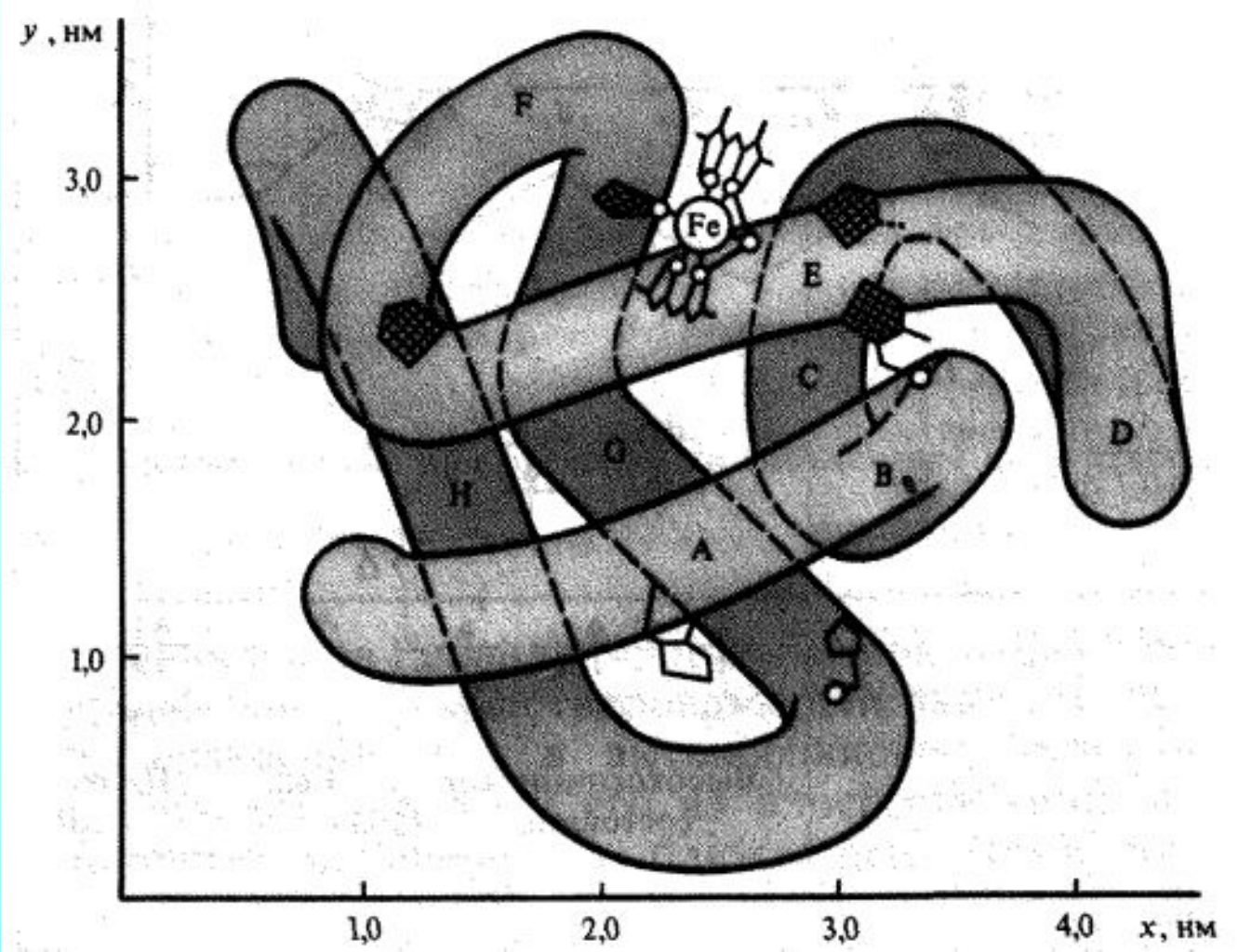
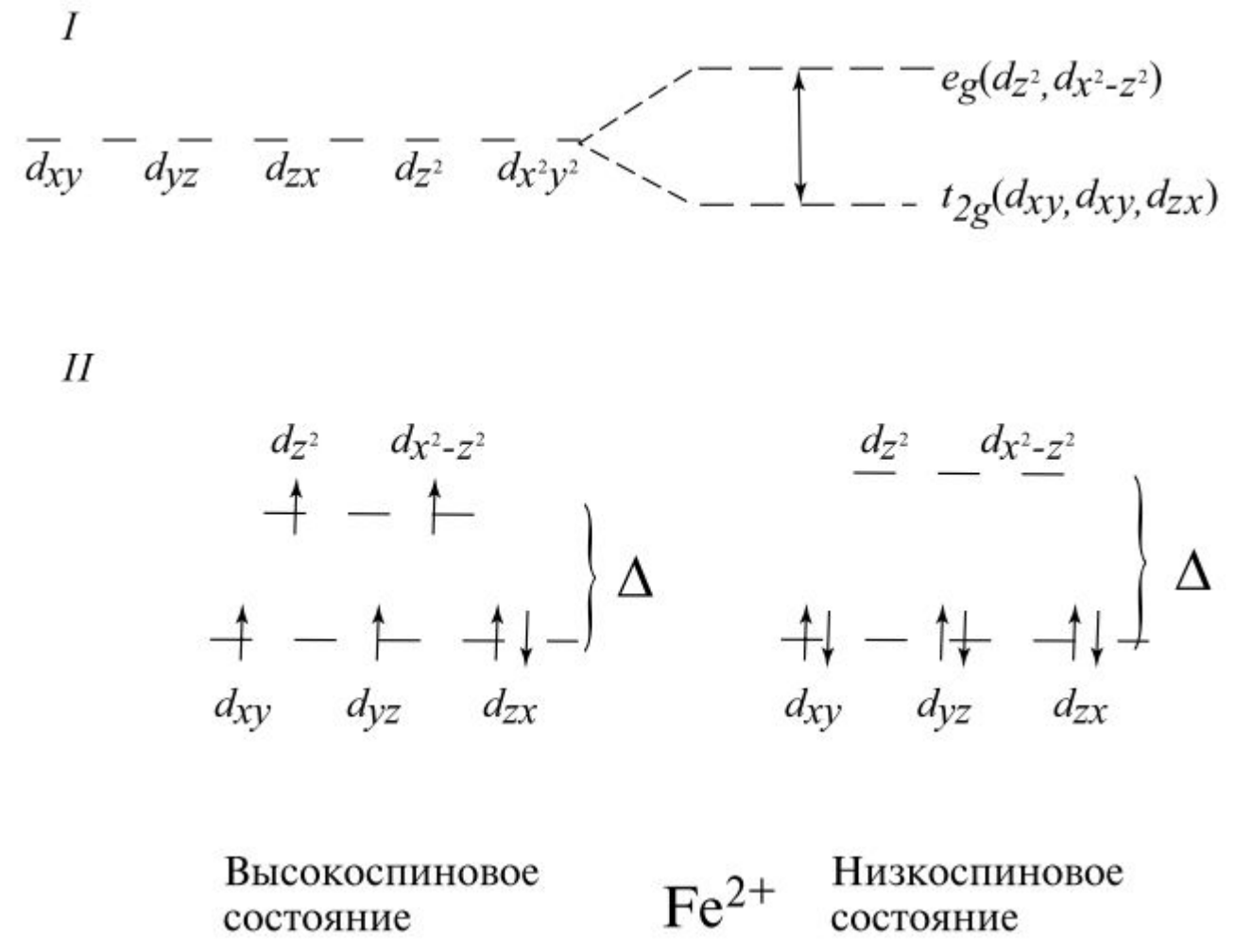
Молекулярная биофизика

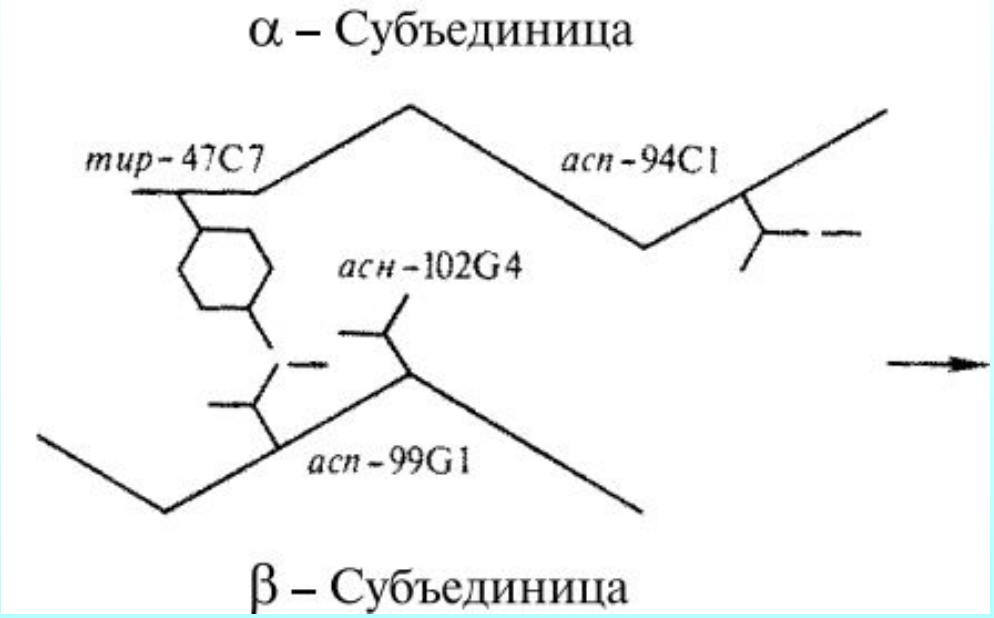
Динамика макромолекул



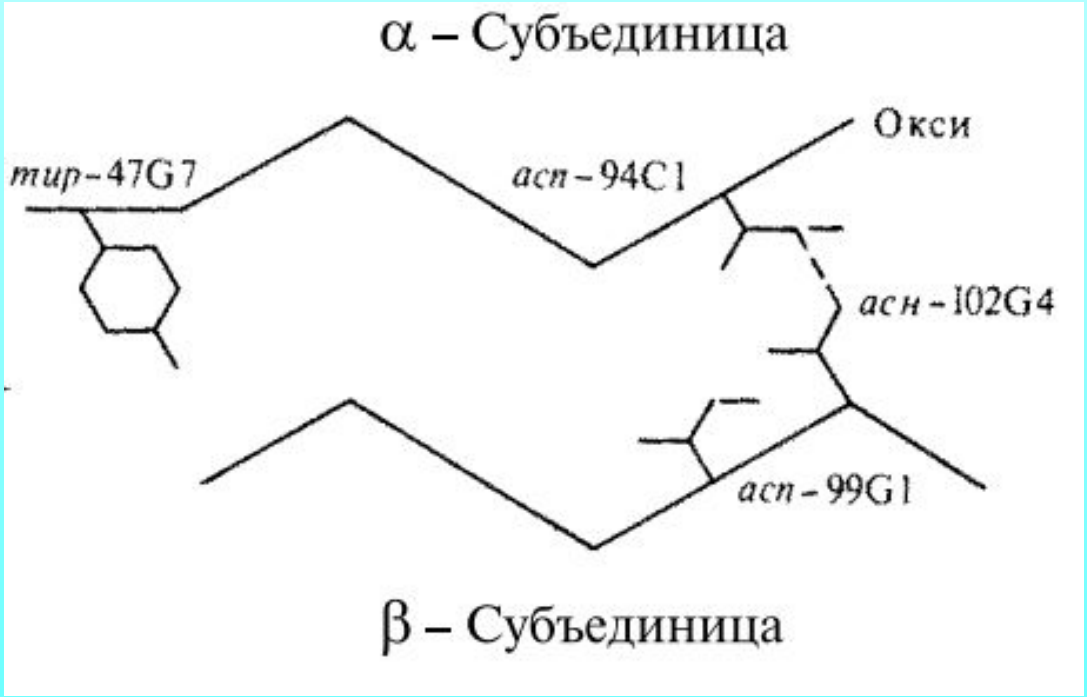
Пространственная структура миоглобина (кашалота) в проекции xy Миоглобин (переносчик кислорода в мышцах) содержит один гем и одну полипептидную цепь, включающую 153 остатка, которые распределены в основном по 8 а-спиральным участкам (А — Н). Гем, в центре которого расположен атом Fe, находится между спиралями Е и F.



Расщепление d-орбиталей в октаэдрическом комплексе (I): и распределение d-электронов по орбиталям высокоспинового (расщепление Δ мало) и низко спинового (расщепление Δ велико) состояний иона Fe^{2+} (II)



Структурные изменения, происходящие в гемоглобине при оксигенации (объяснение см. в тексте) (по Д. Мецлеру, 1980)



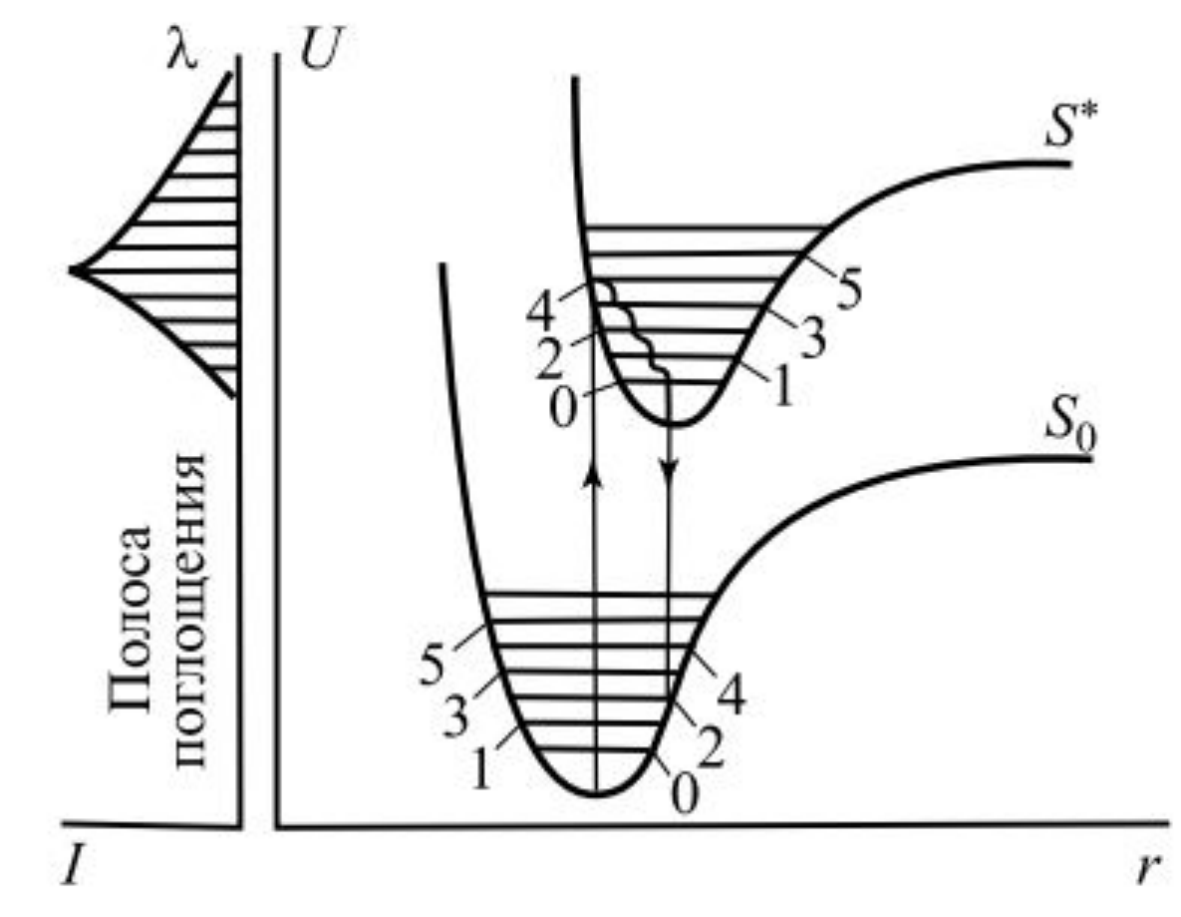
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Белки и нуклеиновые кислоты.

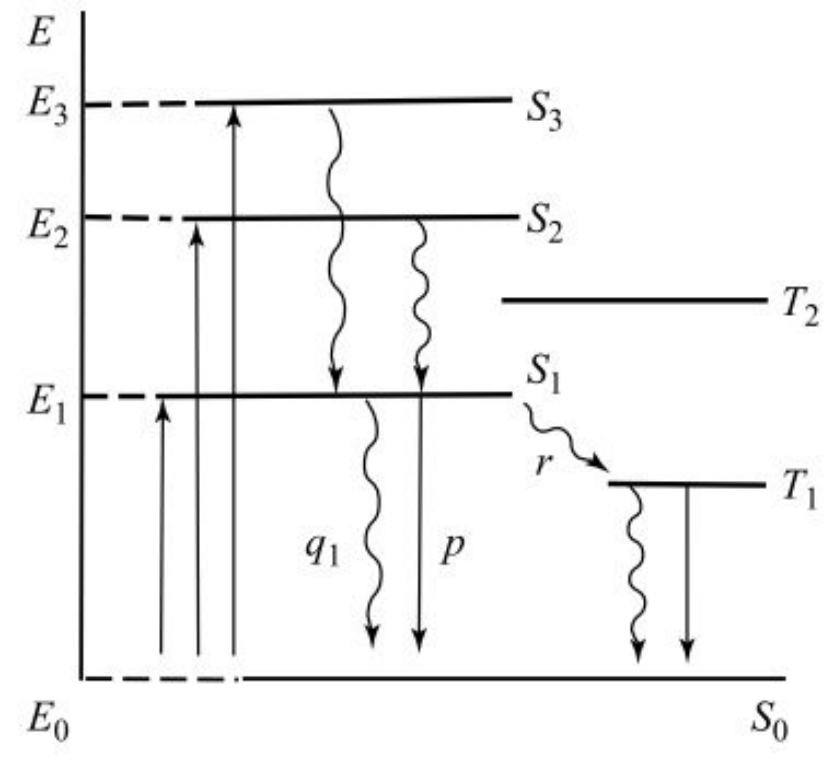
Методы изучения

Методы изучения подвижности белков

- Люминесцентные методы
- ЭПР
- ЯМР
- ЯГР спектроскопия
- Метод изотопного обмена



Кривые потенциальной энергии основного (So) и синглетного возбужденного (S*) состояний двухатомной молекулы:
U — потенциальная энергия; г — межъядерное расстояние; I — интенсивность поглощения; X — длина волны; 0-5 — колебательные подуровни ядерных состояний



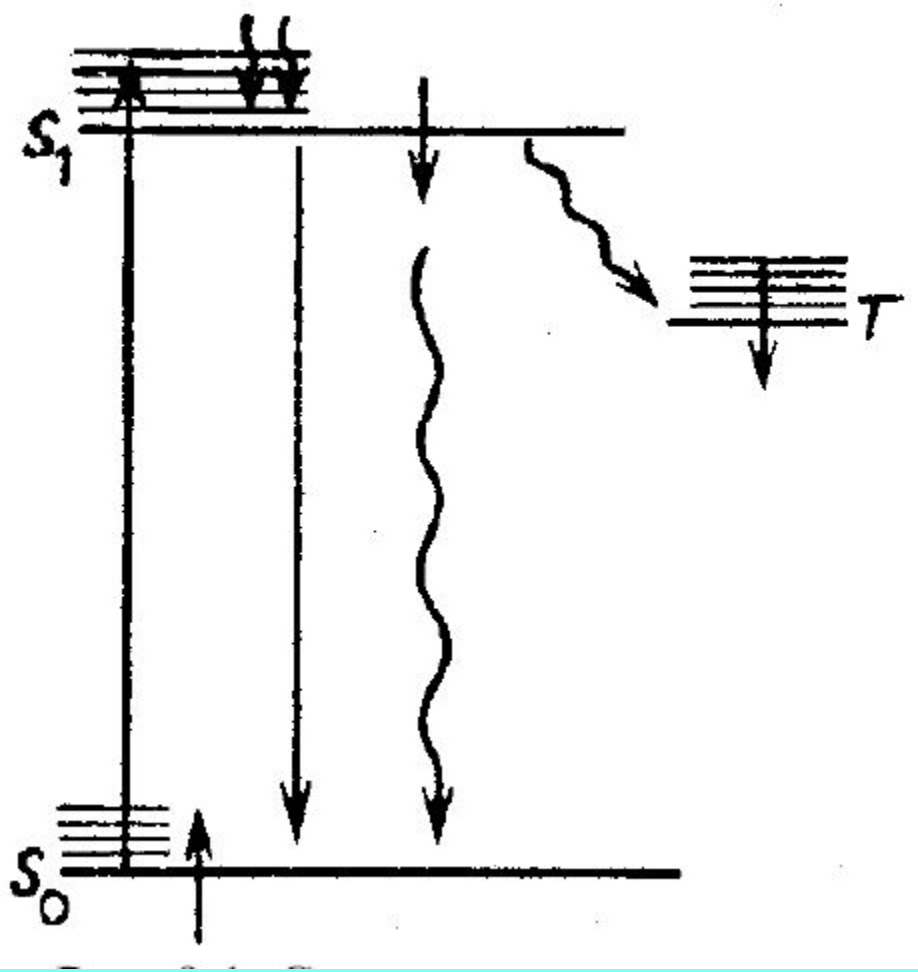
Электронные уровни органической молекулы и переходы между ними (схема Яблонского): p — вероятность переходов в единицу времени на основной уровень с испусканием флуорисценции, qi—то же, без излучения; г — вероятность конверсии и триплетное состояние.

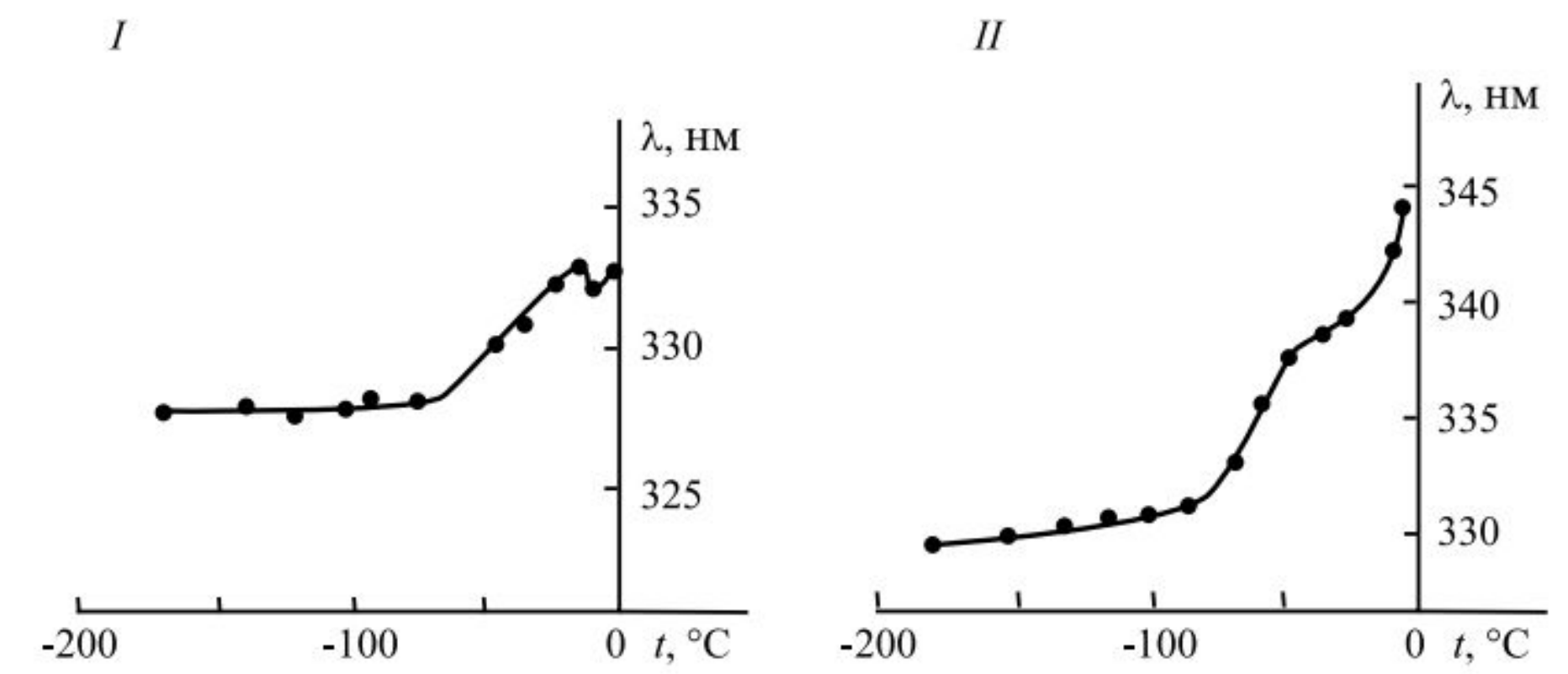
Молекула обладает системой триплетных T_1, T_2,... и синглетных возбужденных уровней S_1, S_2,..., Sn. При переходе на один из высших возбужденных синглетных уровней избыток энергии быстро (10^{-12} с) диссипирует; молекула попадает на низший возбужденный синглетный уровень S_1, с которого и происходит переход ($S_1 \rightarrow S_0$) или внутримолекулярная конверсия ($S_1 \rightarrow T_1$). Суммарная вероятность (P) дезактивации определяется суммой величину, q_i, r:

$P = p + q_i + r$

Люминесцентные методы

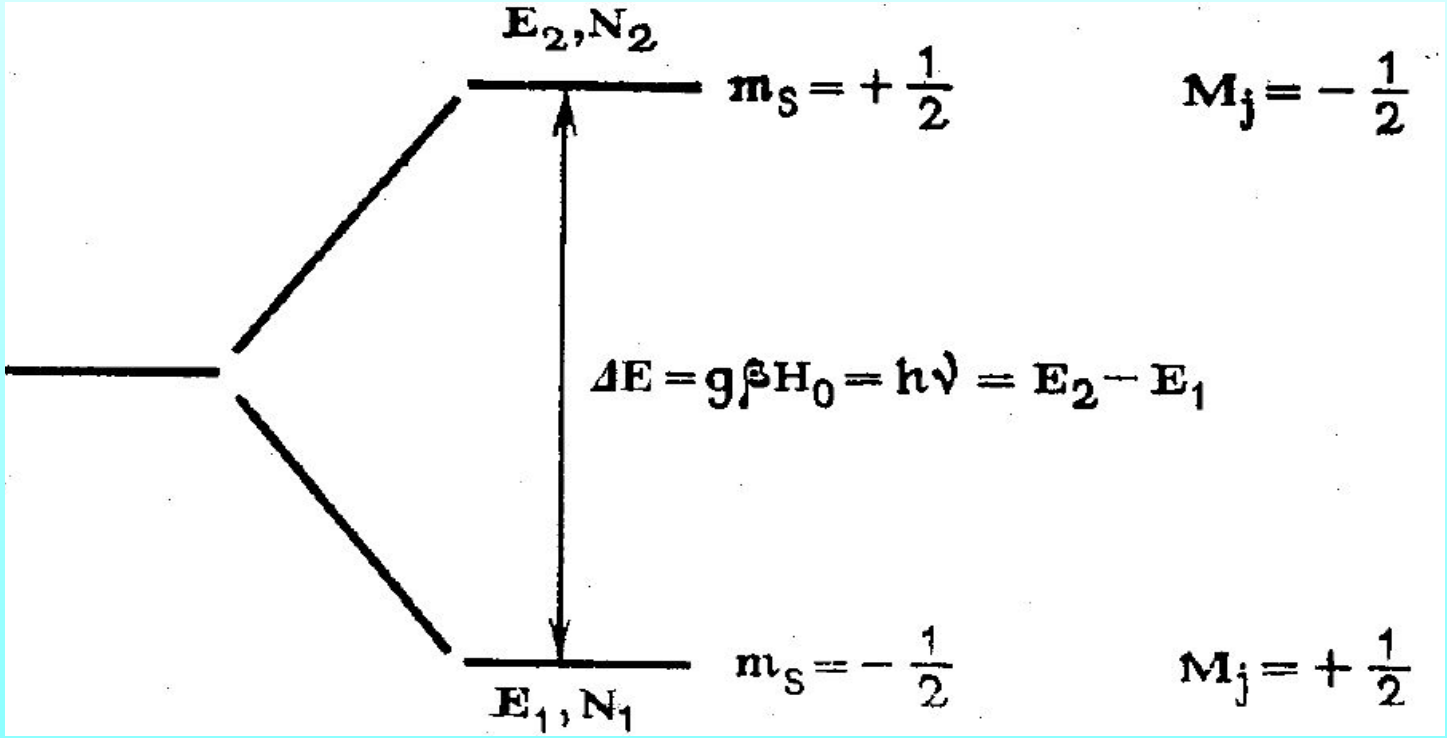
- Измерение внутримолекулярной подвижности белка по зависимости положения максимума люминесценции метки, введенной в белок, либо собственной люминисценции триптофана белка от температуры
- Характеристика подвижности окружения метки
- $t=10^{-2}-10^{-6}$ с
- $\tau=10^{-1}-10^{-2}$ с
- $\tau^*=10^{-8}-10^{-9}$ с



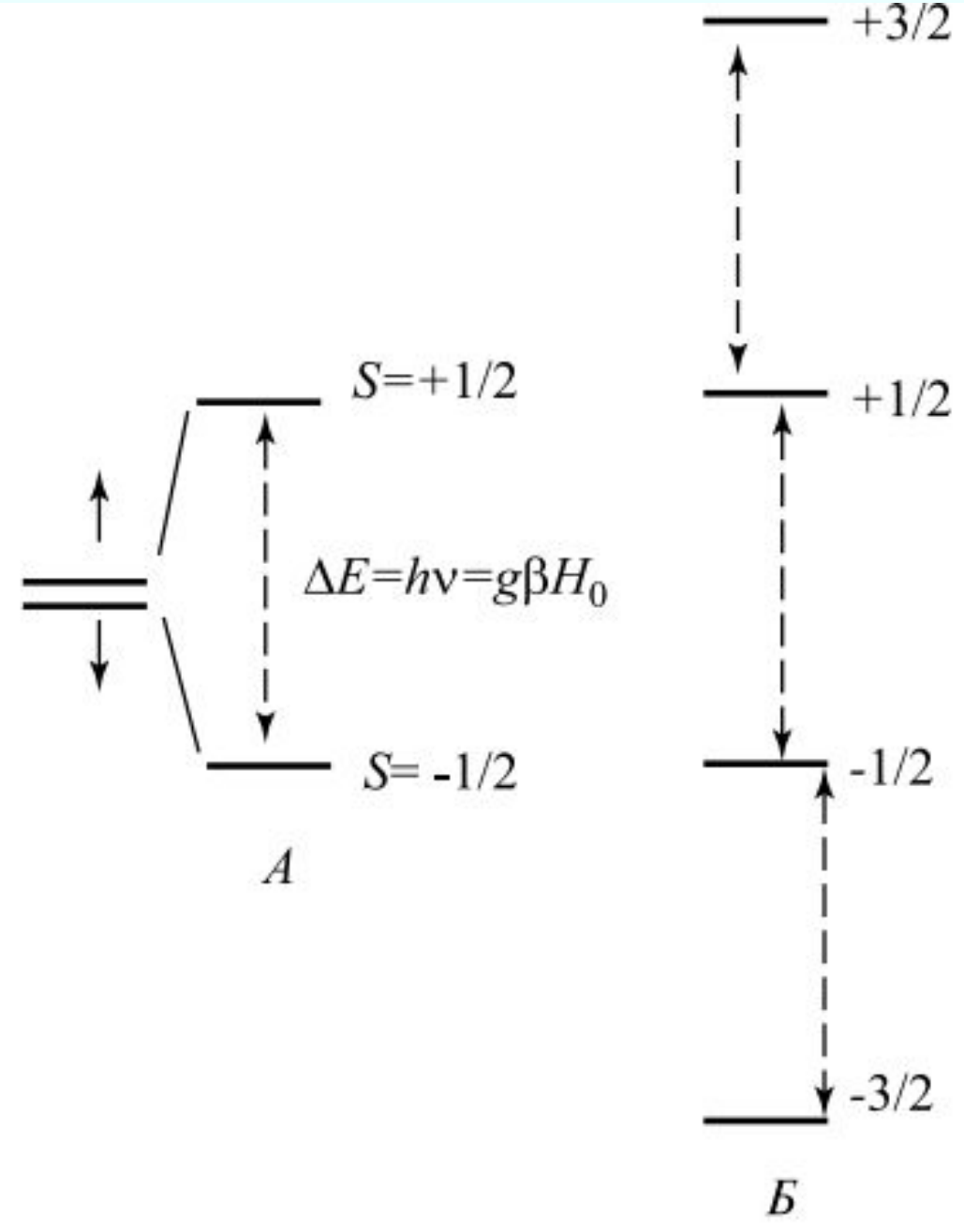


Зависимость положения спектра флуорисценции водного раствора (3-лактоглобулина (I) и нейтротоксина II кобры (II) от температуры при pH 6,5 (по Е. А. Пермякову, 1977)

Методы радиоспектроскопии ЭПР и ЯМР

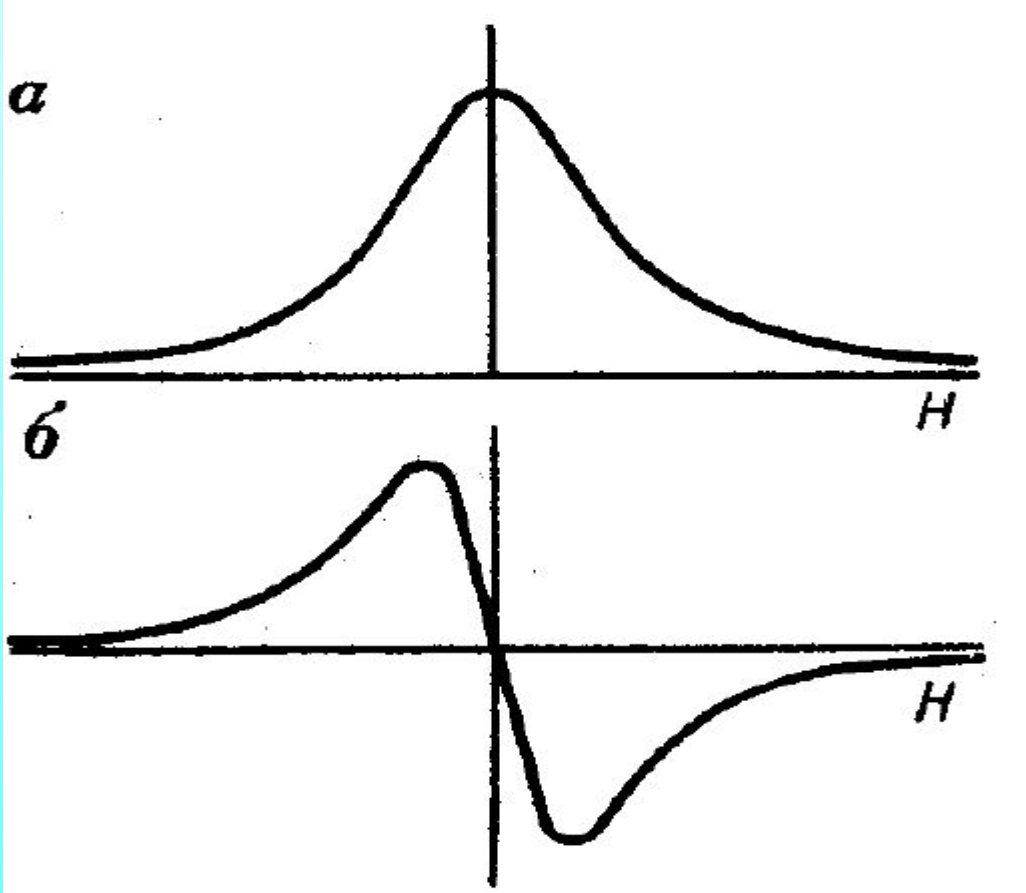


Расщепление энергетических уровней электрона (протона) в магнитном поле (H)



Энергетические уровни электрона в магнитном поле. А — один электрон (спин 1/2); Б — три электрона (максимальное значение спина 3/2;

Линия поглощения СВЧ-
а) поля
б) ее первая производная



Ось абсцисс — величина постоянного магнитного поля H, которая плавно меняется при постоянной частоте СВЧ-поля до достижения значений, соответствующих условию резонансного поглощения

Линия резонанса ЭПР

- Ширина: $\Delta H \cong \frac{1}{2T_1} + \frac{1}{T_2}$
- T_1 – время передачи энергии окружающей среде
- T_2 – время спин-спинового взаимодействия

Для свободных радикалов: $T_1 >> T_2$

$$\Delta H \cong \frac{1}{T_2}$$

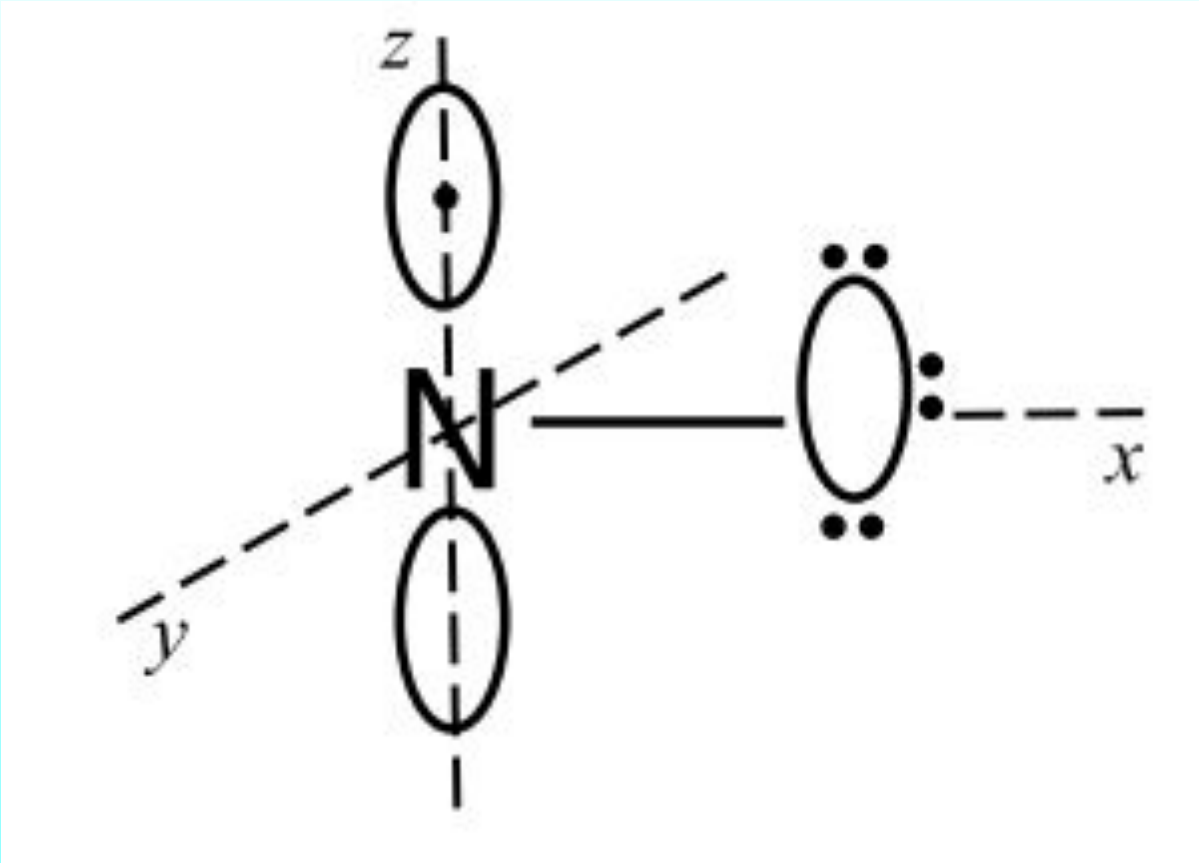
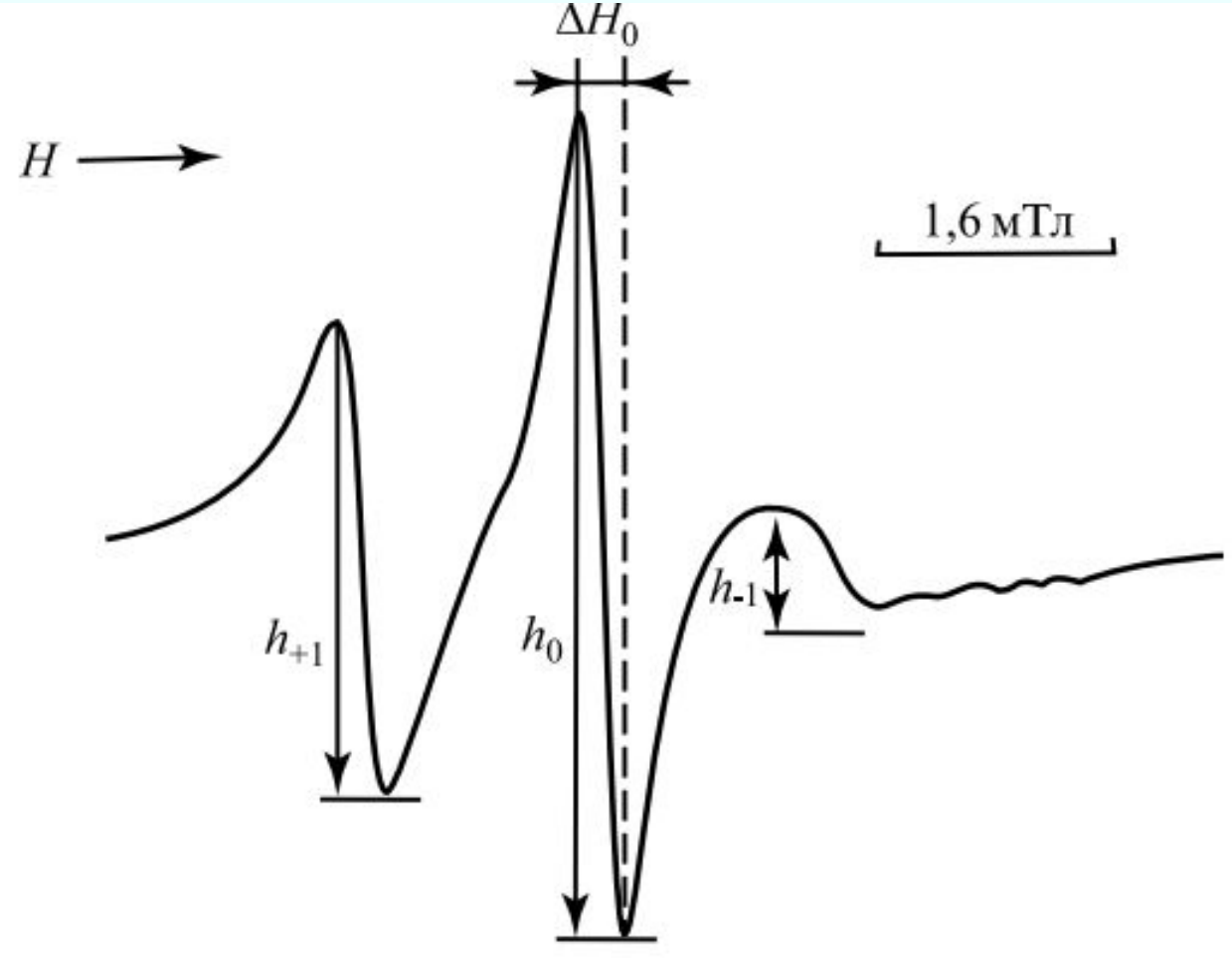


Схема парамагнитного фрагмента нитроксильного радикала



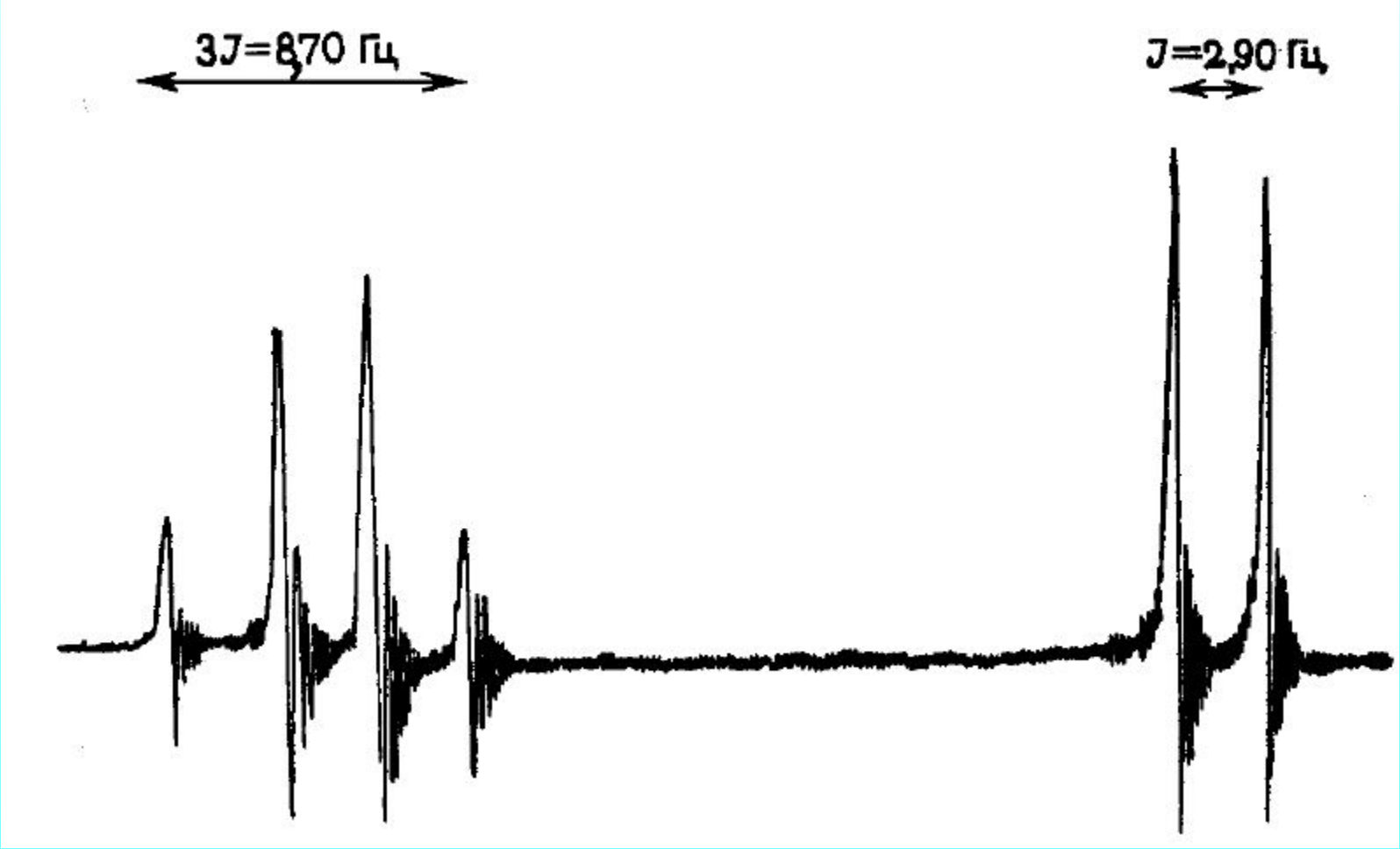
Спектр ЭПР парамагнитной метки, присоединенной к *гис*-15 лизоцима (pH 7,0; t=26°C) (по Г.И. Лихтенштейну, 1971): h_{-1}, h_0, h_{+1}—интенсивность компонентов, соответствующих M= —1;0;+1; ΔH_0—ширина центрального компонента

ЯМР-спектроскопия

- Измерение времени релаксации T_1 и T_2 по ширине линии резонанса.
- Определение времени вращения метки, на которой наблюдается резонанс
- Оценка подвижности белковых структур в состав которых входят «резонирующие» протоны
- Изучение некоторых видов внутримолекулярного движения в белках
- Информация о химической структуре молекулы

Спектр ЯМР ацетальдегида CH_3CHO

по А.Керрингтону, Э. Мак-Лечлану, 1970



CHO

химический сдвиг

ЯГР спектроскопия

- Дает информацию не только о временных, а также амплитудных характеристиках движений в белке (средние величины смещений атомов в структуре белка за $t=10^{-7}-10^{-9}$ с)

Основан на резонансном поглощении γ-квантов тяжелым ядром атома

Эффект Мёссбауэра

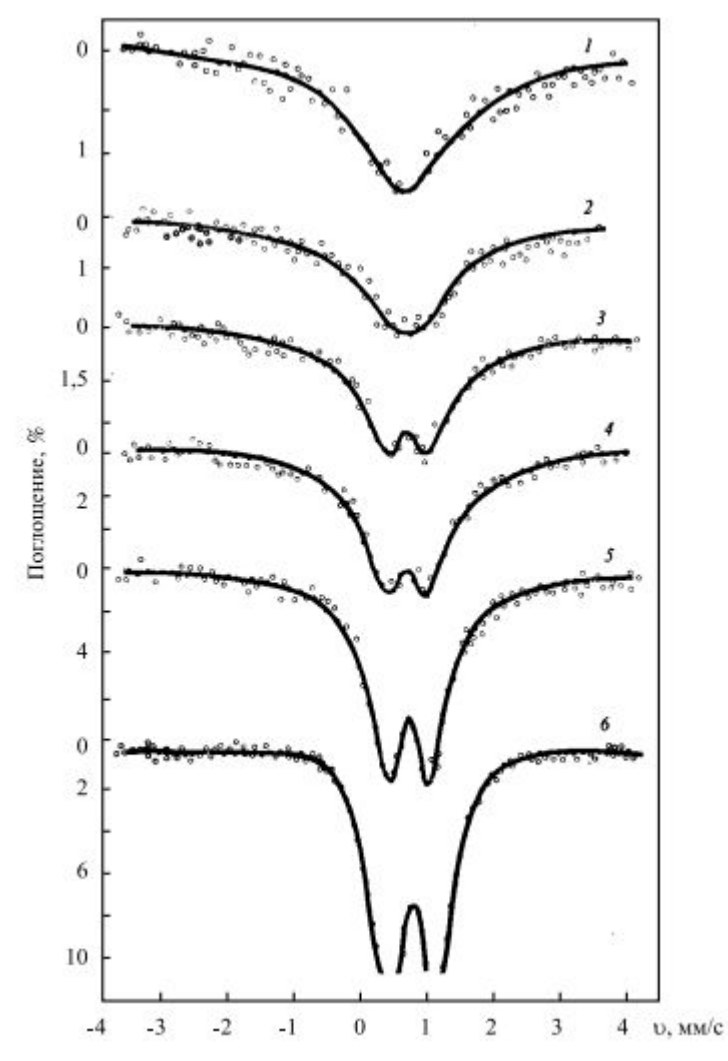
Эффект Мёссбауэра

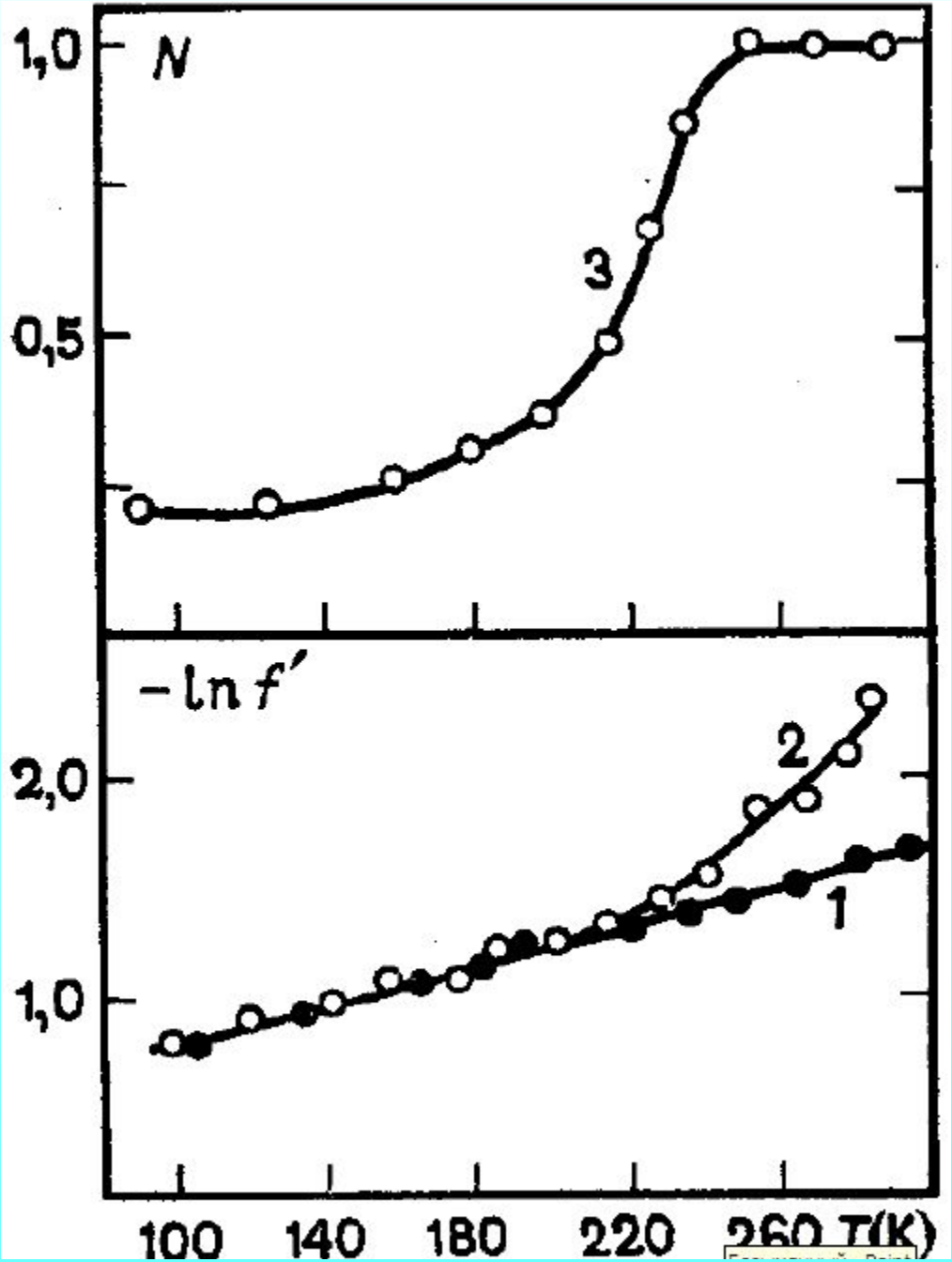
$$f' = e^{-\bar{x}^2/\bar{\lambda}}$$

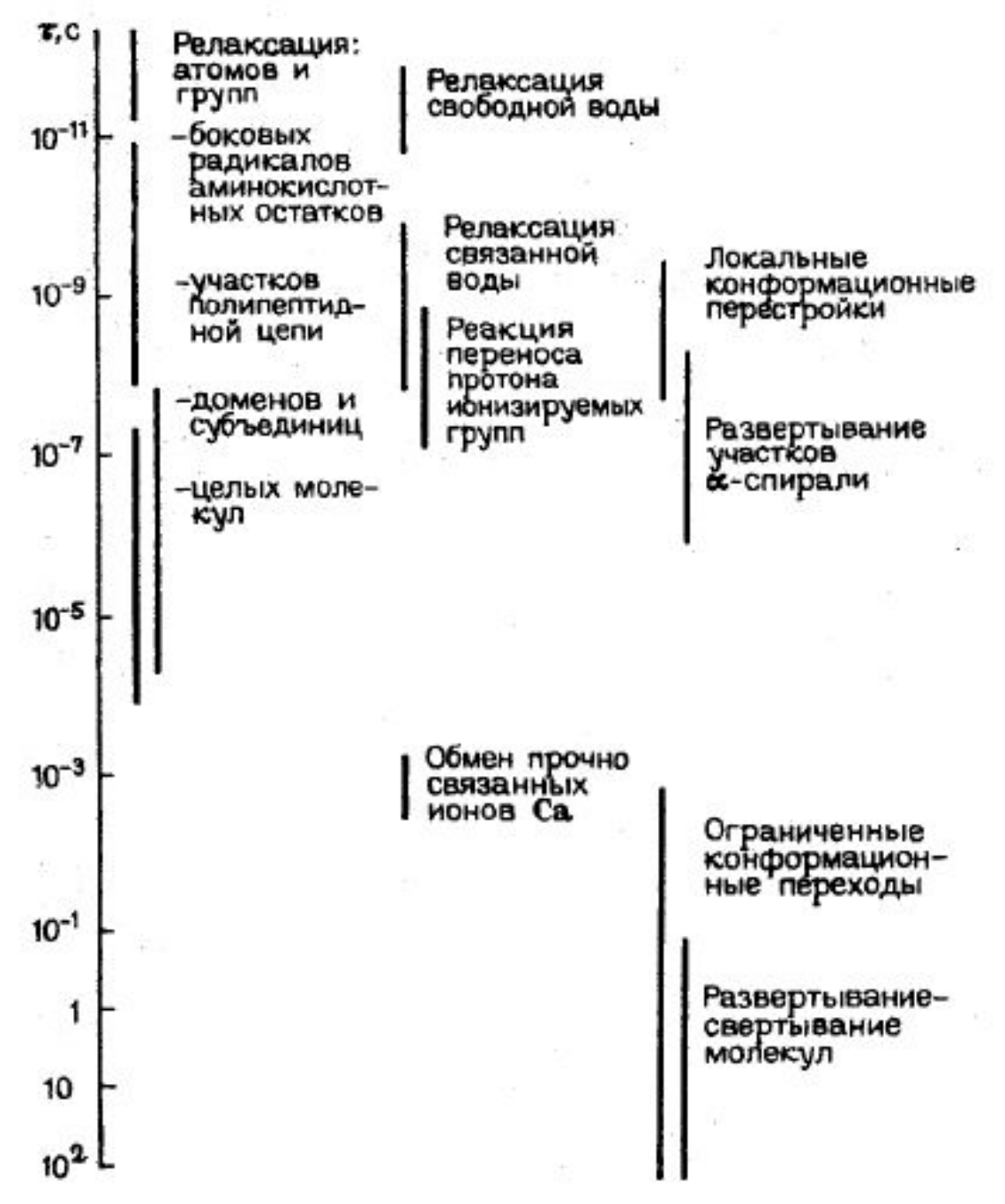
$$\bar{\lambda} = \lambda/2\pi$$

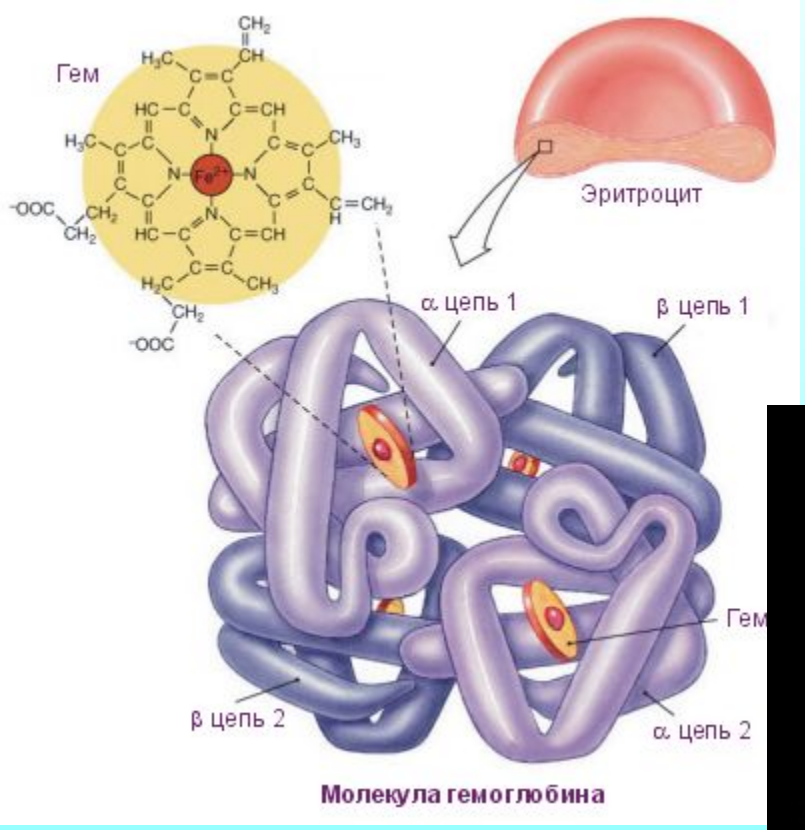
$$\bar{\lambda} = 0{,}13\ \text{Å для}\ {}^{57}\text{Fe}$$

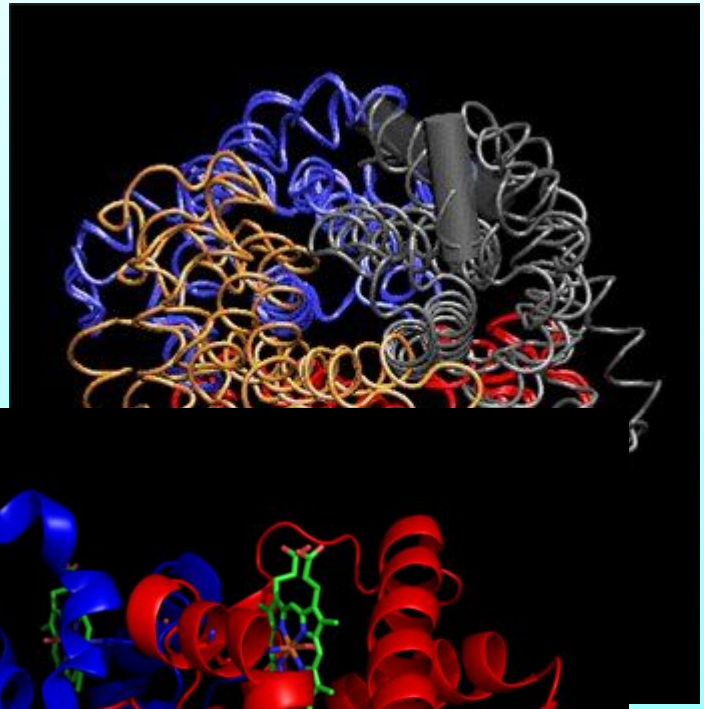
Уширение спектра обусловлено диффузией молекул белка. Изменение частоты уширения пропорционально скорости источника (v)

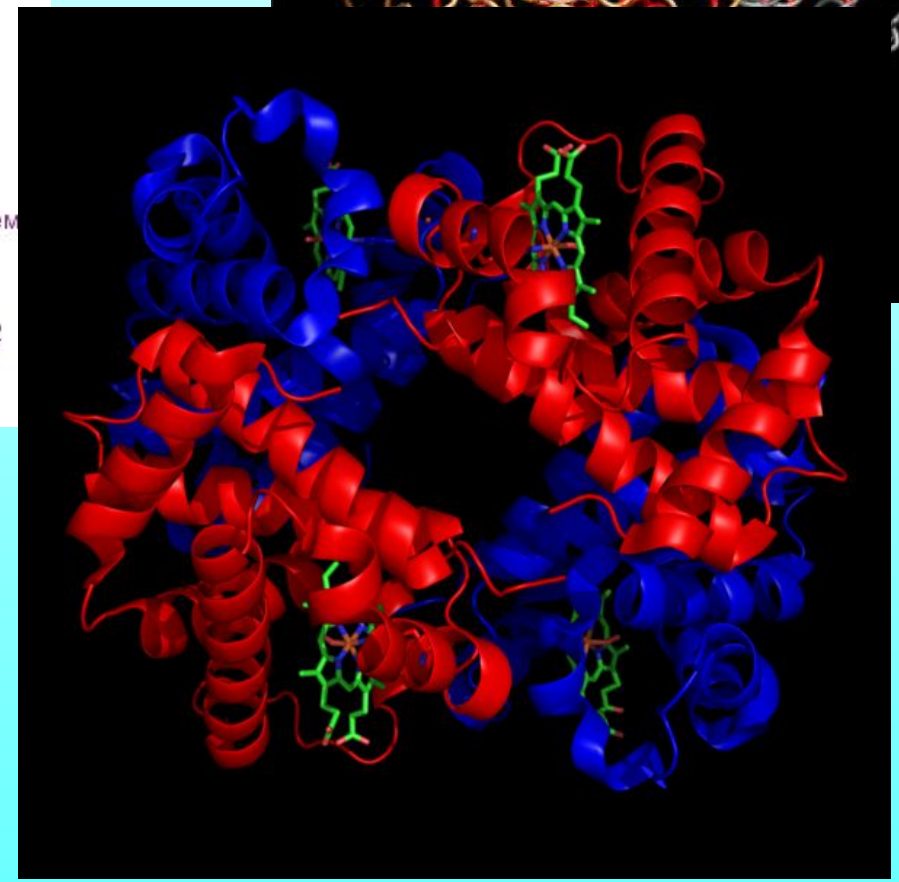


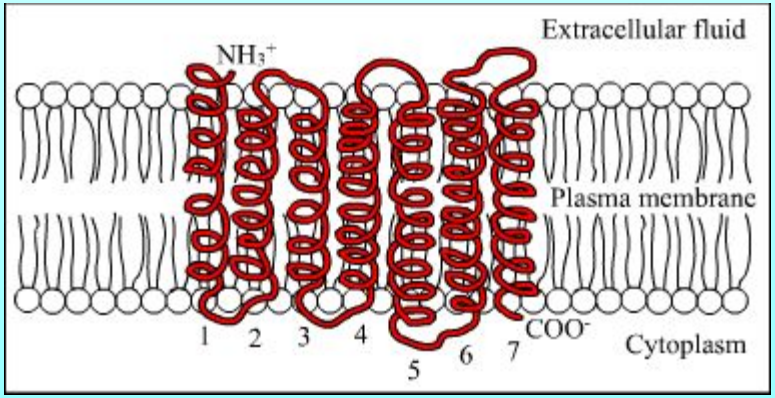

1,0
N
0,5
3
-ln f′
2,0
2
1
1,0
100
140
180
220
260
T(K)


τ, с
10^{-11}
10^{-9}
10^{-7}
10^{-5}
10^{-3}
10^{-1}
1
10
10^{2}
Релаксация: атомов и групп
–боковых радикалов аминокислотных остатков
–участков полипептидной цепи
–доменов и субъединиц
–целых молекул
Релаксация свободной воды
Релаксация связанной воды
Реакция переноса протона ионизируемых групп
Обмен прочно связанных ионов Ca
Локальные конформационные перестройки
Развертывание участков α-спирали
Ограниченные конформационные переходы
Развертывание-свертывание молекул

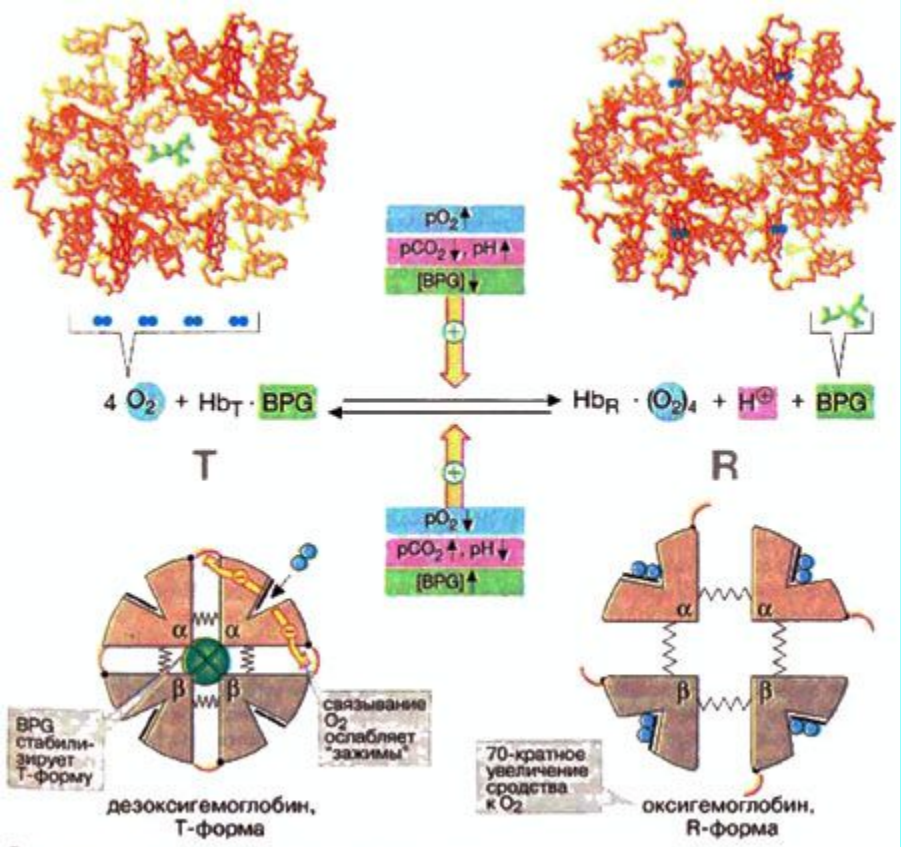

Гем
Эритроцит
α цепь 1
β цепь 1
Гем
β цепь 2
α цепь 2
Молекула гемоглобина



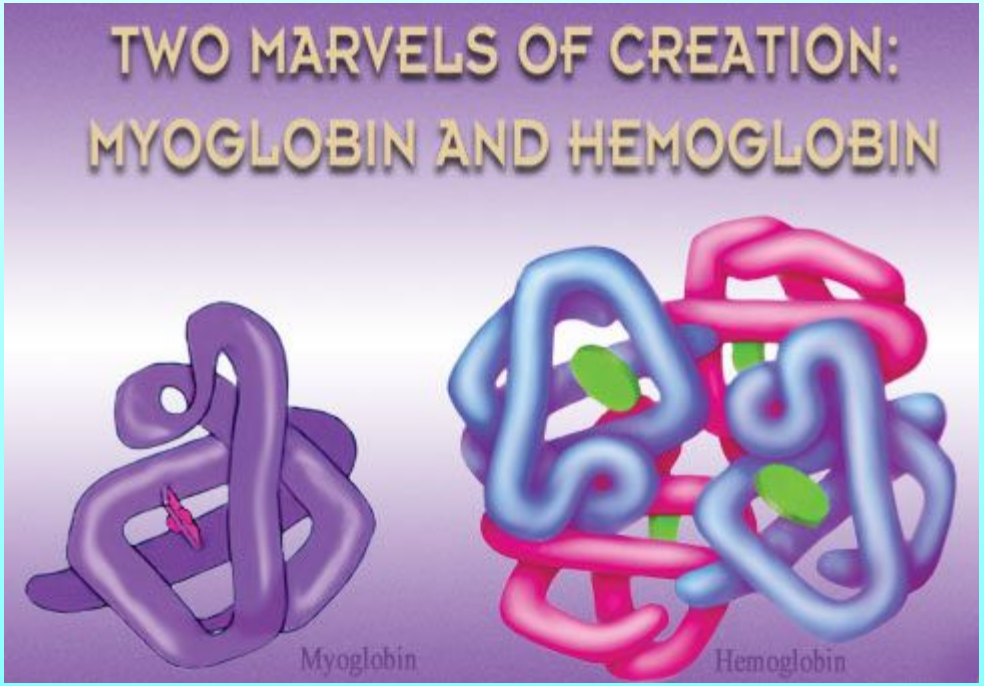


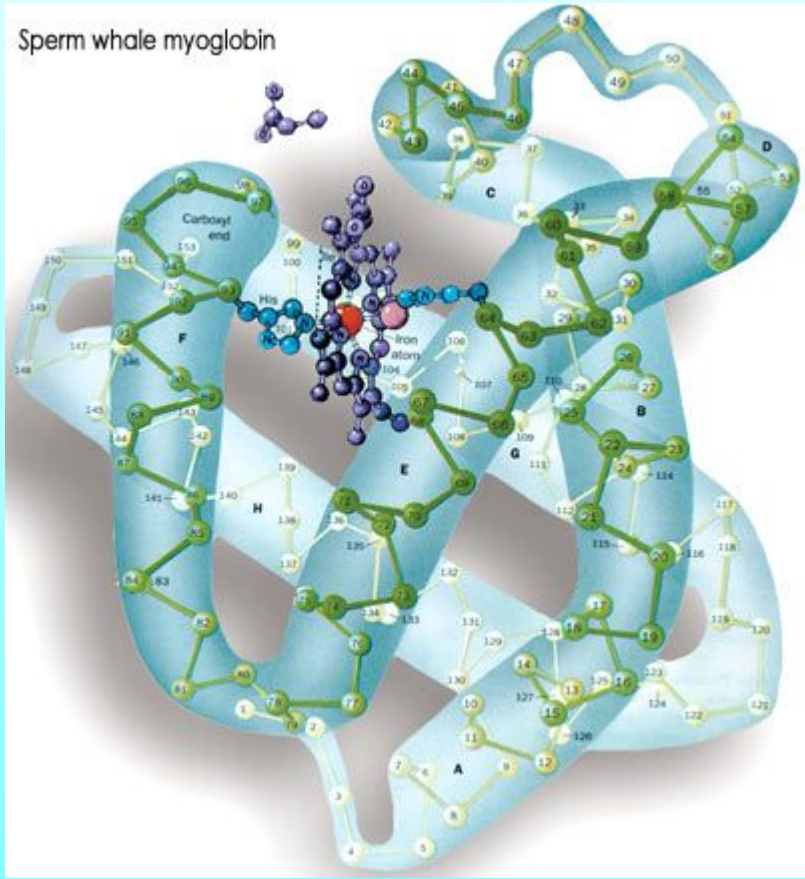


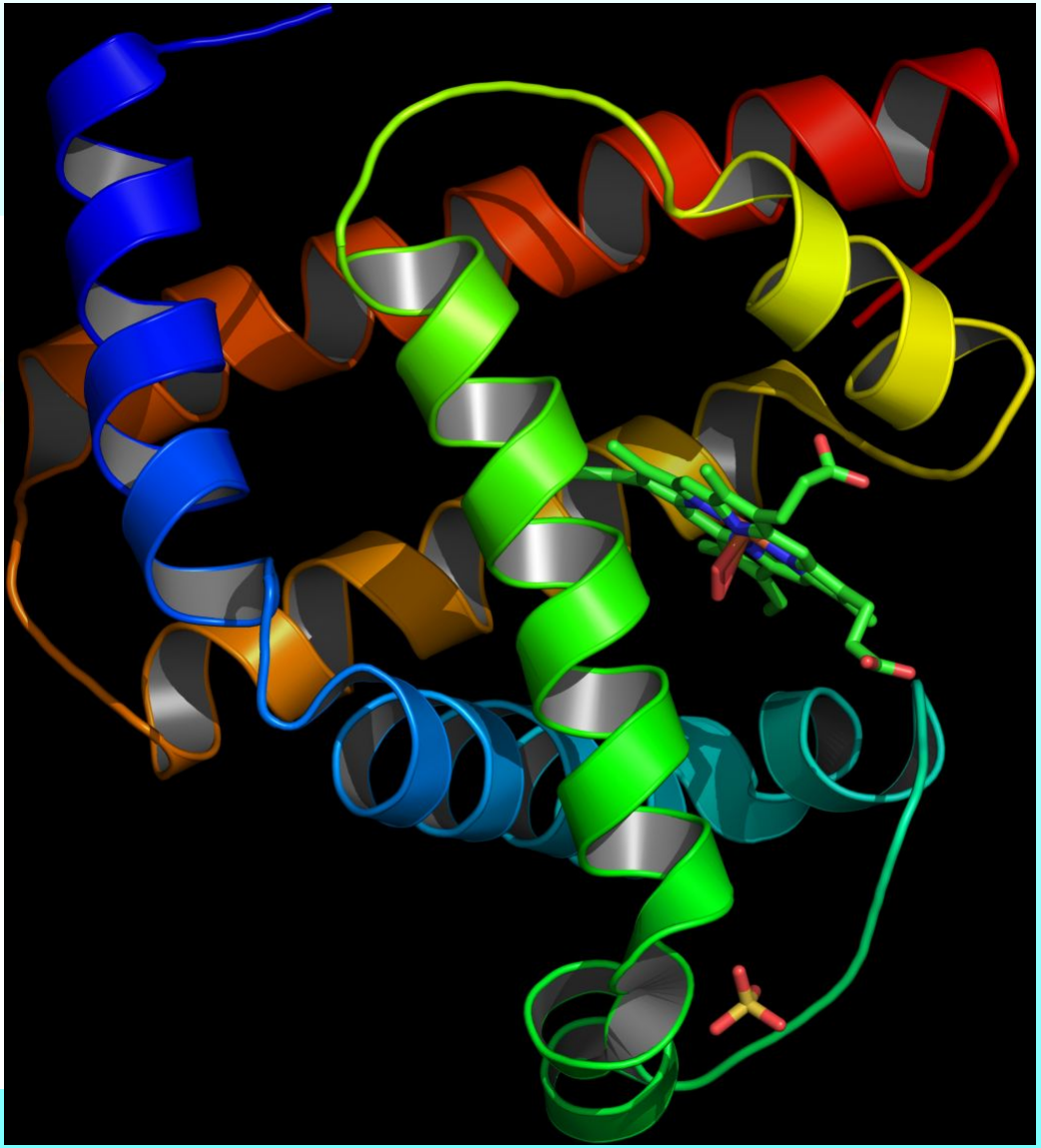
Picture of G-Protein Receptor Family 7 TM Transmembrane Domains

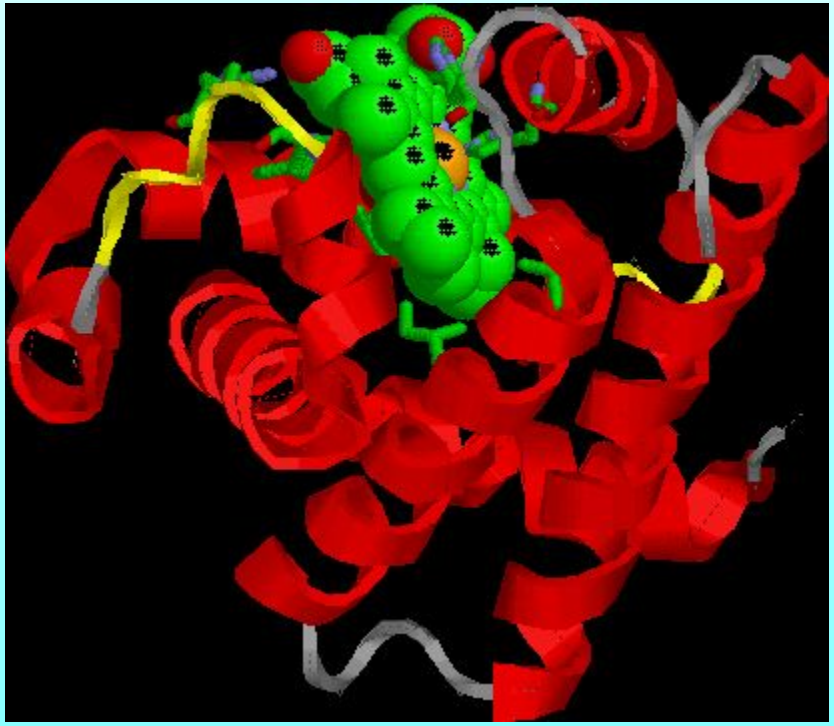


Б. Аллостерические эффекты в гемоглобине


TWO MARVELS OF CREATION:
MYOGLOBIN AND HEMOGLOBIN
Myoglobin
Hemoglobin


Sperm whale myoglobin
Carboxyl end
His
Iron atom
A
B
C
D
E
F
G
H





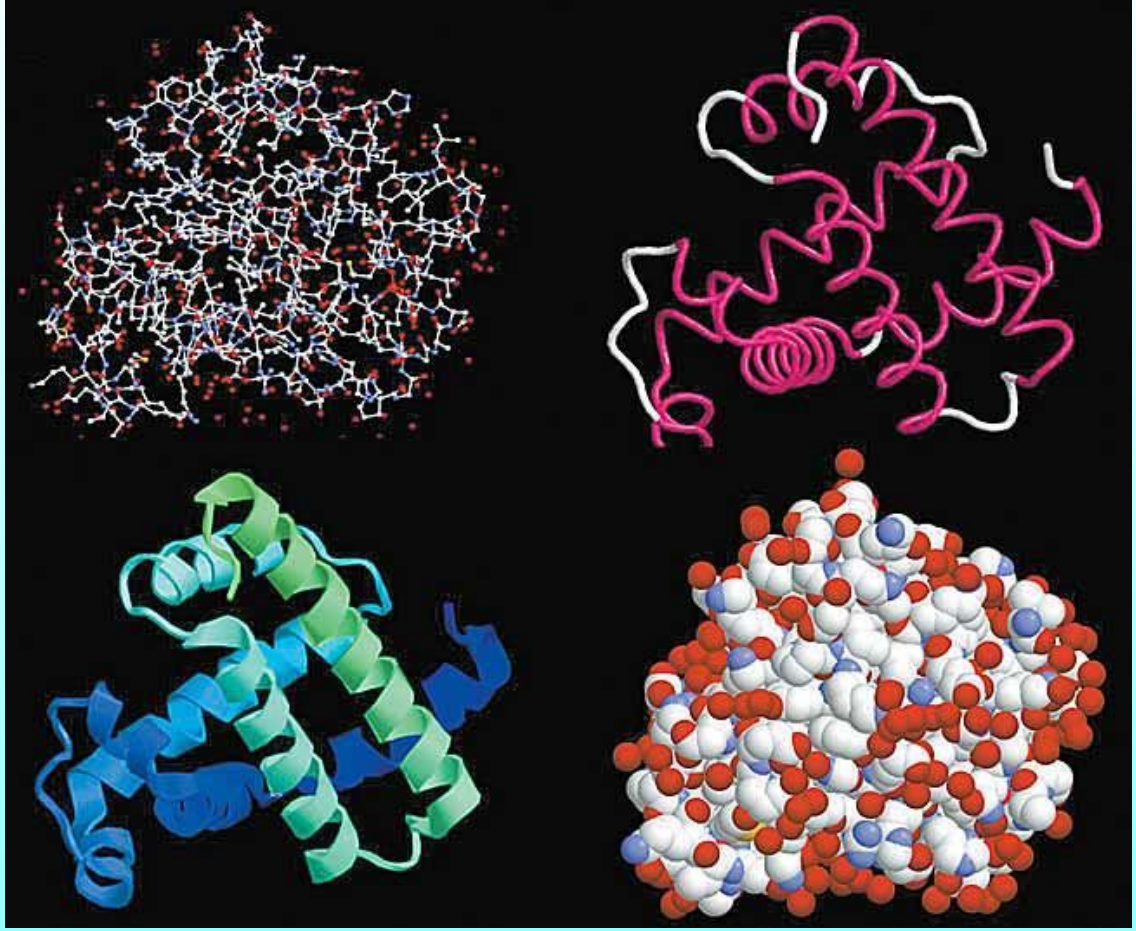


Рис.2. Компьютерные изображения структуры белка миоглобина.
1 - атомы в виде небольших сфер разного цвета: красные - кислород, белые - углерод, синие - азот, желтые - сера. Атомы водорода очень слабо рассеивают рентгеновские лучи и на изображении их нет. Красные сферы по краям белковой молекулы - это кислородные атомы структурированной воды, прочно связанной с белковой глобулой.
2 - общий ход полипептидной цепи. Участки α-спирали выделены красным цветом, неструктурированные петли цепи - белым цветом.
3 - спиральные структуры в виде лент.
4 - атомы даны как сферы с радиусами Ван-дер-Ваальса.
Рассматривая рисунки *1-3*, можно подумать, что полипептидная цепь уложена рыхло и потому обладает большой подвижностью. Но это не так: белковая глобула выглядит как плотная гроздь атомов, лишенных возможности свободного перемещения (*4*).