

Дифференциальная адиабатическая сканирующая калориметрия как метод изучения конформационной стабильности белков в криобиологии

Ю.С. ГОВОРОВА, А.В. ЗИНЧЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Differential Adiabatic Scanning Calorimetry as Method of Studying Conformational Proteins Stability in Cryobiology

YU.S. GOVOROVA, A.V. ZINCHENKO

Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Одним из аспектов криобиологических исследований является изучение влияния криопротекторов и низких температур на стабильность пространственной структуры белков. Проблема денатурации и фолдинга белков имеет также и медицинское значение. Причиной ряда смертельно опасных болезней человека и животных является агрегация белка, которая, в свою очередь, обусловлена неправильным фолдингом либо дестабилизацией белковых молекул.

Термодинамические характеристики процесса тепловой денатурации белков под влиянием различных физико-химических факторов свидетельствуют о конформационных изменениях молекул.

Одним из основных методов изучения тепловой денатурации белков является дифференциальная сканирующая калориметрия. Калориметрия – метод, позволяющий прямо измерять термодинамические характеристики белков и других веществ и изучать энергетику процессов, связанных с конформационными превращениями белковых молекул.

Разработанный для данных целей в Пушино дифференциальный сканирующий адиабатический микрокалориметр третьего поколения ДАСМ-4 предназначен для высокочувствительного теплового анализа жидкостей в интервале температур от 0,5 до 130°C. Принцип его действия заключается в регистрации разности тепловых мощностей, выделяемых или поглощаемых в калориметрических камерах, прогреваемых с постоянной мощностью в адиабатических условиях. Калориметр работает с компенсацией разности тепловых мощностей, возникающих в процессе нагрева исследуемой жидкости и жидкости сравнения. Зависимость сигнала, пропорционального мощности компенсации, от температуры регистрируется двухкоординатным самописцем.

Нами было исследовано влияние глицерина, 1,2-пропандиола (1,2-ПД) и оксиэтилированного глицерина со степенью полимеризации 5 (ОЭГ_{n=5}) на теплофизические параметры денатурации гемоглобина (Hb) быка. Показано, что присутствие глицерина в растворе Hb приводит к появлению экзотермической агрегации, выраженной тем сильнее, чем выше концентрация неэлектролита в растворе гемоглобина. На основании анализа значений полуширины пиков денатурации гемоглобина и их симметричности установлено, что 1,2-ПД понижает кооперативность процесса плавления.

Построены зависимости теплофизических параметров (температуры и энтальпии денатурации гемоглобина) от концентрации ОЭГ_{n=5} и 1,2-ПД. Снижение температуры плавления Hb с увеличением концентрации как 1,2-ПД, так и ОЭГ_{n=5} указывает на уменьшение стабильности пространственной структуры молекулы Hb. Однако ОЭГ_{n=5} в меньшей степени оказывает влияние на конформационную стабильность Hb.

The study of the effect of cryoprotectants and low temperatures on stability of the spatial structure of proteins is one of aspects of cryobiological researches. The problem of denaturation and folding of proteins is also of medical value. The aggregation of protein, which is, in turn, caused by either incorrect folding or by the destabilization of protein molecules, is the reason for a number of human and animal fatal diseases.

Thermodynamic characteristics of process of protein thermal denaturation under the effect of different physical and chemical factors make possible the estimation of conformational changes of molecules.

Differential scanning calorimetry (DSC) is one of basic methods for study of protein thermal denaturation. Calorimetry is the method for direct determination of thermodynamic parameters of proteins and other substances as well as for studying the energetics of the processes associated with conformational transitions of protein molecules.

The differential scanning adiabatic microcalorimeter of the third generation DASM-4 developed for this purpose in Pushchino, Russia, is intended for highly sensitive thermal analysis of liquids within the temperature range from 0.5 to 130°C. The principle of its action is to record the difference of thermal power, emitted or absorbed in the calorimetric chambers, heated with constant power under the adiabatic conditions. Calorimeter works with the compensation for a difference in the heat output, which appears in the process of heating, the investigated liquid and the one of comparison. The dependence of the signal, proportional to the power of compensation, on the temperature is recorded by *xy* recorder. We have investigated the influence of glycerol, 1,2-propane diol (1,2-PD) and oxyethylated glycerol with a degree of polymerization of 5 (OEG_{n=5}) on the thermophysical parameters of bovine hemoglobin (Hb) denaturation. It is shown that the glycerol presence in Hb solution leads to the exothermic aggregation, expressed more strongly the higher the concentration of the non-electrolyte in the solution of hemoglobin. Basing on the analysis of the values of the half-width of the peaks for hemoglobin denaturation and their symmetry it is established that 1,2-PD reduces the cooperativity of the melting process.

The dependences of the thermophysical parameters, (temperature and denaturation enthalpy of hemoglobin) on the concentration of OEG_{n=5} and 1,2-PD are obtained. Decreasing the Hb melting temperature along with increasing the concentration of both 1,2-PD and OEG_{n=5} indicates the decrease in stability of spatial structure of Hb molecule. However, OEG_{n=5} has a less expressed effect on conformational stability of Hb.