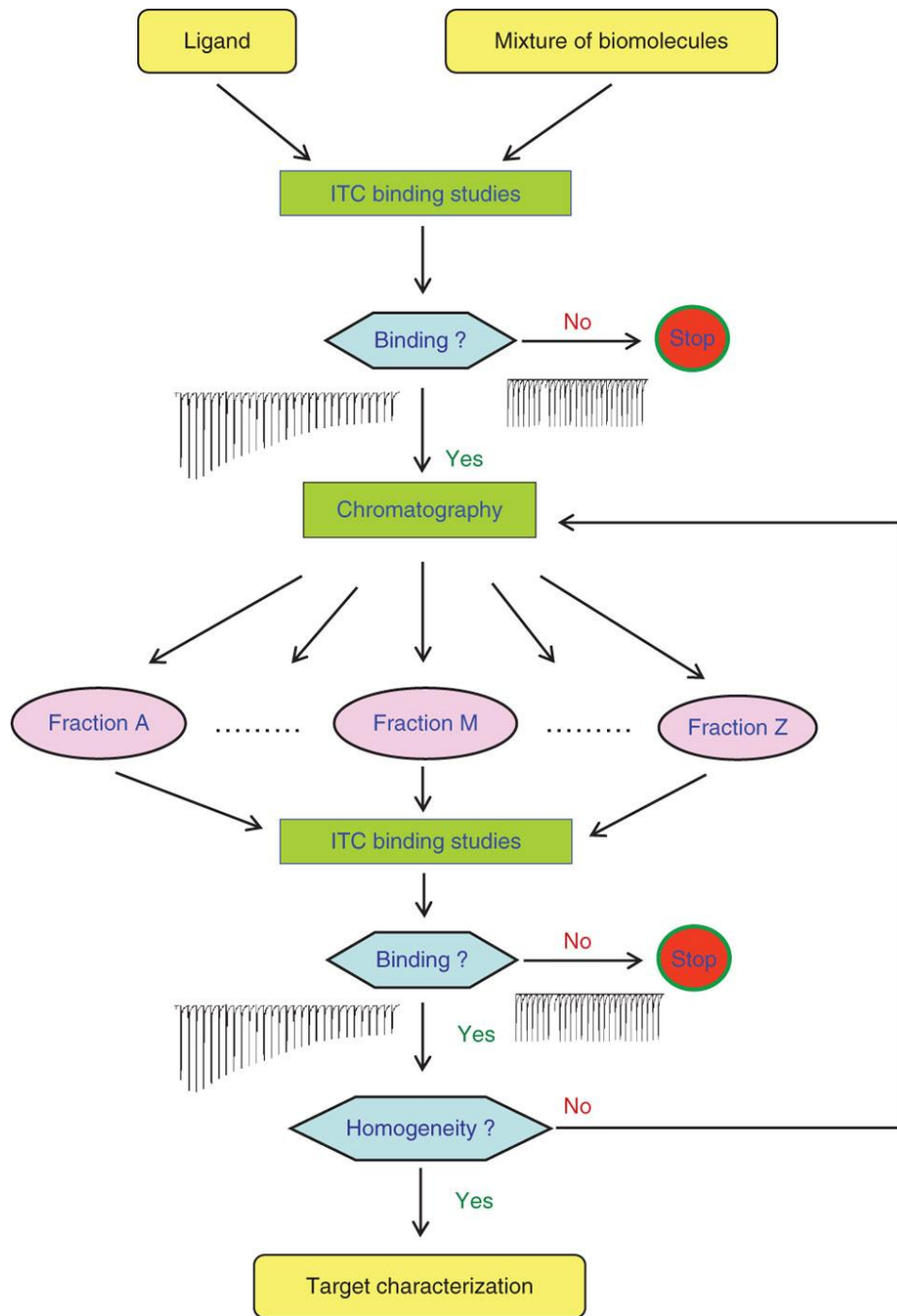
Изотермическая калориметрия титрования. Приложения метода

Идентификация целевого белка из смеси биомолекул



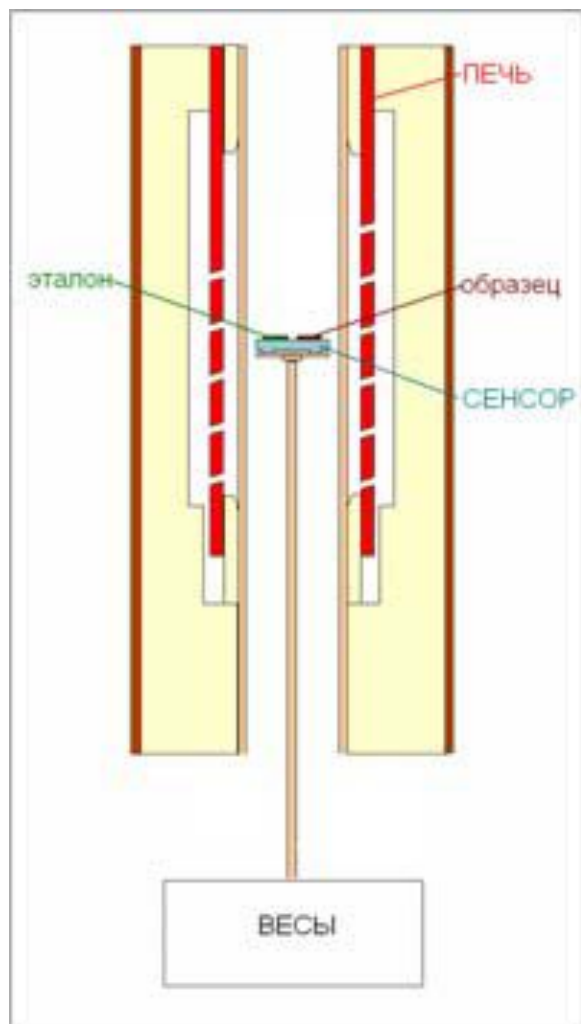
**Из кривой
связывания мы
можем посчитать:**

- константу связывания
- энтальпию
- энтропию
- стехиометрию реакции
- другие термодинамические характеристики

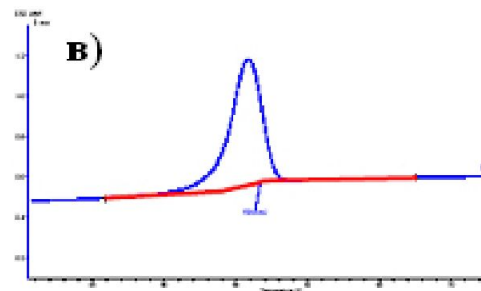
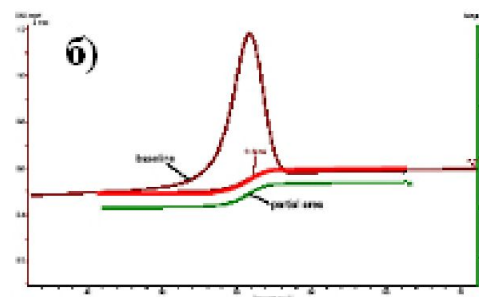
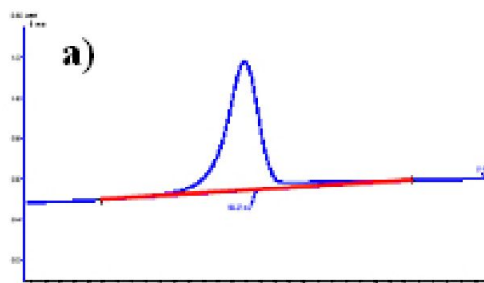


Изотермическая
калориметрия
титрования.
Приложения метода
Идентификация
таргетного белка из
смеси биомолекул

Дифференциальный термический анализ



$$\frac{m(\Delta H)}{gk} = \int_{t_1}^{t_2} \Delta T dt ,$$



Применение ДТА

- измерение теплоты химических и фазовых превращений, а также теплоемкости веществ
- построение фазовых диаграмм
- определение содержания примесей в образце

ДТА активно применяют в археологии, криминалистике, пищевой промышленности, фармацевтике, геологии и экологии.