

Wybrane Zagadnienia Biofizyki Molekularnej

(1100-5BM15)

Jan M. Antosiewicz

**Zakład Biofizyki
Instytut Fizyki Doświadczalnej
Wydział Fizyki**

WKŁAD 10

6 listopada, 2024

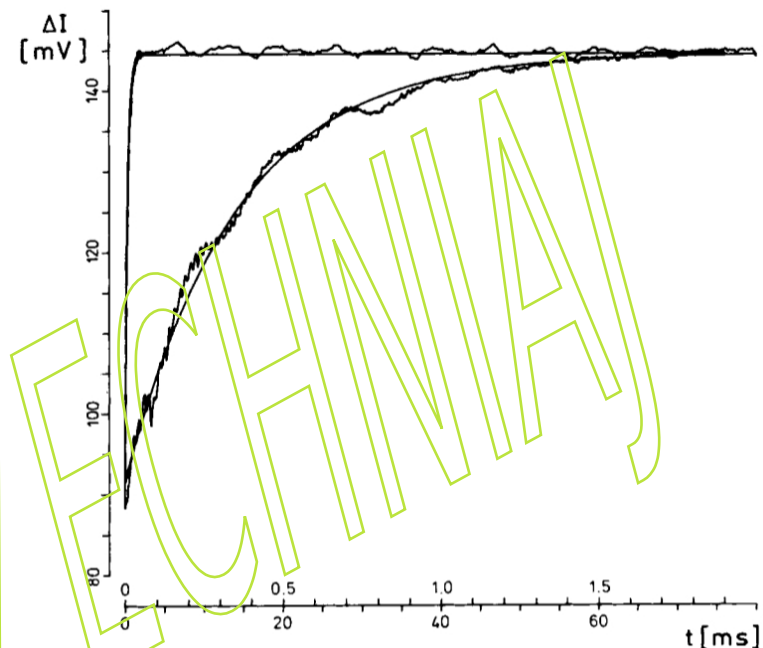
**Kinetyka biomolekularna
(metody relaksacyjne, T-jump - część 2)**

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

jantosi@fuw.edu.pl

Helix-Coil dynamics of a Z-Helix Hairpin

Przejście helisa-kłębek Z-helikoidalnej struktury szpilki do włosów tworzonej przez $d(C-G)_5T_4(C-G)_5$ zostało scharakteryzowane poprzez równowagowe topienie oraz eksperymenty skoku T w 5 M $NaClO_4$ z 10 mM Na_2HPO_4 , w pH 7.0. 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. 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.



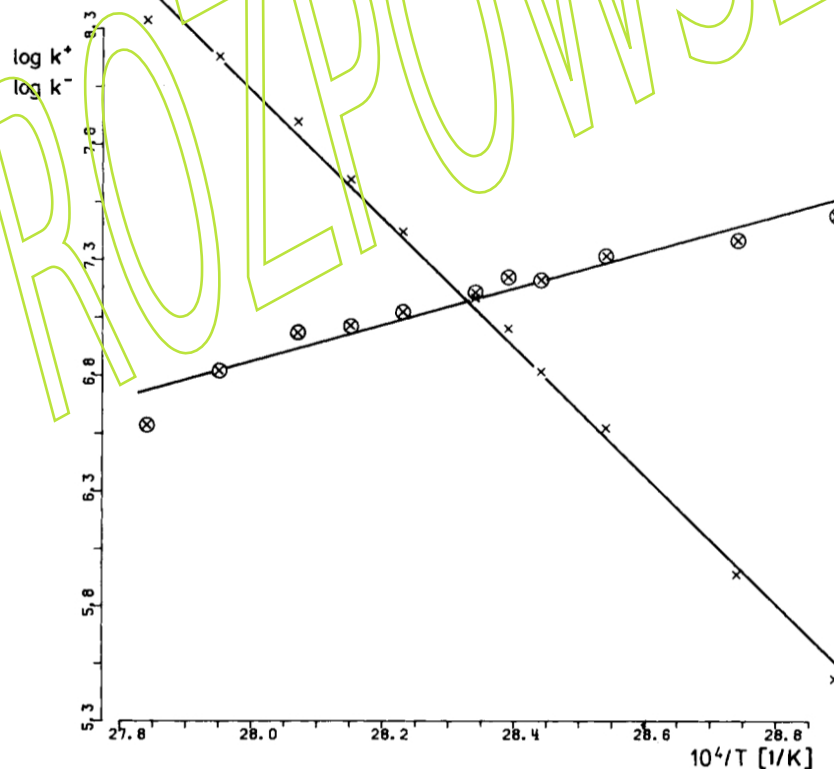
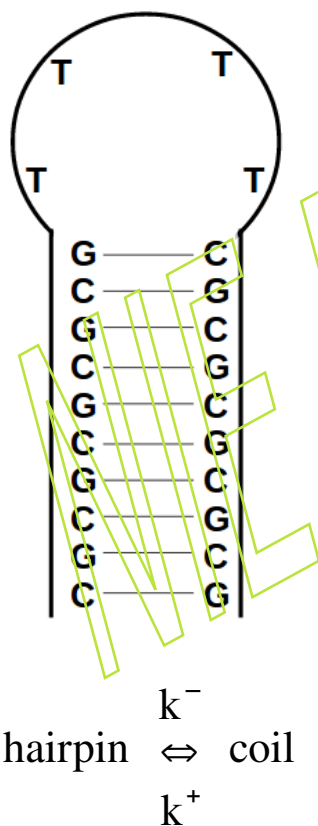
$$\log\left(\frac{k^{\mp}}{k_B T/h}\right) = -\frac{E_a^{\mp}}{RT}$$

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

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

$$\times = k^-$$

$$\otimes = k^+$$

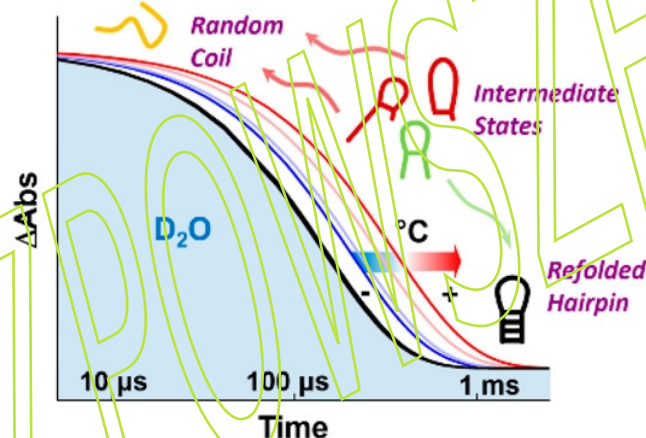


Measuring RNA UNCG Tetraloop Refolding Dynamics Using Temperature-Jump/Drop Infrared Spectroscopy

C. P. Howe, G. M. Greetham, B. Procacci, A. W. Parker, and N. T. Hunt

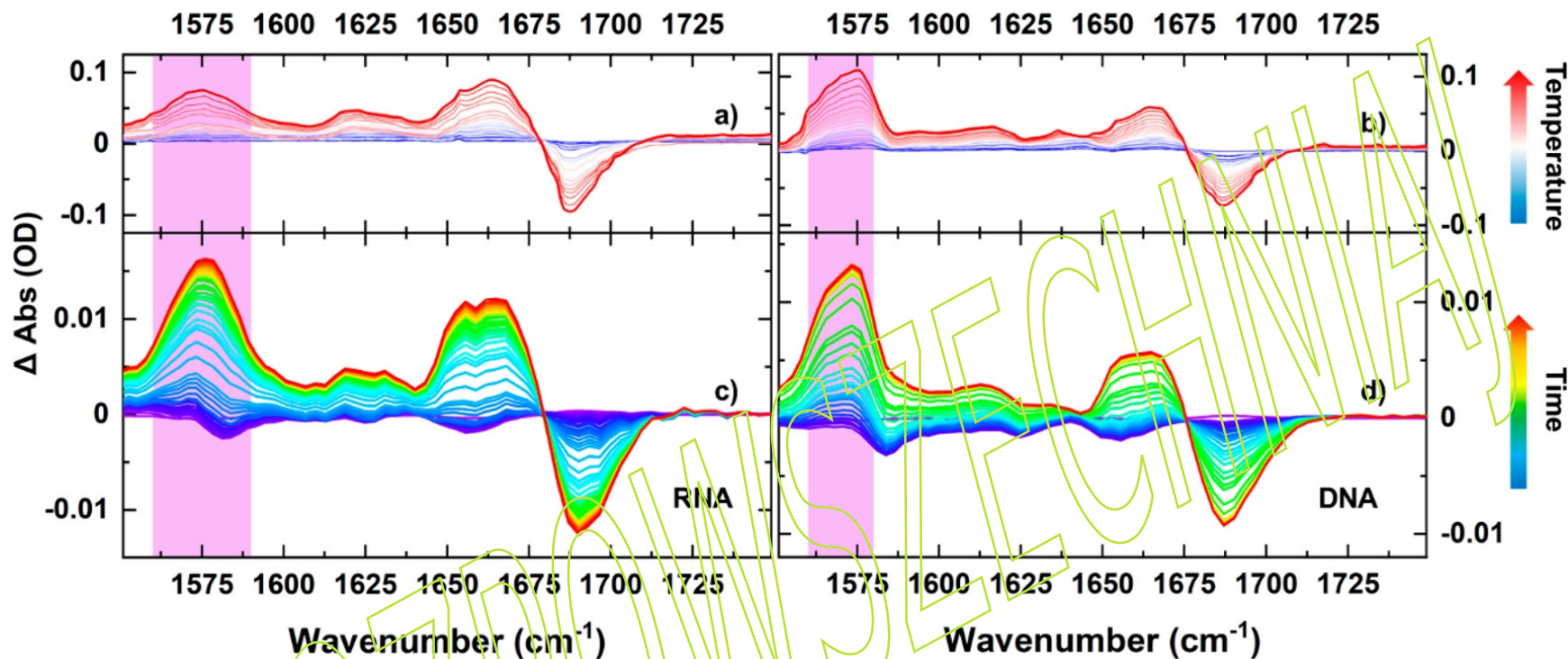
Czasowo-rozdzielcza spektroskopia w podczerwieni ze skokiem/spadkiem temperatury została wykorzystana do pomiaru dynamiki topnienia i ponownego fałdowania 12-nukleotydowej sekwencji RNA składającej się z tetrapętli UACG i dwuniciowego rdzenia GC o czterech parach zasad i porównania ich z dynamikami dla równoważnego DNA (TACG).

TEMPERATURE JUMP/DROP IR SPECTROSCOPY



Zazwyczaj badania ze skokiem T wykorzystują szybką (nanosekundową) inicjację, ale próbki schładzają się w wielomilisekundowych skalach czasowych. To zbyt wolno, aby bezpośrednio obserwować ponowne fałdowanie. Szybkości ponownego fałdowania (asocjacji) może więc być otrzymana z szybkości dysocjacji i stałej równowagi helisa-kłębek. W pracy zademonstrowano podejście, które wykorzystuje znacznie szybszy czas chłodzenia próbki, aby umożliwić obserwację zarówno dynamiki topnienia, jak i ponownego fałdowania spinek do włosów tetrapętli kwasu nukleinowego po inicjacji skoku T. Większe tempo chłodzenia, umożliwiające bezpośrednią obserwację ponownego fałdowania pasma, osiągnięto za pomocą cienkiego naczynka pomiarowego w celu zwiększenia wymiany ciepła. Wykorzystanie spektroskopii IR jako sondy trybów wibracyjnych zasad kwasów nukleinowych zapewnia wgląd w czasie rzeczywistym w parowanie i stacking zasad w helisie.

Skok temperatury o $10^{\circ}C$ powodował 4 ns impuls lasera Nd:YAG-pumped Optical Parametric Oscillator**, centrowany w 2750 cm^{-1} , wzbudzający wibracje drgań rozciągających OD rozpuszczalnika. Do kalibracji skoku temperatury użyto kwasu trifluorooctowego (TFA).



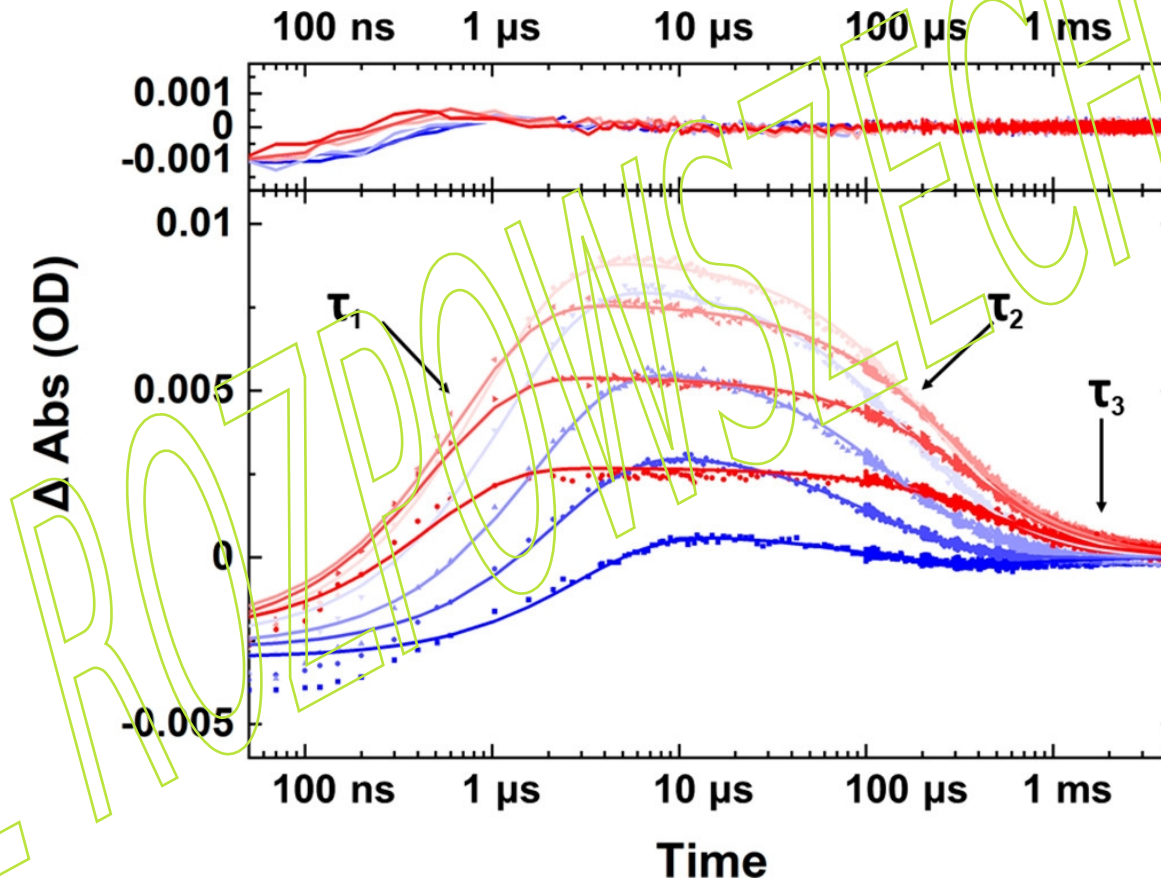
Widma absorpcji IR (a, b) dla rosnących temperatur i zmiany tych widm po skoku T (c, d) dla spinek do włosów RNA (a, c) i DNA (b, d) z tetrapętłą. (a) i (b) pokazują skorygowane na rozpuszczalnik widma różnicowe FT-IR jako funkcję T w stosunku do widma (a) RNA i (b) tetrapętli DNA w temperaturze 20 ° C. Skala kolorów obejmuje zakres od 20 do 80°C (niebiesko-czerwony) z podświetlonym modem G_R^* . Pasma tego modu zwiększa intensywność ze wzrostem temperatury co jest przypisane topieniu helikalnej struktury szpilki.

Panele c i d pokazują widma IR po skoku T, jako różnicowe widma T-jump on–T-jump off rejestrowane w czasie do 20 (RNA) lub 6 (DNA) μ s po skoku temperatury (kierunek od niebieskiego do czerwonego). Temperatury początkowe $T_0 = T_m - 5$ °C. Wzrost amplitudy pasma GR po stopieniu dwuniciowej helisy GCGC pojawia się jako dodatni pik podświetlony przez fioletowy panel. Ujemne sygnały widmowe na bardzo wczesnym etapie po skoku T wynikają z szybkiego przegrupowania wiązań wodorowych.

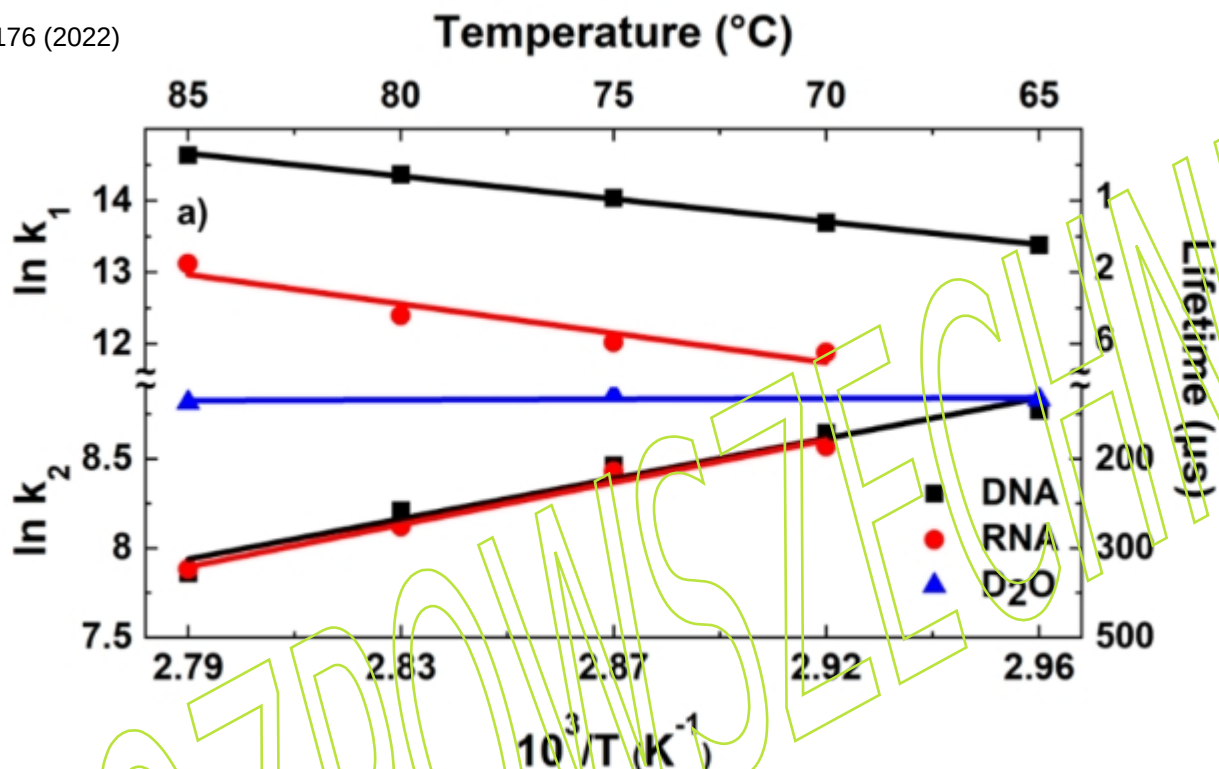
* G_R mode = mod wibracyjny pierścienia guaninowego;

**Optyczny oscylator parametryczny (OPO) jest źródłem światła. Cechą optycznych oscylatorów parametrycznych jest elastyczność długości fali. OPO mogą dostarczać długości fal, które są trudne lub niemożliwe do osiągnięcia przez lasery.

Aby zbadać dynamikę spinek do włosów po skoku T, przeprowadzono eksperymenty na sekwencjach RNA i DNA, dla różnych temperatur początkowych (T_0). W każdym przypadku zaobserwowano wzrost intensywności pasma G_R , osiągając szczyt w pobliżu 20 i 6 μs , odpowiednio dla spinek do włosów RNA i DNA, po czym sygnał spadał w milisekundowej skali czasu. W każdym przypadku zależność czasową pasma G_R dopasowano za pomocą funkcji potrójnie wykładniczej. Większość profilu czasowego została wyjaśniona przez dwa procesy, których czasy życia określały ilościowo wzrost (τ_1) i zanik (τ_2) sygnału. Trzeci składnik wykładniczy miał na ogół niską amplitudę (<25%), ale był niezbędny do uzyskania dobrej jakości dopasowania.



Przykładowe dane pokazujące zależność od temperatury i czasu intensywności pasma G_R (kropki) dla spinki DNA. Dane przedstawiono dla T_0 od 50 do 85°C (niebiesko-czerwone) w odstępach co 5°C przez przejście topnienia typu spinka do włosów, wraz z dopasowaniami potrójnie wykładniczymi (linie). Odchylenia danych doświadczalnych od funkcji dopasowanych pokazuje górna część rysunku. Pokazano czasy relaksacji dla wzrostu (τ_1) i zaniku (τ_2) absorpcji. Trzeci czas relaksacji ma niską amplitudę.



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 (DNA $T_0 + 5^\circ C$, 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 skale czasowe 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

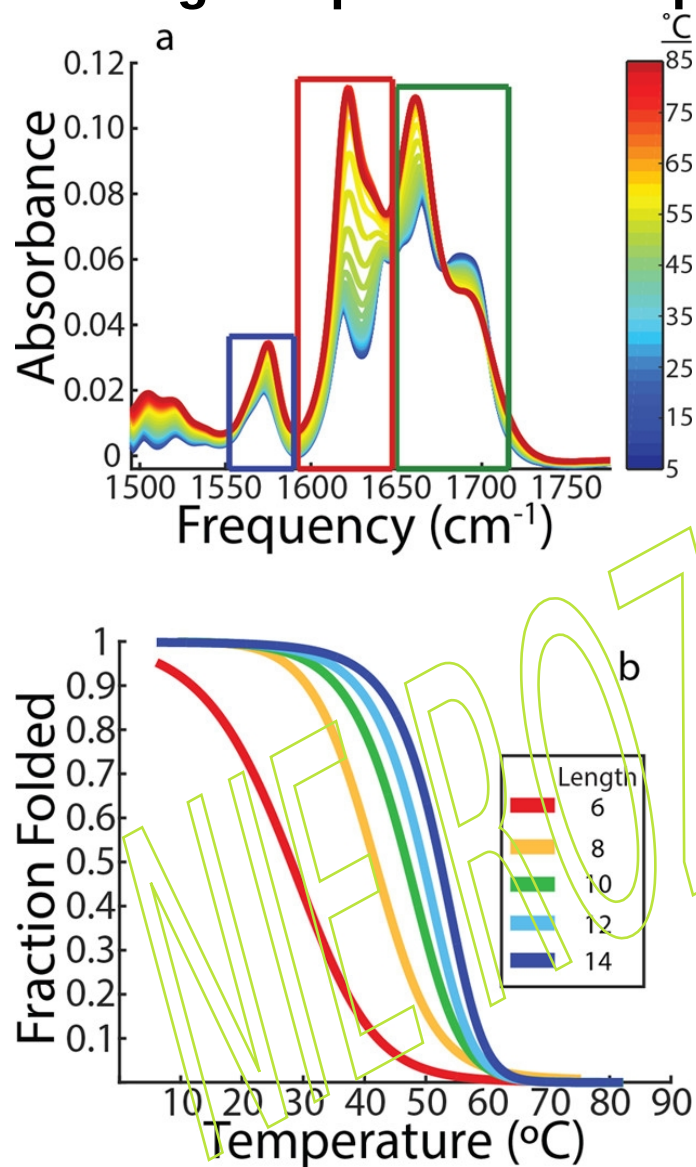
^aAll ΔG calculated at 37 °C.

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.

(JMA: najwyraźniej prace Porschkego nie są autorom znane)

Length-Dependent Melting Kinetics of Short DNA Oligonucleotides

Using Temperature-Jump IR Spectroscopy, R. J. Menssen and A. Tokmakoff



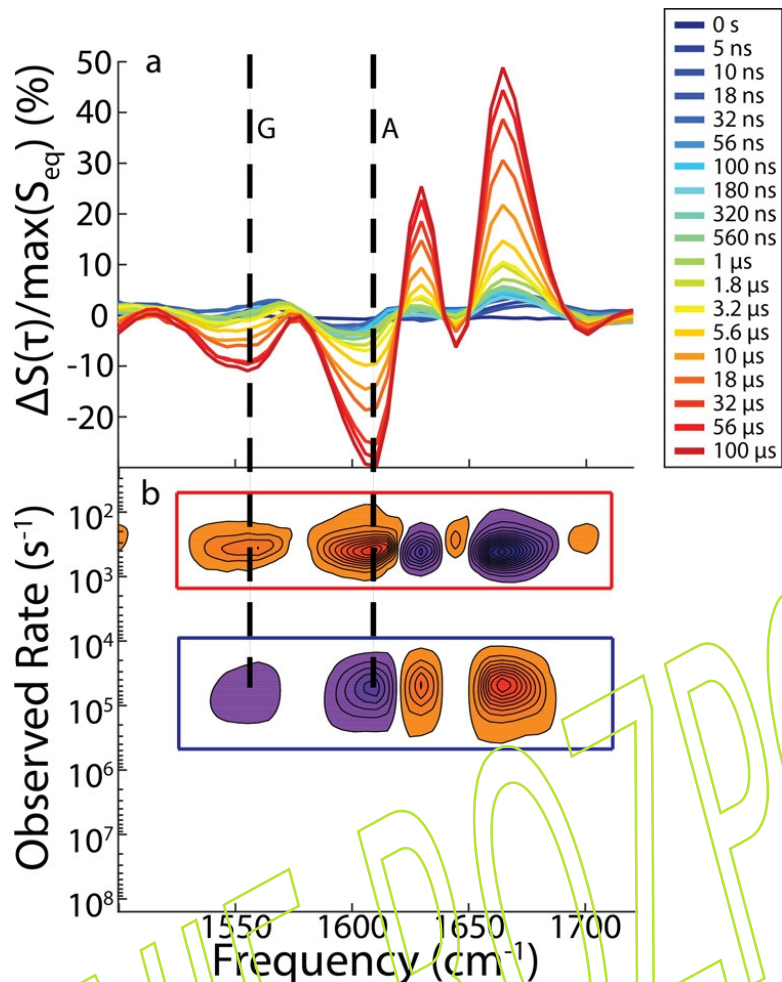
Badano kinetykę topienia dupleksów self-komplementarnych oligonukleotydów DNA o sekwencji C(AT)_nG (n = 2–6) i długościach L = 6–14 nukleotydów w pojedynczej nici. Pomiary kinetyki prowadzono w ultraszybkim nieliniowym spektrometrze IR skoku temperatury. Skok temperatury osiągnęto przez wzbudzenie nadtonów drgań rozciągających wiązania OD w D₂O. Kinetykę dupleksu po skoku T śledzono przy pomocy ultraszybkiego spektrometru IR używającego lasera działającego na próbkę impulsami centrowanymi na długości fali 6.2 μm (1613 cm⁻¹) andi szerokości połówkowej 160 cm⁻¹ zsynchronizowanymi elektronicznie z nanosekundowym laserem T-jump. The spot size of the T-jump laser is 500 μm in diameter, which is larger than the spot size of the probe pulses 100 μm in diameter. All przejściowe widma T-jump są widmami różnicowymi między widmem IR zarejestrowanym po określonym czasie od skoku temperatury (τ) i równowagowym widmem IR:

$$\Delta S(\omega, \tau) = S(\omega, \tau) - S_0(\omega).$$

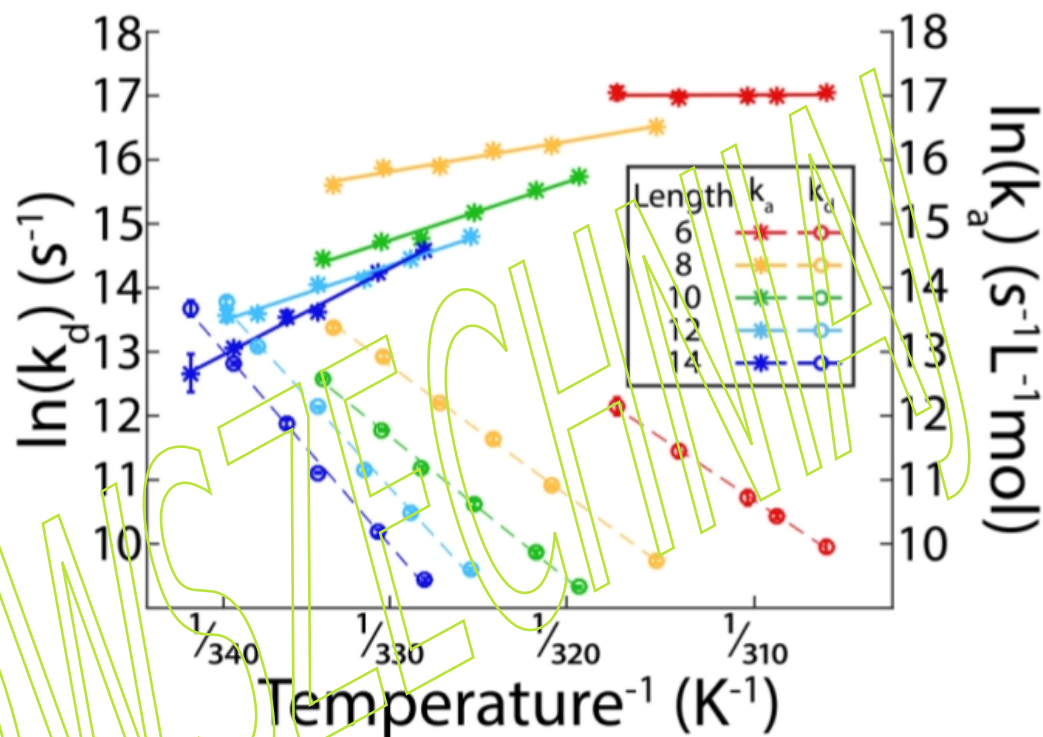
*heterodyne-detected vibrational echo

(a) Temperaturowe zmiany FTIR dla L = 14. Ramki zaznaczają piki dla modu pierścienia guaniny (niebieska) dla modu pierścienia adeniiny (czerwona) i dla obszaru nakładania się wkładów od tyminy, cytozyny i guaniny (zielona).

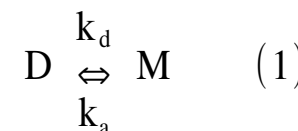
(b) Krzywe topienia DNA otrzymane z fitowania zależności temperaturowej widm FTIR.



(a) Przejściowe widmo IR dla $L = 6$, $T_i = 25^\circ\text{C}$ i $T_f = 40^\circ\text{C}$ w skoku temperatury, dla czasów opóźnienia między 0 and 0.1 ms, ze wzrostem czasu zaznaczonym kolorami od niebieskiego do czerwonego. Widma pokazują dodatnie i ujemne piki odpowiadające przejściom wibracyjnym od 0 do 1 i od 1 do 2.
 (b) Rozkład stałych szybkości, gdzie kolor fioletowy oznacza zmniejszanie sygnału w czasie a kolor pomarańczowy oznacza wzrost sygnału. Kropkowane czarne linie są wskazówką dla oka i pokazują powiązanie zmian w widmie z rozkładem stałych szybkości.

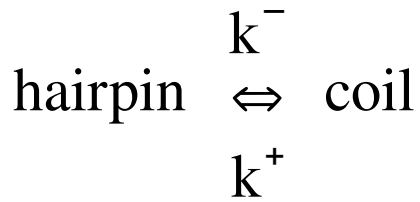


Wykresy Arrhenius'a dla stałych szybkości asocjacji i dysocjacji z pomiarów drgań pierścienia adeniny. Wyniki wskazują na termicznie aktywowaną kinetykę z dodatnią barierą dla dysocjacji i ujemną barierą dla asocjacji, w zgodzie z wynikami opisanymi w literaturze (Porschke; Crothers). Ujemna bariera aktywacji wskazuje, że proces asocjacji w równaniu 1 nie reprezentuje reakcji elementarnej.



Aby uniknąć niejednoznaczności w fizycznej interpretacji ujemnej energii aktywacji i aby lepiej zrozumieć rolę zmian entropii w określeniu bariery dla reakcji, otrzymane wyniki zostały zinterpretowane z wykorzystaniem równania Eyring'a:

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = -\frac{\Delta H^\ddagger}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}$$



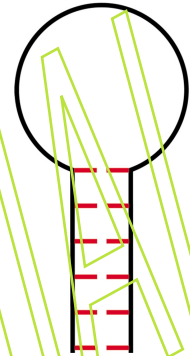
$$\frac{1}{\tau} = k^- + k^+$$

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

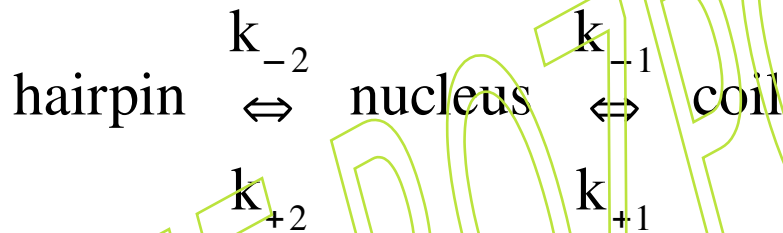
$$k^+ = A^+ e^{-E_a^+/RT}$$

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

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



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.



$$[\text{nucleus}] = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} [\text{coil}]$$

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

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

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

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

Eyring analysis:

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = -\frac{\Delta H^\ddagger}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}$$

J. Phys. Chem. B 123:756-767 (2019)						
species	ΔG_d^\ddagger [kJ/mol]	ΔH_d^\ddagger [kJ/mol]	ΔS_d^\ddagger [J/(mol·K)]	ΔG_a^\ddagger [kJ/mol]	ΔH_a^\ddagger [kJ/mol]	ΔS_a^\ddagger [J/(mol·K)]
C(AT) ₂ G	49.0	160	358	32.2	-3.2	-114
C(AT) ₃ G	54.0	175	390	32.9	-44.0	-248
C(AT) ₄ G	58.1	193	435	33.3	-82.4	-373
C(AT) ₅ G	64.1	262	638	34.4	-83.1	-379
C(AT) ₆ G	66.9	279	684	31.3	-129	-517

J. Phys. Chem. Lett. 13:9171-9176 (2022)						
species	ΔG_m^\ddagger [kJ/mol]	ΔH_m^\ddagger [kJ/mol]	ΔS_m^\ddagger [J/(mol·K)]	ΔG_r^\ddagger [kJ/mol]	ΔH_r^\ddagger [kJ/mol]	ΔS_r^\ddagger [J/(mol·K)]
DNA hairpin	46.8	61.2	46	49.5	-48.1	-315
RNA hairpin	53.8	80.4	86	49.1	-51.2	-324

RNA hairpin: 5'-GCGC(UACG)GCGC-3'

DNA hairpin: 5'-GCGC(TACG)GCGC-3'

W J. Phys. Chem. Lett. 2022, 13, 9171-9176, analizę Eyringa przeprowadza się dla procesu jednocząsteczkowego, nie ma zatem konieczności odwoływania się do interpretacji Arrheniusa zakładającej istnienie etapów polegających na zarodkowaniu struktury helikalnej.

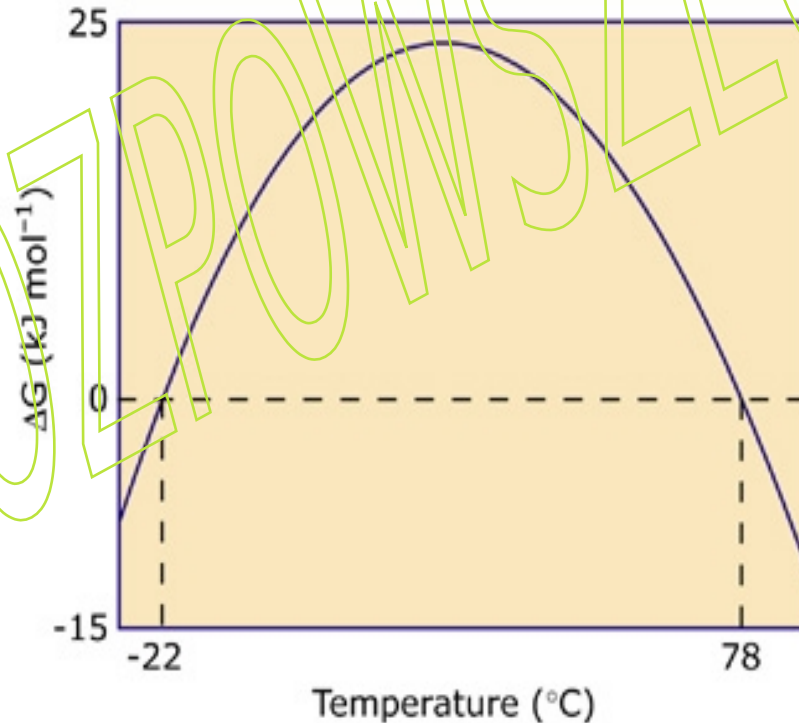
SCOPUS do 5 XI 2024 opublikowano 1980 prac zawierających w tytule słowo Arrhenius.

Termodynamika zimnej denaturacji białek

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, trzy publikacje w J. Am. Chem. Soc., 1964, 1964 i 1967.

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.



1. The Thermodynamics of Protein Denaturation. I. The Denaturation of Chymotrypsinogen, Brandts, J.F., J. Am. Chem. Soc., 86:4291-4301 (1964), cytowania 260;
2. The Thermodynamics of Protein Denaturation. II. A Model of Reversible Denaturation and Interpretations Regarding the Stability of Chymotrypsinogen, Brandts, J.F., J. Am. Chem. Soc., 86:4302-4314 (1964), cytowania 185;
3. The Thermodynamics of Protein Denaturation. III. The Denaturation of Ribonuclease in Water and in Aqueous Urea and Aqueous Ethanol Mixtures, Brandts, J.F., Hunt, L., J. Am. Chem. Soc., 89:4826-4838 (1967), cytowania 380; (stan na 5 XI 2024)

Misconceptions arising from a Sign Discrepancy in Thermodynamic Data for the Gibbs Free Energy Profile of Ribonuclease A

Paul W. Chun

Protein & Peptide Letters

Volume 9, Issue 4, 2002, Page: [305 - 313]

Keywords: Misconceptions, Thermodynamic, Gibbs Free Energy, Ribonuclease A

Streszczenie

Widoczna rozbieżność w danych dotyczących zmiany energii swobodnej Gibbsa w funkcji temperatury przy różnych pH, pierwotnie opublikowanych przez Brandtsa w 1965 r. i powtórzonych przez Brandtsa i Hunta w 1967 r. z niewyjaśnioną zmianą znaku, doprowadziła do prawie 40 lat błędnego myślenia w badaniu termodynamiki rozwijania się białek, łącznie z często gloszoną koncepcją zimnej denaturacji. Przeprowadziliśmy szczegółową analizę w oparciu o podejście Plancka-Benzingera, które ma ogromne znaczenie w wyjaśnianiu podstawowych aspektów energetyki biochemicznej.



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Chemical Physics Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cplett

A simple model of protein cold denaturation

Angelo Riccio^a, Giuseppe Graziano^{b,*}^a Dipartimento di Scienze e Tecnologie, Università degli Studi di Napoli Parthenope, Centro Direzionale, Isola C4, Napoli 80143, Italy^b Dipartimento di Scienze e Tecnologie, Università degli Studi del Sannio, via Francesco de Sanctis, Benevento 82100, Italy

Pionierskie badania Brandtsa termodynamiki stabilności konformacyjnej białek globularnych sugerowały występowanie denaturacji w niskiej temperaturze, oprócz zwykłej denaturacji w wysokiej temperaturze [1,2]. Jednoznaczne eksperymentalne wykrycie tzw. zimnej denaturacji nastąpiło później, operując w bardzo niskich temperaturach i po znalezieniu odpowiedniego białka modelowego. Pomiar DSC przeprowadzone przez grupę Privalova na mioglobinie [3], apomioglobinie [4] i innych białkach wykazały istnienie przejścia i jego osobliwości [5]: zarówno zmiany entalpii, jak i entropii związane z denaturacją zimną są ujemne (po obniżeniu temperatury początkowej od warunków otoczenia). Mimo że natywna struktura ulega rozwinięciu, entropia maleje, co oznacza, że wodny roztwór, w którym rozpuszczone jest białko, musi odgrywać kluczową rolę. Ponadto denaturację zimną rejestrowano także za pomocą pomiarów NMR [6–8], co stanowi ostateczne strukturalne potwierdzenie jej istnienia.

$$\Delta X = X^U - X^F; \quad d(\Delta X) = d(X^U) - d(X^F)$$

Zatem dla energii swobodnej Gibbsa mamy:

$$\Delta G = G^U - G^F \quad (1)$$

U = rozwinięty, F = zwinięty

Przywołajmy trzy znane relacje:

$$dH = T dS + V dp \quad (2)$$

$$c_p = \left(\frac{dH}{dT} \right)_p \quad (3)$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (4)$$

Z relacji (2) i (3) mamy:

$$(dH)_p = T dS \quad \Rightarrow \quad c_p = T \left(\frac{dS}{dT} \right)_p \quad (5)$$

Wykorzystując relację (3) możemy zapisać:

$$d(H)_p = c_p dT \Rightarrow \left[(dH^U)_p = c_p^U dT \wedge (dH^F)_p = c_p^F dT \right]$$

Zatem

$$(dH^U)_p - (dH^F)_p = c_p^U dT - c_p^F dT \Rightarrow d(\Delta H)_p = \Delta c_p dT$$

Możemy scałkować ostatnie wyrażenie od temperatury referencyjnej T_{ref} do temperatury T

$$\int_{T_{ref}}^T d(\Delta H)_p = \int_{T_{ref}}^T \Delta c_p dT$$

I wykorzystując fakt założonej niezależności ciepła właściwego od temperatury, otrzymujemy:

$$\Delta H(T) - \Delta H(T_{ref}) = \Delta c_p (T - T_{ref})$$

Podobne wyprowadzenie możemy przeprowadzić dla entropii:

$$d(\Delta S)_p = \frac{\Delta c_p}{T} dT$$

Zatem

$$\int_{T_{ref}}^T d(\Delta S)_p = \int_{T_{ref}}^T \frac{\Delta c_p}{T} dT$$

Skąd otrzymujemy

$$\Delta S(T) - \Delta S(T_{ref}) = \Delta c_p \ln\left(\frac{T}{T_{ref}}\right)$$

Wykorzystując relacje (1) i (4), możemy

$$\Delta G(T) = G^U(T) - G^F(T)$$

zapisać w formie:

$$\Delta G(T) = \Delta H(T) - T \Delta S(T) = \Delta H(T_{ref}) + \Delta c_p (T - T_{ref}) - T \left[\Delta S(T_{ref}) + \Delta c_p \ln\left(\frac{T}{T_{ref}}\right) \right]$$

co ostatecznie prowadzi do równania:

$$\Delta G(T) = \Delta H(T_{ref}) - T \Delta S(T_{ref}) + \Delta c_p (T - T_{ref} - T \ln(T/T_{ref}))$$

Możemy zbadać ostatnie wyrażenie jako funkcję temperatury T zakładając $\Delta c_p > 0$.
Zacznijmy od przepisania tego wyrażenia w następującej formie:

$$\Delta G(T) = \Delta H(T_{ref}) - T \Delta S(T_{ref}) - T_{ref} \Delta S(T_{ref}) + T_{ref} \Delta S(T_{ref}) + \Delta c_p (T - T_{ref} - T \ln(T/T_{ref}))$$

$$\Delta G(T) = \Delta H(T_{ref}) - T_{ref} \Delta S(T_{ref}) - T \Delta S(T_{ref}) + T_{ref} \Delta S(T_{ref}) + \Delta c_p (T - T_{ref} - T \ln(T/T_{ref}))$$

$$\Delta G(T) = \Delta G(T_{ref}) - (T - T_{ref}) \Delta S(T_{ref}) + \Delta c_p (T - T_{ref} - T \ln(T/T_{ref}))$$

$$\Delta G(T) = \Delta G(T_{ref}) + [\Delta c_p - \Delta S(T_{ref})] (T - T_{ref}) - \Delta c_p T \ln(T/T_{ref})$$

Zapiszmy T w postaci $T_{ref} + \Delta T$, zatem ostatnie wyrażenie przedstawimy w postaci:

$$\Delta G(T) = \Delta G(T_{ref}) + [\Delta c_p - \Delta S(T_{ref})] \Delta T - \Delta c_p (T_{ref} + \Delta T) \ln\left(\frac{T_{ref} + \Delta T}{T_{ref}}\right)$$

Dla małych $\Delta T/T_{ref}$ zapiszemy: $\ln\left(\frac{T_{ref} + \Delta T}{T_{ref}}\right) \approx \frac{\Delta T}{T_{ref}}$

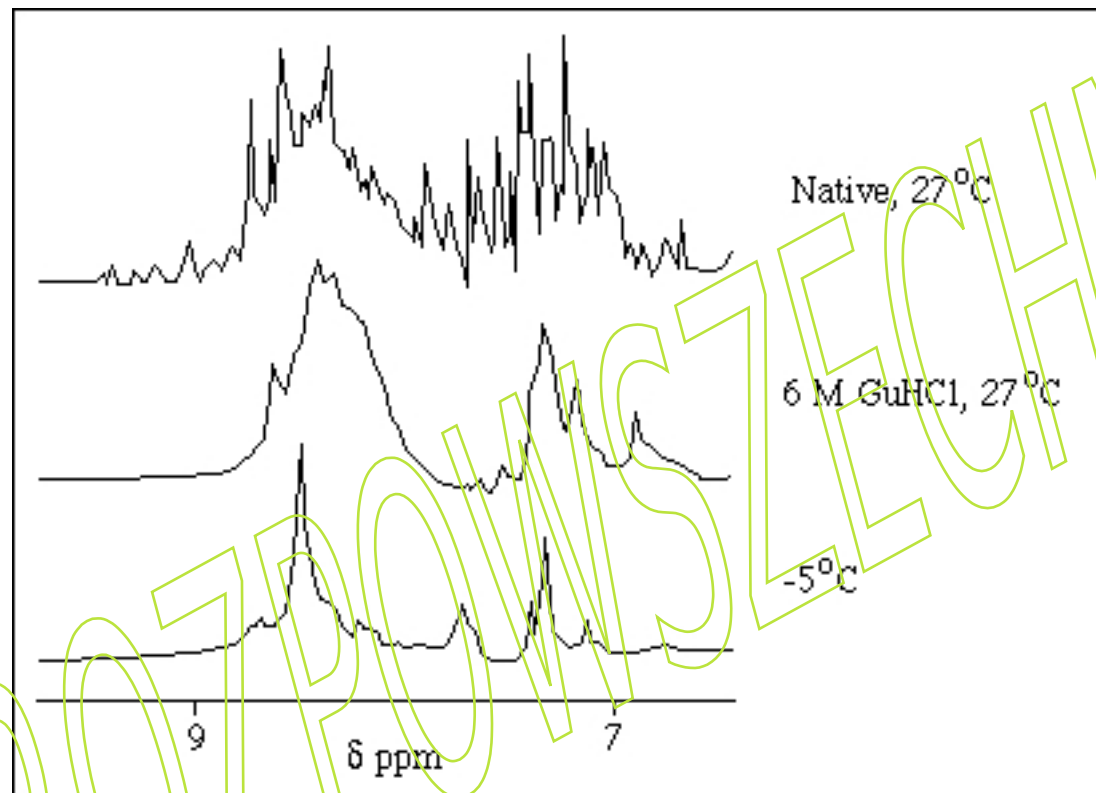
Skąd:
$$\Delta G(T) = \Delta G(T_{ref}) + [\Delta c_p - \Delta S(T_{ref})] \Delta T - \Delta c_p (T_{ref} + \Delta T) \frac{\Delta T}{T_{ref}}$$

$$\Delta G(T) = \Delta G(T_{ref}) + [\Delta c_p - \Delta S(T_{ref})] \Delta T - \Delta c_p \Delta T - \frac{\Delta c_p}{T_{ref}} (\Delta T)^2$$

I w końcu:

$$\Delta G(T) = \Delta G(T_{ref}) - \Delta S(T_{ref}) \Delta T - \frac{\Delta c_p}{T_{ref}} (\Delta T)^2$$

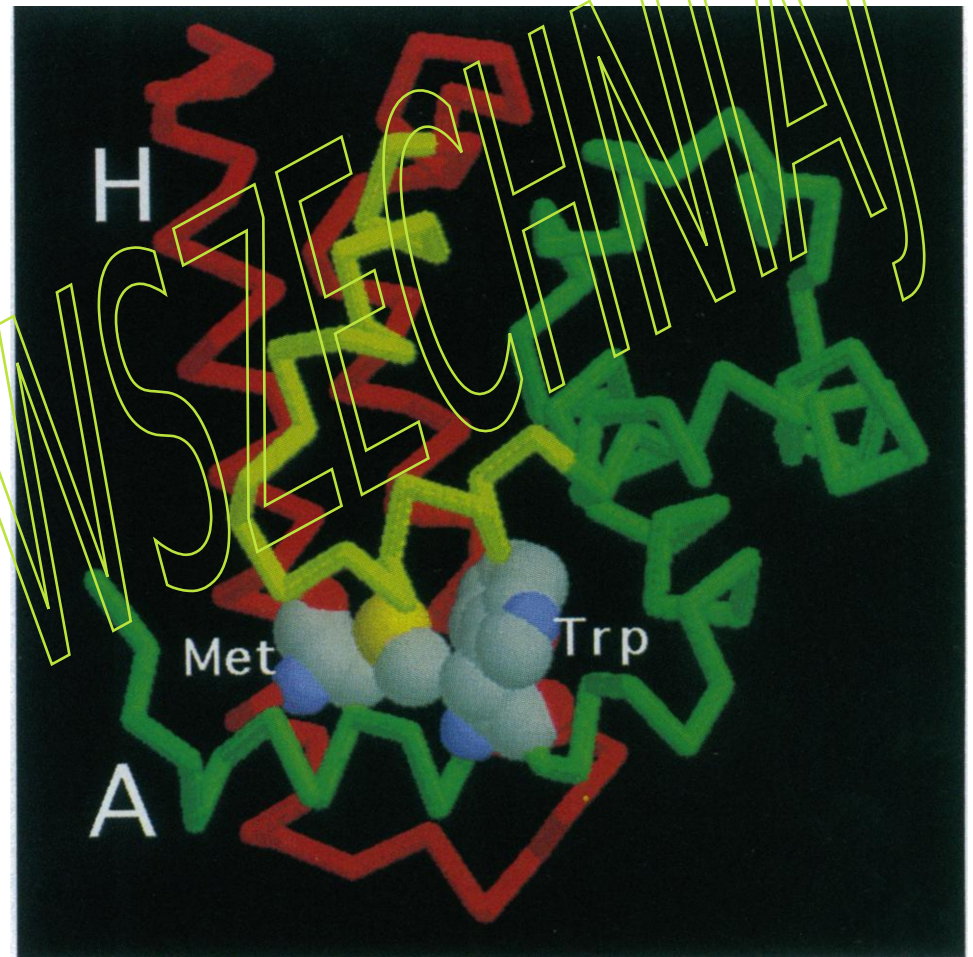
denaturacja białek zimnem



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. W tym stanie białko nie ma struktury trzeciorzędowej, chociaż zachowuje pewną resztkową eliptyczność, która może być spowodowana zmienną konformacją alfa-helikalną rozłożonego łańcucha polipeptydowego. Rozerwanie natywnej struktury białka zarówno podczas chłodzenia (denaturacja zimnem), jak i podczas ogrzewania (denaturacja ciepłem) przebiega w sposób „wszystko albo nic”, ze znacznym i podobnym wzrostem pojemności cieplnej białka, ale z odwrotnymi efektami entalpowym i entropowym: entalpia i entropia cząsteczki białka zmniejszają się podczas denaturacji zimnem i rosną podczas denaturacji cieplnej.

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

Istota eksperymentu: próbkę białka poddaje się denaturacji zimnem w kuwecie o krótkiej drodze optycznej poprzez przechłodzenie buforu wodnego. Spektroskopia CD 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 Ramana w podczerwieni. Rozwinięte białko znajduje się teraz w ogrzonym buforze w temperaturze termodynamicznie sprzyjającej zwijaniu. Proces zwijania śledzi się poprzez oświetlenie próbki ciągiem krótkich impulsów lasera UV wzbudzających fluorescencję tryptofanu.



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.

(A) Średnia eliptyczność na aminokwas przy 222 nm (dyski) dla h-apoMb w zakresie $-8-95^{\circ}\text{C}$ (pH 5,9).

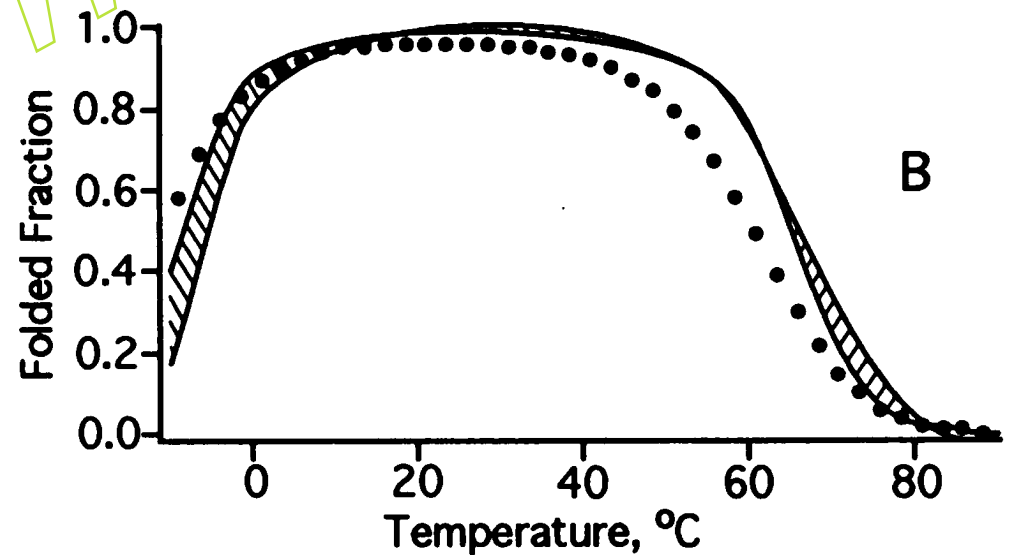
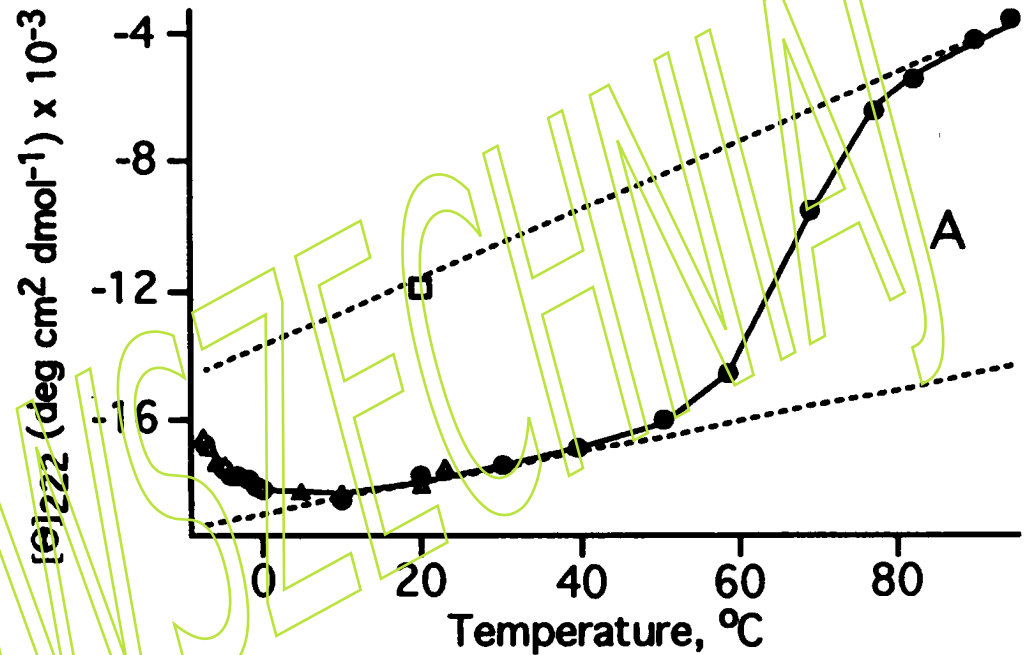
\triangle CD zmierzone po przetrzymywaniu próbki w temperaturze $-7,2^{\circ}\text{C}$ przez 1 godzinę (w pełni odwracalna denaturacja zimnem);

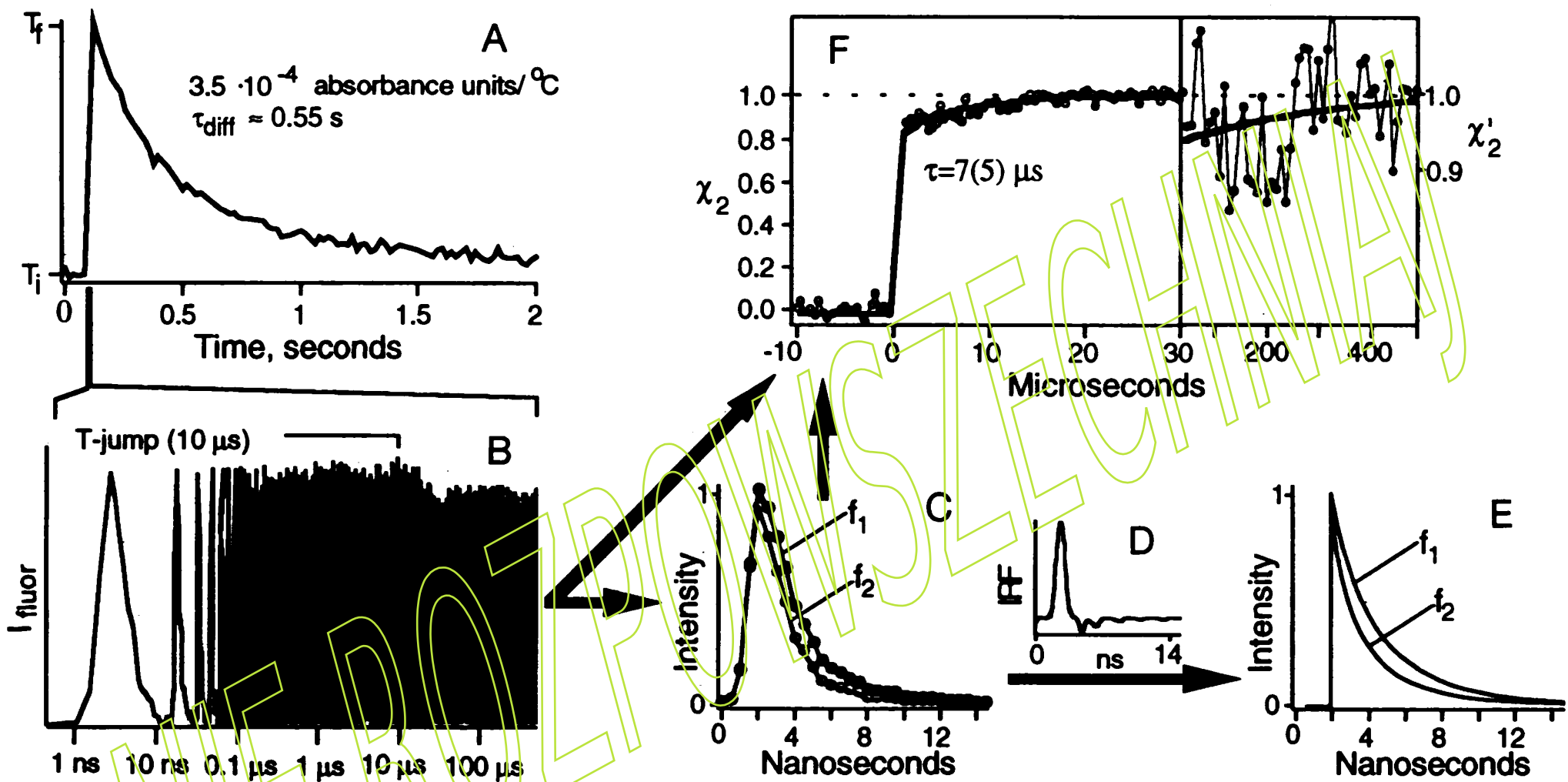
\square CD w większości zdenaturowanego białka (próbka w temperaturze $70-95^{\circ}\text{C}$ przez 1 h, następnie schłodzona do 20°C);

Linia ciągła: dopasowanie do termodynamicznego modelu dwustanowego, w tym dopasowane linie bazowe zależne od temperatury (linia przerywana);

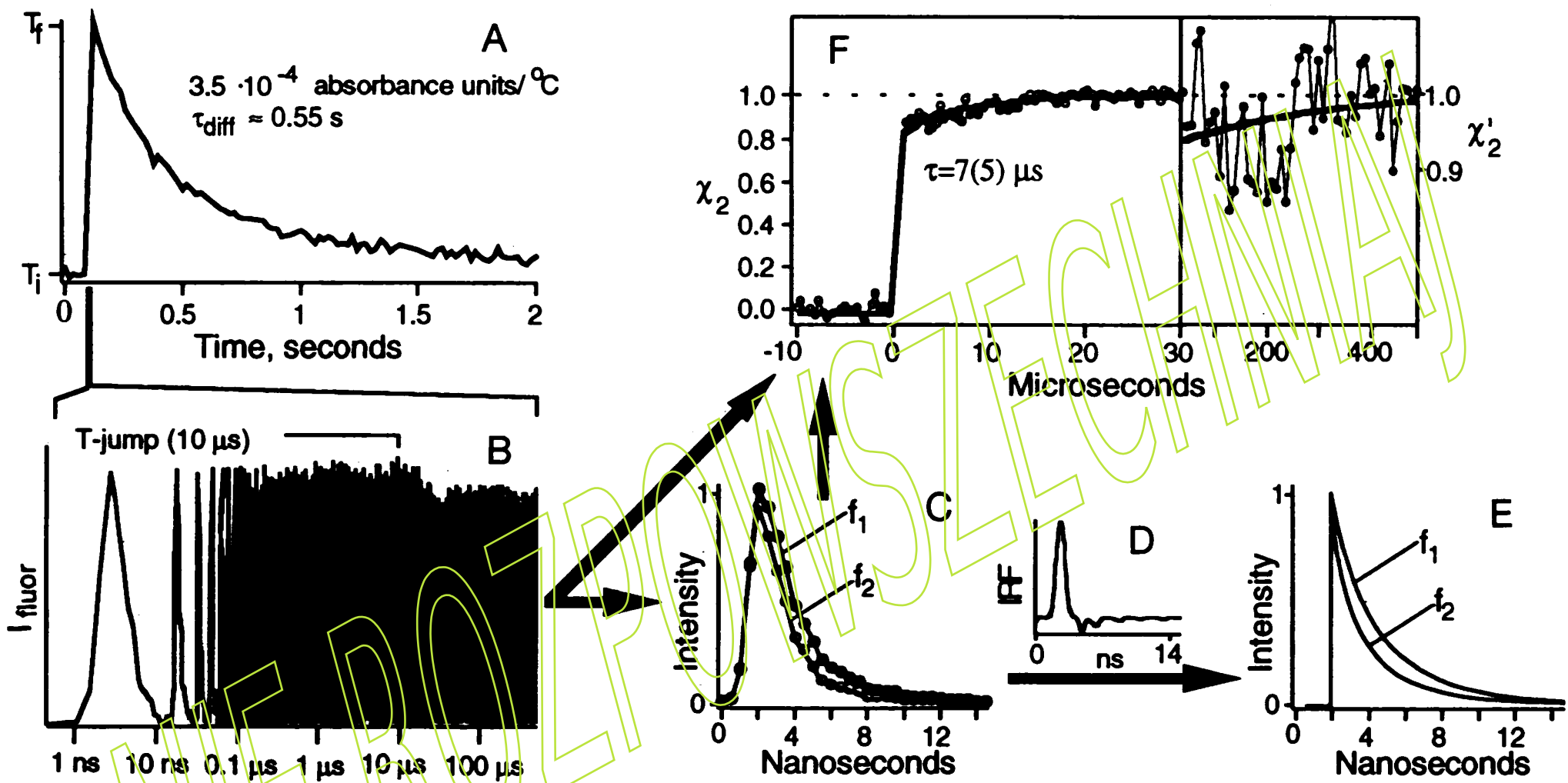
Termodynamiczne parametry dla procesu rozwijania: ΔH 195 kJ/mol, $\Delta S = 0,575$ kJ/mol-deg i $\Delta C_p = 5,1$ kJ/mol-deg.

(B) Frakcja zwiniętego białka (obszar zakreskowany oznacza niepewność wynikającą z błędów parametrów termodynamicznych). Dyski odnoszą się do eksperymentu w 3 M glicerynie, w której nadal zachodzi znacząca denaturacja zimnem. (Dane z widm CD dla buforów z 0 i 3 M gliceryny przy pH 5,2 są podobne do tych z części A i nie zostały tutaj pokazane; niepewność we frakcji formy zwiniętej w 3 M glicerolu jest podobna do tej pokazanej dla warunków 0 M, pH 5,9.) Skoki T w zakresie od -10 do 10°C może spowodować zmianę populacji o 25-40%.





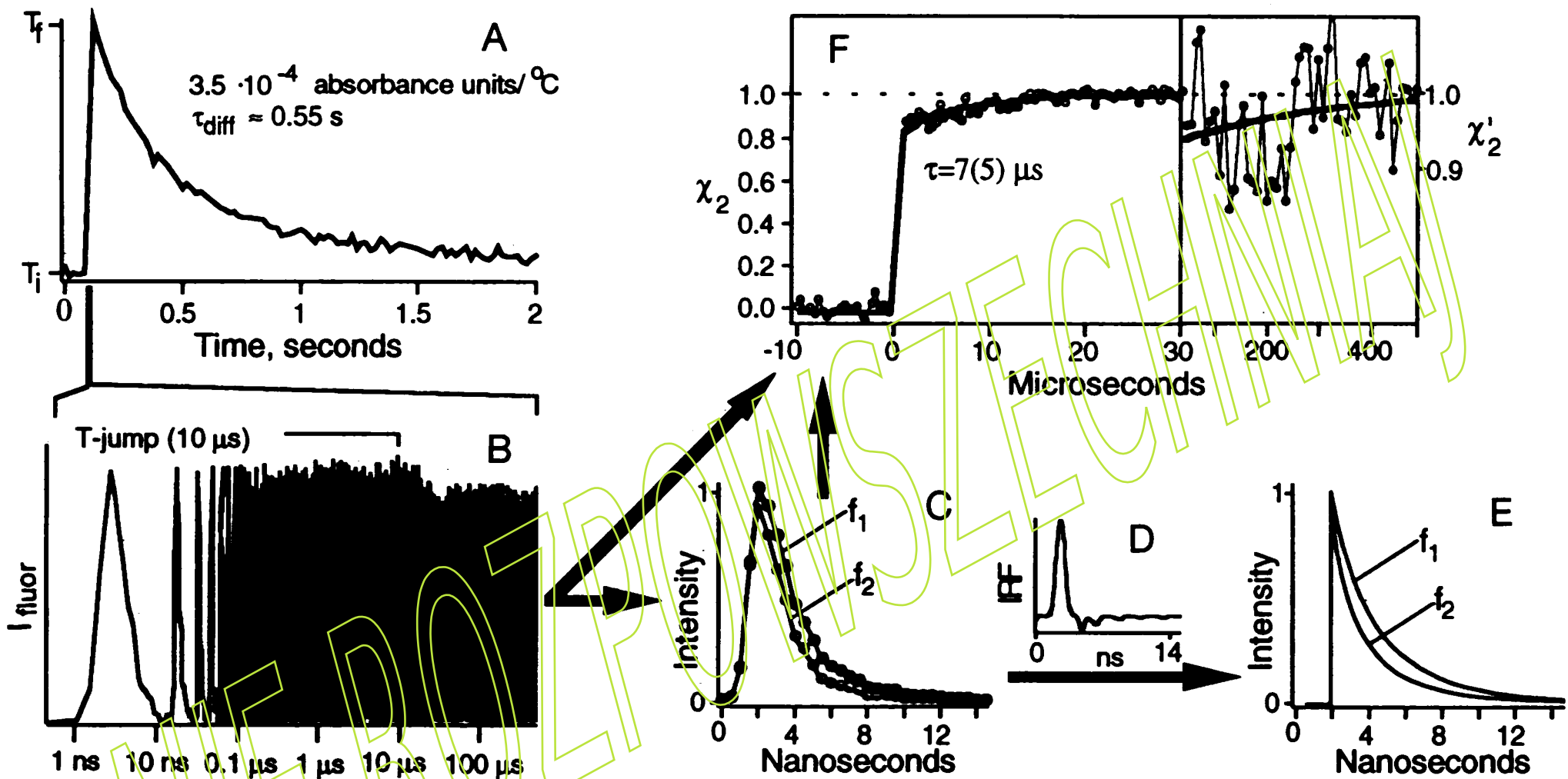
A) Powolna dyfuzyjna relaksacja temperatury w naczynku pomiarowym po skoku T.
B) Pokazane w skali logarytmicznej czasu, obejmującej sześć rzędów wielkości, od $-10 \mu\text{s}$ do $+490 \mu\text{s}$ (w odniesieniu do zaznaczonego skoku T), kolejne impulsy przejściowej fluorescencji tryptofanu Trp-14 wzbudzonej przez impulsy lasera próbującego (pH 5.9, 3×10^{-4} M białka). Po skoku T następuje faza „natychmiastowa” i faza trwająca 5 do $7 \mu\text{s}$, osiągająca fluorescencję w stanie ustalonym. Poszczególne transjenty (długość 15 ns) wyznaczają jeden punkt na drodze związania 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 μs przedziału czasu pokazanego w części A. Funkcje te charakteryzują fluorescencję Trp-14 w białku rozwiniętym (f_1) i zwiniętym (f_2).

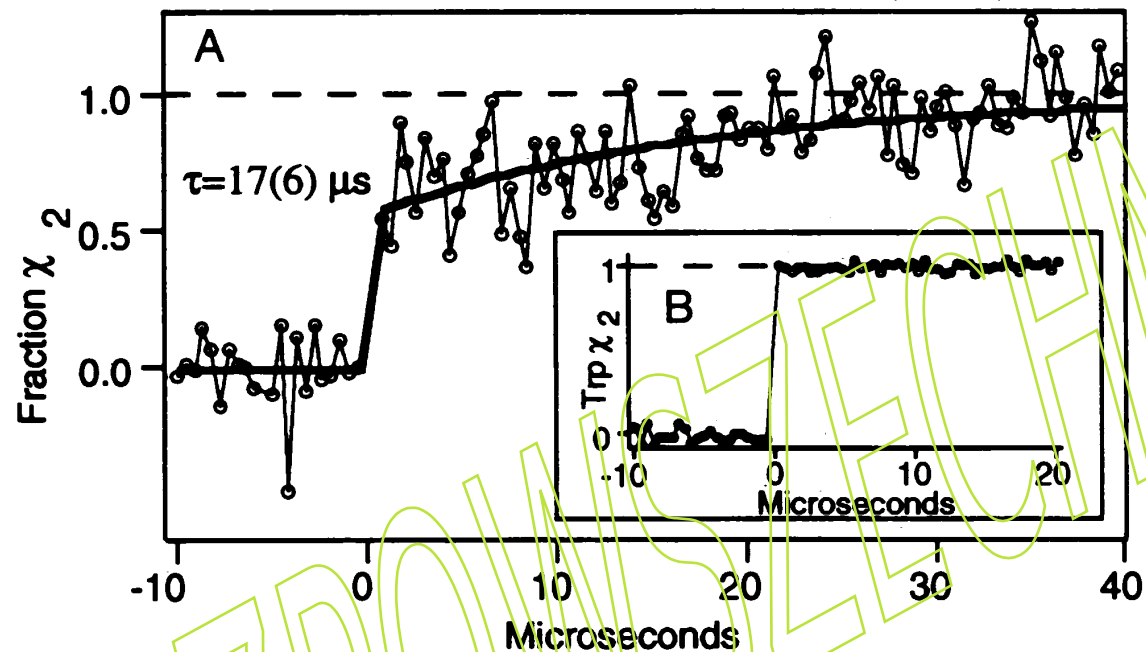
(D) funkcja odpowiedzi instrumentu, otrzymywana z pomiarów czasu życia przy użyciu skalibrowanych związków (p-terfenylu) lub rozpraszania 420 nm jako odpowiedzi natychmiastowej.

Zaniki fluorescencji są dopasowane do funkcji dwueksponencjalnej powiązanej (spłot funkcji – poprzedni wykład) z funkcją odpowiedzi instrumentu.



(E) Funkcje zaniku fluorescencji, f_1 i f_2 , po dekonwolucji dofitowaniu zaniku dwueksponencjalnego. Każda zarejestrowana, między czasem "zero" aż do $482 \mu\text{s}$ jest przedstawiona jako suma f_1 i f_2 pomnożonych przez odpowiednie amplitudy względne: $f = A_1 f_1 + A_2 f_2$, z $A_1 + A_2 = 1$, skąd określa się $\chi_2 = A_2 / (A_1 + A_2)$, określające frakcję formy zwiniętej;

(F) Kinetyczna faza $7(5)\text{-}\mu\text{s}$ w $\chi_2 = A_2 / (A_1 + A_2)$ związana z procesem zwijania mioglobiny. Stanowi ona 15% zmian w χ_2 . Początkowe zmiany wynikają z chwilowego efektu wpływu skoku temperatury na fluorescencję tryptofanu. χ_2 jest niezależne od ogólnej intensywności fluorescencji i zależy jedynie od kształtu (tj. czasu życia) sygnału w miarę przechodzenia białka od stanu rozwiniętego do stanu zwiniętego.



(A) Kinetyczna faza w χ_2 dla h-apoMb badanej w buforze zawierającym 3 M gliceryny (pH 5.2). Faza z czasem relaksacji 17(6)- μ s dla tej próbki [3.5 cP w 5°C (1 P = 0.1 Pa·s)] jest znacząco wolniejsza niż ta obserwowana w buforze bez dodatku gliceryny (1.3 cP at 10°C). Wskazuje to, że lepkość rozpuszczalnika dominuje nad efektami tarcia wewnętrznego białek w przypadku znaczących przemieszczeń elementów struktury białka podczas procesu zwijania.

(B) Kontrolny eksperyment z wolnym Trp (pH 5.9, skok T od 0 do 22°C). Widoczna jest tylko “natychmiastowa” składowa kinetyczna w χ_2 . Podobne wyniki uzyskano dla kontrolnych eksperymentów z h-apoMb zdenaturowaną kwasem oraz z apoMb kaszalota, w której dokonano mutacji Met-131-Ala.