



LOSCHMIDTOVY
LABORATOŘE
MASARYKOVA UNIVERZITA



Mikrokalorimetrie pro studium biomakromolekul

Veronika Štěpánková

Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Obsah přednášky

- termodynamika obecně
- historie a současnost kalorimetrie
- **isotermální titrační kalorimetrie**
 - princip, popis přístroje, příklady využití
- **diferenční skenovací kalorimetrie**
 - princip, popis přístroje, příklady využití
- úskalí experimentů
- výhody a nevýhody mikrokalorimetrie
- literatura

Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Obecně termodynamika

- tepelné změny probíhající v biologických systémech se řídí termodynamickými zákony
- **změna volné energie** při přechodu mezi počátečním a konečným konformačním stavem nebo rozdíl volné energie volných reaktantů a výsledných produktů reakce

$$\Delta G = -nRT \ln K \qquad \Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

- ΔH je z molekulárního hlediska teplo spojené se vznikem, zánikem a deformací chemických vazeb
- ΔS je při dané teplotě spojena se změnou v uspořádanosti systému molekul

Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Obecně termodynamika

- termodynamické veličiny možno vyjádřit pomocí **tepelné kapacity**, kterou lze experimentálně určovat

$$\Delta H = \int_{T_{\text{poč}}}^{T_{\text{kon}}} C_p \, dT \qquad \Delta S = \int_{T_{\text{poč}}}^{T_{\text{kon}}} C_p / T \, dT$$

- přechod z poměrně rigidního nativního stavu do méně kompaktního denaturovaného stavu doprovázena **nárůstem** tepelné kapacity
- uplatnění hydrofobních interakcí při vazbě vede k uvolnění původně uspořádaných molekul vody do roztoku, což se projeví celkovým **snížením** tepelné kapacity

Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Kalorimetrie

- experimentální technika zabývající se měřením energie ve formě tepla
- umožňuje měřit termodynamické charakteristiky přímo v jediném experimentu
- různé druhy energie (zářivou, elektrickou či chemickou) lze za vhodných podmínek převést kvantitativně na teplo

$$Q = C_k \cdot \Delta T$$

Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Počátky kalorimetrie

- **Antoine Lavoisier** považován za zakladatele kalorimetrie a termochemie
- 1782: první známý experiment, při kterém byla změřena tepelná výměna u biologického systému (tzv. ledový kalorimetr)



Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Současnost kalorimetrie

- **moderní mikrokolorimetry** MicroCal (GE Healthcare)
- umožňují sledovat velmi malé tepelné toky ($> 4 \text{ J}$)
- objem vzorku v řádu mikrolitrů



Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Rozdělení technik

A) Izotermální titrační kalorimetrie

B) Diferenční skenovací kalorimetrie

Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Izotermální titrační kalorimetrie

- ITC (z angl. Isothermal Titration Calorimetry)
- **měří množství tepla uvolněného nebo spotřebovaného při interakci molekul**
- studované interakce: protein-protein, protein-DNA, protein-ligand, enzym-substrát, enzym-inhibitor, protein-lipid atd.

Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Izotermální titrační kalorimetrie

- teplotní efekt při sledovaném ději kompenzován známým tepelným efektem s opačným znaménkem tak, aby teplota v kalorimetrické nádobce byla konstantní
- měří se výkon topného tělíska (případně Peltierova článku) v čase

Exotermní reakce: ohřev nádoby snížen

Endotermní reakce: ohřev nádoby zvýšen

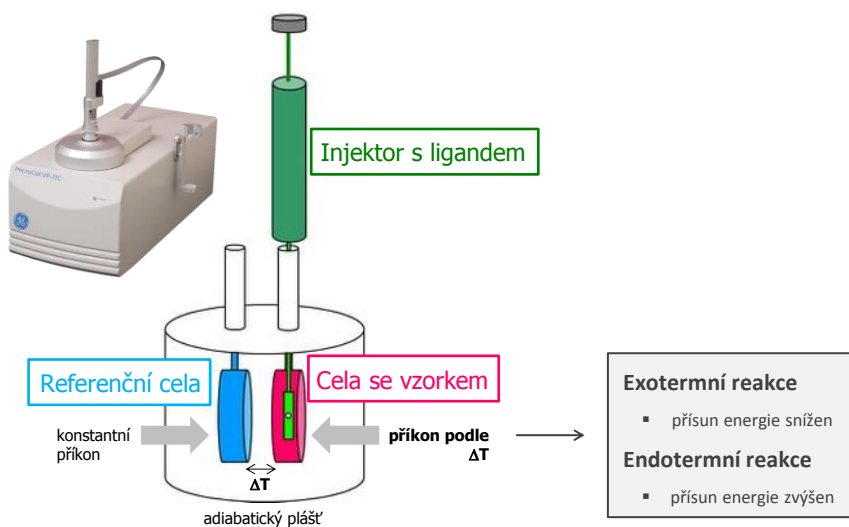
Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Izotermální titrační kalorimetrie

- příklady využití:
 - stanovení disociační konstanty (K_d)
 - vazebný mechanismus
 - stanovení reakční stechiometrie (n)
 - stanovení entropie, enthalpie a tepelné kapacity (ΔH , ΔS , ΔC_p)
 - stanovení kinetických parametrů enzymatických reakcí (K_m , k_{cat} , inhibice ...)

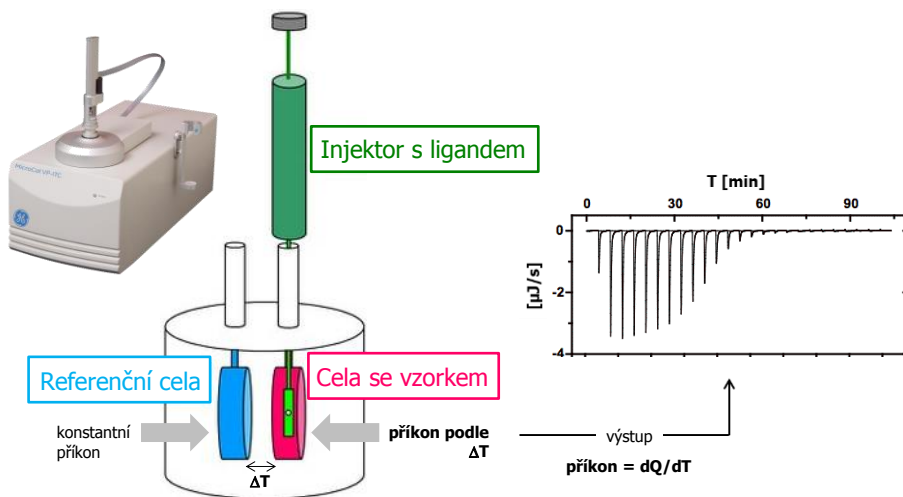
Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Izotermální titrační kalorimetrie



Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

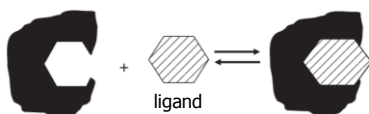
Izotermální titrační kalorimetrie



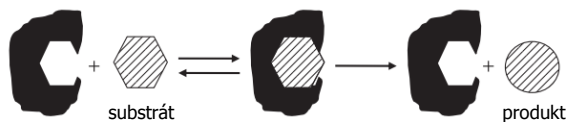
Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Využití ITC

A) Stanovení vazebných parametrů



B) Stanovení kinetických parametrů enzymů

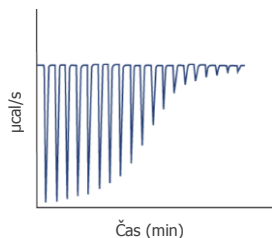


Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Využití ITC

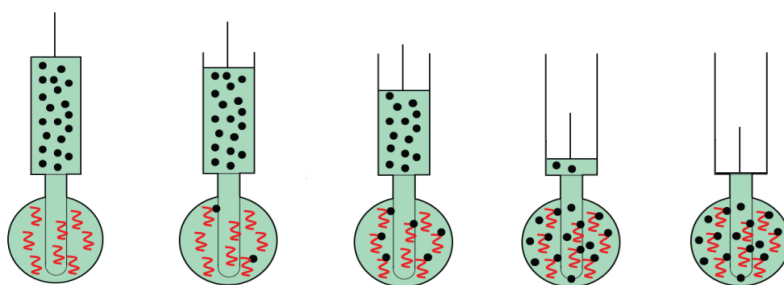
Stanovení vazebných parametrů

- záznam tepelné změny generované během přikapávání malého objemu ligandu do cely se vzorkem

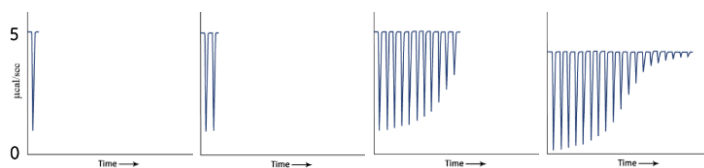


Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Titrační experiment



- Ligand v injektoru
- ⤿ Vzorek v cele

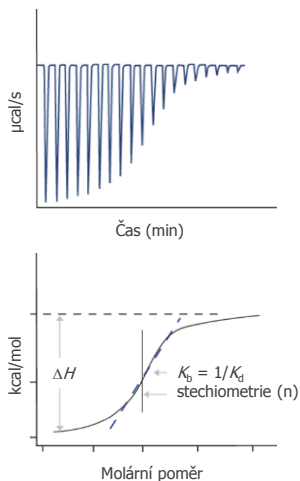


Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Využití ITC

Stanovení vazebných parametrů

- záznam tepelné změny generované během přikapávání malého objemu ligandu do cely se vzorkem
- závislost uvolněné energie na molárním poměru ligandu a vzorku vypočtena integrací jednotlivých píků ze známé koncentrace vzorku v cele a ligandu v injektoru

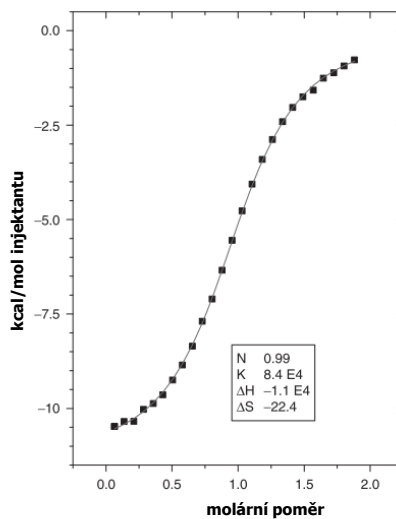


Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Využití ITC

Stanovení vazebných parametrů

- nelineární regresní analýza



Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Využití ITC

Stanovení vazebných parametrů

- ITC poskytuje celkový obrázek o vazebných energiích
- ΔG přímo souvisí s celkovou vazebnou afinitou (zápornější ΔG , vyšší afinita)

$$\Delta G = -nRT \ln K_d$$

- ΔH indikuje změny ve vodíkových a van der Waalových vazbách
- ΔS indikuje konformační změny a změny v hydrofobních interakcích
- stechiometrie udává poměr ligandu a makromolekuly při vzájemné vazbě

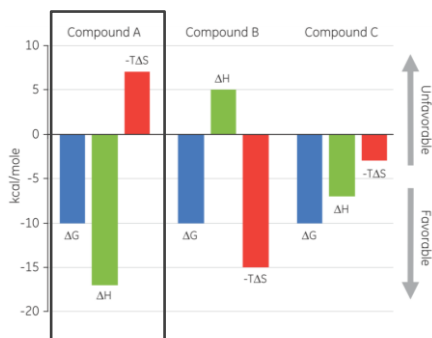
Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Využití ITC

ITC poskytuje celkový obrázek o vazebných energiích

3 různé ligandy, stejná ΔG ale ...

- vazba ligandu **A**: energeticky výhodné vodíkové vazby a van der Waalovy interakce, provázeno konformačními změnami



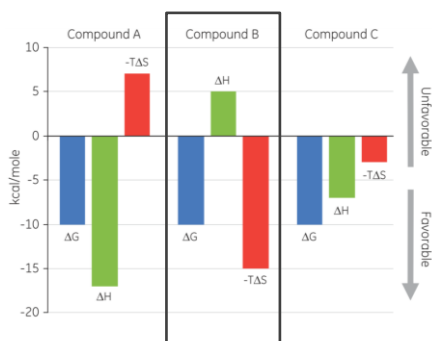
Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Využití ITC

ITC poskytuje celkový obrázek o vazebných energiích

3 různé ligandy, stejná ΔG ale ...

- vazba ligandu **A**: energeticky výhodné vodíkové vazby a van der Waalsovy interakce, provázeno konformačními změnami
- vazba ligandu **B**: energeticky výhodné hydrofobní interakce, dehydratace povrchu molekuly



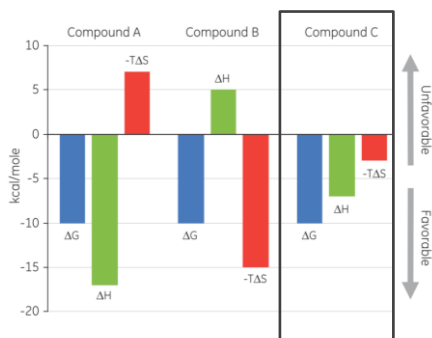
Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Využití ITC

ITC poskytuje celkový obrázek o vazebných energiích

3 různé ligandy, stejná ΔG ale ...

- vazba ligandu **A**: energeticky výhodné vodíkové vazby a van der Waalsovy interakce, provázeno konformačními změnami
- vazba ligandu **B**: energeticky výhodné hydrofobní interakce, dehydratace povrchu molekuly
- vazba ligandu **C**: energeticky výhodné jak vodíkové vazby a van der Waalsovy interakce, tak hydrofobní interakce



Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Využití ITC

Stanovení kinetických parametrů enzymatické reakce

1. metoda vícenásobné injektáže
2. metoda jediné injektáže

Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

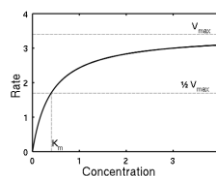
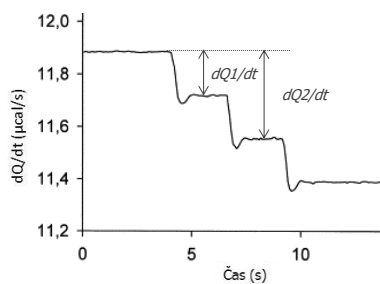
Využití ITC

Stanovení kinetických parametrů enzymatické reakce

- Detekce tepelné energie generované během konverze substrátu na produkt

Metoda vícenásobné injektáže

- roztok enzymu v reakční celi
- malá množství substrátu injektována postupně
- reakce pseudo-prvního řádu

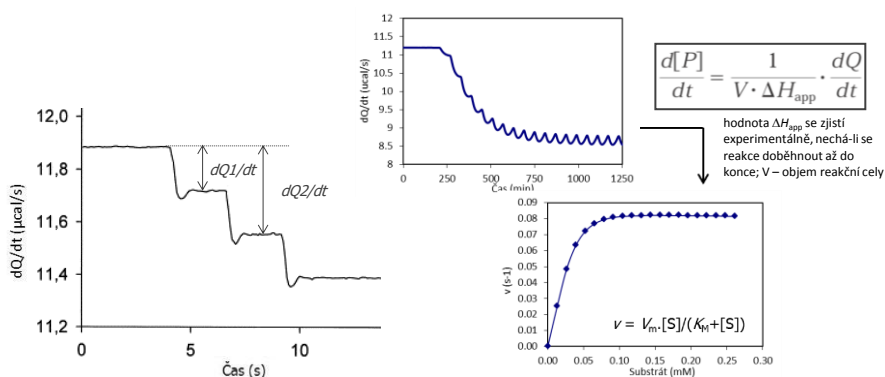


Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Využití ITC

Stanovení kinetických parametrů enzymatické reakce

- Detekce tepelné energie generované během konverze substrátu na produkt

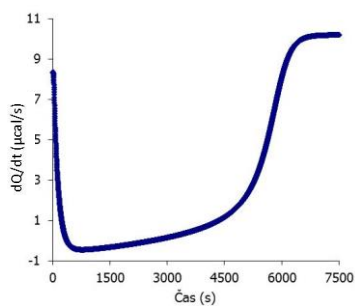


Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Využití ITC

Stanovení kinetických parametrů enzymatické reakce

- Detekce tepelné energie generované během **kompletní** konverze substrátu na produkt



Metoda jediné injektáže

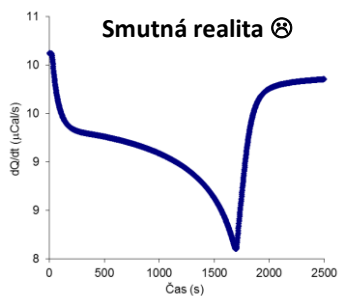
- roztok substrátu v reakční celi
- roztok enzymu injektován jednorázově
- totální konverze substrátu enzymem
- několik tisíc bodů v rámci jednoho měření

Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Využití ITC

Stanovení kinetických parametrů enzymatické reakce

- Detekce tepelné energie generované během **kompletní** konverze substrátu na produkt



Metoda jediné injektáže

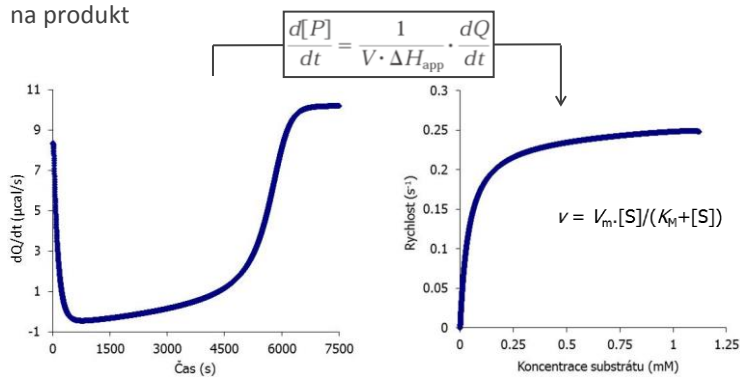
- roztok substrátu v reakční cele
- roztok enzymu injektován jednorázově
- totální konverze substrátu enzymem
- několik tisíc bodů v rámci jednoho měření

Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Využití ITC

Stanovení kinetických parametrů enzymatické reakce

- Detekce tepelné energie generované během **kompletní** konverze substrátu na produkt

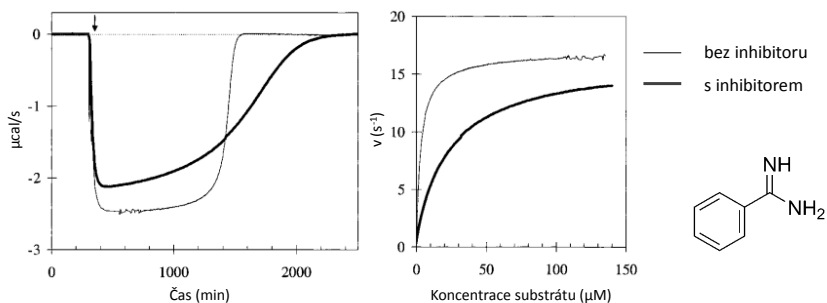


Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Využití ITC

Stanovení kinetických parametrů enzymatické reakce

- příklad: studium inhibičního účinku benzamidinu na trypsin



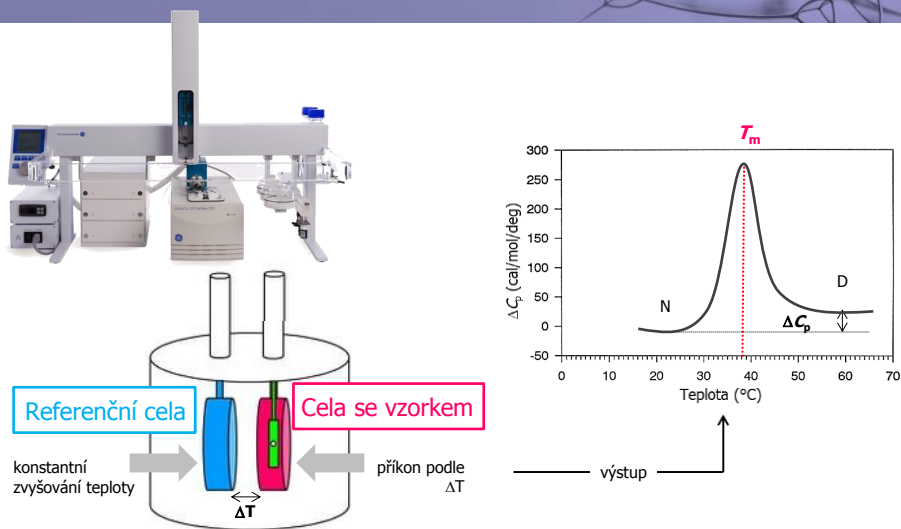
Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Diferenční skenovací kalorimetrie

- **DSC** (z angl. differential scanning calorimetry)
- **měří množství tepla, které se uvolní nebo spotřebuje při tepelně indukovaných konformačních přechodech** (tání DNA, denaturace proteinů)
- přechod z nativního rigidního stavu do méně kompaktního více flexibilního stavu doprovázen nárůstem jak entropie tak tepelné kapacity
- dvě identické kalorimetrické cely umístěné ve stejném termostatu
- eliminuje vliv tepelné kapacity rozpouštědla u velmi zředěných roztoků biomolekul
- využití DSC:
 - stanovení všech termodynamických parametrů charakterizujících děj uvnitř cely

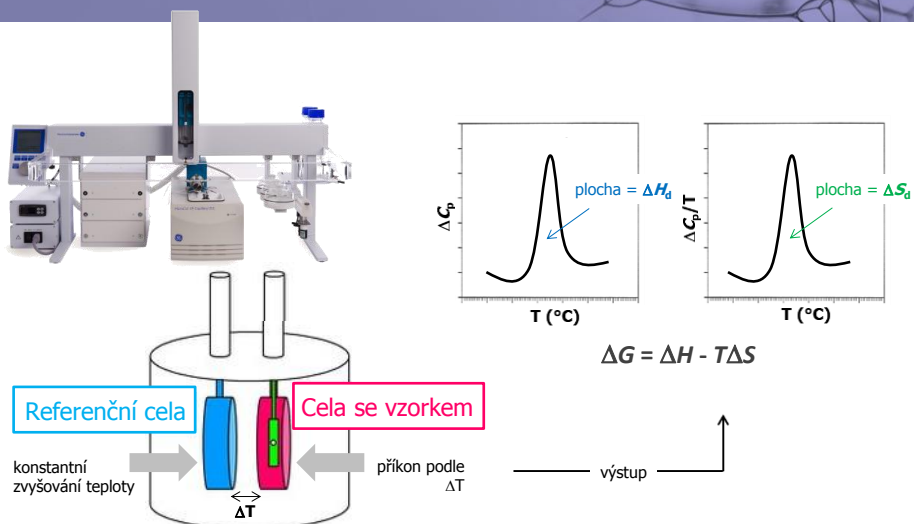
Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Diferenční skenovací kalorimetrie



Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Diferenční skenovací kalorimetrie

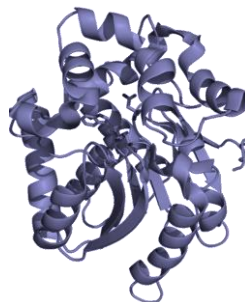
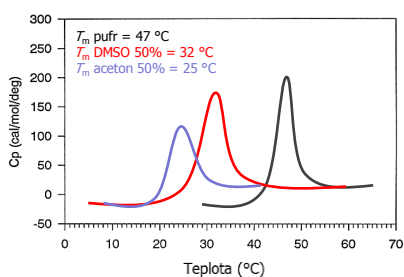


Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Využití DSC

Studium termostability proteinů v přítomnosti denaturantů

- příklad: pokles teploty tání proteinu halogenalkan dehalogenasy v přítomnosti vysokých koncentrací organických rozpouštědel

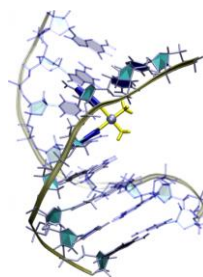
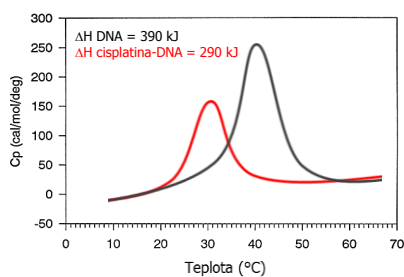


Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Využití DSC

Popis termodynamických změn vyvolaných kovalentní vazbou protinádorově účinných sloučenin kovů na DNA

- příklad: vytvoření komplexu cisplatinu-DNA snížilo hodnotu entalpie pro tání DNA, což odpovídá narušení vodíkových vazeb v okolí navázané cisplatinu



Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Úskalí experimentů



- zajistit dokonale stejný objem roztoků v obou celách
- zajistit precízní ohřívání a měření teploty obou cel
- eliminovat bublinky plynu (tepelná roztažnost plynů je větší než kapalin)
- vyloučit vzájemné interakce mezi molekulami proteinů
- zvolit rozpouštědlo ve kterém je bílkovina rozpustná v celém zkoumaném teplotním rozsahu
- zvolit pufr jehož disociační teplo je co nejmenší (fosfát, acetát, glycin ...), Tris pufr nevhodný
- **přechody mezi konformačními stavy by měly být reversibilní** (nejlépe splněno u proteinů s molekulovou hmotností do 40 kDa)

Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Výhody & nevýhody



- omezené využití pokud nelze dosáhnout rovnovážného stavu reakce
- neposkytuje dostatečnou citlivost měření při použití velkých objemů vzorků nebo v případě analýzy průběhu reakce za dlouhý časový úsek
- + kvantitativní, levná a univerzální metoda
- + přináší časovou, materiální i finanční úsporu
- + měření enzymové aktivity bez nutnosti značení
- + umožňuje kvantifikaci bez nutnosti oddělit ostatní složky reakční směs

Biofyzikální chemie II, 29.11.2013

Literatura

- C. Hofr. Mikrokalorimetrie biologicky významných molekul. Čs. čas. fyz. (2006), 56, 288-292.
- M. J. Todd, J. Gomez. Enzyme kinetics determined using calorimetry: A general assay for enzyme activity?. Anal. Biochem. (2001), 296, 179-187.
- M. W. Freyer, E. A. Lewis. Experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. (2008), Methods in cell biology, vol. 84, 79-113.
- D. Sheehan. Physical Biochemistry: Principles and applications. (2000), John Wiley and Sons.
- Video: <http://www.youtube.com/watch?v=uLxvSFnuGd0>