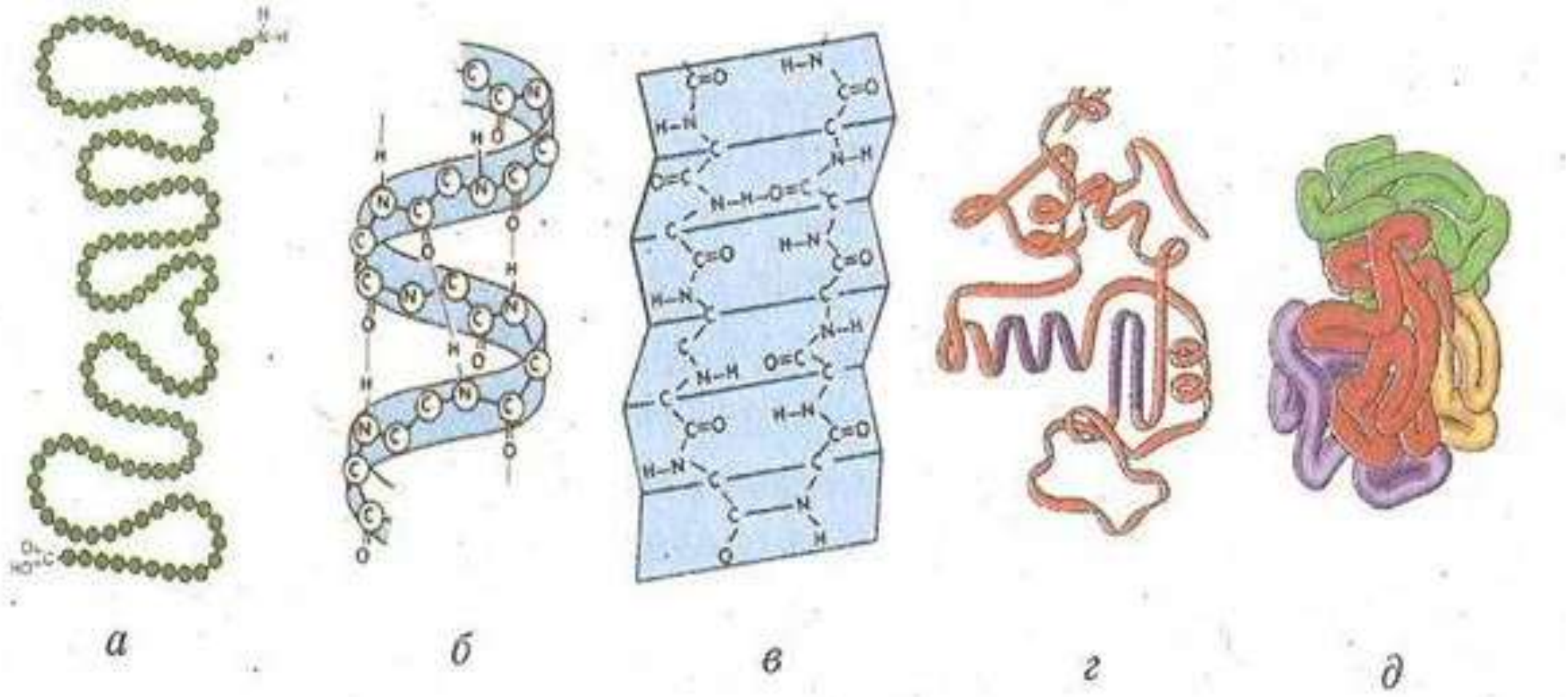
Лекція. Біофізика структури білків

План

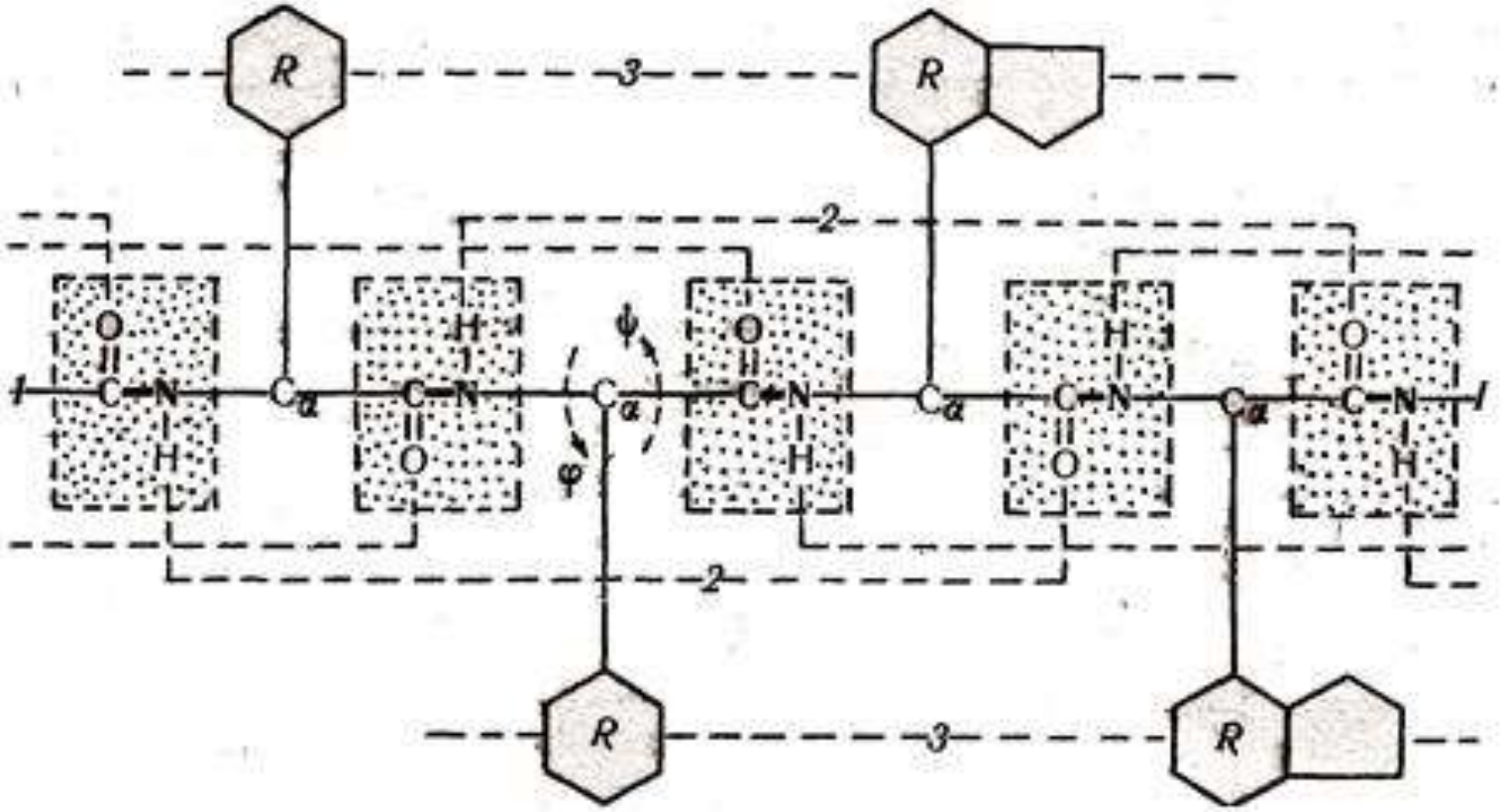
1. Первинна і вторинна структура білків
2. Дисперсія оптичного обертання і круговий дихроїзм
3. Домени і третинна будова білків
4. Диференційна сканувальна мікрокалориметрія
5. Динаміка структури білків
6. Абсорбційна та диференційна спектрофотометрія
7. Флуоресцентна спектроскопія білків

Рівні організації білкових молекул



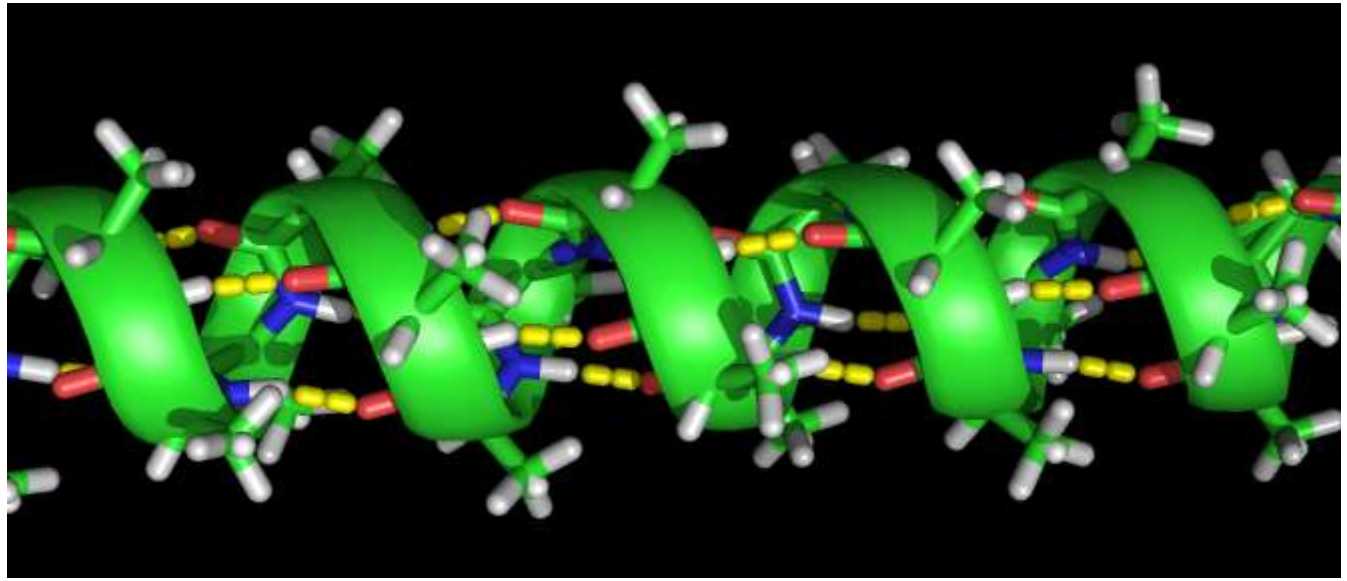
а – вторинна структура, б – α-спіраль, в – β-шар, г – третинна структура, д – четвертинна структура

Структурна організація білкової молекули



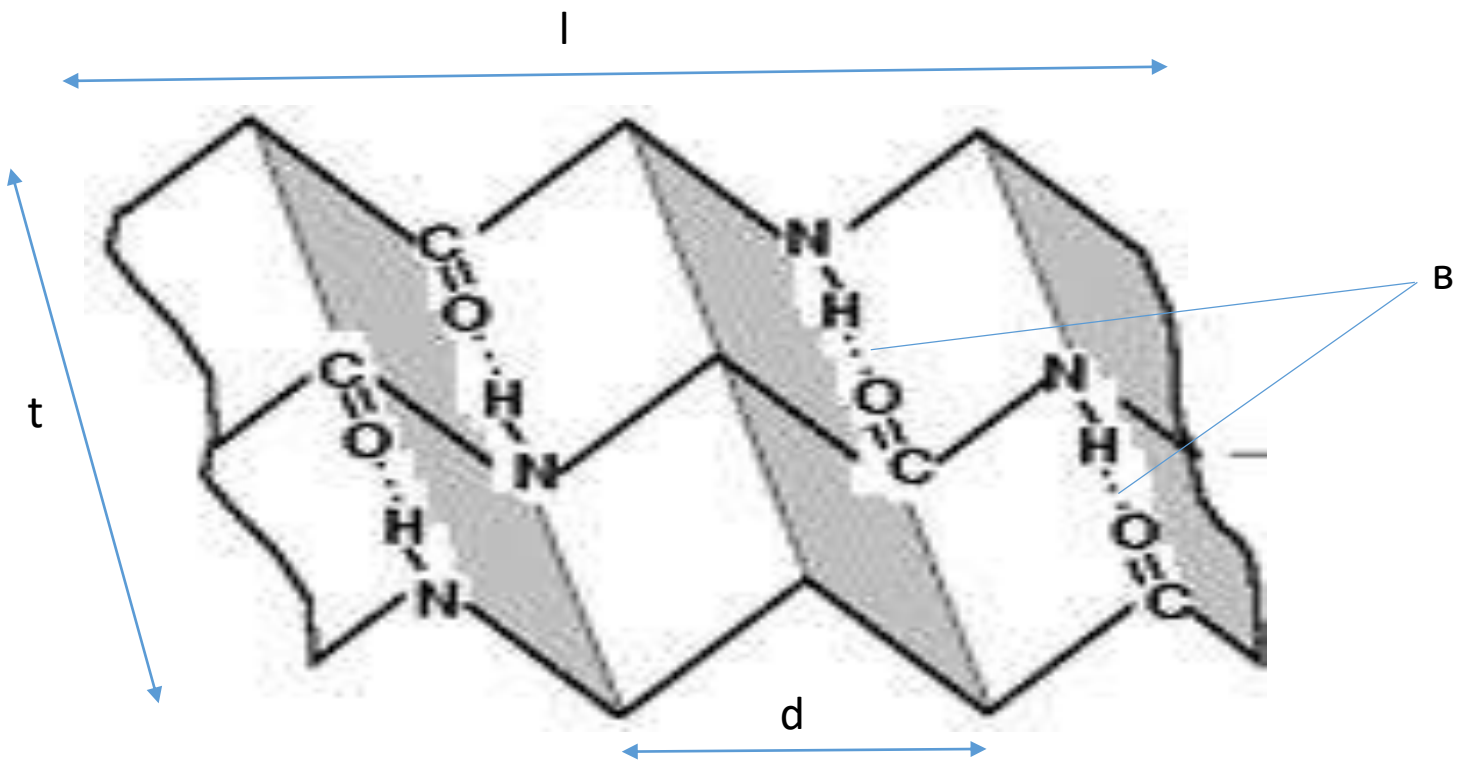
- Первинна структура (1 -1) – послідовність пептидних груп; ф і ψ – торсійні кути; довжина зв’язків: C-N – 0,132 нм; N-C_α – 0,147 нм; C_α-C – 0,153 нм.
- Вторинна структура (2 – 2) – водневі зв’язки між пептидними групами.
- Третинна структура (3- 3) – слабкі (нековалентні) взаємодії білкових радикалів R амінокислотних залишків

α-спіраль білка



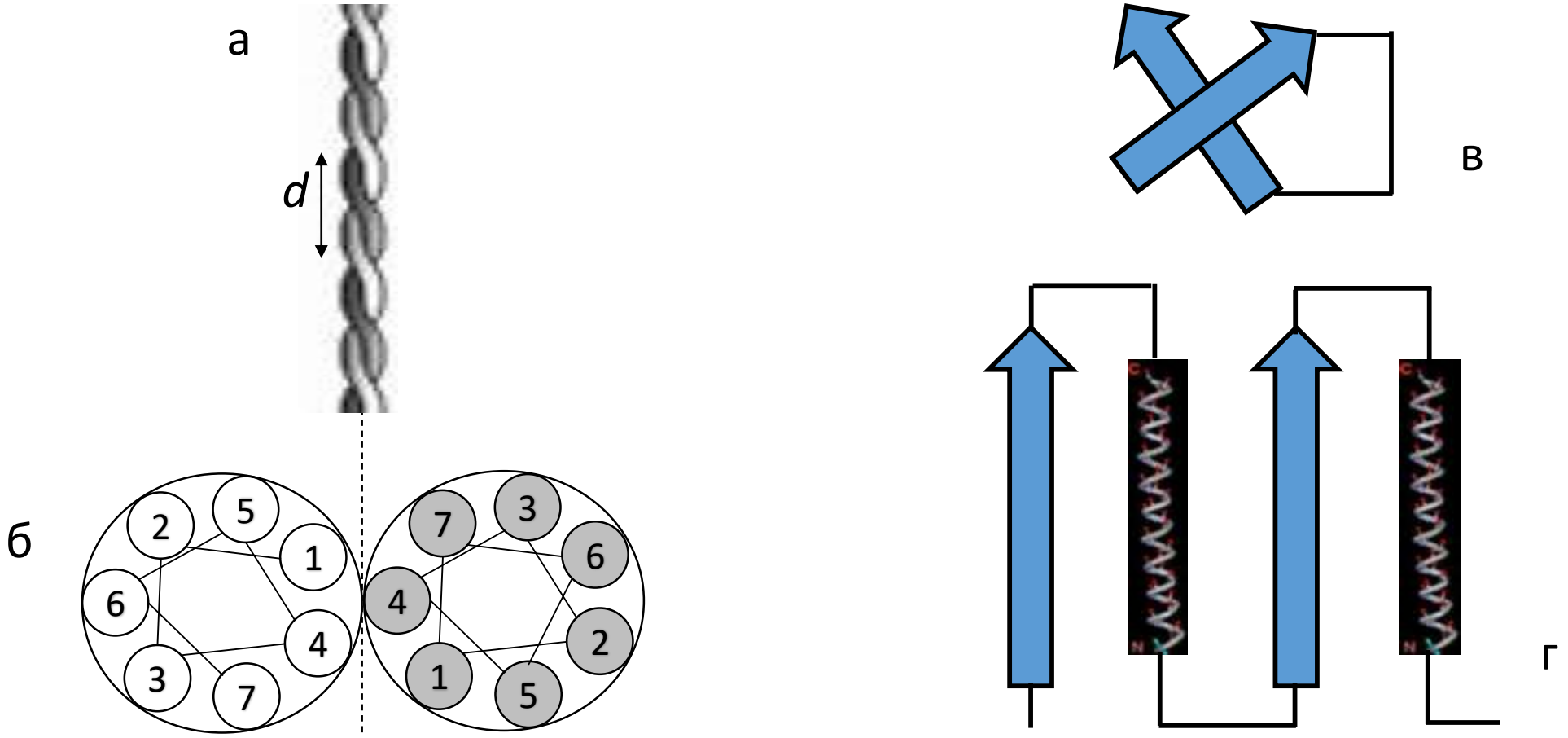
Водневі зв’язки показано жовтими крапками

Антипаралельний β-складчастий лист



- l і t – відповідно довжина і ширина листа; в – водневі зв’язки; d = 0,68 нм (відстань між вигинами)

Надвторинні білкові структури



α- суперспіраль, d - крок суперспіралі, 1 – α-спіраль; б – поперечний переріз суперспіралі: гептапептиди амінокислотних залишків 1-7; в - з’єднання паралельних β-листів (βξβ-структура); г - поперемінне з’єднання β-листів і α-спіралей

Ефект Коттона

- Кут повертання α пропорційний різниці показників заломлення і товщині шару оптичноактивної речовини:

$$\alpha_\lambda = \frac{180^\circ}{\lambda}(n_L - n_R)d.$$

- Питоме обертання розчину з концентрацією C (г/см^2) і товщиною d (дм):

$$[\alpha]_\lambda = \frac{\alpha_\lambda}{dC}, \frac{\text{град} \times \text{см}^3}{\text{г} \times \text{дм}}$$

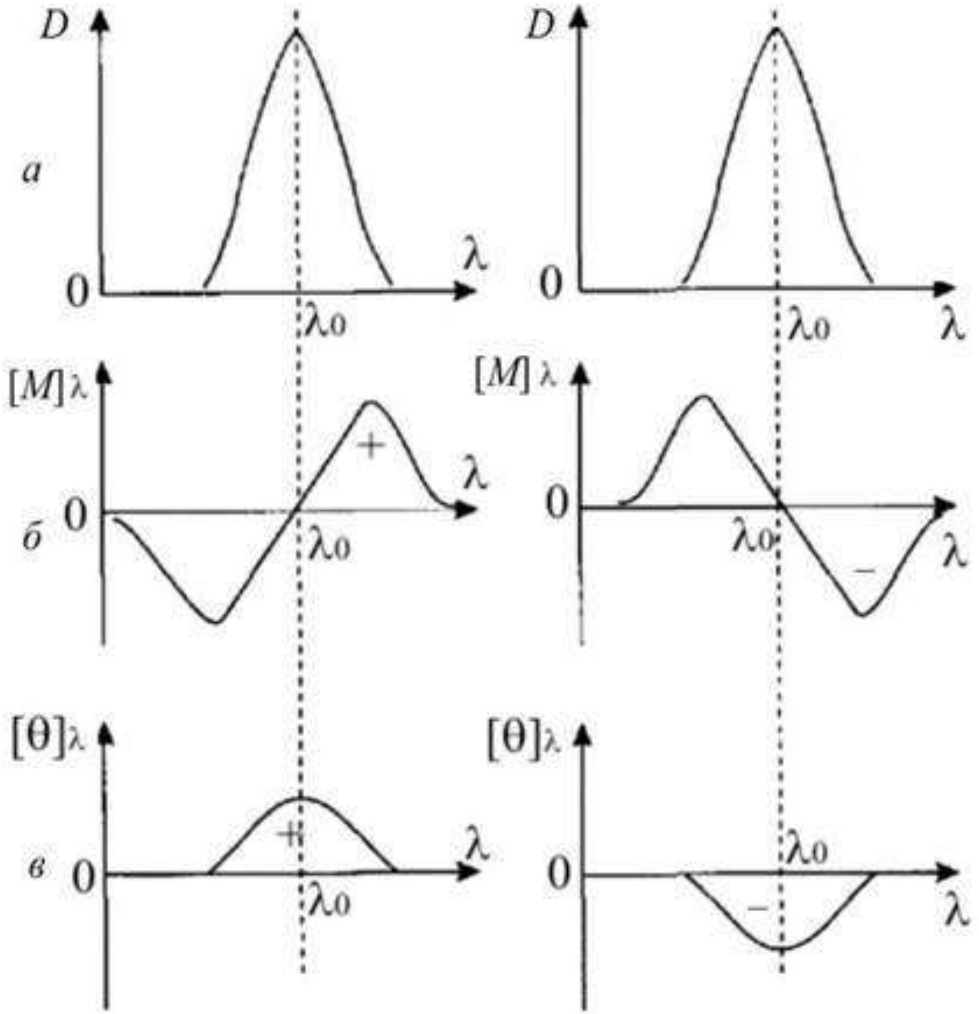
- Молярне обертання:
  - $[M]_\lambda = \frac{\text{M}}{100dC}\alpha_\lambda, \frac{\text{град} \times \text{см}^2}{\text{дмоль}},$

де M – молекулярна маса.

- Кут обертання залежить від довжини хвилі. ДОО плавно змінюється залежно від λ (рівняння Друде):

$$M_\lambda = \frac{K}{\lambda_2 - \lambda_0^2}, \text{ де K – стала.}$$

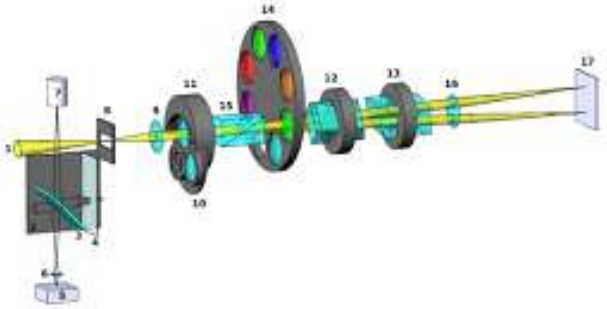
- Залежно від форми ДОО можливі два ефекти Коттона. Якщо $\lambda > \lambda_0$ величина [M]λ має позитивне значення – це позитивний Коттон-ефект, а якщо негативний – то негативний (рис.)

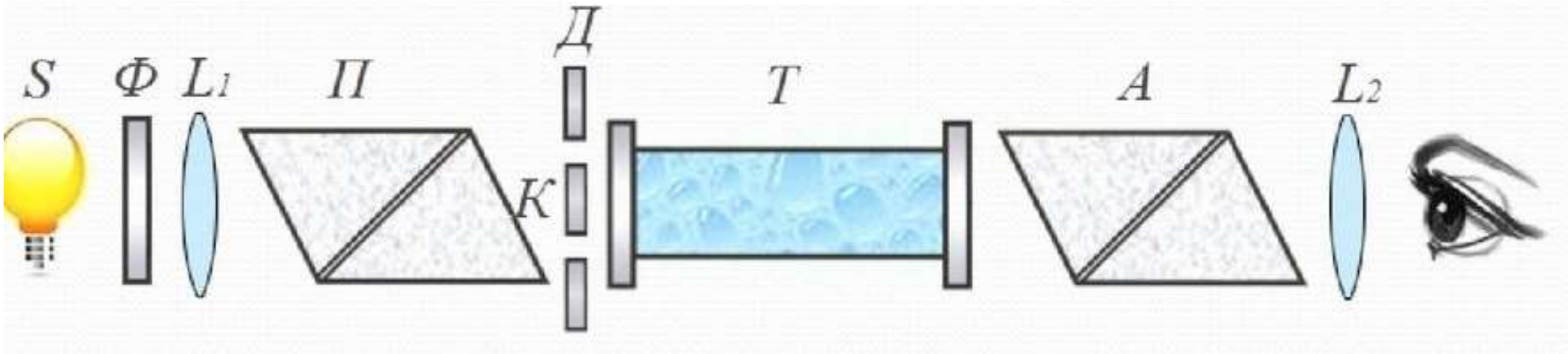


- а – смуга поглинання з оптичною густиною D, б – ДОО, в – круговий дихроїзм; (+) – позитивний і (-) – негативний Коттон-ефекти

(c) Babsky

Дисперсія оптичного обертання (ДОО). Оптична схема поляриметра





S – джерело світла, Ф – фільтр, L_1 – об’єктив, П – поляризатор, Д – діафрагма, К – кварцева пластинка, Т – кювета з розчином, L_2 - окуляр

Круговий дихроїзм

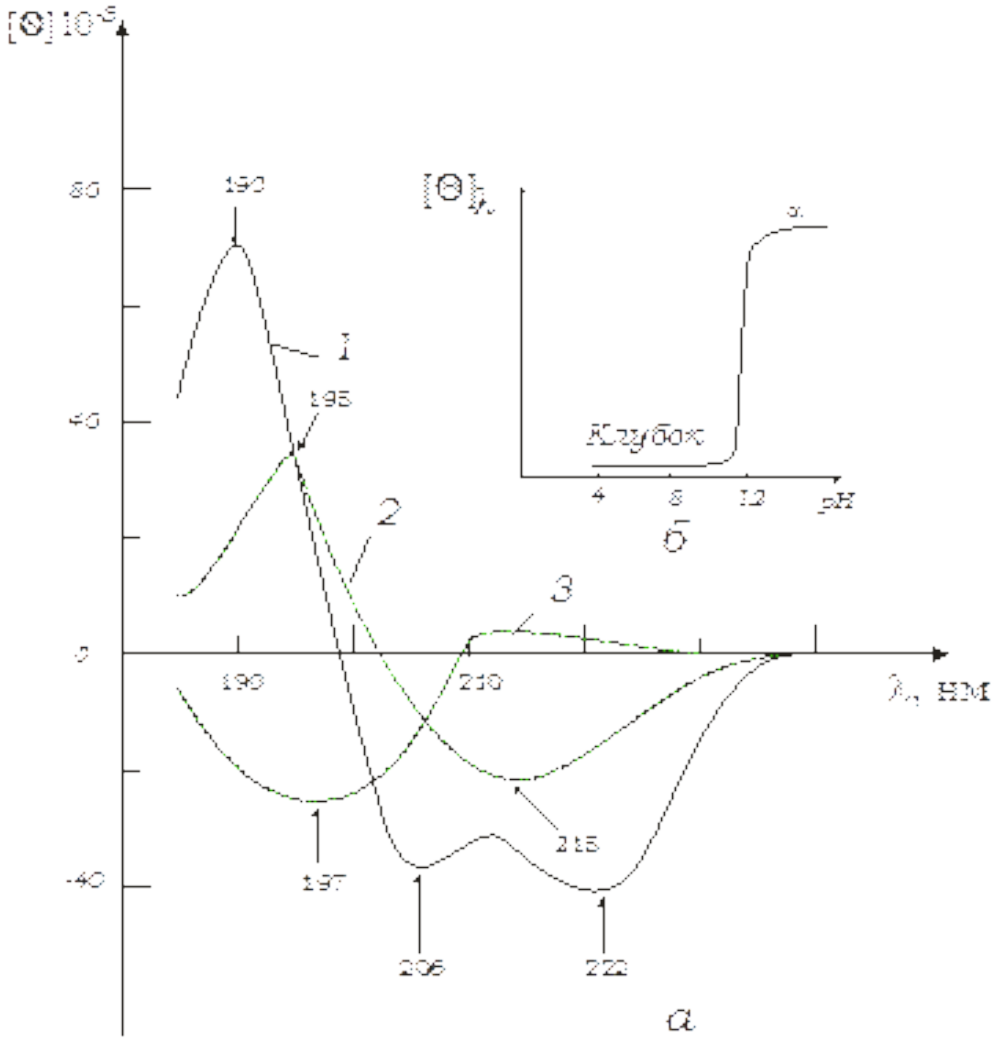
- Оптичноактивні речовини мають різні коефіцієнти екстинкції ε_L і ε_R. Оптична густина D для L і R-компонентів білків є різною і лінійно поляризоване світло після проходження крізь розчин перетворюється в еліптично поляризоване світло:

$$\theta_\lambda = 2,303\frac{180^\circ}{4\pi}(D_L - D_R) = 33,0(D_L - D_R)$$

- Молярна еліптичність:

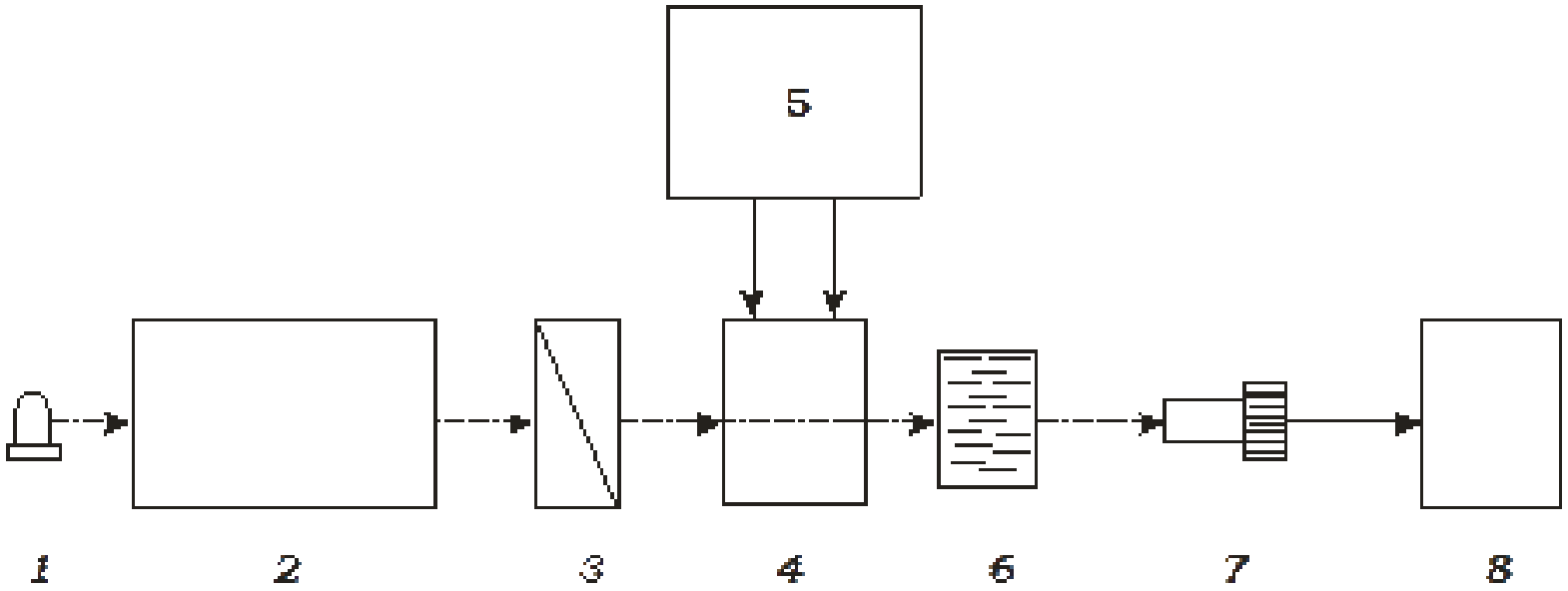
$$\theta_\lambda = \frac{100\,\theta_\lambda}{dC} = 3300\,(\varepsilon_L - \varepsilon_R)$$

- Залежність еліптичності від довжини хвилі називають *круговим дихроїзмом (КД)*. Вимірюється *дихрографом.*
- За допомогою методів ДОО і КД показано, що білки значно відрізняються за кількістю упорядкованих структур.
- Фібрилярні білки є високо упорядкованими, а глобулярні - менш упорядковані.
- Зміна температури, pH, денатурати зумовлюють перехід поліпептидного ланцюга від упорядкованої до неупорядкованої структури.



Конформаційні зміни полі-L-лізину. а – спектри кругового дихроїзму (КД) трьох конформацій: *1* - α-спіраль (pH=12; 295 К); 2 - β - структура (pH=12, нагрівання до 325 К і потім охолодження до 295 К); 3 – неупорядкований клубок (pH=5,7; 295 К); *б* – перехід клубок-спіраль при зміні pH.

Круговий дихроїзм (КД).
Блок-схема дихрографа для реєстрування спектрів



- 1 - джерело УФ-світла; 2 – монохроматор; 3 – поляризатор; 4 – кристал, який пропускає поперемінно L-чи R-компоненту; 5 – модулятор; 6 – кювета з оптично активною речовиною; 7 – фотоелектронний помножувач (ФЕП); 8 – електронна система реєстрації спектрів КД.

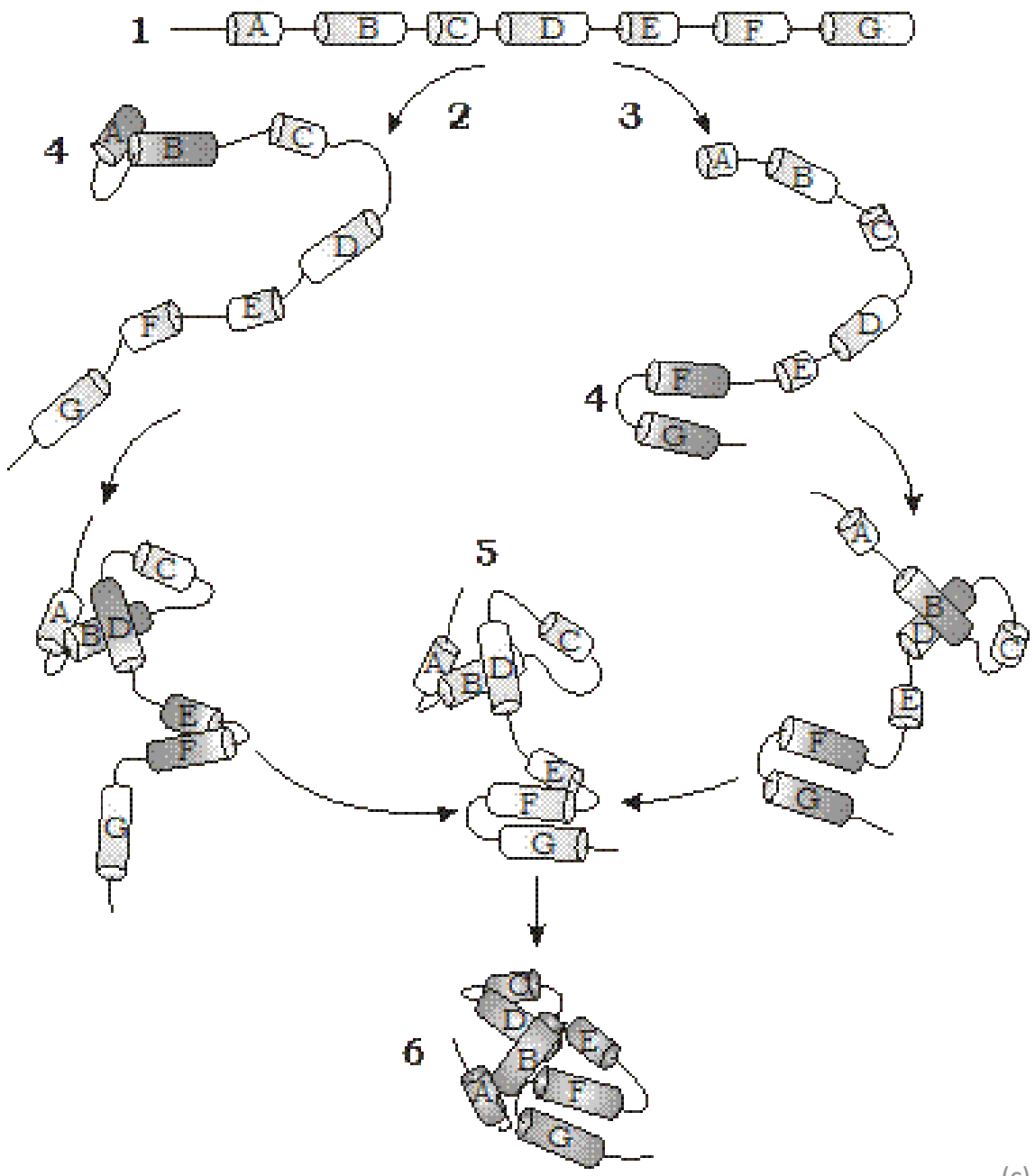


Схема згортання білкової глобули

1 - Розгорнутий поліпептидний ланцюг з локально сформованими структурами;

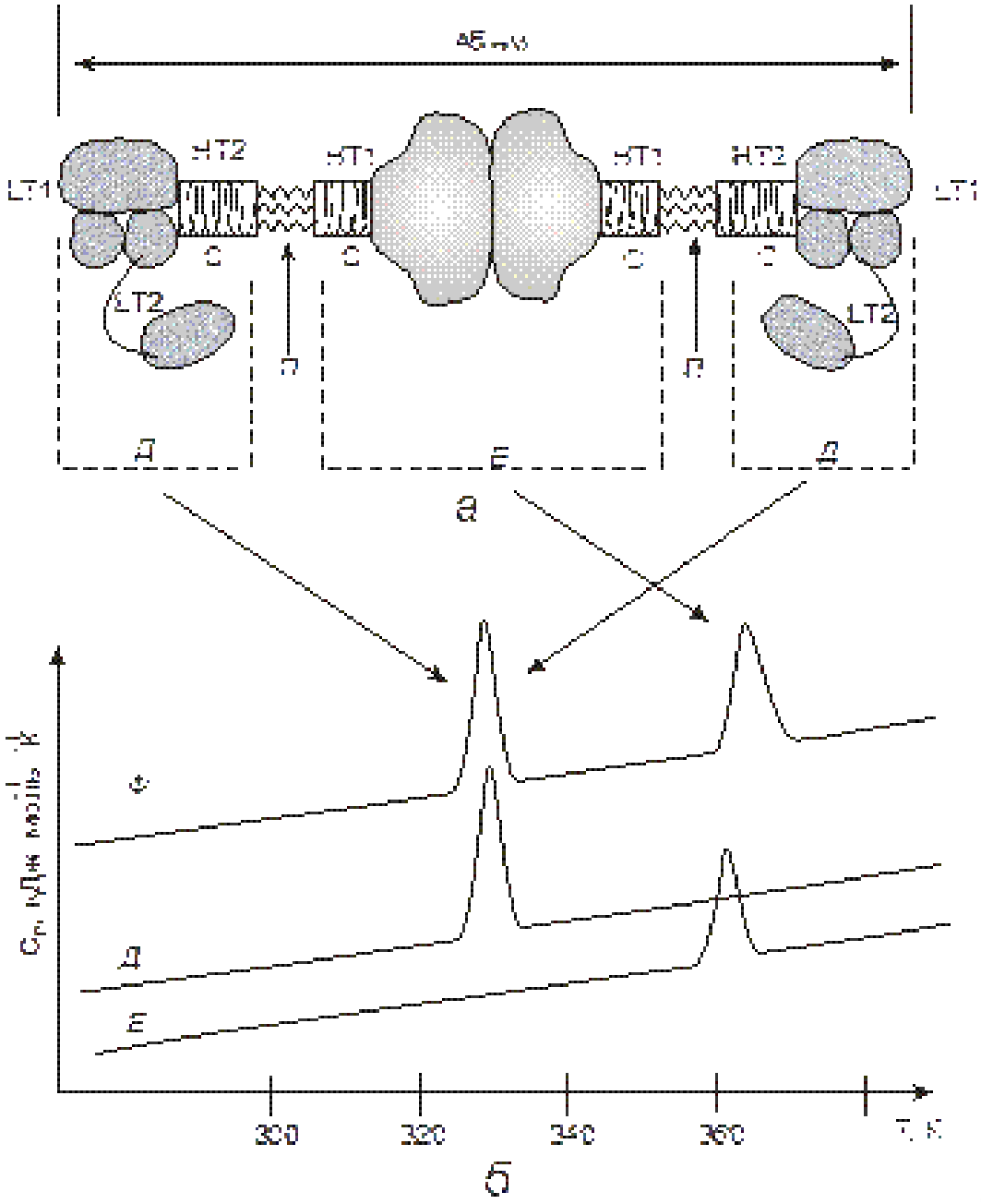
2 і 3 – два можливі шляхи згортання білкової глобули;

4 – асоціація сусідніх ділянок, завдяки чому утворюються стабільні упорядковані мікродомени (темніш циліндри);

5 – інтермедіат, який лімітує щвидкість процесу згортання;

6 – згорнута глобула білку.

Диференційна сканувальна мікрокалориметрія

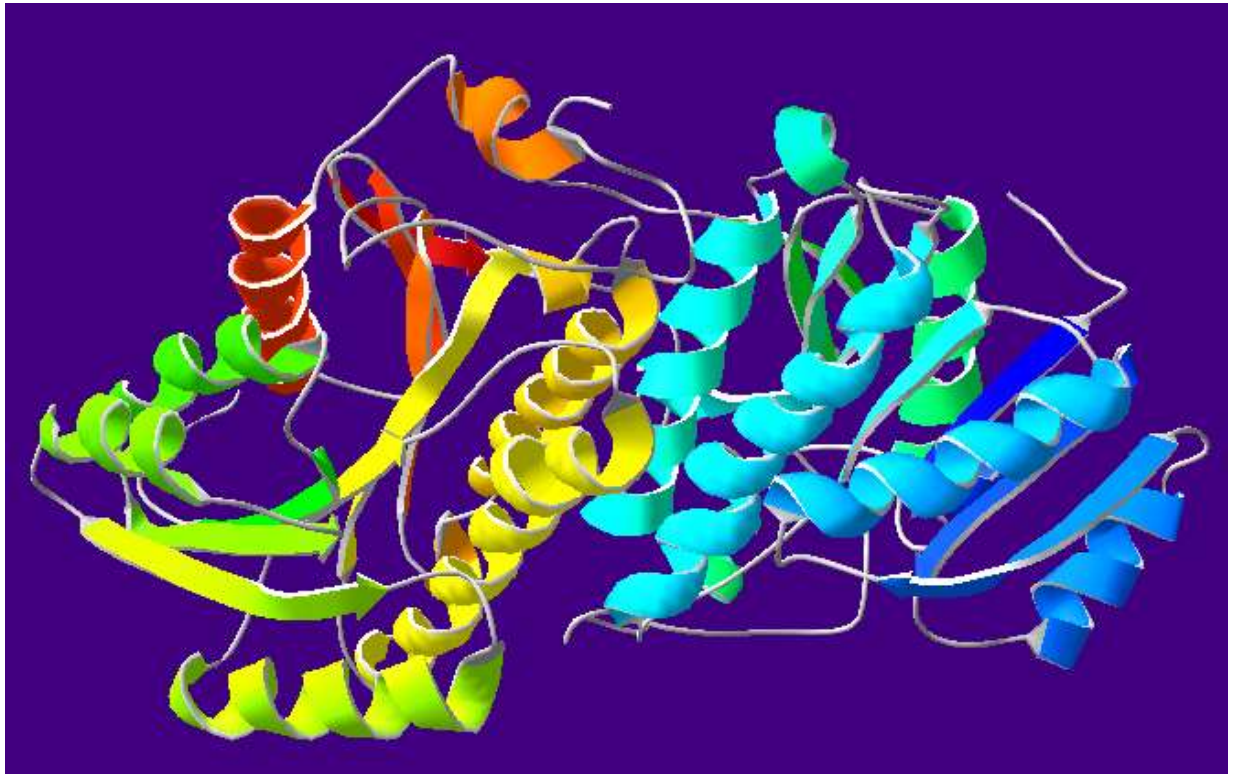


- Зміна ентальпії за розгортання макромолекули визначається кількістю теплоти, яка необхідна для підтримування температури обох зразків у *сканувальному мікрокалориметрі* (чутливість 16×10^{-6} Дж × моль$^{-1}$ × град$^{-1}$).
- Криві плавлення – це температурні залежності теплоємності C_p.
- Перехід білкової молекули з нативного в денатурований стан визначається на кривій плавлення піком C_P, якому відповідає температура плавлення білка $T_п$.
- Якщо в білку є структурні домени з різною термостійкістю, на кривій плавлення виявляється декілька піків C_p. Для фібриногену – це низькотемпературний з $T_п$=328 К і високотемпературний піки з $T_п$=368 К.

Криві плавлення та структурна організація фібриногену

- а – доменна будова молекули фібриногену: структурні домени LT1 і LT2, HT1 і HT2; С – суперспіральні ділянки; П – ділянки розщеплення плазміном;
- б – криві плавлення фібриногену Ф і його фрагментів Д і Е.

Алкогольдегідрогеназа (АДГ)



- Швидкі конформаційні зміни в ферменті необхідні для просторової підгонки функціональних груп в активному центрі до структури субстрату.
- Повільним великомасштабним конформаційним перебудовам АДГ печінки передують високочастотні дрібні флуктуації структури.
- АДГ складається із чьотирьох структурних доменів, між якими розміщений активний центр ферменту.

- Доступність субстрату до активного центру регулюється обертанням доменів навколо шарнірного з’єднання.
- АДГ може перебувати в двох конформаціях: відкритій, з великою щілиною між доменами, і закритій.
- Після завершення хімічної реакції фермент приймає відкриту конформацію і звільнюється від продуктів реакції. Спонтанний перехід між цими конформаціями відбувається за більш тривалий період (~10^{-9}с), ніж час локальних флуктуацій (10^{-12}с).
- Здійснення такого відносно повільного великомасштабного зміщення доменів у ферменті можливе тільки тоді, коли відбувається зниження до мінімуму енергетичного бар’єру обертання доменів.

(C) Babsky

Абсорбційна та диференційна спектрофотометрія

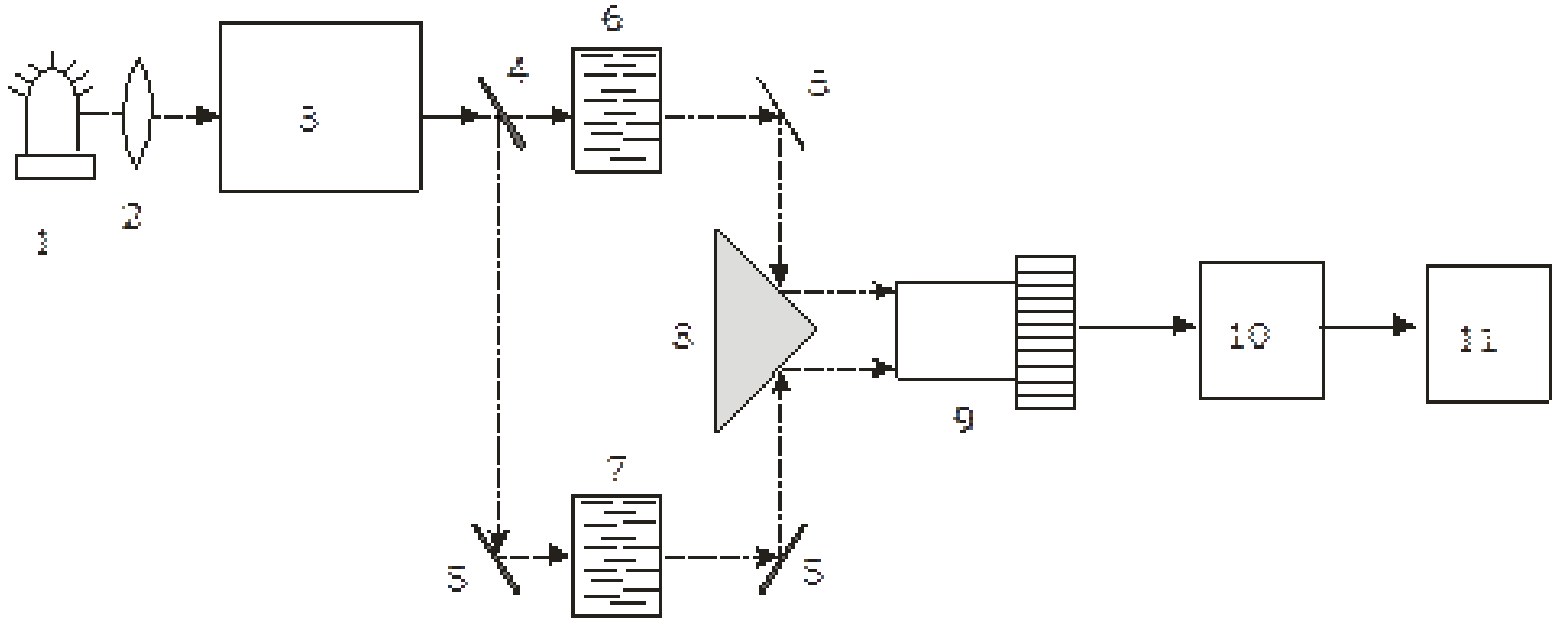
- Спектр поглинання білків в УФ-ділянці (230-310 нм) обумовлений поглинанням ароматичних амінокислот - триптофана, тирозина і фенілаланіна. Світло поглинають хромофорні групи цих амінокислот: індольне кільце в триптофані, фенольне кільце в тирозині і бензольне кільце в фенілаланіні.
- Основним законом абсорбційної спектрофотометрії є закон Ламберта-Бера:

$$I = I_0 e^{-knl},$$

де I – інтенсивність світла, яке пройшло через розчин досліджуваної речовини; Іо – інтенсивність світла, яке падає на кювету; n – кількість молекул в одиниці об'єму; k – ефективна площа поперечного розрізу молекули, яка поглинає кванти світла; l – товщина кювети.

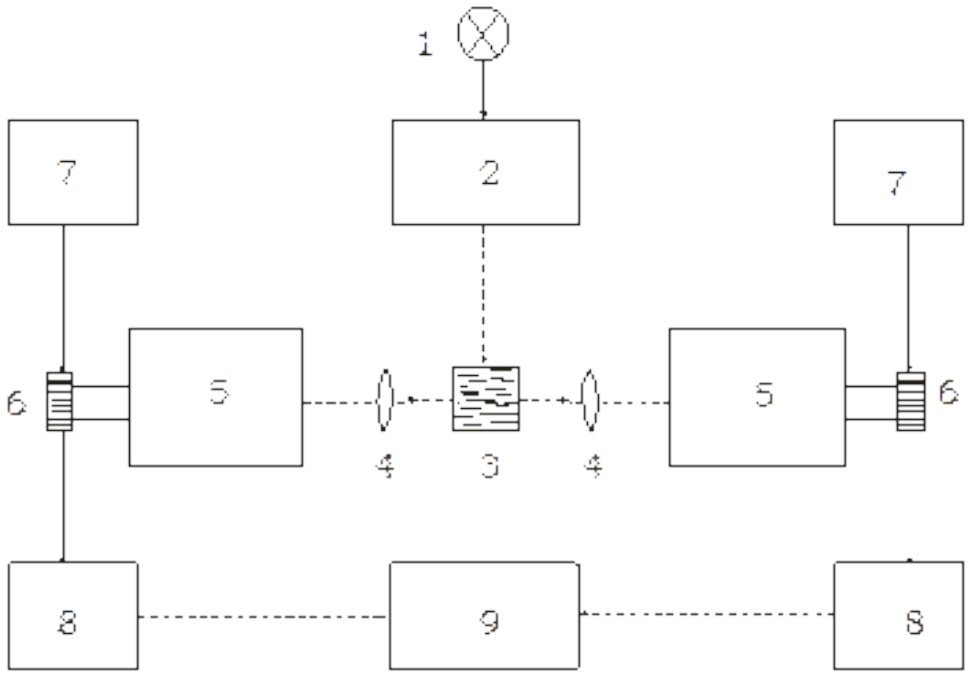
- Залежність оптичної густини від довжини хвилі світла λ називають ***спектром поглинання***.
- Спектри поглинання або спектри пропускання речовини реєструють на ***спектрофотометрах.***

Блок-схема спектрофотометра



- 1 – джерело світла; 2 – лінза; 3 – монохроматор; 4 – напівпрозоре дзеркало; 5 – відбиваючі дзеркала; 6 і 7 – кювети з розчином і розчинником, відповідно; 8 – призма; 9 – ФЕП; 10 – підсилювач; 11 – записуючий пристрій.

Блок-схема спектрофлуориметра



- 1 - джерело УФ – світла; 2 – монохроматор збудження; 3 – кювета з розчином; 4 – фокусуючі лінзи; 5 – монохроматор флуоресценції; 6 – ФЕП; 7 – високовольтний стабілізатор напруги; 8 – підсилювачі; 9 – комп’ютер.

- При збудженні молекул лінійно поляризованим світлом спостерігають поляризовану флуоресценцію зі **ступінню поляризації**:

$$P = \frac{I_f^{\parallel} - I_f^{\perp}}{I_f^{\parallel} + I_f^{\perp}}$$

чи **анізотропією**:

$$A = \frac{I_f^{\parallel} - I_f^{\perp}}{I_f^{\parallel} + 2I_f^{\perp}},$$

де $I_f^{\parallel}$ і $I_f^{\perp}$ *- інтенсивність флуоресценції при паралельному і перпендикулярному розміщенні поляризатора і аналізатора, відповідно.*

- Вимірюючи ступінь поляризації, можна визначити внутрішньомолекулярну рухомість хромофорних груп в білкових молекулах.

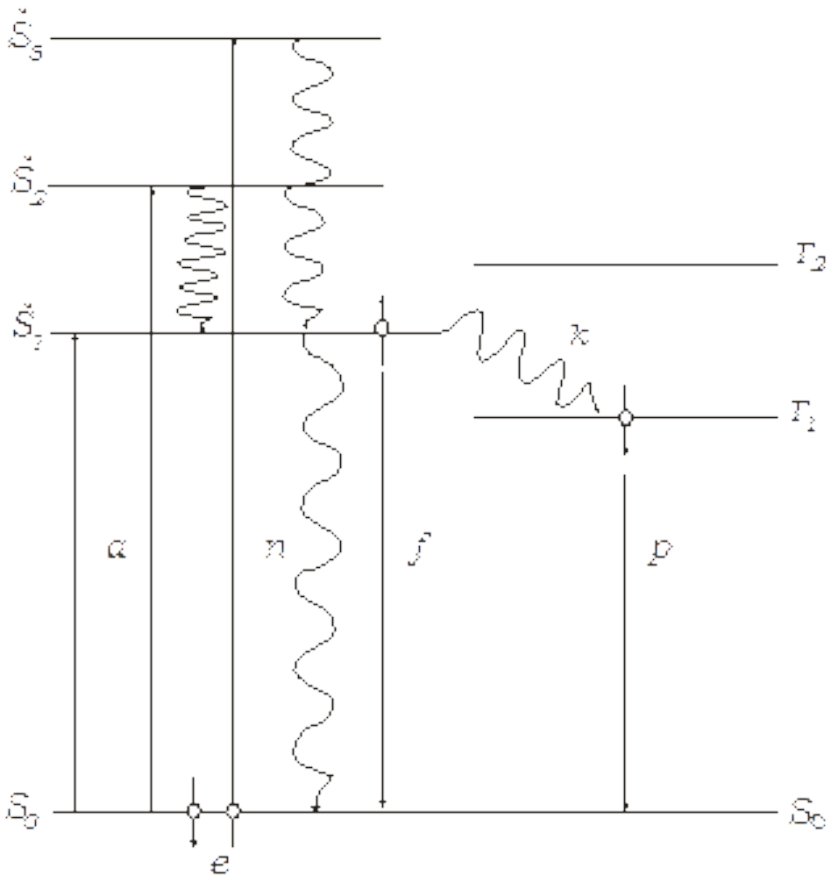
Флуоресцентна спектроскопія білків. Діаграма енергетичних рівнів

Спектрофлуориметр, FluoroMax-4P

Молекули білків поглинають кванти світла, енергія яких визначається за формулою Планка

$$E = h\nu\frac{c}{\lambda}$$

де ν - частота світла; λ - довжина хвилі світла; c – швидкість світла (c = 2, 9979×10^{8} м × с$^{-1}$); h – постійна Планка (h = 6,63 × 10^{-34} Дж × с).



- S – синглетні рівні; T – триплетні рівні; a – поглинання квантів світла; f – флуоресценція; P – фосфоресценція; n – внутрішня конверсія (безрадіаційні переходи); k – інтеркомбінаційна конверсія; e – електрон.

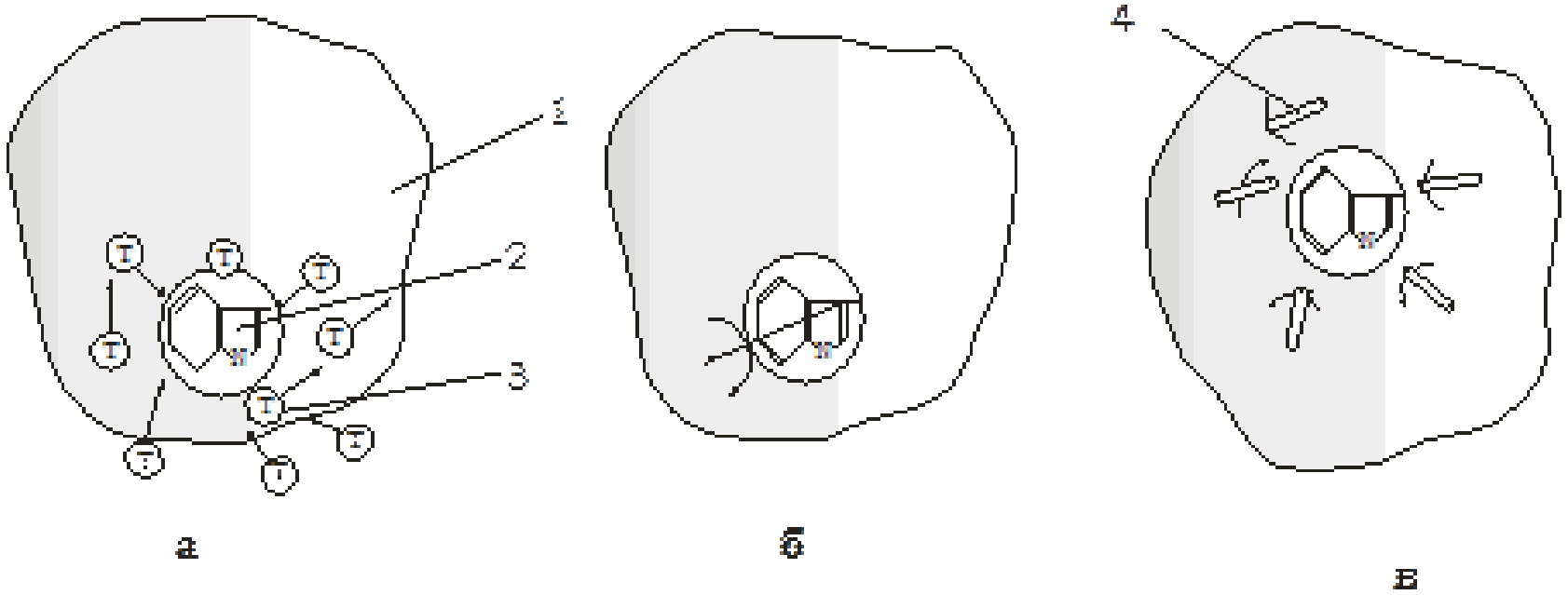
- Поглинені кванти світла переводять електрони з основного, незбудженого рівня S_0 на збуджені рівні S_1*, S_2*…, в залежності від енергії кванта.
- Збуджена молекула в нерівноважному стані повинна повернутися в рівноважний стан.
- Стрілками вниз показані шляхи дезактивації збудженої молекули: безвипромінювальна дисипація енергії через теплові коливання (хвилясті стрілки) і випромінювання квантів світла (прямі стрілки).
- Процес, який супроводжується випромінюванням квантів світла при переході електронів між синглетними рівнями S_1* і S_0 , називається *флуоресценцією*.

Процеси, які досліджують флуоресценцією

а. Гасіння флуоресценції триптофанових залишків, які заховані всередині білкової молекули, молекулами-гасіями (Cs^+, J^-, акриламід, O_2)

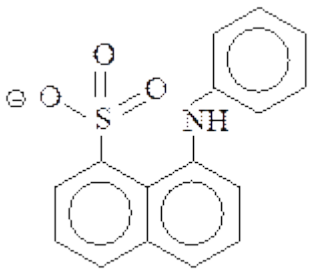
б. Аналіз обертальних рухів хромофорів через виміряну анізотропію флуоресценції *A(t)* з наносекундним часовим розділенням

в. Дослідження реорієнтаційної динаміки дипольних груп, які оточують хромофор

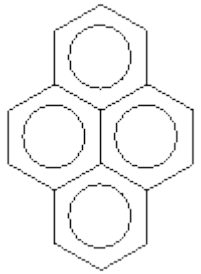


1 – білкова глобула; 2 – індольне кільце триптофану; 3 – гасії флуоресценції; 4 – дипольні групи.

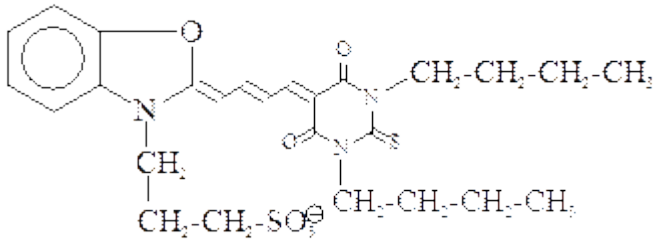
Флуоресцентні зонди



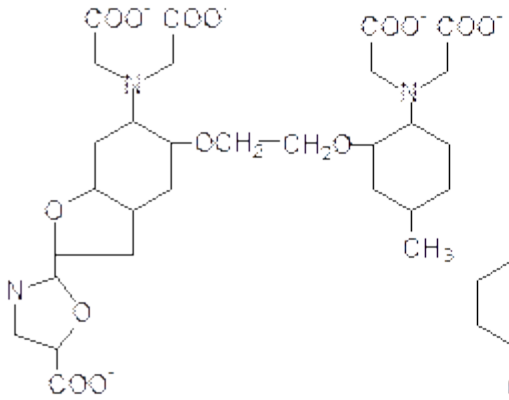
1-анілінонафталін-8-сульфонат (АНС)



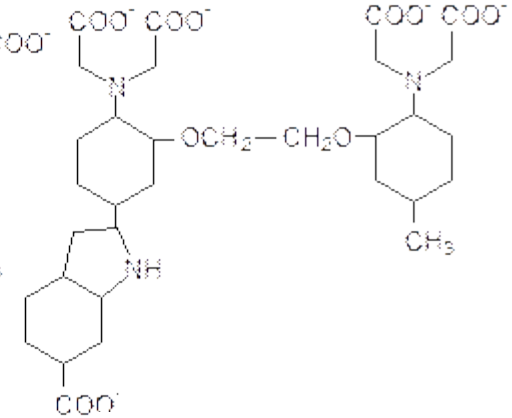
Пірен



Мероціанін 540



Фура-2



Індо-1

Додаткова література

1. Костюк П.Г., Зима В.Л., Магура І.С. та ін.. Біофізика. – Київ: вид-во «Київський університет», 2008. – 567 с.
2. Посудін Ю.І. Біофізика: Підручник.– Київ: вид-во НАУ, 2016. – 451 с.
3. Санагурський Д.І. Об’єкти біофізики. – Львів: вид-во ЛНУ імені Івана Франка, 2008. – 522 с.
4. Таланов С.О., Федоренко О.А., Плиска О.І., Лазоришинець В.В. Біофізика: Курс лекцій. - Київ: вид-во НПУ імені М.П.Драгоманова, 2014. – 209 с.
5. Тіманюк В.О., Животова О.М. Біофізика: Навч. посібн. для студ. фармац. вищ. навч. закладів. - Харків: вид-во НФАУ: Золоті сторінки, 2001. – 204 с.