

Biofizyka

(1100-114BFIZ11)

Jan M. Antosiewicz

**Zakład Biofizyki
Instytut Fizyki Doświadczalnej
Wydział Fizyki**

Wykład 6

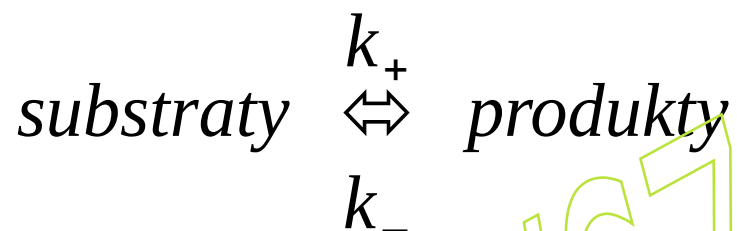
25 marca, 2025

Kinetyka biomolekularna (cz. 2)

<http://www.fuw.edu.pl/~jantosi/>

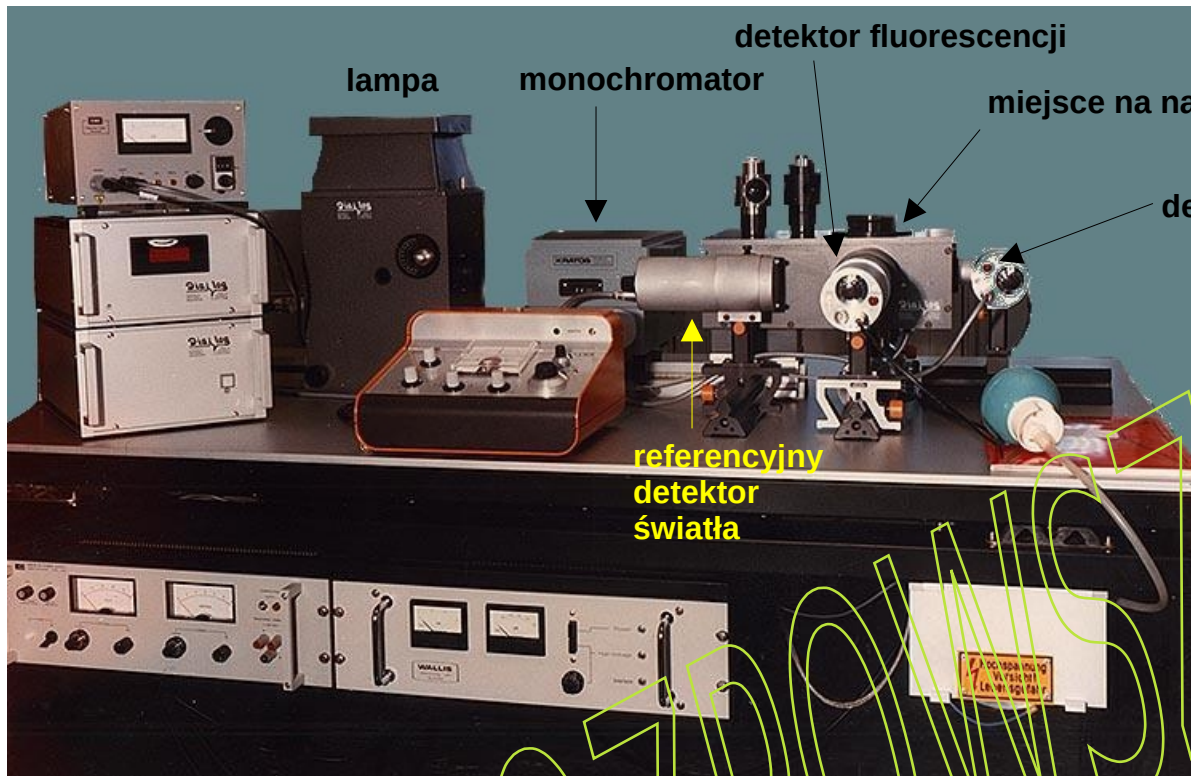
jantosi@fuw.edu.pl

Spektrometria skoku temperatury (T-jump)



$$K = \frac{k_+}{k_-}$$

$$\frac{\partial \ln K}{\partial T} = \frac{\Delta H^\ominus}{RT^2}; \quad \frac{\partial \ln K}{\partial T} = \frac{1}{K} \frac{\partial K}{\partial T}; \quad \Rightarrow \quad \frac{\Delta K}{K} = \frac{\Delta H^\ominus}{RT^2} \Delta T$$

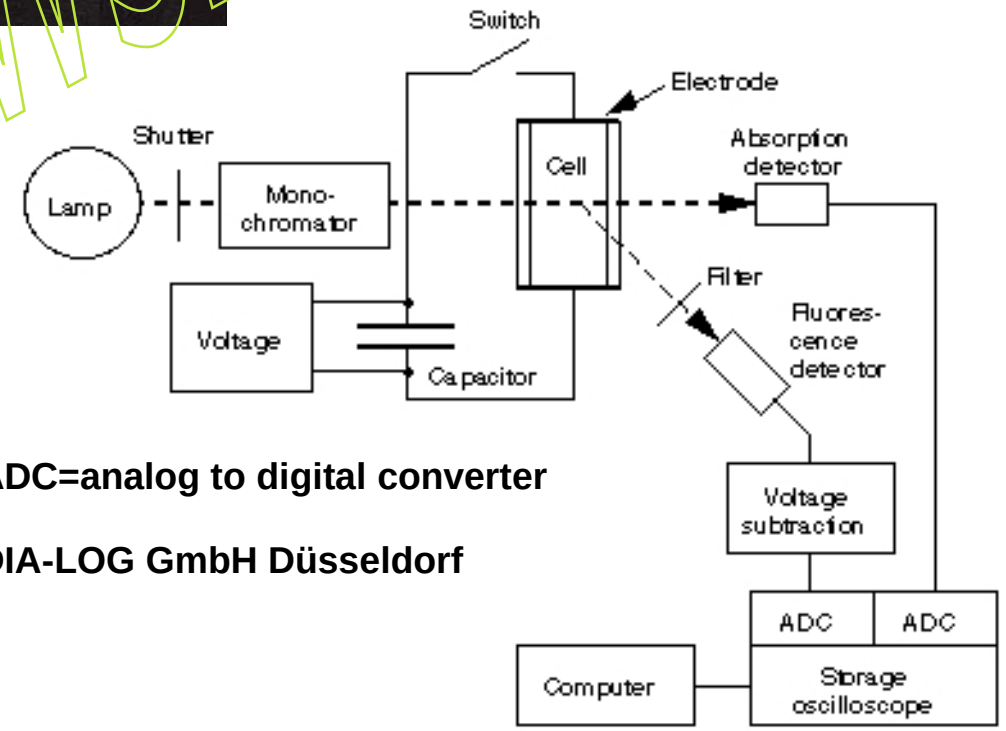
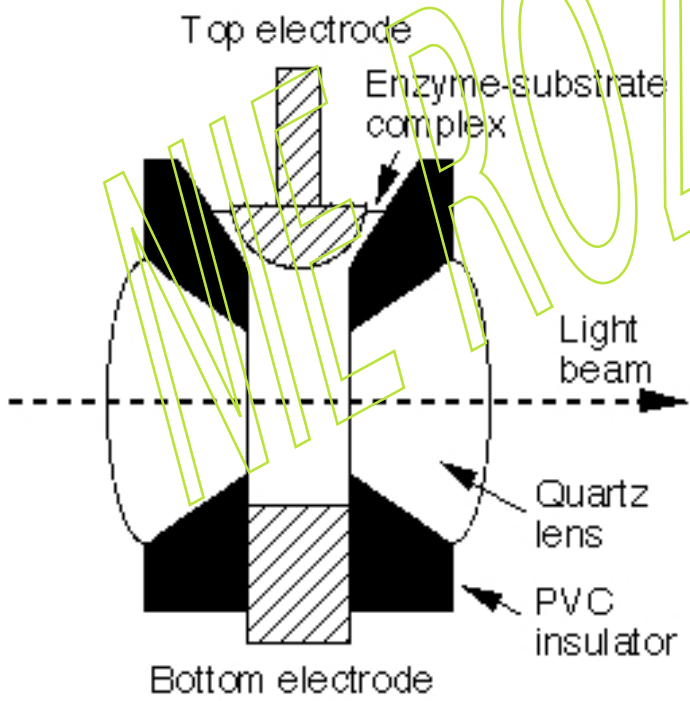


$$U = \frac{1}{2} \frac{Q_o^2}{C} = \frac{1}{2} C V_o^2$$

$$i(t) = \frac{V_o}{R} \exp\left(-\frac{t}{RC}\right)$$

$$\Delta T_o = \frac{C V_o^2}{2} \frac{1}{c_p v d}$$

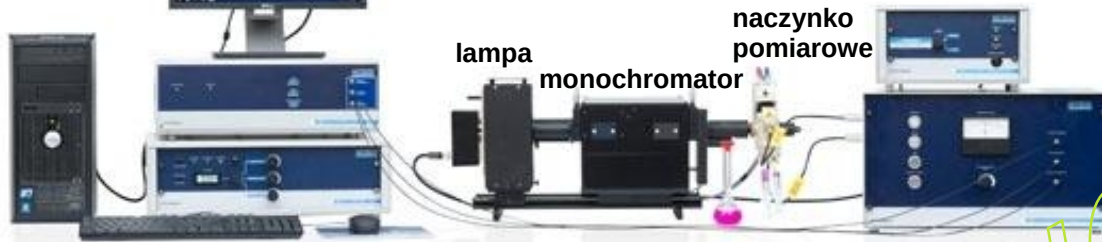
Z $V_o = 2 \times 10^4$ V, $C = 5 \times 10^{-8}$ F, $R = 100 \Omega$ (co odpowiada 0.1 M roztworowi soli), $c_p = 4.2$ J/g·K, $v = 1$ cm³, $d = 1$ g/cm³, dostajemy $\Delta T_o = 2.4^\circ\text{C}$ i $(RC/2) = 2.5 \mu\text{s}$.



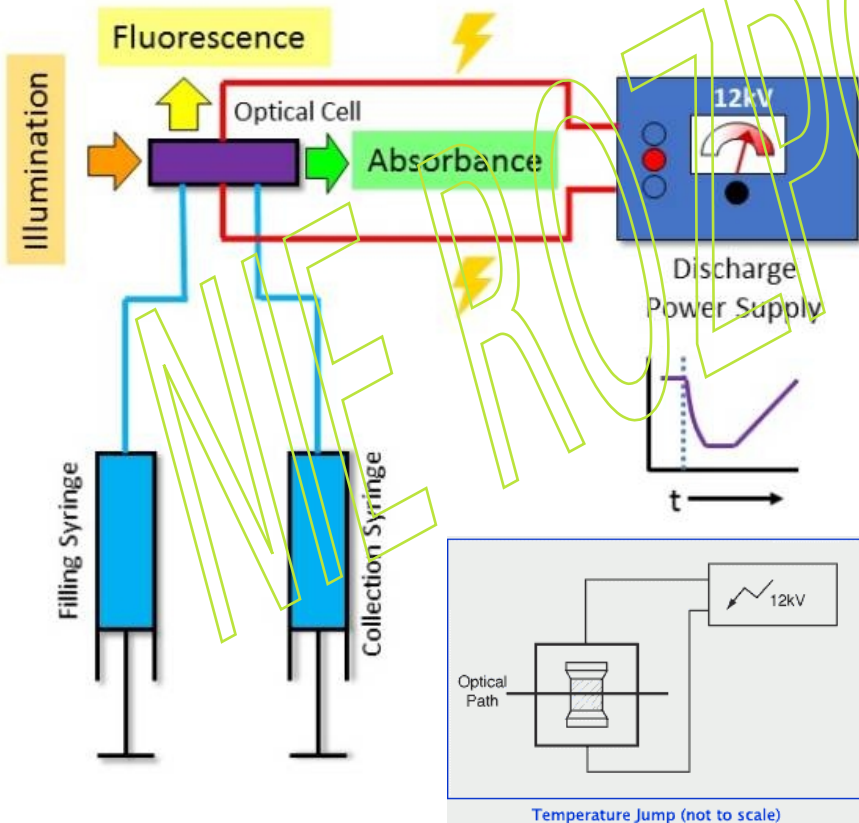
ADC=analog to digital converter

DIA-LOG GmbH Düsseldorf

TgK Scientific, 7 Long's Yard St Margaret's
Street, Bradford on Avon BA15 1DH
United Kingdom



Temperature-Jump System, TJ-64



System skoku temperatury TJ-64 firmy TgK Scientific to przyrząd wykorzystujący metodę ogrzewania Joule'a, w której wyładowanie elektryczne powoduje szybką zmianę temperatury 100 μ l objętości reakcji, zaburzając w ten sposób jej równowagę. Przyrząd ten umożliwia skoki temperatury do 10°C w ciągu kilku mikrosekund.

System składa się z termostatowanego naczynka połączonego bezpośrednio z układem optycznym z możliwością detekcji absorpcji i fluorescencji. System wykorzystuje zasilacze magazynujące energię pod wysokim napięciem w kondensatorach. Energia kondensatorów jest szybko rozładowywana poprzez badaną próbkę.

A Nanosecond Temperature-Jump Apparatus (z ogrzewaniem Joule'a, za pomocą kabla koncentrycznego*)

G. W. Hoffman

Charakterystyka rozładowania kabla koncentrycznego nie jest taka sama jak w przypadku zwykłego kondensatora, ponieważ kabel ma zarówno właściwości indukcyjne, jak i pojemnościowe. W przypadku kabla bezstratnego najważniejszymi parametrami jest impedancja Z , określona przez

$$Z = (L/C)^{1/2}$$

oraz prędkość propagacji v , dana wzorem

$$v = (LC)^{-1/2}$$

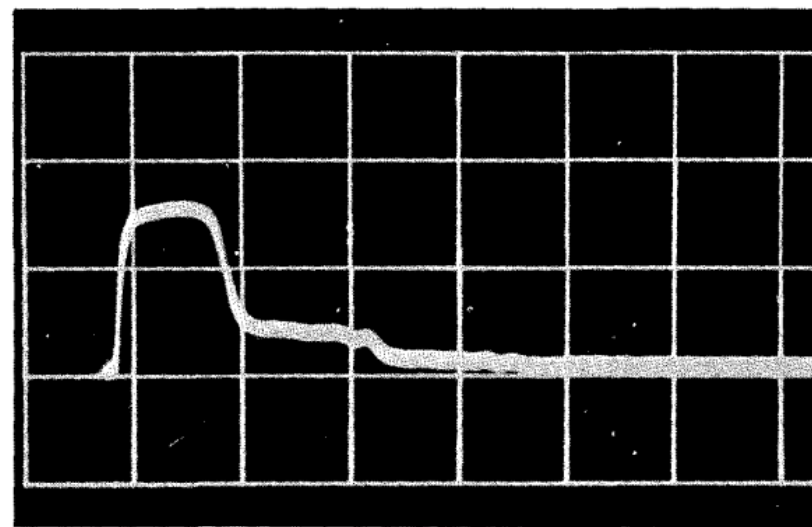
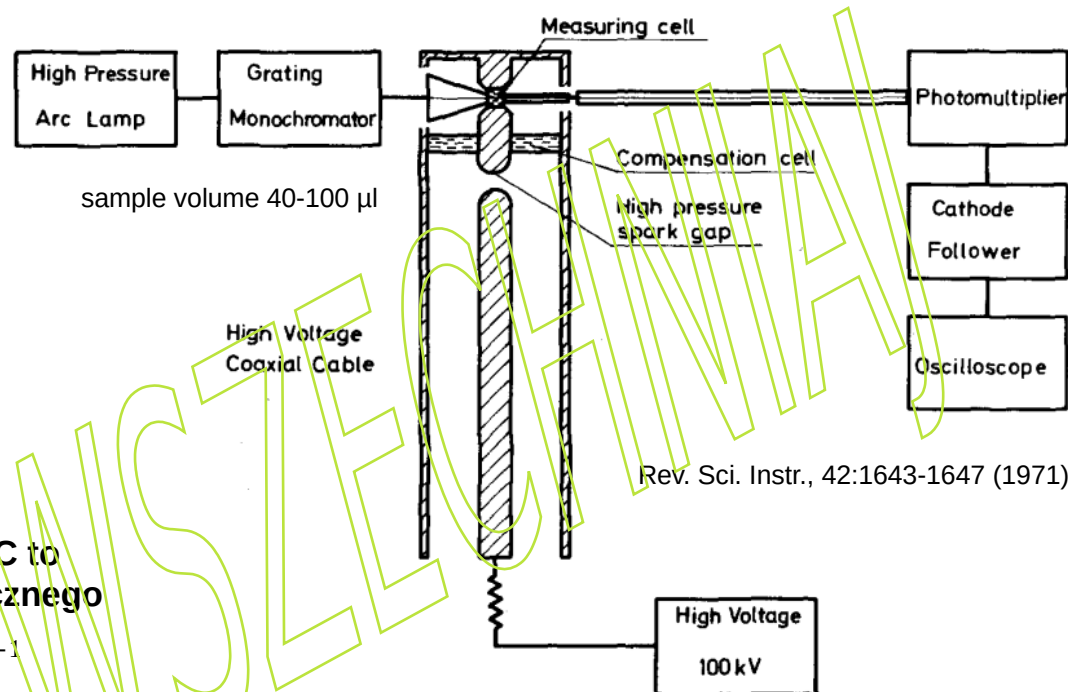
gdzie L to indukcyjność kabla na jednostkę długości, a C to pojemność na jednostkę długości. Dla kabla koncentrycznego

$$L = (\mu/2\pi) \cdot \ln(b/a) \quad \text{and} \quad C = (2\pi\epsilon) [\ln(b/a)]^{-1}$$

gdzie a i b to promienie odpowiednio wewnętrznego i zewnętrznego przewodnika oraz gdzie μ to przenikalność magnetyczna, a ϵ to stała dielektryczna izolatora. Zatem

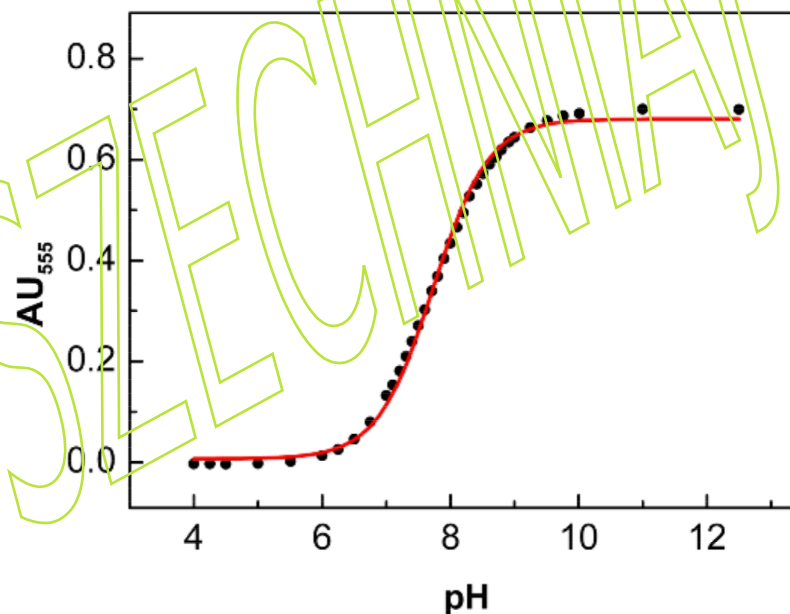
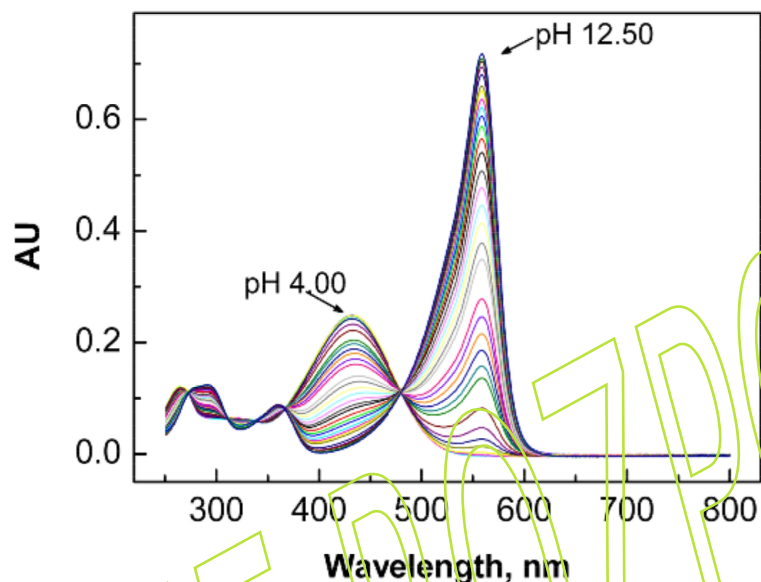
$$Z = (1/2\pi)(\mu/\epsilon)^{1/2} \ln(b/a) \quad \text{i} \quad v = (\mu\epsilon)^{-1/2}$$

Czas t_0 przesłania fali elektromagnetycznej wzdłuż kabla o długości s wyraża się wzorem $t_0 = s/v$.



Forma impulsu prądu rozładowania ($R=50 \Omega$, $Z=28 \Omega$). Skala pozioma 50 ns/dz. Zatem wymóg dopasowania nie jest bardzo krytyczny. Wewnętrzny przewodnik jest ładowany do napięcia do 100 kV. Jest on odizolowany od naczynka próbek za pomocą iskriennika wysokociśnieniowego. Wyładowanie następuje poprzez zawór magnetyczny uwalniający to ciśnienie (około 10 atm).

*Kabel koncentryczny składa się z wewnętrznego przewodnika otoczonego koncentryczną osłoną przewodzącą, przy czym oba te elementy są oddzielone dielektrykiem (materiałem izolacyjnym). Prędkość propagacji, z jaką sygnał elektryczny może roszodzić się w kablu jest porównywalna z prędkością światła.

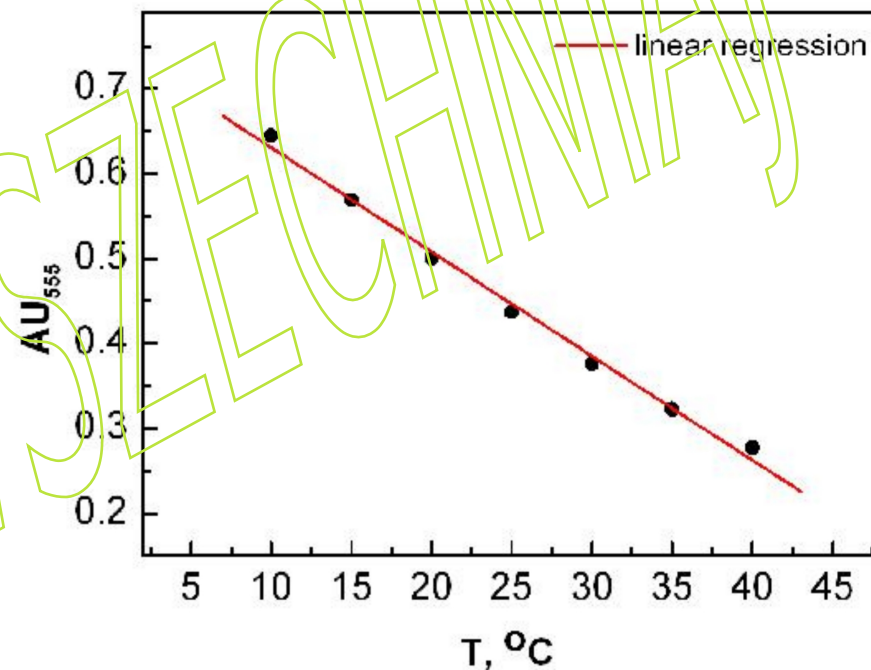
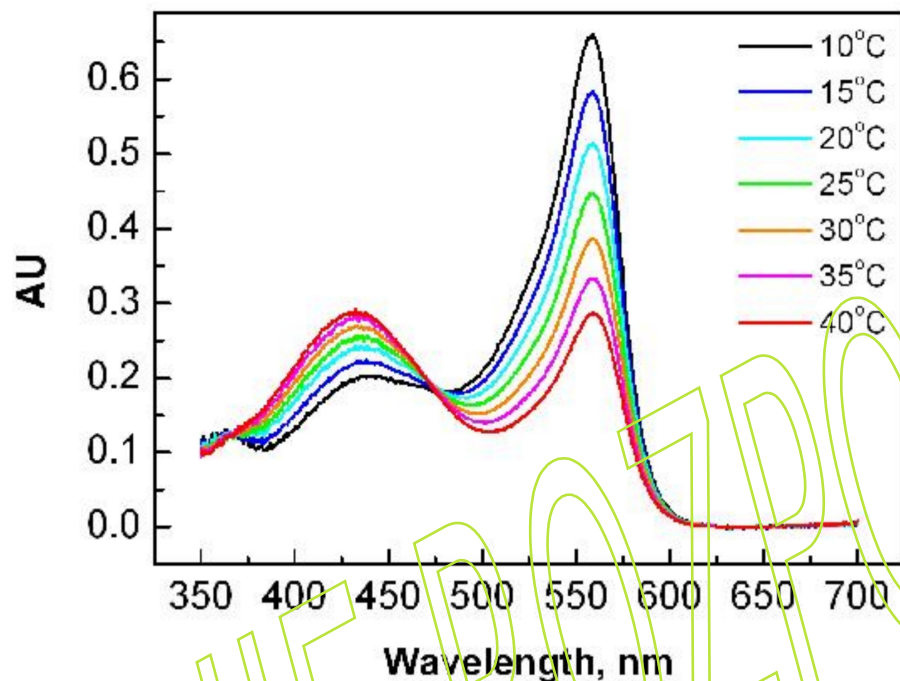


Kalibracja obserwowanych zmian temperatury w spektrometrze T-jump, odpowiadających przyłożonym napięciom wyładowania. Bada się sprzężoną reakcję Tris/czerwień fenolowa za pomocą analizy amplitudy relaksacji. Czerwień fenolowa jest powszechnie stosowanym wskaźnikiem pH z dobrze określoną zmianą koloru podczas protonowania/deprotonowania. Tris jest buforem o działaniu znacząco zależnym od temperatury, z pK_a równym 8.21 w 21 °C i $\Delta pK_a/\Delta T = -0.027/^\circ C$. Czerwień fenolowa ma $\Delta pK_a/\Delta T = -0.006/^\circ C$. **Lewa:** Zależność od pH absorbancji czerwieni fenolowej w 100 mM roztworze Tris w temperaturze 25 °C. **Prawa:** Absorbancja przy 555 nm wykreślona z funkcją dopasowania pH (czerwona linia) do:

$$AU_{555} = AU_{max} + \frac{AU_{min} - AU_{max}}{1 + 10^{pH - pK_a}}$$

z $pK_a = 7.73 \pm 0.01$ pomiary z użyciem spektrometru Varian's Cary 50.

TEMPERATURE CALIBRATION OF T-JUMP INSTRUMENT TJ-64 USING TRIS/PHENOL RED

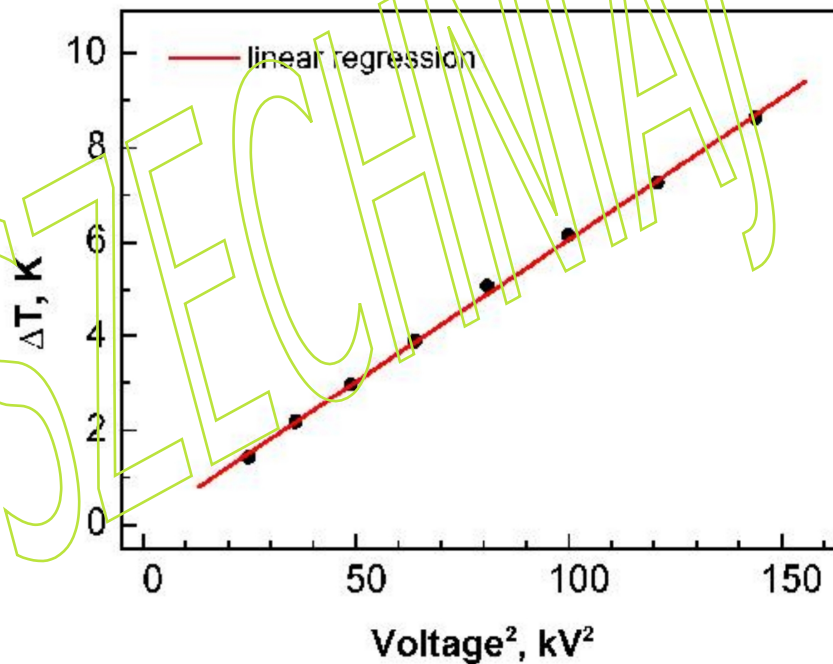
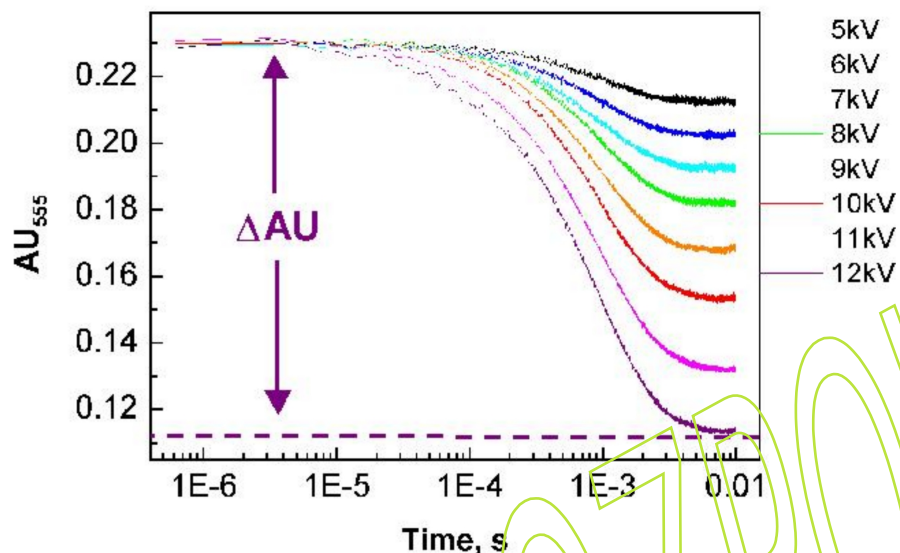


Lewa: Widma absorbancji czerwieni fenolowej w 100 mM Tris, pH 7,7 (w 25 °C) mierzone w różnych temperaturach.

Prawa: Zależność temperaturowa absorbancji deprotonowanej formy czerwieni fenolowej przy 555 nm. Nachylenie, dAU_{555}/dT , wynosi $-0.0123 \pm 0.0004 AU_{555}/^{\circ}C$

$$AU_{555}(T) = \frac{d AU_{555}}{dT} \cdot T + AU_{ref}$$

TEMPERATURE CALIBRATION OF T-JUMP INSTRUMENT TJ-64 USING TRIS/PHENOL RED



Pomiary zmian absorbancji roztworu Tris/czerwień fenolowa przy skoku temperatury przeprowadzonego przy rozładowaniu napięć w zakresie od 5 do 12 kV.

Lewy: Krzywe relaksacji T-Jump czerwieni fenolowej w 100 mM Tris, pH 7,7, od $20\text{ }^{\circ}C$, mierzone przy różnych napięciach rozładowania w TJ-64. Zmiany absorbancji przekształcono na zmiany temperatury, korzystając z nachylenia wykresu z poprzedniego slajdu.

Prawy: Zależność pomiędzy wielkością skoku temperatury (ΔT) a napięciem rozładowania. Nachylenie określone metodą regresji liniowej wynosi $+0.0603 \pm 0.0008\text{ }^{\circ}C/kV^2$

Pomiar amplitudy relaksacji w doświadczeniu skoku T

Napięcie fotopowielacza jest proporcjonalne do natężenia światła padającego: $P \propto I$.

$$A = \sum_j \epsilon_j c_j l; \quad A = \log_{10}(I_0/I); \quad I = I_0 \cdot 10^{-A} = I_0 \cdot \exp(-2.303 A)$$

$$\bar{P} \equiv P^f; \quad \bar{I} \equiv I^f; \quad \bar{A} \equiv A^f; \quad \bar{c}_j \equiv c_j^f$$

$$\Delta P \equiv P - \bar{P}; \quad \Delta I \equiv I - \bar{I}; \quad \Delta A \equiv A - \bar{A}; \quad \Delta c_j \equiv c_j - \bar{c}_j$$

$$A = \sum_j \epsilon_j c_j l = \sum_j \epsilon_j (\bar{c}_j + \Delta c_j) l = \sum_j \epsilon_j \bar{c}_j l + \sum_j \epsilon_j \Delta c_j l \equiv \bar{A} + \Delta A$$

$$I = I_0 \cdot \exp(-2.303 A) = I_0 \cdot \exp[-2.303(\bar{A} + \Delta A)] = I_0 \cdot \exp(-2.303 \bar{A}) \cdot \exp(-2.303 \Delta A)$$

$$I = \bar{I} \cdot \exp(-2.303 \Delta A) \quad \text{ale również:} \quad I = \bar{I} + \Delta I$$

$$\frac{\bar{I} + \Delta I}{\bar{I}} = \exp(-2.303 \Delta A) \Rightarrow \ln\left(1 + \frac{\Delta I}{\bar{I}}\right) = -2.303 \Delta A$$

$$\ln\left(1 + \frac{\Delta I}{\bar{I}}\right) \approx \frac{\Delta I}{\bar{I}} \Rightarrow \frac{\Delta I}{\bar{I}} \approx -2.303 \Delta A$$

$$P \propto I; \quad \bar{P} \propto \bar{I}; \quad \Delta P \propto \Delta I;$$

$$\frac{\Delta P}{\bar{P}} \approx -2.303 \Delta A = -2.303 \sum_j \epsilon_j \Delta c_j l$$

Wprowadzimy zmianę temperatury do ostatniego wyrażenia ...

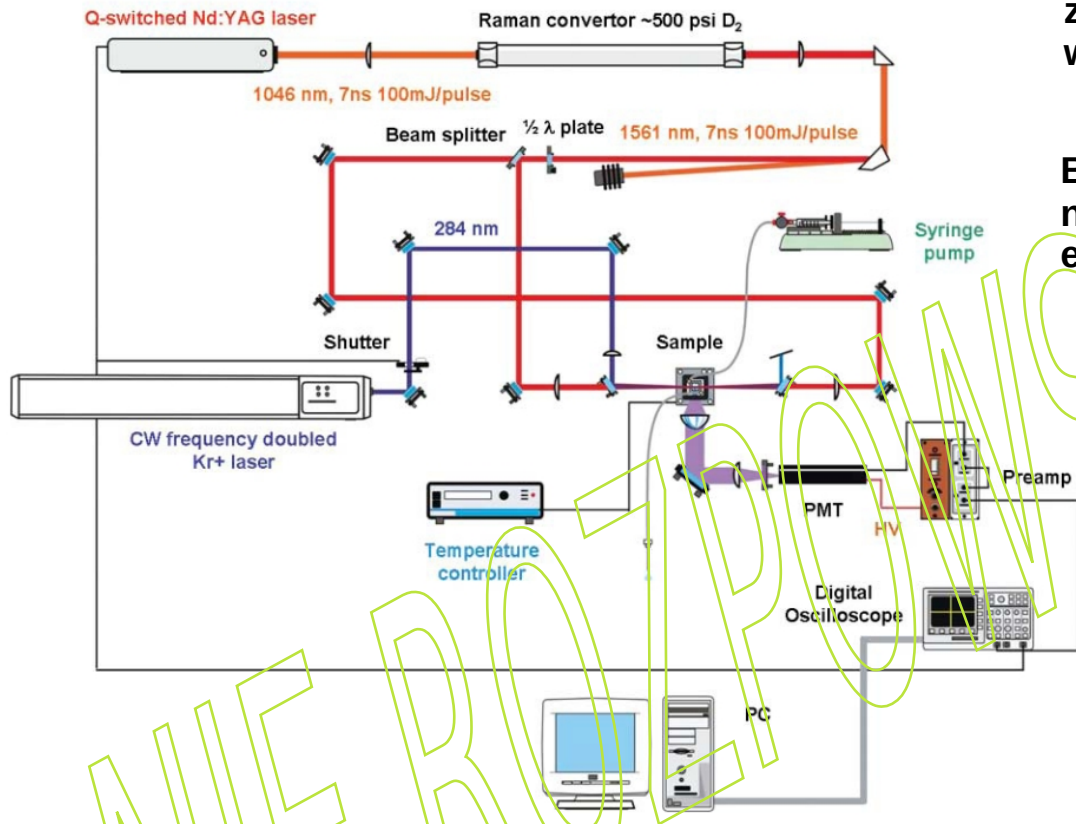
$$P^i \propto I^i; \quad P^f \propto I^f; \quad \Delta P^o = P^f - P^i \propto I^f - I^i = \Delta I^o;$$

$$\frac{\Delta P^o}{P^f} = \frac{\Delta I^o}{I^f} \Rightarrow \frac{\Delta P^o}{\bar{P}} = \frac{\Delta I^o}{\bar{I}} \approx -2.303 \Delta A^o \Rightarrow \Delta A^o = -\frac{\Delta P^o}{2.303 \bar{P}}$$

$$A = f(T) \Rightarrow dA = \left(\frac{dA}{dT} \right) dT \Rightarrow \Delta A^o = \left(\frac{dA}{dT} \right) \Delta T^o$$

$$\Delta T^o = -\frac{\Delta P^o}{2.303 \cdot (dA/dT) \cdot \bar{P}}$$

Time-resolved methods in biophysics. 9. Laser temperature-jump methods for investigating biomolecular dynamics, Photochem. Photobiol. Sci., 2009, 8, 499-512; Jan Kubelka



Schematyczny układ laserowego instrumentu do pomiaru skoku temperatury Narodowego Instytutu Zdrowia (NIH). Photochem. Photobiol. Sci., 8:499-512 (2009)

Użycie lasera w eksperymentach T-jump zaproponowano już w latach 60-tych XX wieku, wkrótce po pojawieniu się laserów impulsowych.

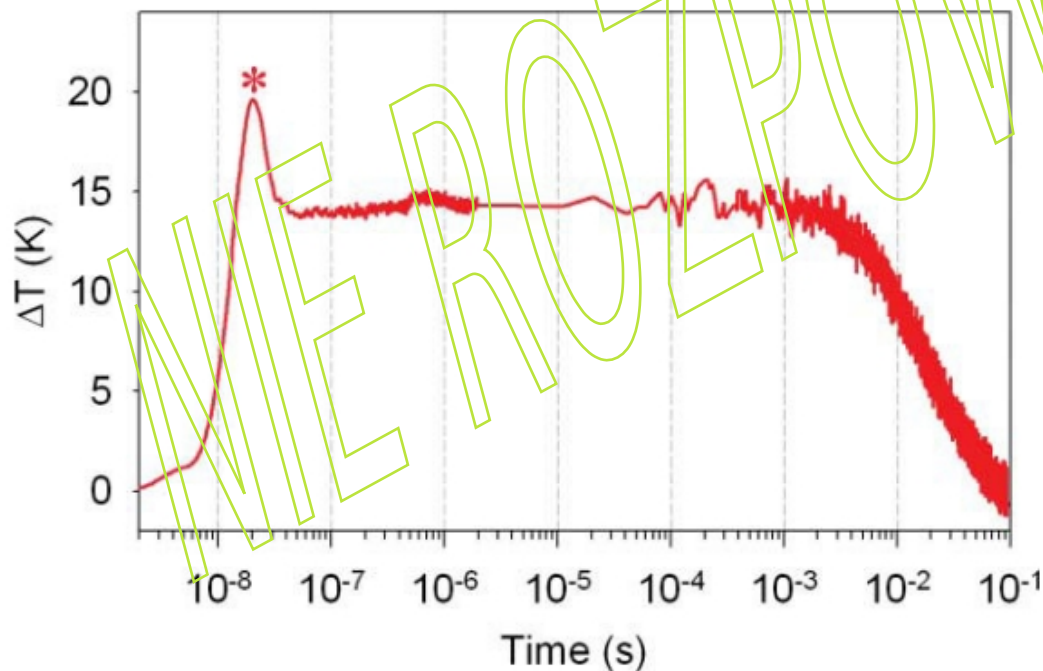
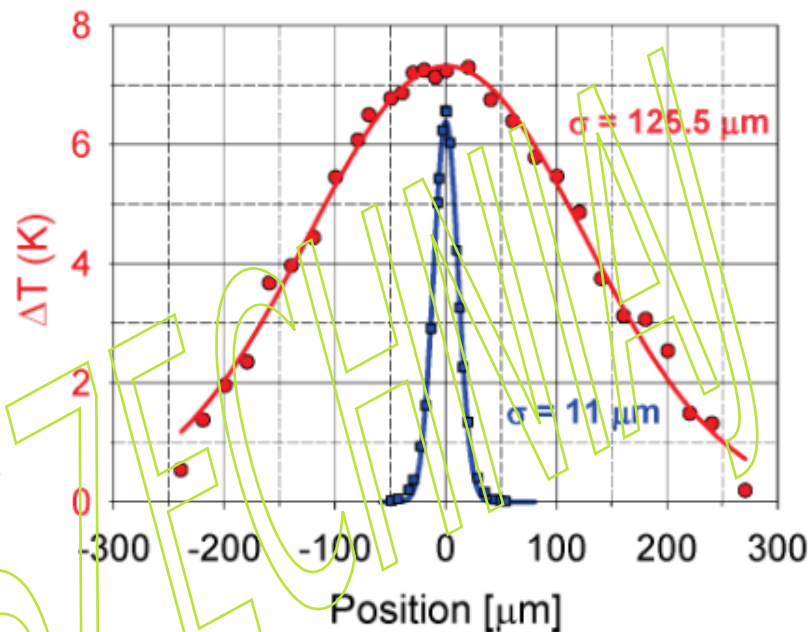
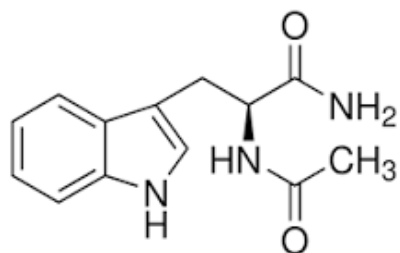
Bezpośrednie ogrzewanie wodnego rozpuszczalnika wymaga impulsów bliskiej podczerwieni o energii kilku mJ w zakresie od 1300 do 2200 nm.

Intensywne impulsy laserowe o pożądanych długościach fal można uzyskać poprzez konwersję Ramana łatwo dostępnych laserów z przełączaniem Q.

W ciągu ostatniej dekady opracowano około tuzina laserowych przyrządów do wykonywania skoków temperatury. Układy te są podobne do siebie, różnice dotyczą głównie rejestracji zmian zachodzących w roztworze po skoku temperatury.

Laserowy aparat T-jump (przedstawiony powyżej), został zaprojektowany do pomiarów kinetyki fałdowania białek przy użyciu fluorescencji tryptofanu (Trp) jako sondy. Skok temperatury jest generowany przez laser Nd:YAG z przełączaniem Q (tzw. Q-switch), który wytwarza impulsy 7 ns, 300 mJ przy 1064 nm. Moc wyjściowa lasera Nd:YAG jest przesuwana przez komórkę Ramana wypełnioną D₂ pod ciśnieniem 500 psi, wytwarzającą ~15 mJ na impuls przy 1562 nm. Impuls jest rozdzielany na dwie przeciw-bieżne wiązki, skupiane na kuwecie próbki, powodując skoki temperatury od 15 K (przy ~293 K) do 10 K (przy ~333 K). Fluorescencję Trp wzbudza się przy 284 nm przy użyciu lasera kryptonowego CW. Lasery kryptonowe mogą emitować światło widzialne w pobliżu kilku różnych długości fal, zwykle 406,7 nm, 413,1 nm, 415,4 nm, 468,0 nm, 476,2 nm, 482,5 nm, 520,8 nm, 530,9 nm, 568,2 nm (podwojenie częstości daje 284.1 nm), 647,1 nm i 676,4 nm.

Eksperymentalne profile wiązek bliskiej podczerwieni (ogrzewanie) i UV (sonda) w spektrometrze T-jump Kubelki. Skok temperatury w H₂O mierzono za pomocą zależnej od temperatury fluorescencji N-acetylotryptofanuamidu (NATA).



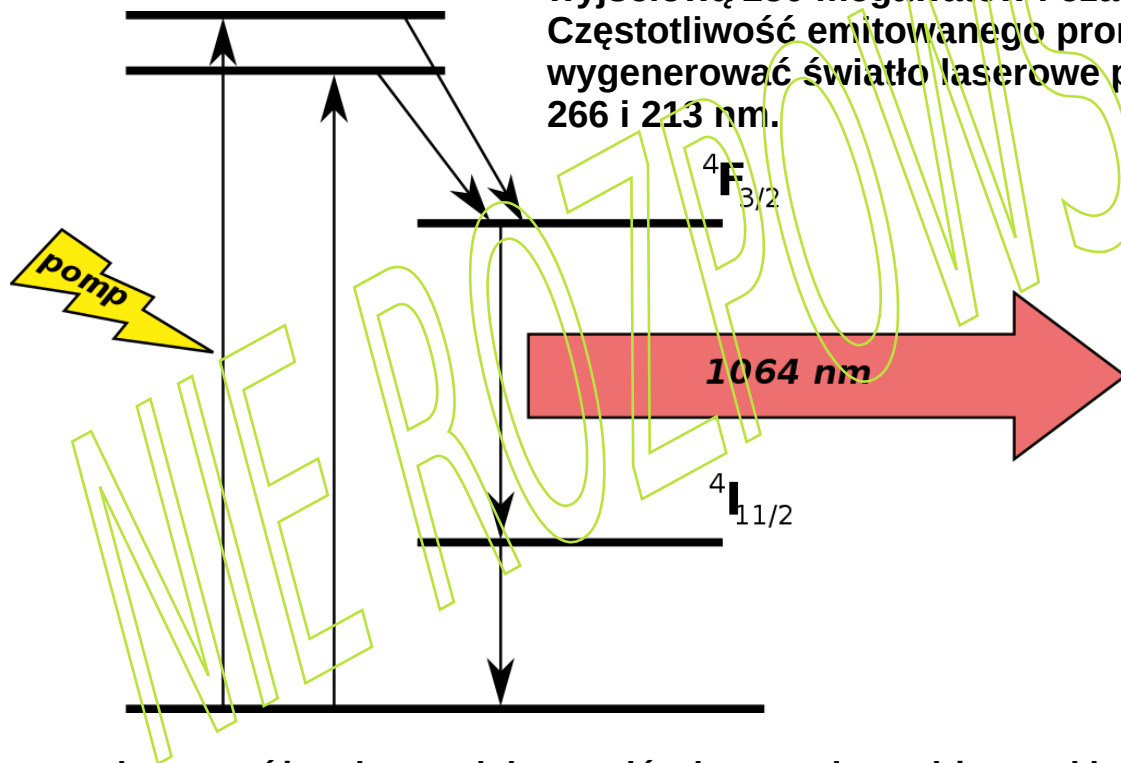
Czasowy profil zmian temperatury w spektrometrze T-jump Kubelki. Temperaturę kalibrowano za pomocą fluorescencji NATA. Gwiazdka oznacza eksperymentalny artefakt („kolec”). Temperatura pozostaje w przybliżeniu stała przez około 3 ms, a próbka jest skutecznie schładzana do temperatury początkowej przez ~100 ms. Aby zapewnić całkowitą relaksację termiczną, jak również optymalną wydajność ogniwa Ramana, doświadczenie przeprowadza się z częstotliwością 1,67 Hz. Aby zredukować fotouszkodzenie Trp przez promieniowanie UV, stosuje się szybką migawkę, która blokuje wiązkę UV pomiędzy rejestracjami dla kolejnych skoków temperatury. Aby jednak całkowicie wyeliminować utratę sygnału na skutek fotowybielania, pomiary prowadzi się ze specjalnie opracowaną kuetwą przepływową.

Laser Nd:YAG



pręt laserowy Nd:YAG

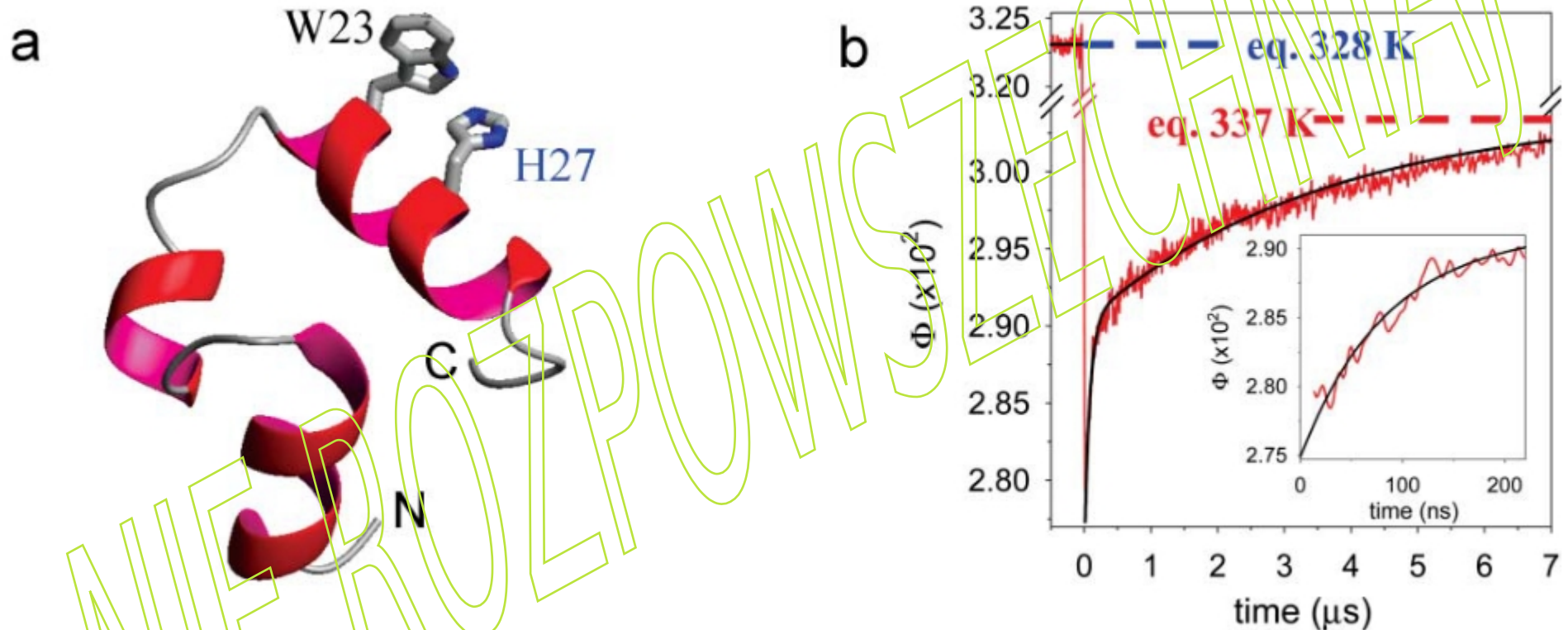
Nd:YAG (granat itrowo-aluminiowy domieszkowany neodymem; Nd:Y₃Al₅O₁₂) to kryształ stosowany jako ośrodek laserowy w laserach na ciele stałym. Domieszka, potrójnie zjonizowany neodym, Nd(III), zazwyczaj zastępuje niewielką frakcję (1%) jonów itru w strukturze krystalicznej macierzystego granatu itrowo-glinowego (YAG), ponieważ oba jony mają podobną wielkość. To jon neodymu zapewnia aktywność laserową w kryształach. Impulsowe lasery Nd:YAG są zwykle obsługiwane w tak zwanym trybie przełączania Q: przełącznik optyczny jest wkładany do wnęki lasera i czeka na maksymalną inwersję obsadzeń jonów neodymu, zanim się otworzy. Następnie fala świetlna może przejść przez wnękę, opróżniając wzbudzony ośrodek laserowy przy maksymalnej inwersji obsadzeń. W tym trybie przełączania Q osiągnięto moc wyjściową 250 megawatów i czas trwania impulsu od 10 do 25 nanosekund. Częstotliwość emitowanego promieniowania można efektywnie podwoić, aby wygenerować światło laserowe przy 532 nm lub wyższe harmoniczne przy 355, 266 i 213 nm.



Granat itrowo-aluminiowy (diamonair, cyrolit, YAG)

Jony neodymu w różnych typach kryształów jonowych, a także w szklach, działają jako ośrodek wzmocnienia lasera, zazwyczaj emitując światło o długości fali 1064 nm z określonego przejścia atomowego w jonie neodymu (ze stanu oznaczonego jako $4F_{3/2}$ do stanu $4I_{1/2}$, po „wpompowaniu” do wzbudzenia ze źródła zewnętrznego i dezaktywacji bezpromienistej do $4F_{3/2}$. Neodym jest pierwiastkiem chemicznym o symbolu Nd i liczbie atomowej 60.

36 aminokwaswe białko Villin Headpiece HP35 oraz kinetyka relaksacyjna jego rozwijania/zwijania w spektrometrze T-jump opisanym przez Kubelkę.



(a) Model wstęgowy HP35 (PDB 1yrf) z wyróżnionym Trp23 (sonda fluorescencyjna) i wygaszaczem (His27), wprowadzonym do sekwencji, aby fluorescencja Trp monitorowała proces zwijania.

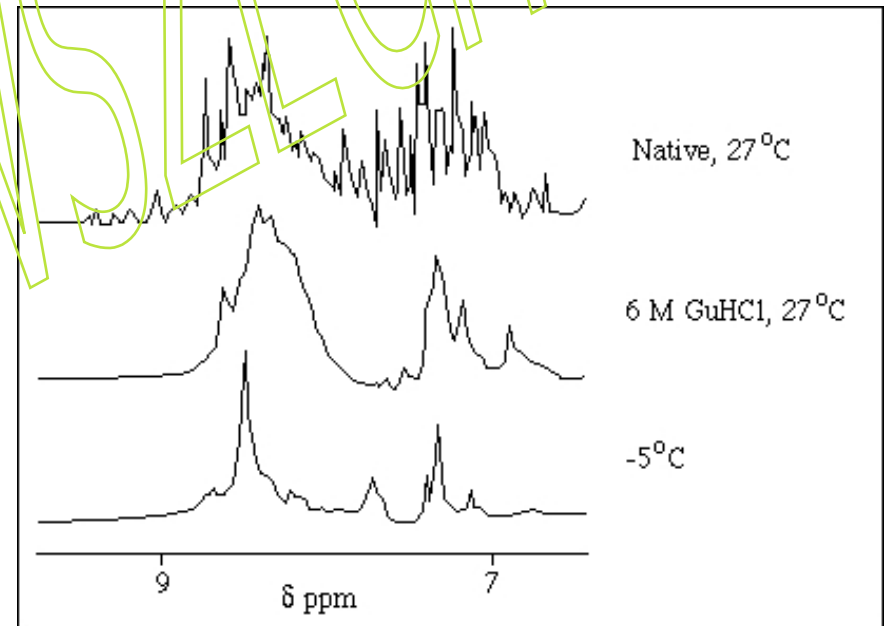
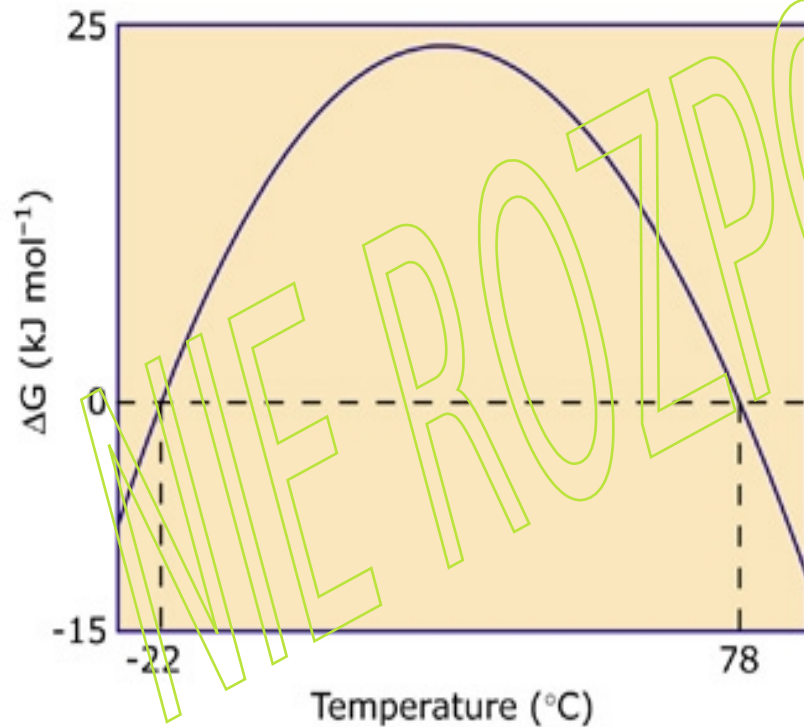
(b) Relaksacja fluorescencji Trp po skoku T z 328 do 337 K. Chwilowy spadek intensywności fluorescencji wynika z wewnętrznej zależności wydajności kwantowej Trp od temperatury. Późniejszy wzrost wynika z przerwania kontaktu pomiędzy Trp23 i wygaszaczem His27, monitorując ogólne rozwinięcie struktury białka w odpowiedzi na podwyższoną temperaturę. Czarna krzywa jest dwuwykładniczym dopasowaniem do danych. Wstawka pokazuje szczegóły szybkiej (~ 70 ns) fazy kinetycznej.

Denaturacja białek zimnem czyli związanie białek w spektrometrze T-jump

Oprócz dobrze znanej denaturacji białek pod wpływem ciepła, istnieje, powszechnie uznawane jako dobrze znany fakt, zjawisko denaturacji białek przez odpowiednio duże obniżenie temperatury (zimna denaturacja białek). Zjawisko to przewidział w 1964 roku J. F. Brandts (JACS,86:4291-4301 i 4302-4314).

Większość białek, które denaturują pod wpływem zimna, robi to w warunkach, w których ich stan natywny jest już zdestabilizowany przez obecność denaturanta lub skrajnej wartości pH.

Na podstawie badań kalorymetrycznych Privalov ustalił, że ciepło właściwe w stałym ciśnieniu rozwiniętej formy białek jest większe niż formy zwiniętej. Zakładając, że ΔC_p jest niezależne od temperatury, możemy przewidzieć istnienie formy zdenaturowanej przez zimno. Wyprowadzenie wzoru na zależność $G_D - G_N$ od temperatury poznamy później.



Widma 1D NMR mioglobiny zarejestrowane przez Privalova i współpracowników: białko natywne wykazuje silne cechy strukturalne; widmo zarejestrowane w 6 M GuHCl wskazuje na pełną denaturację; widmo zarejestrowane w temperaturze -5°C wskazuje na istnienie struktury resztkowej.

$$\Delta G = G_{denatured} - G_{native}$$

Bezpośrednia obserwacja szybkiego fałdowania białek w laserowym spektrometrze skoku T: przypadek mioglobiny

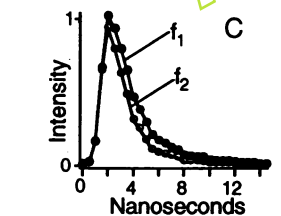
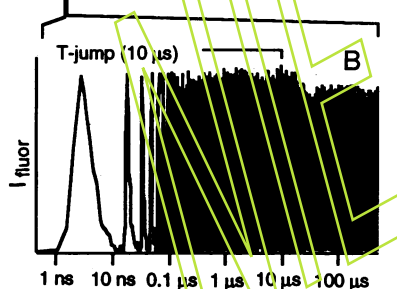
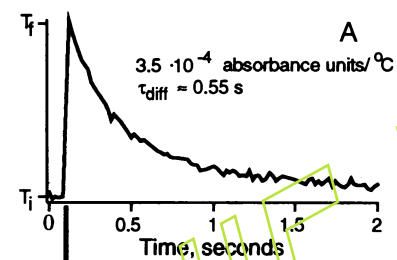
Próbkę białka poddaje się denaturacji zimnem w kuwecie o krótkiej drodze optycznej poprzez przechłodzenie buforu wodnego.

Spektroskopia dichroizmu kołowego (CD od circular dichroism) służy do sprawdzenia pofałdowania białka w zastosowanych warunkach.

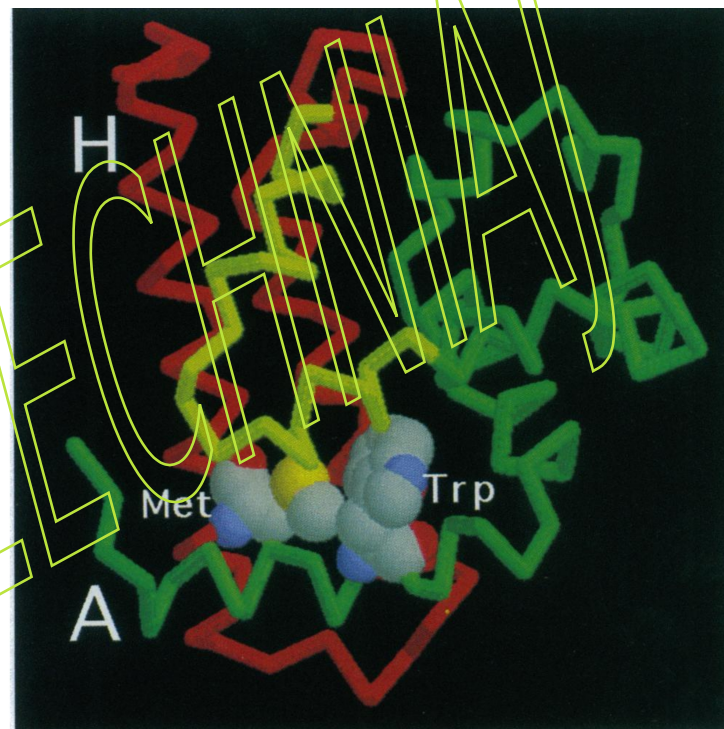
Bufor wodny jest bezpośrednio podgrzewany (z szybkością $5 \cdot 10^9$ K/s) za pomocą nanosekundowego impulsu w podczerwieni.

Rozwinięte białko znajduje się teraz w ogrzanym buforze w temperaturze termodynamicznie sprzyjającej zwijaniu.

Proces zwijania śledzi się poprzez oświetlenie próbki ciągiem krótkich impulsów lasera UV wzbudzających fluorescencję tryptofanu mioglobiny.

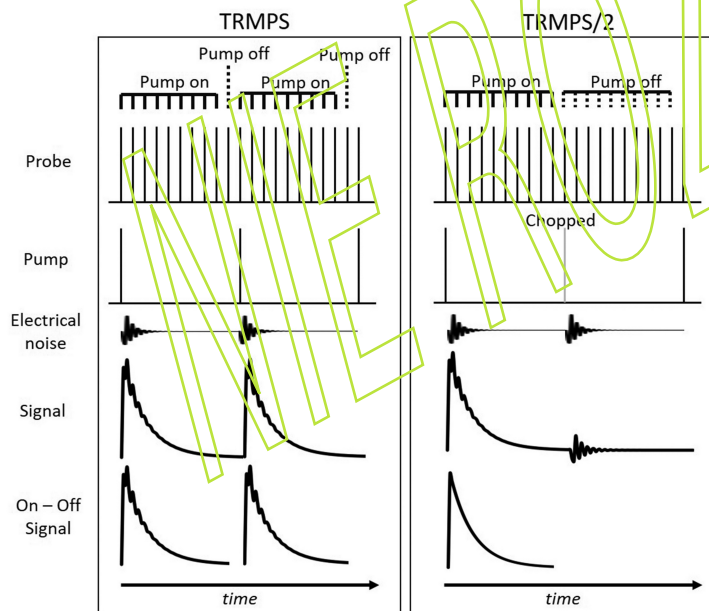
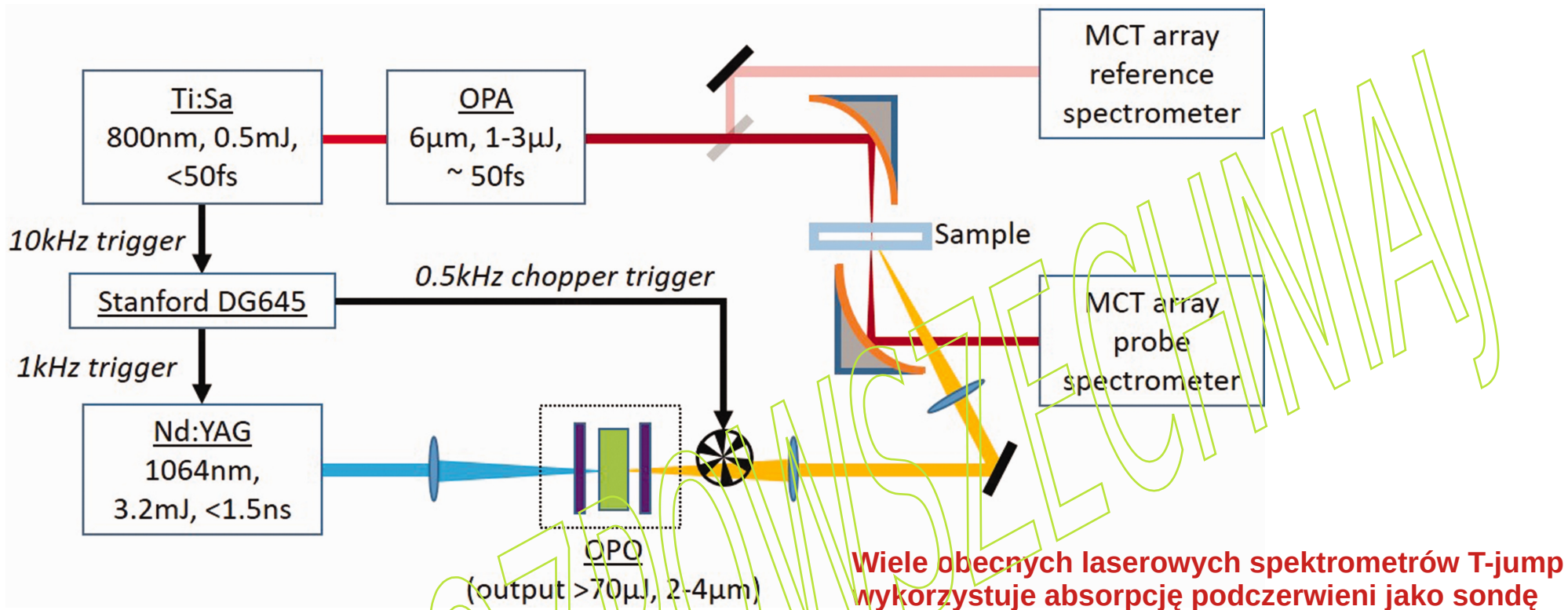


- A)** Powolna dyfuzyjna relaksacja temperatury w naczynku pomiarowym po skoku T. Stała temp. utrzymuje się przez 500 μ s.
- B)** Kolejne impulsy przejściowej fluorescencji tryptofanu Trp-14 mioglobiny obecnych w roztworze, wzbudzanej przez impulsy lasera próbującego (pH 5.9, $3 \cdot 10^{-4}$ M białka), pokazane w skali logarytmicznej czasu, obejmującej sześć rzędów wielkości, od ~ 10 μ s do $+490$ μ s (w odniesieniu do zaznaczonego skoku T). Poszczególne transjenty (długość 15 ns) wyznaczają jeden punkt na drodze zwijania białka. W zależności od skali czasu dane są uśredniane w 1–600 blokach przejściowych w celu wyodrębnienia maksymalnego stosunku sygnału do szumu w długich okresach czasu.
- C)** Funkcje przedstawiające przejściową fluorescencję, f_1 i f_2 , otrzymane, odpowiednio, poprzez uśrednienie początkowych i końcowych 8 μ s przedziału czasu pokazanego w części A. Funkcje te charakteryzują fluorescencję Trp-14 w białku rozwiniętym (f_1) i zwiniętym (f_2). Kolejne fluorescencje przejściowe między $t=0$ i $t=482$ μ s, są równe $f_a = (1 - w_a) \cdot f_1 + w_a \cdot f_2$.



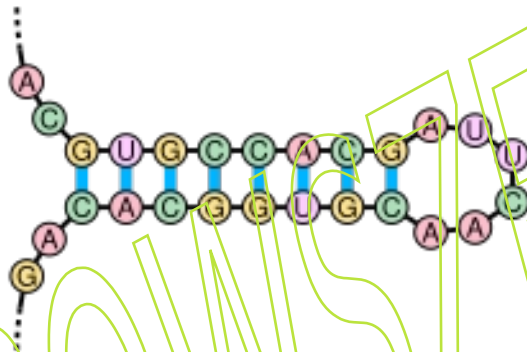
Model zwiniętej ludzkiej apo-mioglobiny przedstawiający reszty Trp-14 (w helisie A) i Met-131 (w helisie H) zaangażowane w wygaszanie fluorescencji po kontakcie helis A-H.

Wyznaczony czas relaksacji procesu zwijania mioglobiny wynosi 7 ± 5 μ s.



Ten spektrometr T-jump wykorzystuje laser sondujący o częstotliwości 10 kHz i zsynchronizowany z nim laser pompujący o częstotliwości 1 kHz, przycięty przez "chopper" do 500 Hz. Laser pompujący to układ OPO (optyczny oscylator parametryczny) pompowany przez granat itrowo-aluminiowy domieszkowany neodymem (Nd:YAG). Laser sondy to tytanowo-szafirowy wzmacniacz impulsowy o mocy 20 W, o częstotliwości powtarzania 10 kHz i czasie trwania impulsu <50 fs. Światło sondy skupia się na pompowanym obszarze próbki w plamce o średnicy 50 μ m (znacznie mniejszej niż wiązka T-jump). Rejestrowane jest widmo dla każdego impulsu lasera sondy. Ponieważ częstotliwość powtarzania sondy do pompy wynosi 20:1, na każdy skok temperatury uzyskuje się grupę 20 widm. Dla każdej grupy ustalany jest czas impulsu pompy w stosunku do początkowego impulsu sondy i rejestrowany jest grzebień impulsów sondy. Pierwsza sonda podążająca za impulsem pompy jest rejestrowana z opóźnieniem x ns, a widma kolejnej sondy rejestrowane są z $x + 100 \mu$ s, $x + 200 \mu$ s, $x + 300 \mu$ s itd. Po uśrednieniu przez kilka sekund, opóźnienie pompa-sonda jest zmieniane. Daje to zestaw danych z pomiarów od nanosekund do milisekund po skoku temperatury. Pierwsze 19 impulsów sondy jest wykorzystane jako dane opóźnienia czasowego od 0,0 do 1,9 ms, a końcowy impuls sondy (1,9–2,0 ms) jest użyty do obliczenia znormalizowanych widm różnicowych. Nazywamy to metodą spektroskopii wielosondowej z rozdzielczością czasową (TRMPS). Redukcja częstotliwości wiązki pompy pozwala na dłuższy czas powrotu próbki do początkowej równowagi (2 zamiast 1 ms) i stwarza ważną możliwość usuwania szumów. Nazwane to jest TRMPS/2. (TRMPS=time-resolved multiple probe spectroscopy)

Badania kinetyki przejść helisa ↔ kłębek w strukturach “spinki do włosów” tworzonych przez RNA i jednoniciowe DNA.



Hairpin to motyw strukturalny często obserwowany w cząsteczkach RNA i DNA. Motyw ten jest zaangażowany w różne funkcje biologiczne (np. ekspresję i regulację genów). Występuje, gdy dwa regiony tego samego łańcucha, zwykle komplementarne w sekwencji nukleotydowej, gdy są odczytywane w przeciwnych kierunkach, łączą się w pary zasad, tworząc podwójną helisę, która kończy się niesparowaną pętlą. Powstała struktura jest kluczowym elementem wielu drugorzędowych struktur RNA.

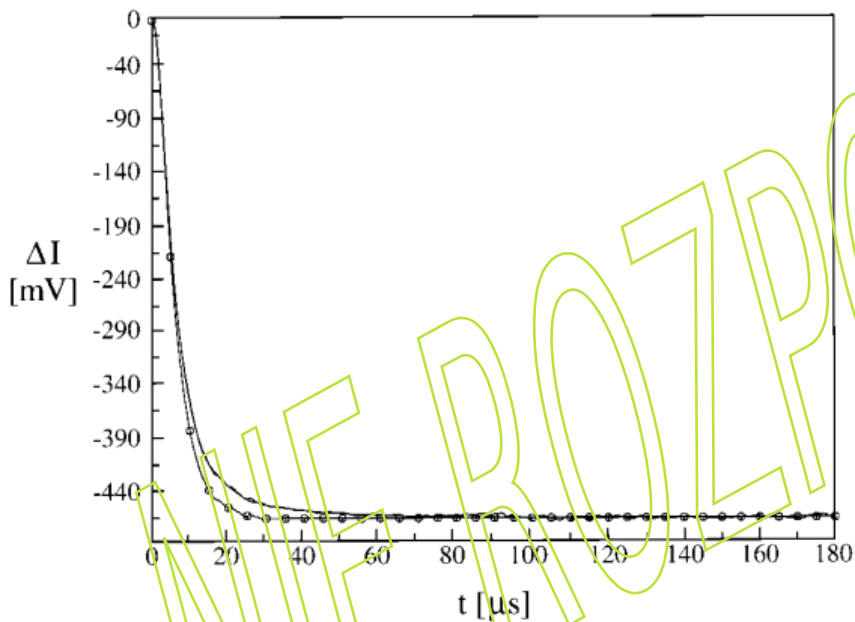
Analiza zależności temperaturowych stałych szybkości otrzymywanych w eksperymentach na strukturach hairpin w języku równań Arrheniusa i Eyringa jest bardzo pouczająca.

Dynamics of the RNA Hairpin GNRA Tetraloop

M. Menger, F. Eckstein, and D. Porschke

(dekonwolucja funkcji odpowiedzi instrumentu)

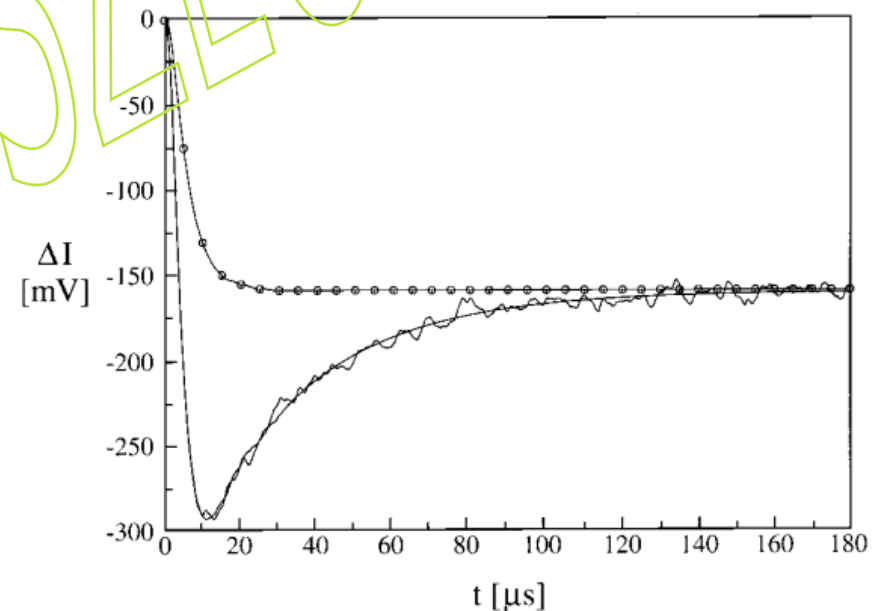
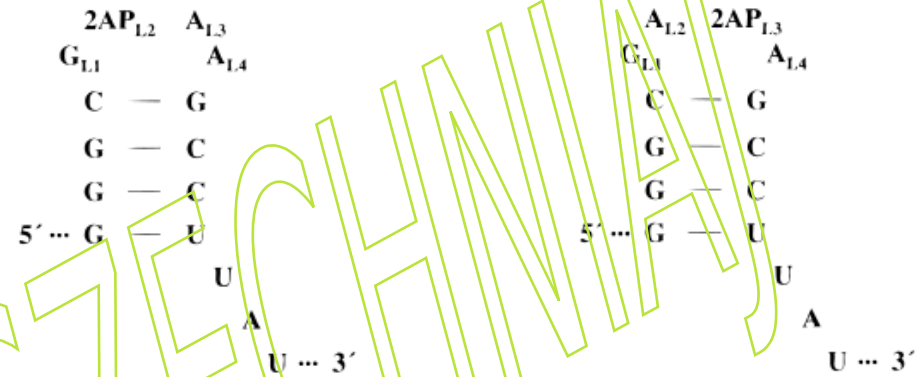
Dynamikę tetrapętli RNA o strukturze spinki do włosów typu GNRA [sekwencja G – dowolny rybonukleotyd (N)-puryna (R)-A] analizowano metodą spektroskopii fluorescencyjnej oraz metodą relaksacji skoku temperatury wykrywaną przez fluorescencję, stosując oligomery RNA z 2-aminopuryną (2AP) podstawiony w dwóch różnych pozycjach sekwencji pętli, Gp2APpApA (HP1) i GpAp2APpA (HP2), jako wskaźnik.



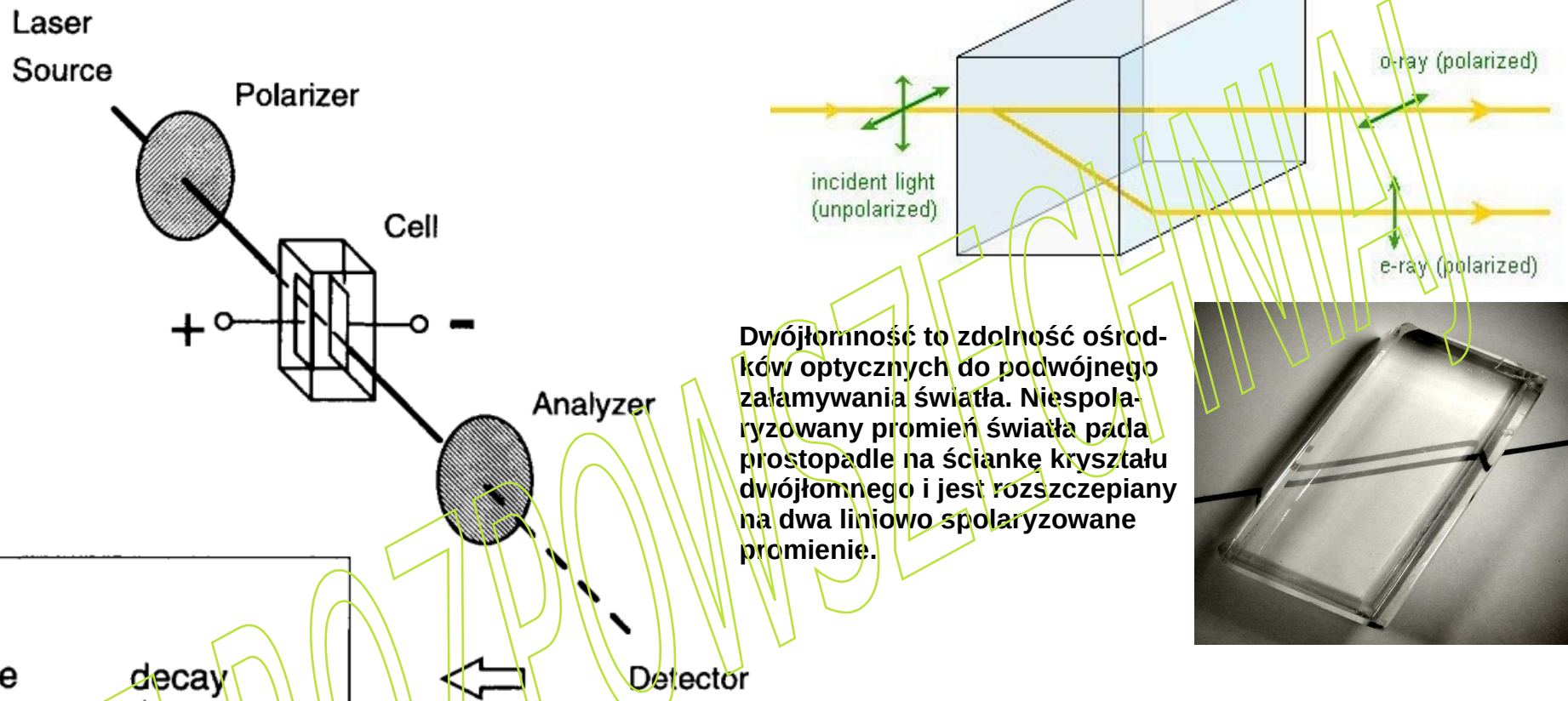
Relaksacja HP1 po skoku temperatury rejestrowana przez pomiar fluorescencji. Skok temperatury od 2 do 8,1°C (7,1 μM HP1). Linia oznaczona kółkami reprezentuje sygnał referencyjny do dekonwolucji. Dopasowania wykładniczego ($\tau_c = 22,1 \mu s$) nie można odróżnić od danych eksperymentalnych. (bufor = 0,1 M NaClO₄ i 50 mM kwas kakodylowy/Tris, pH 7,2)

HP1

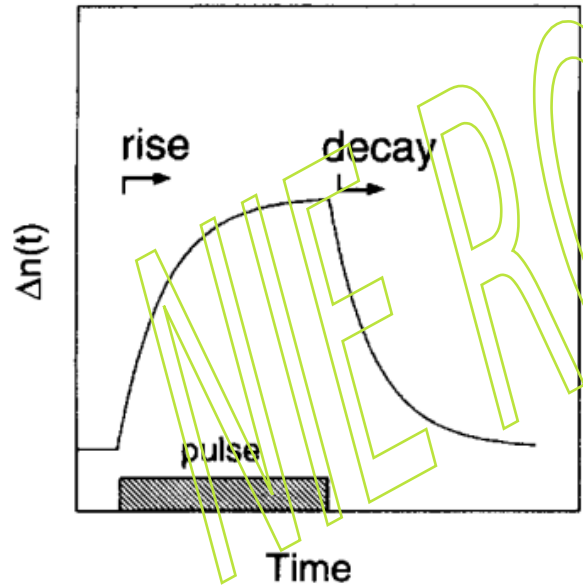
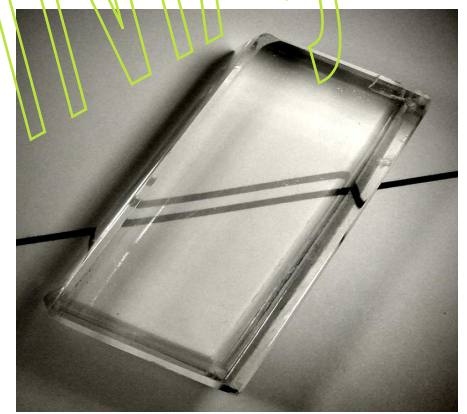
HP2



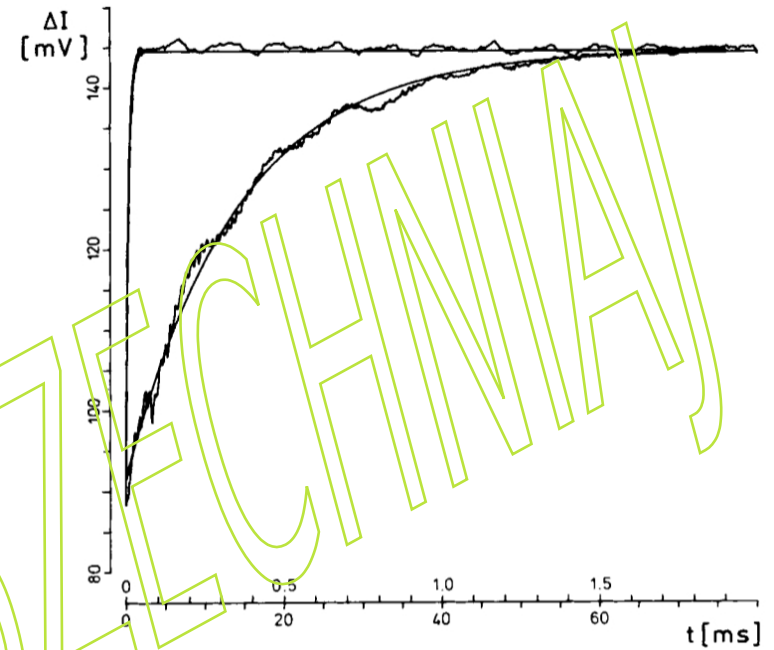
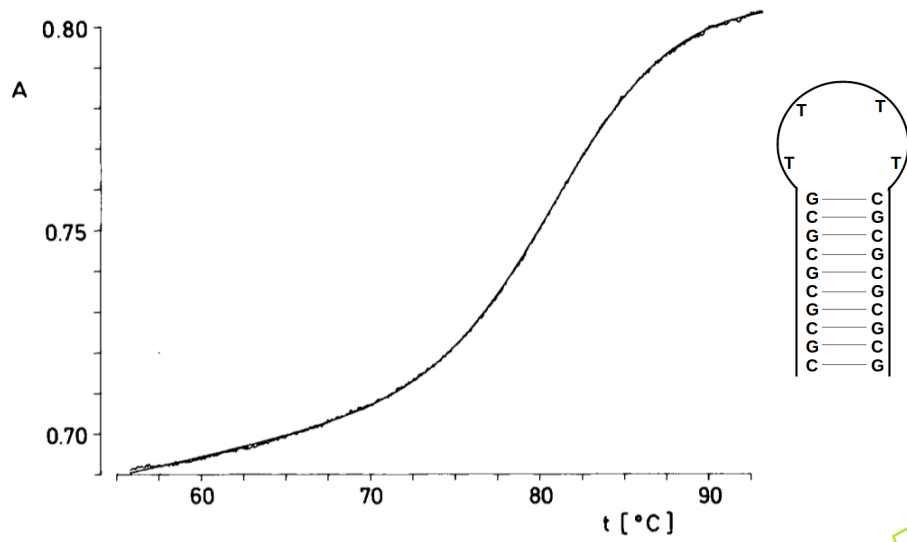
Relaksacja HP2 po skoku temperatury rejestrowana przez pomiar fluorescencji. Skok temperatury od 2 do 8,1°C (7,1 μM HP2). Linia oznaczona kółkami reprezentuje sygnał referencyjny do dekonwolucji. Eksponecjalny fit ($\tau_1 = 5.2 \mu s$, $\tau_2 = 41.3 \mu s$) nie może być odróżniony od krzywej doświadczalnej.



Dwójłomność to zdolność ośrodków optycznych do podwójnego załamania światła. Niepolarizowany promień światła pada prostopadłe na ściankę kryształu dwójłomnego i jest rozszczepiany na dwa liniowo spolaryzowane promienie.



Zarys podstawowego eksperymentu TEB: Światło ze źródła laserowego, rozprzestrzeniające się wzdłuż osi z, przechodzi kolejno przez polaryzator, komorę próbki i analizator, który jest zorientowany na bliskie wygaszenie względem polaryzatora. Po przyłożeniu pola elektrycznego cząsteczki w komórce stają się częściowo zorientowane, co sprawia, że roztwór staje się dwójłomny (różne współczynniki załamania światła są prostopadłe i równoległe do pola orientującego). W rezultacie światło staje się spolaryzowane eliptycznie, co pozwala na przejście części światła przez analizator do detektora. W przypadku impulsu napięcia o przebiegu prostokątnym (kreskowany pasek, wstawka) sygnał wyjściowy (przedstawiony jako dwójłomność, n) wzrasta i opada w czasie. Sygnały przejściowe oznaczone kółkami na wykresach pokazanych przez Porschke i współpracowników reprezentują zanik dwójłomności, który jest wykorzystywany do "oczyszczenia" rejestrowanej w eksperymentach intensywności światła fluorescencji z wkładu aparaturowego. To daje obserwowane stałe szybkości odnoszące się wyłącznie do przejścia strukturalnego badanych oligonukleotydów.

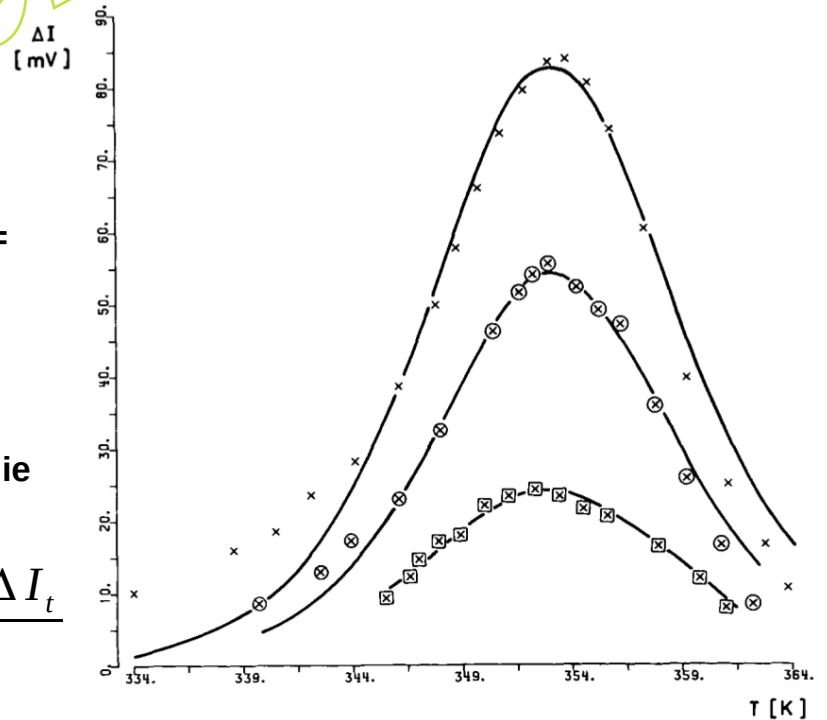


Wpływ temperatury na absorpcję UV d(C-G)₅T₄(C-G)₅ w buforze. Zmiany absorpcji wynikają z przejścia uporządkowanej struktury spinki do włosów o podwójnej helisie do stanu zdenaturowanego lub losowych, niesparowanych pasm spinki do włosów. Pochodzenie wzrostu absorpcji nazywa się efektem hiperchromicznym. Zaobserwowane zmiany absorpcji są zgodne z zależnością amplitud skoków T od temperatury, pokazaną na prawym dolnym rysunku.

Prawy górny: Relaksacji T-jump dla d(C-G)₅T₄(C-G)₅ w buforze, pokazana dla dwóch skal czasu (skok od 81.1 to 81.9°C, 265 nm, A₂₆₅ = 0.96). Linia ciągła przedstawia dopasowanie funkcji monoeksponecjoidalnej metodą najmniejszych kwadratów z czasem relaksacji 351 μs. Prawy dolny: Amplitudy relaksacji ΔI dla skoków temperatury w funkcji temperatury T dla trzech różnych stężeń nukleotydów [absorbancja (265 nm, 1 cm, 21°C) 0.45, 0.96, and 1.53]. Linie ciągłe przedstawiają dopasowanie metodą najmniejszych kwadratów zgodnie z równaniem:

zmiana natężenia światła ΔI jako funkcja zmiany entalpii ΔH, stałej stabilności K, zmiany temperatury ΔT, całkowitej zmiany natężenia światła odpowiadającej 100 % przejściu ΔI_t oraz temperatury bezwzględnej T (R= stała gazowa).

$$\Delta I = \frac{\Delta H^\ominus \cdot K \cdot \Delta T \cdot \Delta I_t}{R \cdot T^2 \cdot (1 + K)^2}$$



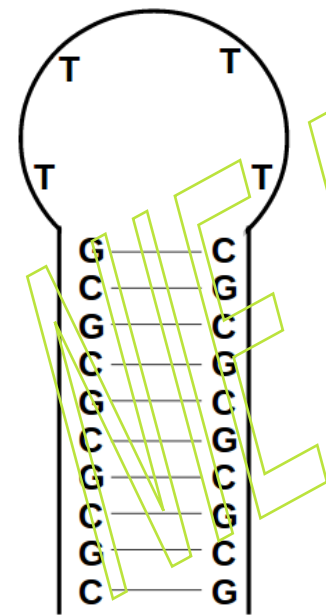
Jak pokazano na poprzednim slajdzie, relaksacja po skoku temperatury może być, z zadowalającą dokładnością, opisana funkcją monoeksponencjalną.

Stała szybkości tworzenia helisy jest rzędu 1300 s^{-1} , ze względnie słabą zależnością od temperatury, podczas gdy stała szybkości rozpadu helisy zmienia się w zakresie $200\text{-}4500 \text{ s}^{-1}$ z bardzo silną zależnością od temperatury.

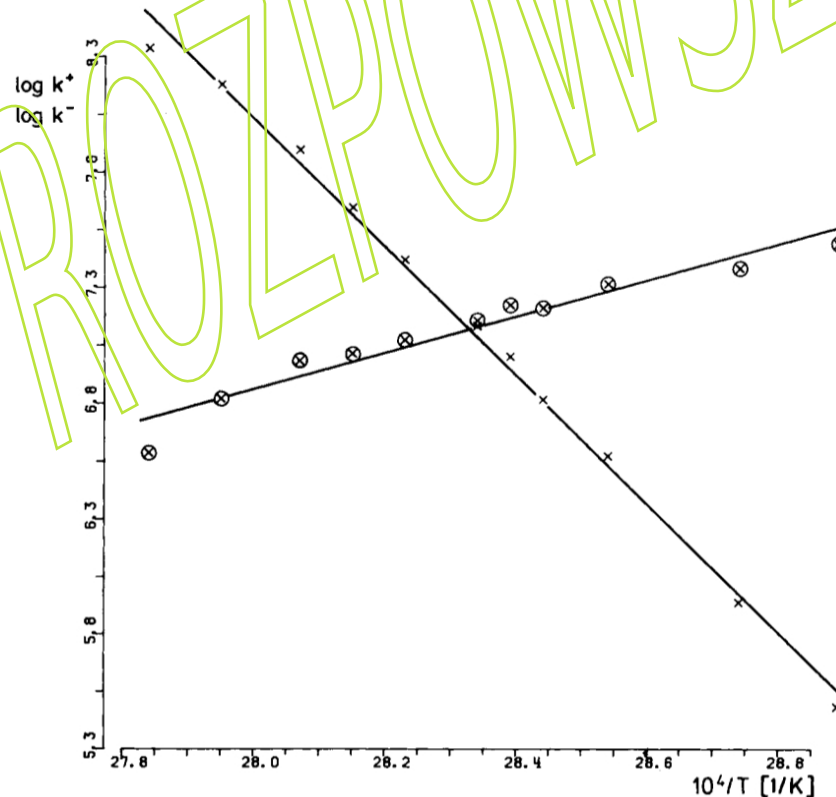
Zależność stałych szybkości od temperatury można zanalizować w oparciu o równanie Arrheniusa (Wykład 5).

Wykresy Arrhenius'a są liniowe w zakresie dokładności eksperymentalnej i wykazują znaczną dodatnią entalpię aktywacji wynoszącą 235 kJ/mol dla dysocjacji helisy, podczas gdy asocjacja helisy jest powiązana z ujemną entalpię aktywacji wynoszącą około -50 kJ/mol .

Ujemna entalpia aktywacji wyraźnie pokazuje, że tworzenia helisy nie można opisać jako prostego, elementarnego etapu reakcji.



hairpin \rightleftharpoons coil
 k^-
 k^+



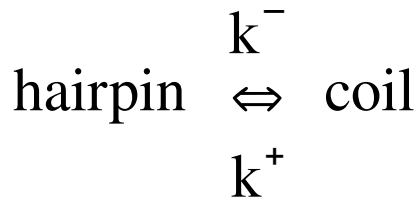
$$\log_e \left(\frac{k^\ddagger}{k_B T/h} \right) = - \frac{E_a^\ddagger}{RT}$$

$$E_a^- = +230 \text{ kJ/mol}$$

$$E_a^+ = -65 \text{ kJ/mol}$$

$$\times = k^-$$

$$\otimes = k^+$$



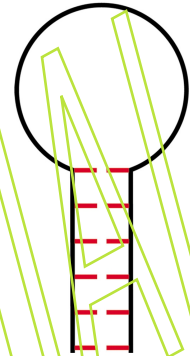
$$\frac{1}{\tau} = k^- + k^+$$

$$K = \frac{k^+}{k^-}$$

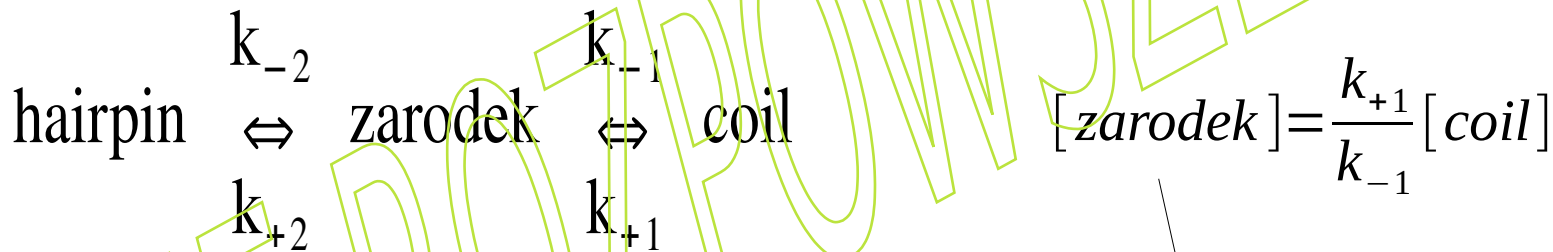
$$k^+ = A^+ e^{-E_a^+/RT}$$

$$k^- = A^- e^{E_a^-/RT}$$

$$\ln K = -\frac{\Delta H^\ominus}{RT} + \frac{\Delta S^\ominus}{R}$$



Najbardziej niezwykłą cechą wyników spektroskopii T-jump dla self-komplementarnych oligonukleotydów oraz oligonukleotydów tworzących struktury szpilki do włosów, analizowanych w oparciu o model Arrhenius'a, jest ujemna wartość E_a^+ . To mówi nam, że reakcja tworzenia helisy nie jest reakcją elementarną zgodną z równaniem przedstawionym w lewym górnym rogu slajdu.



$$\frac{d[\text{hairpin}]}{dt} = k^+ [\text{coil}] - k^- [\text{hairpin}] = k_{+2} [\text{zarodek}] - k_{-2} [\text{hairpin}]$$

$$k^+ = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} k_{+2} \quad k^- = k_{-2}$$

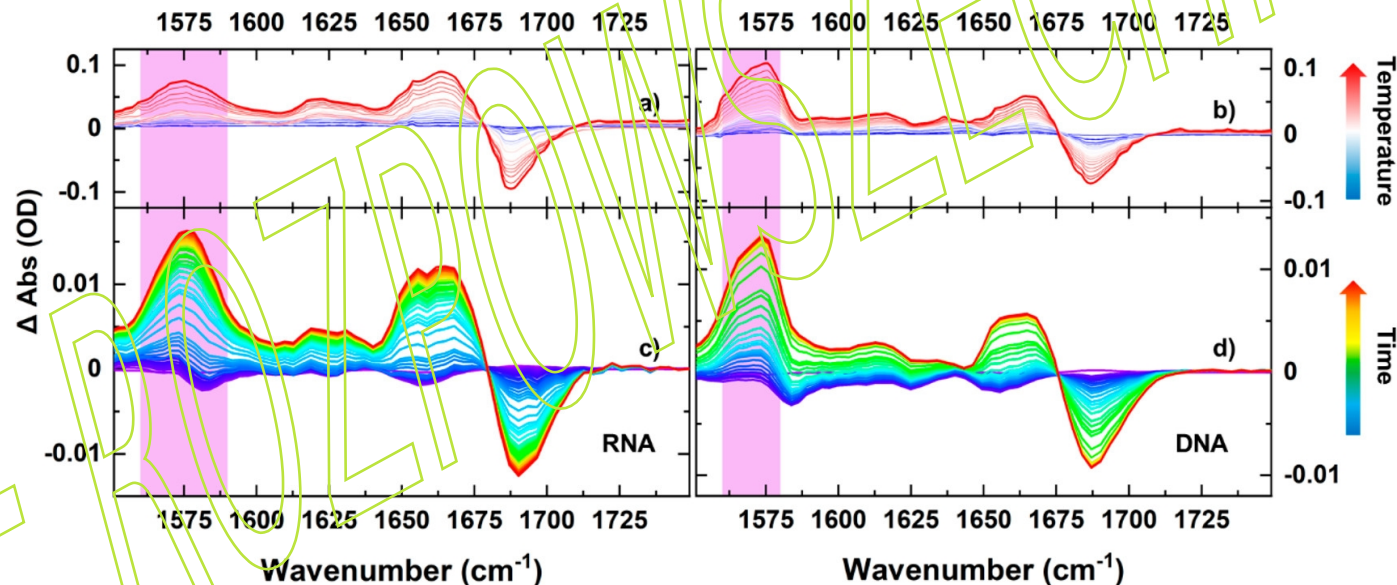
$$E_a^+ = E_a^{\text{zarodek} \rightarrow \text{hairpin}} + \Delta G_{\text{coil} \rightarrow \text{zarodek}}^\ominus$$

$$E_a^- = E_a^{\text{zarodek} \rightarrow \text{coil}}$$

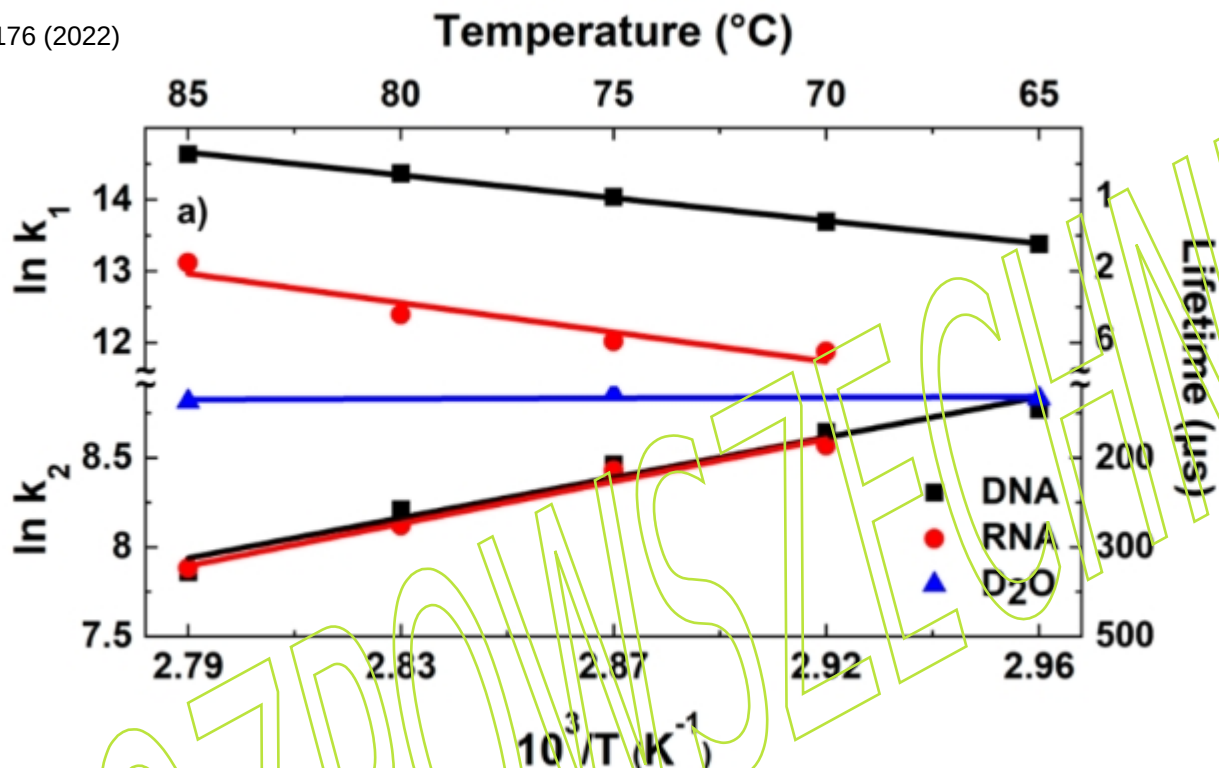
Measuring RNA UNCG Tetraloop Refolding Dynamics Using Temperature-Jump/Drop Infrared Spectroscopy, J. Phys. Chem. Lett., 13:9171-9176 (2022)

Tetraoops to rodzaj czterozasadowych motywów pętli spinki do włosów w drugorzędowej strukturze RNA, które zamykają wiele podwójnych helis. Tetraloop UNCG jest powszechny w rybosomalnym RNA. N może być uracylem, adeniną, cytozyną lub guaniną.

Eksperymenty T-jump, metodą TRMPS (Time Resolved Multiple Probe), przeprowadzono na roztworach oligomerów DNA (5'-GCGCTACGGCGC-3') i RNA (5'-GCGCUACGGCGC-3'). Eksperymenty refoldingu, zachodzącego w skali 200 μ s, przeprowadzono metodą ultraszybkiego schładzania.



Absorpcja w podczerwieni (a, b) i widma T-jump w podczerwieni (c, d) dla spinek tetraloopowych RNA (a, c) i DNA (b, d). (a) i (b) przedstawiają widma różnicowe jako funkcję T względem widma przy 20 °C. Skala kolorów obejmuje zakres od 20 do 80 °C (niebieski–czerwony) z wyróżnionym modem drgań pierścienia guaniny (mod GR). Panele c i d pokazują odpowiednio widma IR T-jump RNA i DNA ($T_0 = T_m - 5$ °C). Wyświetlane są opóźnienia czasowe od 1 ns (niebieski) do czasów końcowych (czerwony) przy 20 μ s (RNA) i 6 μ s (DNA).



Wyniki dopasowania stałych szybkości ze spektroskopii skoku T w funkcji wartości T_0 dla próbek RNA i DNA. Dane przedstawiono za pomocą wykresów Arrheniusa. Linia niebieska pokazuje zależność szybkości chłodzenia D_2O od temperatury. Powyżej linii D_2O topienie a poniżej tej linii ponowne fałdowanie spinek do włosów DNA (kolor czarny) i RNA (kolor czerwony). W każdym przypadku wykreślona temperatura to $T_0 + 5^\circ C$, czyli średnia temperatura w czasie skoku T (o $10^\circ C$). Aby skupić się na eksperymentach, w których wystąpił znaczny odsetek topnienia spinki do włosów, przedstawiono dane dla zakresu temperatur, w którym maksymalna zmiana intensywności pasma G_R była większa niż 20% największego zaobserwowanego sygnału ($T_0 + 5^\circ C$, DNA 65–85 °C; RNA 70–85 °C).

Narastanie sygnału G_R przypisano topnieniu helisy GCGC i towarzyszącemu temu topnieniu pętli. Dla RNA stwierdzono, że τ_1 zmienia się od $2,0$ do $6,9 \pm 0,6 \mu s$ w zakresie wartości T_0 od 80 do 65 °C wokół przejścia topnienia. Dla DNA wartości τ_1 wynoszą od $0,4$ do $1,5 \pm 0,2 \mu s$ w tym samym zakresie temperatur. Dane dobrze pasują do zależności Arrheniusa, dając dodatnie energie aktywacji ($E_{a,m} = 83 \pm 20$ i $64 \pm 10 \text{ kJ mol}^{-1}$ odpowiednio dla spinek do włosów RNA i DNA). Wartości te są zgodne z wcześniejszymi pracami.

Czasy relaksacji, τ_2 , dla zmian sygnału w procesie ochładzania po skoku T, pokazują również dobrą zgodność z wykresem Arrheniusa. Jednakże w przeciwieństwie do τ_1 , stwierdzono, że czasy relaksacji τ_2 rosną wraz ze wzrostem T_0 , dając wartości od 150 do 400 μs, od 60 do 80 °C zarówno dla RNA, jak i DNA, co prowadzi do ujemnej energii aktywacji.

Równanie Van't Hoffa wiąże zmianę stałej równowagi K_{eq} reakcji chemicznej ze zmianą temperatury, T , powiązaną ze zmianą standardowej entalpii ΔH^\ominus procesu. Zostało zaproponowane przez holenderskiego chemika Jacobusa Henricusa van't Hoffa w 1884 roku, w książce *Études de Dynamique chimique* (Studia z chemii dynamicznej).

Table 1. Thermodynamic Parameters Obtained via Van't Hoff, Arrhenius, and Eyring Analyses

		RNA	DNA	
		81 °C	76 °C	
		T_m		
Van't Hoff	ΔH	118.3	124.2	kJ mol ⁻¹
	ΔS	334	356	J K ⁻¹ mol ⁻¹
	ΔG^a	14.8	13.9	kJ mol ⁻¹
Arrhenius	$E_{a,m}$	83.3	64.0	kJ mol ⁻¹
	$E_{a,r}$	-48.2	-45.2	kJ mol ⁻¹
Eyring	ΔH_m^\ddagger	80.4	61.2	kJ mol ⁻¹
	ΔS_m^\ddagger	86	46	J K ⁻¹ mol ⁻¹
	$\Delta G_m^{\ddagger a}$	53.8	46.8	kJ mol ⁻¹
	ΔH_r^\ddagger	-51.2	-48.1	kJ mol ⁻¹
	ΔS_r^\ddagger	-324	-315	J K ⁻¹ mol ⁻¹
	$\Delta G_r^{\ddagger a}$	49.1	49.5	kJ mol ⁻¹

^aAll ΔG calculated at 37 °C.

Podczas gdy dynamika topnienia i ponownego fałdowania spinek do włosów RNA i DNA była zgodna z zależnościami temperatury Arrheniusa, ponowne fałdowanie charakteryzowało się widoczną ujemną energią aktywacji, zgodnie z mechanizmem obejmującym wiele nieprawidłowo sfałdowanych półproduktów przed zapięciem par zasad helisy.