

Kalorimetrie

Kalorimetrie patří mezi biofyzikální metody, která měří změnu tepla vyvíjeného/spotřebovaného v průběhu chemické reakce a z důvodu konformačních změn jako je denaturace proteinů.

Kalorimetrie hraje důležitou roli v charakterizaci termodynamických vlastností jak samotných makromolekul (diferenciální skenovací kalorimetrie) tak i ke studiu interakcí (isotermální titrační kalorimetrie, diferenciální skenovací kalorimetrie).

Kalorimetrie je schopna měřit látky v jejich nativním stavu, není závislá na značení (MST) nebo „kotvení“ (SPR), je proto označována za zlatý standard pro charakterizaci biomolekul a jejich interakcí.

Historie:

Pojem kalorimetrie vznikl z latinského slova „*calor*“ – teplo a „*metron*“ – měřit.

Počátky kalorimetrie sahají do konce 18. století a za jejího zakladatele je považován Joseph Black (1728 – 1799), který jako první začal rozlišovat pojmy teplota a teplo. Na jeho práci poté navázali Antoine Lavoisier (1743-1794) a Pierre-Simon Laplace (1749-1827), kteří sestrojili první kalorimetr, kdy do tepelně izolované nádoby bylo uzavřeno morče a posléze byl sledován poměr výdeje tepla těla morčete s množstvím uvolněného CO₂. Spolu s dalšími experimenty tak dokázali, že dýchání je formou pomalého spalování. Jednalo se o první známý experiment, při kterém byla změřena tepelná výměna u biologického systému.



Pravděpodobně největší zásluhy za kalorimetrii takovou, jak ji známe dnes, patří francouzskému chemikovi Pierru Eugène Berthelotovi (1827-1907). V roce 1860 se Berthelot začal zajímat o problémy s měřením tepla a byl to on, kdo sestrojil první moderní kalorimetr a poprvé vyslovil termíny „endotermní“ a „exotermní“ k popsání reakcí, které teplo buď spotřebovávají nebo uvolňují.

Termodynamika:

Tepelné změny probíhající v biologických systémech se řídí termodynamickými zákony – termodynamický zákon o zachování energie, kdy celkovou energii nelze vyrobit ani zničit, ale pouze přeměnit na jiný druh energie.

ΔH je z molekulárního hlediska teplo spojené se vznikem, zánikem a deformací chemických vazeb. Vazebná entalpie obvykle popisuje změny v počtu vodíkových můstků - ΔH je negativní, když dojde k navýšení počtu vodíkových můstků.

ΔS je při dané teplotě spojena se změnou v uspořádanosti systému molekul. ΔS je pozitivní, jestliže při vazbě makromolekul dojde k uvolnění vody vázané na povrchu makromolekul a tím se zvýší neuspořádanost systému.

Z naměřených hodnot ΔH a K_a jsme schopni spočítat volnou energii ΔG , která musí být negativní, aby reakce mohla probíhat samovolně.

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_a$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Jednotky:

Jedna kalorie je množství energie potřebné pro zvýšení teploty 1g vody o 1°C. 1 joule je definován jako práce, kterou koná síla 1 N působící po dráze 1 m ve směru pohybu.

1 kalorie = 1 cal = 4.184 J

1 Kalorie = 1 kcal = 4184 J

1 J = 0.000239 kcal = 0.2390 cal

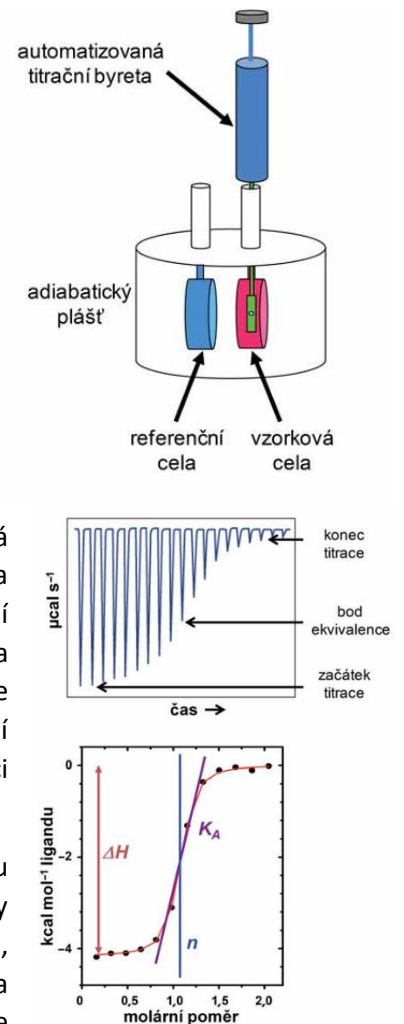
Isotermální titrační kalorimetrie:

Isotermální titrační kalorimetrie (ITC) je biofyzikální metodou měřící teplo reakce, resp. změnu vazebné energie.

Kalorimetr se skládá ze dvou cel ve tvaru mince – cela referenční a cela vzorková. Cely jsou umístěny v adiabatickém plášti s termočlánkem (Peltier) zajišťujícím konstantní teplotu cel během celého měření.

Referenční cela je naplněna vodou/pufrem bez makromolekuly. Do vzorkové cely je postupně přidáván předem definovaný objem roztoku ligandu ve stejném pufru jako je makromolekula ve vzorkové cele. Po přidání příspěvku ligandu dojde ke změně teploty na vzorkové cele. Tato změna teploty je detekována pomocí termočlánku (Peltier), který dodá elektrickou energii vzorkové cele pro její ochlazení/oteplení (záleží zda se jedná o endotermní nebo exotermní interakci). Tím je zajištěna stejná teplota referenční a vzorkové cely. Tento děj se opakuje ideálně až do nasycení makromolekuly ligandem. Na konci měření by měla být veškerá makromolekula vyvázána ligandem a v roztoku by měl zůstat pouze volný ligand. Tím dosáhneme saturace systému a v na termogramu vidíme pouze malé teplo ředění srovnatelné s kontrolním ředěním ligandu a pufru, kdy dochází pouze k titraci ligandu do pufru bez přítomnosti makromolekuly.

Termogram se poté vyhodnocuje pomocí integrace, čímž dostaneme křivku závislosti vazebné entalpie na molárním poměru ligandu a makromolekuly v cele. Pomocí nelineární regrese výsledné křivky získáme vazebnou entalpii ΔH , vazebnou konstantu K_A a stechiometrii reakce N . Výsledná křivka je tvořena body vzniklými integrací jednotlivých peaků, kdy největší peak je z první titrace a zpravidla určuje hodnotu vazebné entalpie ΔH . Jak dochází k postupnému obsazování vazebných míst, dochází také ke zmenšování jednotlivých peaků. Ze sklonu titrační křivky získáme hodnotu vazebné konstanty K_A a z ní potom vypočítáme hodnotu ΔG . Inflexní bod křivky udává stechiometrii N . Všechny získané parametry jsou uvedeny s odchylkou, která určuje kvalitu fitu.

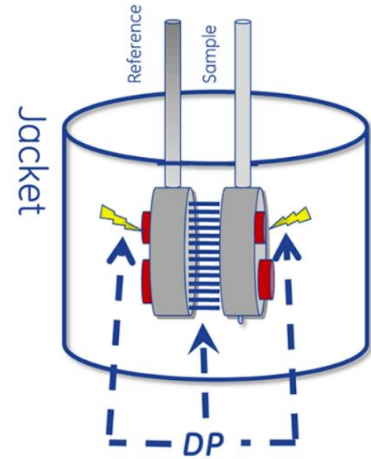


Diferenciální skenovací kalorimetrie:

Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) je biofyzikální metoda umožňující sledovat změny termodynamických parametrů molekul v jejich nativním stavu nebo po vazbě s ligandem – stabilizace/destabilizace zkoumané látky.

DSC se skládá ze dvou cel – referenční a vzorková, kdy referenční cela obsahuje pouze vzorkový pufr a cela vzorková obsahuje vzorek makromolekuly. Obě cely se nachází v adiabatickém plášti s termočlánkem, který zaznamenává rozdíl teplot mezi celou referenční a vzorkovou.

Během měření makromolekuly pomocí DSC dochází ke kontrolovanému ohřevu látky v cele např. o 1 °C/min v teplotním rozsahu 0-130°C. Jestliže dojde k denaturaci makromolekuly nebo tání dvoušroubovice DNA, kdy se část dodaného tepla spotřebuje pro narušení kovalentních vazeb a oddělení komplementárních řetězců bude teplota cely se vzorkem nižší než teplota cely referenční.



Rozdíl teplot mezi celou referenční a vzorkovou je potom zaznamenán pomocí Peltierova termočlánku a je určena dodatečná energie potřebná k ohřevu cely vzorkové na stejnou hodnotu jako má cela referenční. Dodaná energie je zaznamenána a výsledkem měření je termogram, který udává závislost tepelné kapacity C_p roztoku makromolekuly na teplotě. Přechod z poměrně rigidního nativního stavu do méně kompaktního denaturovaného stavu je doprovázen nárůstem tepelné kapacity

Integrací termogramu lze určit změnu entalpie H . Teplota odpovídající maximu termogramu je teplota tání T_m , kdy je právě polovina molekul v denaturovaném stavu. Počátek zvedající křivky se označuje jako T_{on} , konec zase jako T_{off} . V ideálním případě se jedná o reverzibilní děj, který ale není pravidlem.

