

# KALORIMETRIE BIOMOLEKUL

**Experimentální metody biofyziky**

F9070

**Ctirad Hofr**

**LifeB** – Laboratoř interakce a funkce esenciálních **Biomolekul**

FGP – Funkční genomika a proteomika

NCBR – Národní centrum výzkumu biomolekul

Přírodovědecká fakulta | Masarykova univerzita

**M U N I** Národní centrum  
**S C I** pro výzkum  
biomolekul

# Jaký je původ všech slov?



[https://en.wikipedia.org/wiki/My\\_Big\\_Fat\\_Greek\\_Wedding](https://en.wikipedia.org/wiki/My_Big_Fat_Greek_Wedding)

# Kalorimetrie

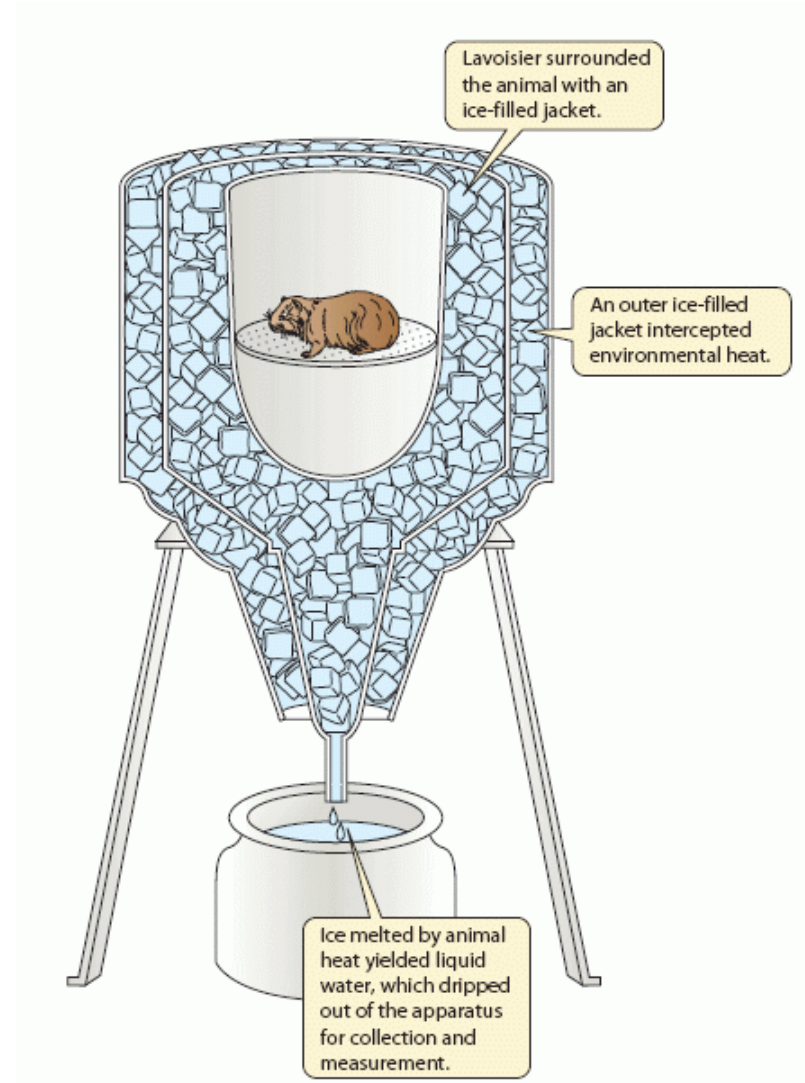
*calor* = teplo

*metri* = měřít



**Antoine Laurent Lavoisier**  
(1743 -1794)

# Biokalorimetrie

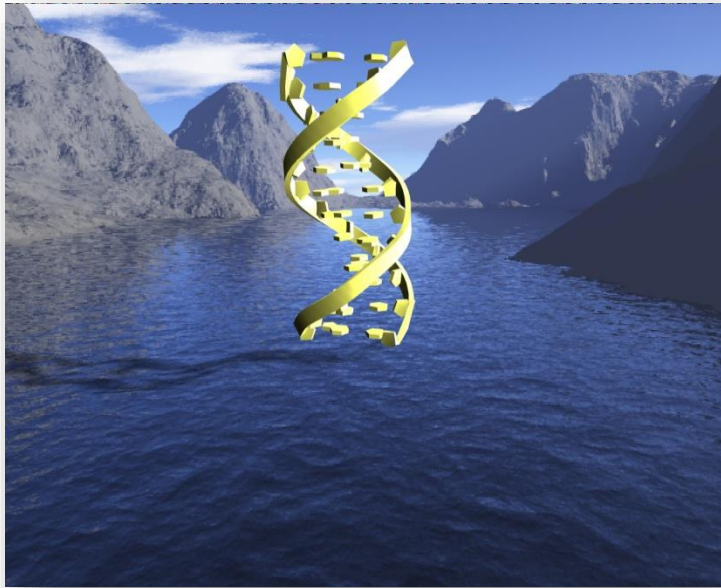


# Kalorimetrie biopolymerů

Cílem je měření termodynamických parametrů  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $\Delta G$  u molekulárních procesů

Jejich znalost umožňuje nahlédnout pod pokličku regulace průběhu reakce z termodynamického hlediska

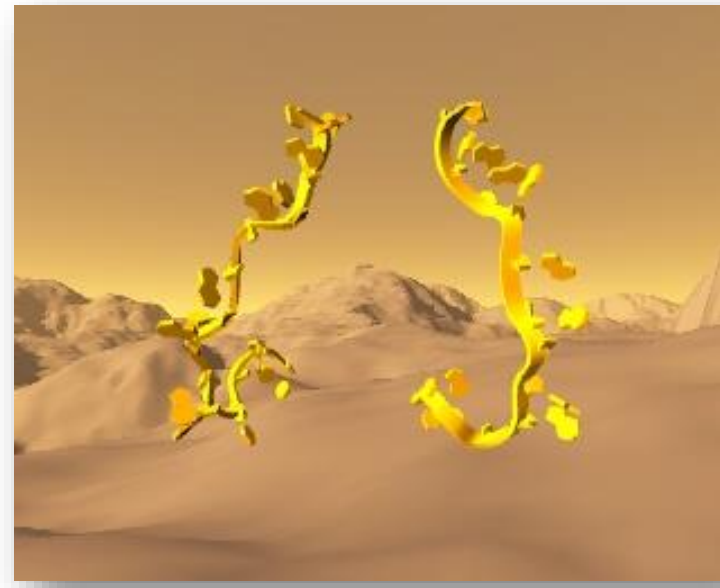
# Popis termodynamické stability DNA



## Entalpie $H$

$$\Delta H = q ; \quad (p = \text{konst.})$$

– vytváření, zánik nebo  
deformace vazeb



## Entropie $S$

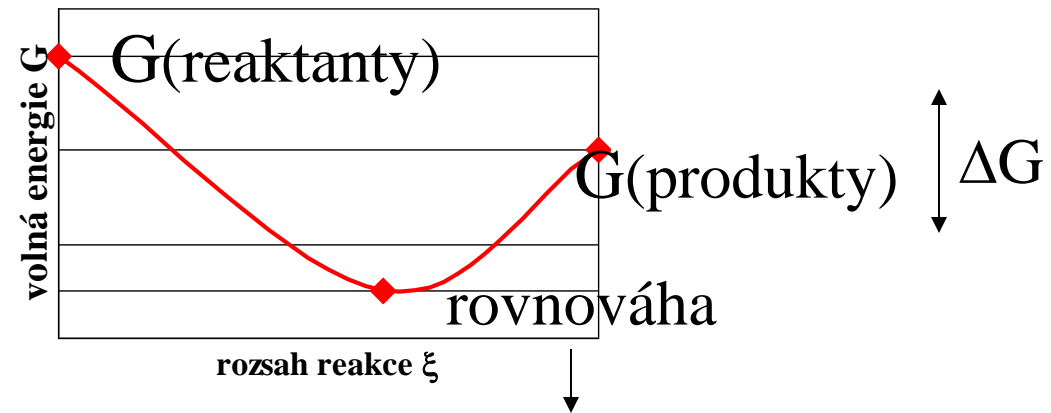
$$\Delta S = \frac{q_{\text{rev}}}{T}$$

– změna uspořádanosti systému

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

# Volná energie $\Delta G$ a rovnovážná konstanta $K$

$$\Delta G = -RT \ln K \qquad K = e^{-\frac{\Delta G}{RT}}$$



$$1 \text{ cal} = 4.184 \text{ J}$$

# Poměrná velikost nekovalentních interakcí

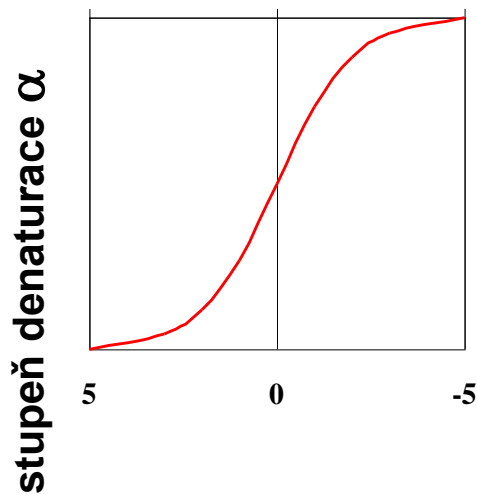
<b>Typ interakce</b>	<b>kcal mol<sup>-1</sup></b>	<b>kJ mol<sup>-1</sup></b>
Ion-ion	14.0	58.6
Stacking	5.0	20.9
Vodíkové můstky	1.3	5.4



## Denaturace proteinu

$$K = \frac{[N]}{[D]} = \frac{\alpha}{1-\alpha}$$

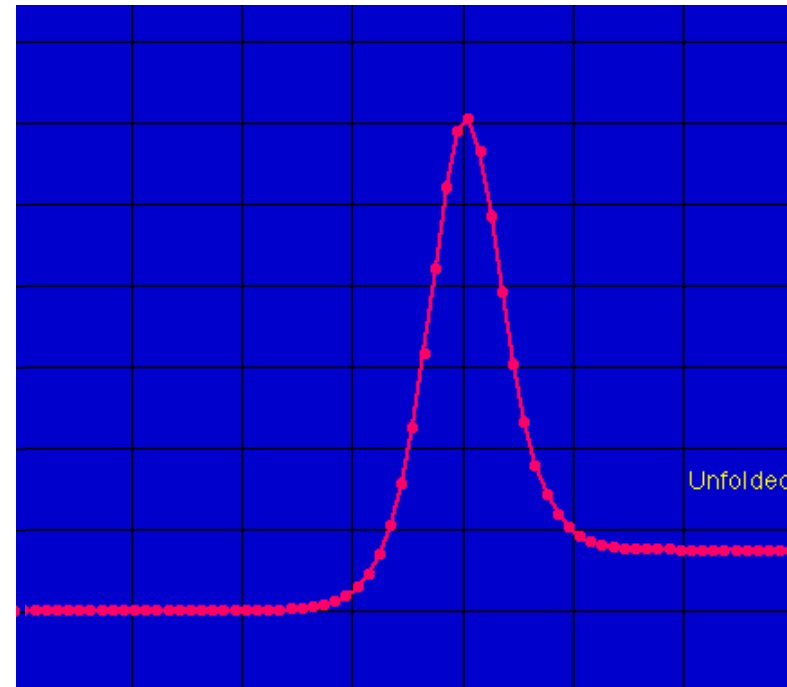
$$\alpha = \frac{[N]}{[N]+[D]}$$



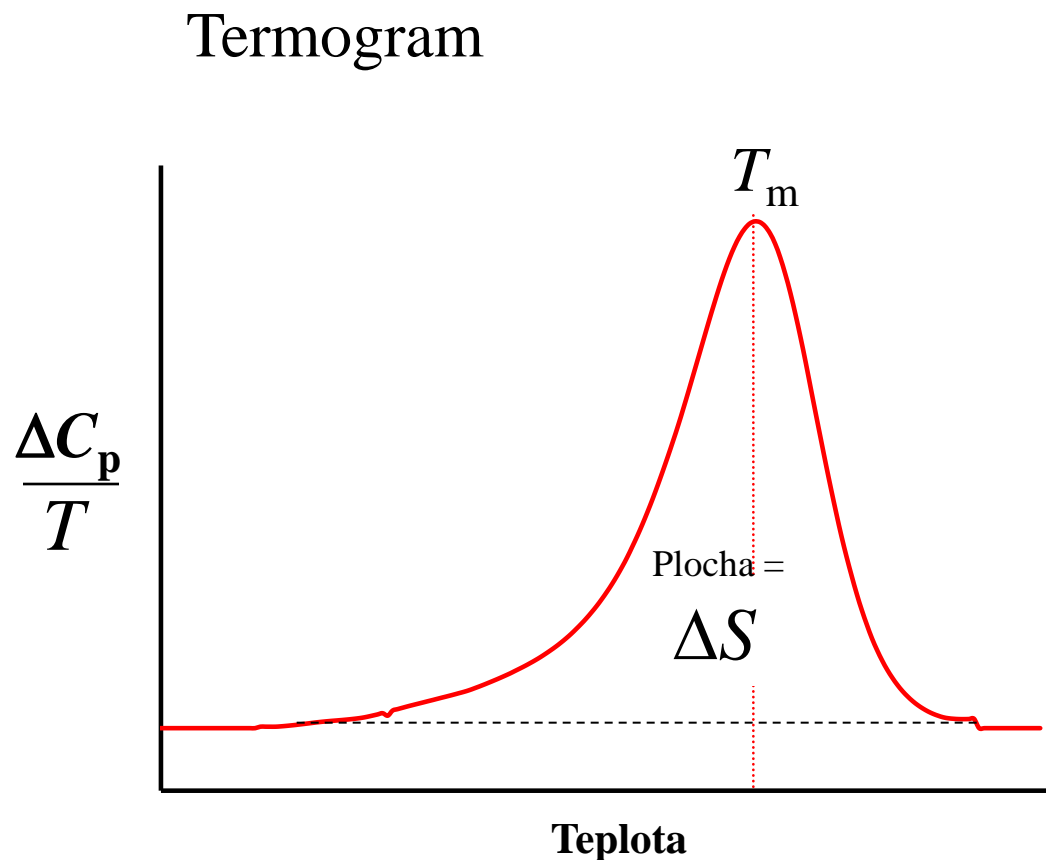
$\Delta G$ (kJ)	$\Delta G$ (kcal)	$\Delta G/RT$	K	$\alpha$
7.43	1.78	3	0.05	0.047
4.95	1.18	2	0.135	0.119
2.48	0.59	1	0.368	0.269
0	0	0	1	0.5
-2.48	-0.59	-1	2.718	0.731
-4.95	-1.18	-2	7.389	0.881
-7.43	-1.78	-3	20.09	0.953

# Diferenční skenovací kalorimetrie DSC

(DSC)



# Veličiny získané z měření DSC



Teplota tání  $T_m$

Změna entalpie  $\Delta H$

$$\Delta H = \int \Delta C_p dT$$

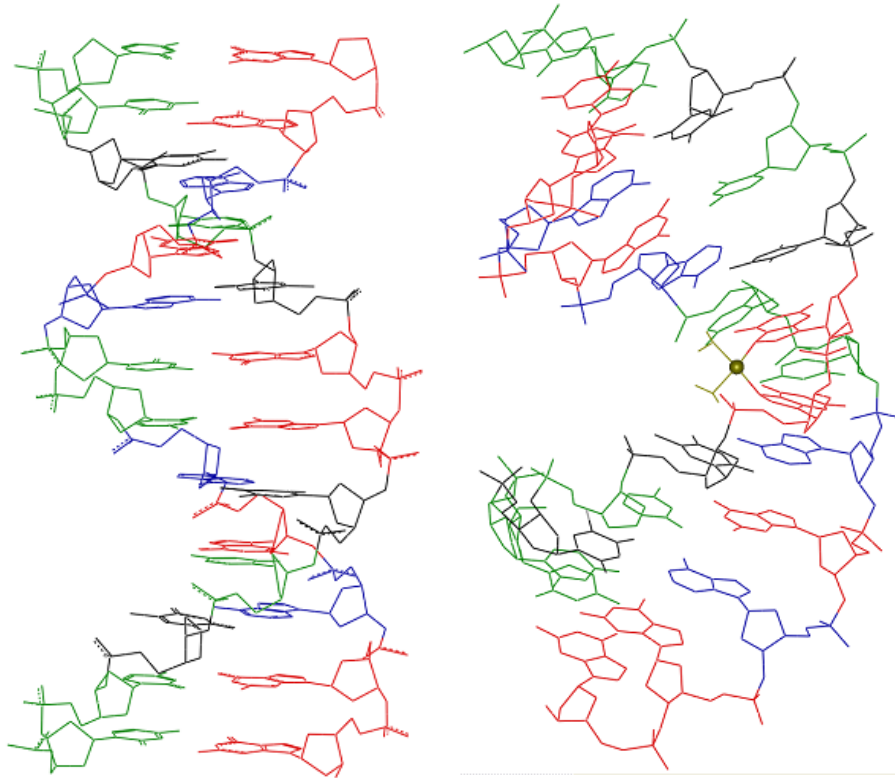
Změna entropie  $\Delta S$

$$\Delta S = \int \frac{\Delta C_p}{T} dT$$

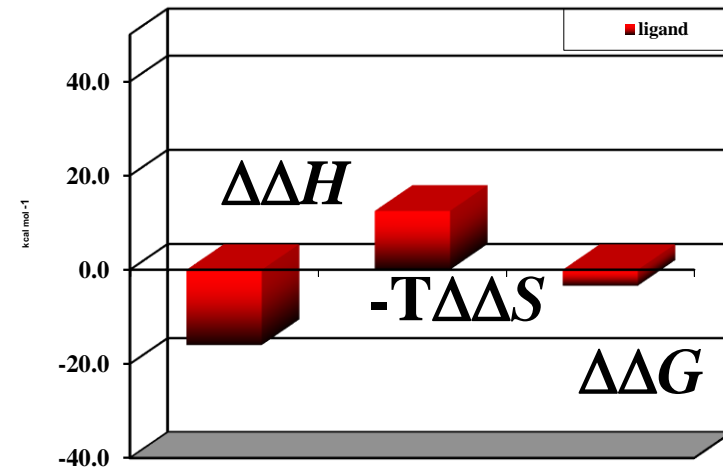
Volná energie  $\Delta G$

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

# Použití DSC pro stanovení vlivu kovalentní vazby ligandu na termodynamickou stabilitu DNA

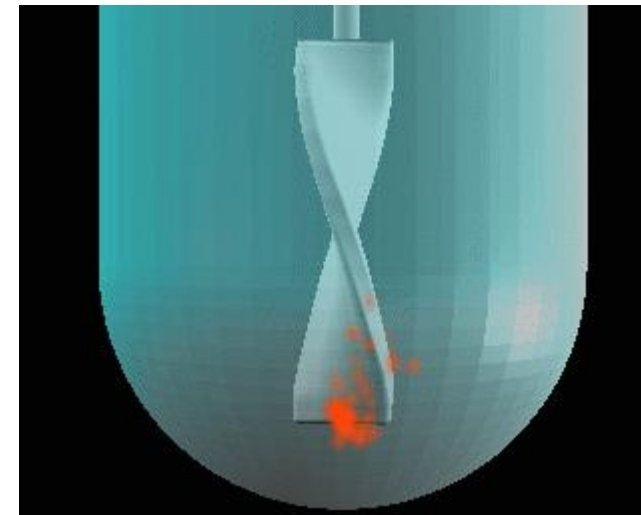
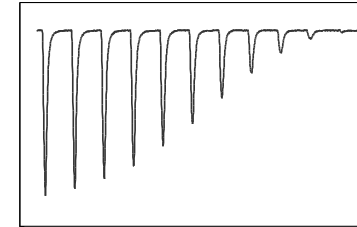
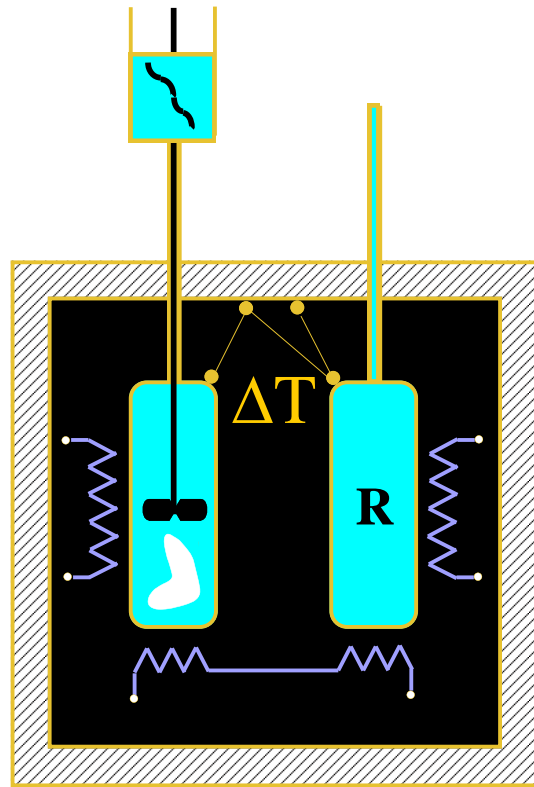


Duplex	$T_m$ (°C)	$\Delta H$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (cal °C <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ (kcal mol <sup>-1</sup> )
unmod. DNA	70.2	151	446	18.0
ligand	61.8	135	404	14.6



$$\Delta\Delta(H,S,G) = \Delta(H,S,G)_L - \Delta(H,S,G)_{\text{unmod.}}$$

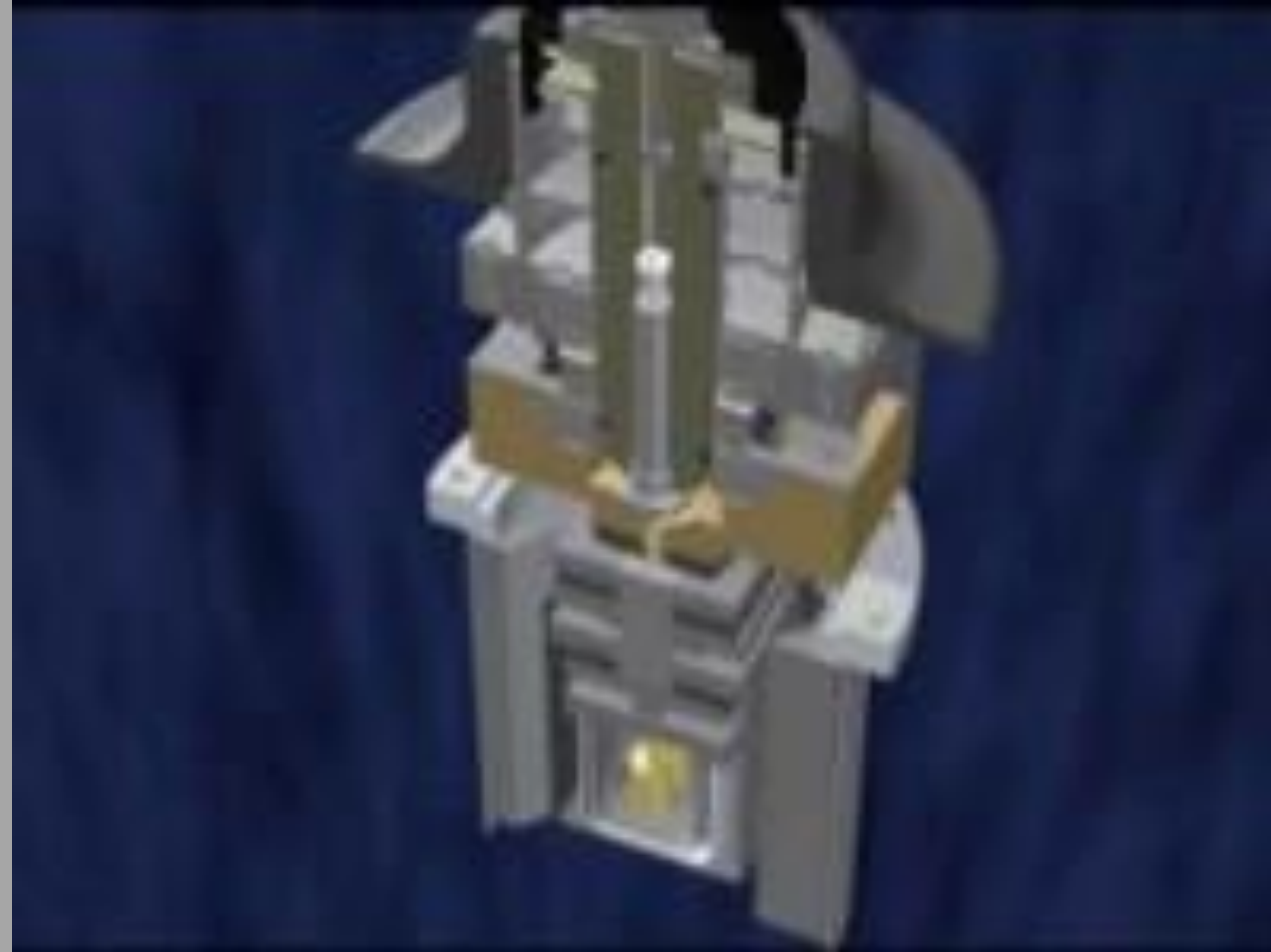
# Izotermální Titrační Kalorimetrie (ITC)



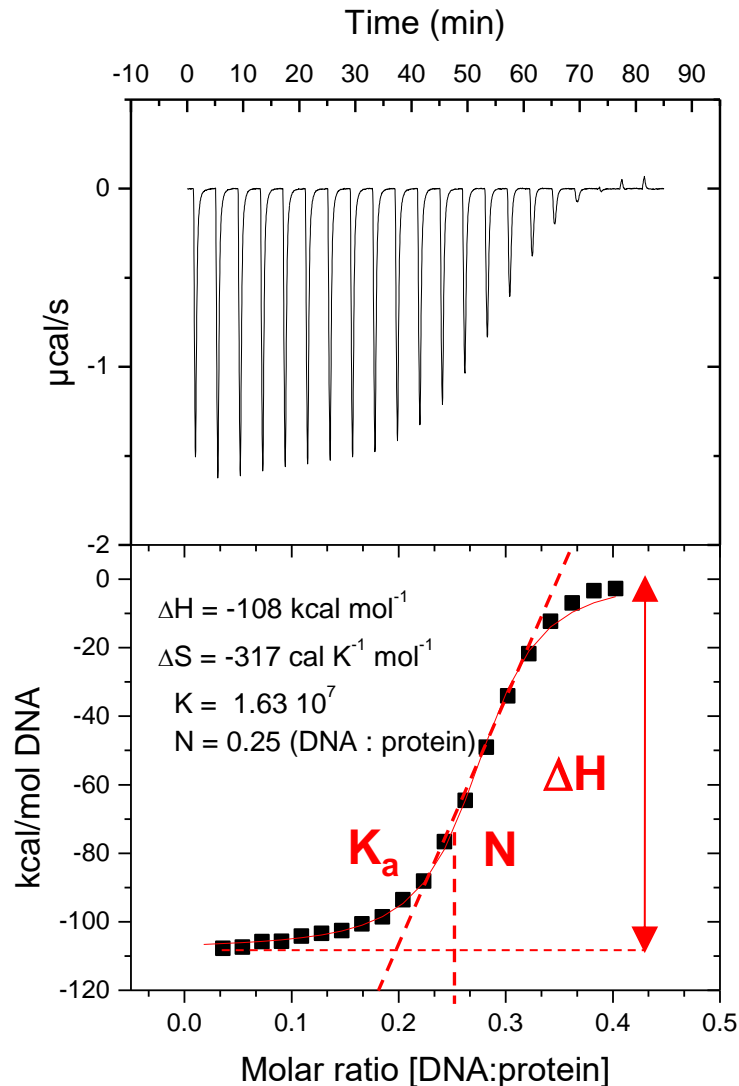
<http://www.youtube.com/watch?v=cYj5IOELaVI>

[https://www.youtube.com/watch?v=o\\_lpWcWKNXI](https://www.youtube.com/watch?v=o_lpWcWKNXI)

# Nano ITC



# Veličiny získané z jednoho měření ITC



Vazebná entalpie  $\Delta H$

Stechiometrie **N**

Vazebná konstanta  $K_a$

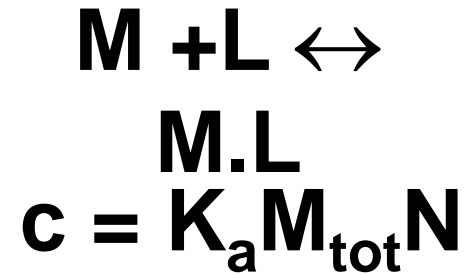
Volná energie  $\Delta G$

vypočtena z  $\Delta G = -R T \ln K_a$

Změna entropie  $\Delta S$

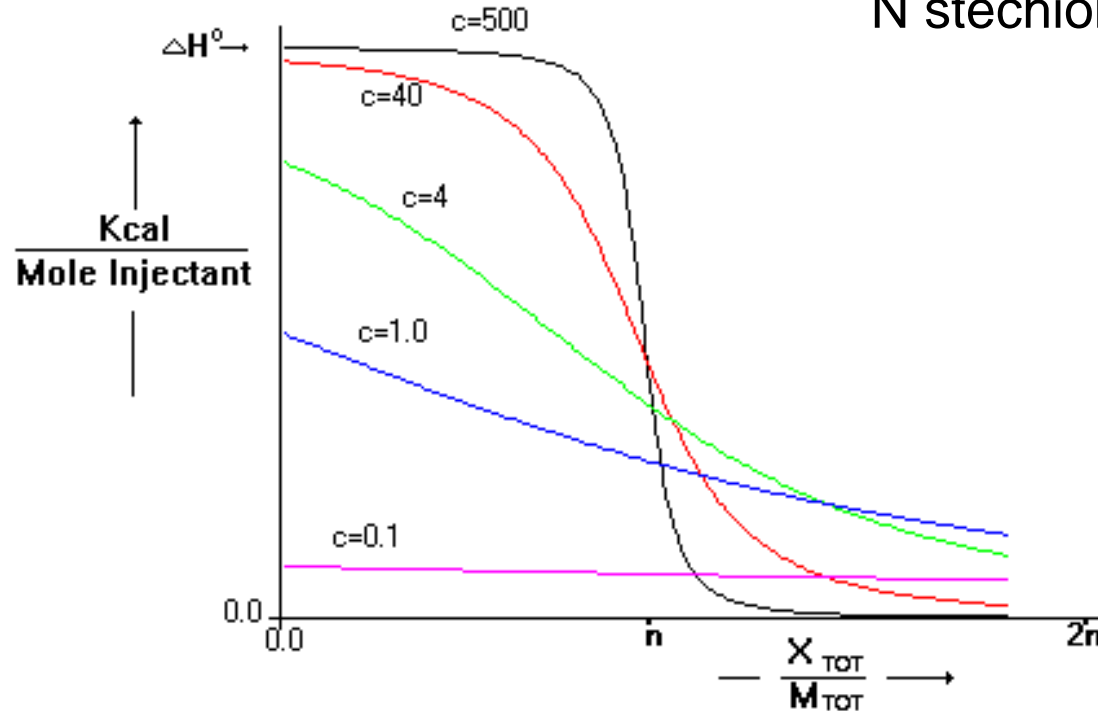
vypočtena z  $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$

# Děje měřitelné na ITC



M – makromolekula, L -  
Ligand

$M_{tot}$  celková koncentrace makromolekuly  
 $K_a$  vazebná konstanta  
N stechiometrie interakce



$$5 < c < 500$$

Př.

$$M_{tot} = 10^{-5} M$$

pak je měřitelný rozsah  
vazebné konstanty

$$K_a = 10^6 \text{ až } 10^8 M^{-1}$$

$$K_D = 10^{-6} \text{ až } 10^{-8} M \sim$$

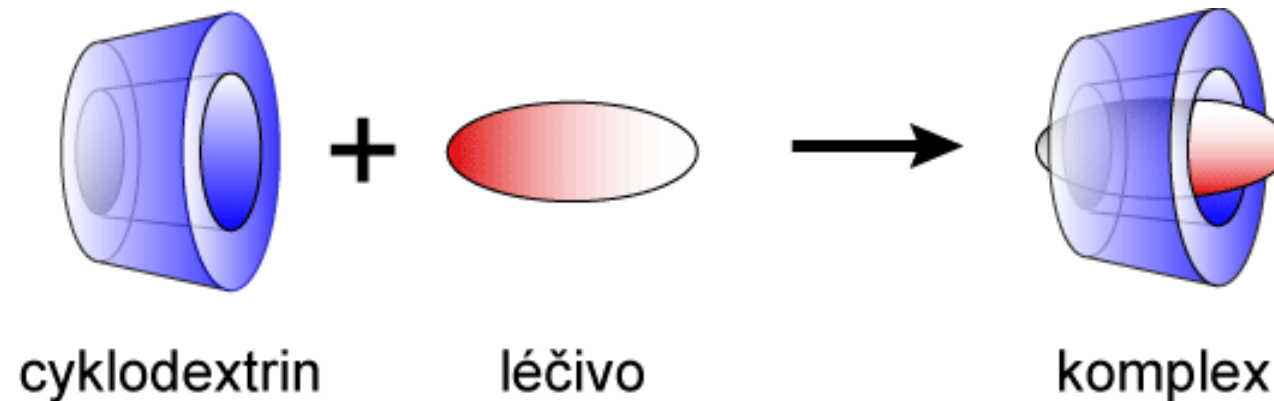
$$K_D \sim \mu M - nM$$



# Použití ITC při navrhování léčiv

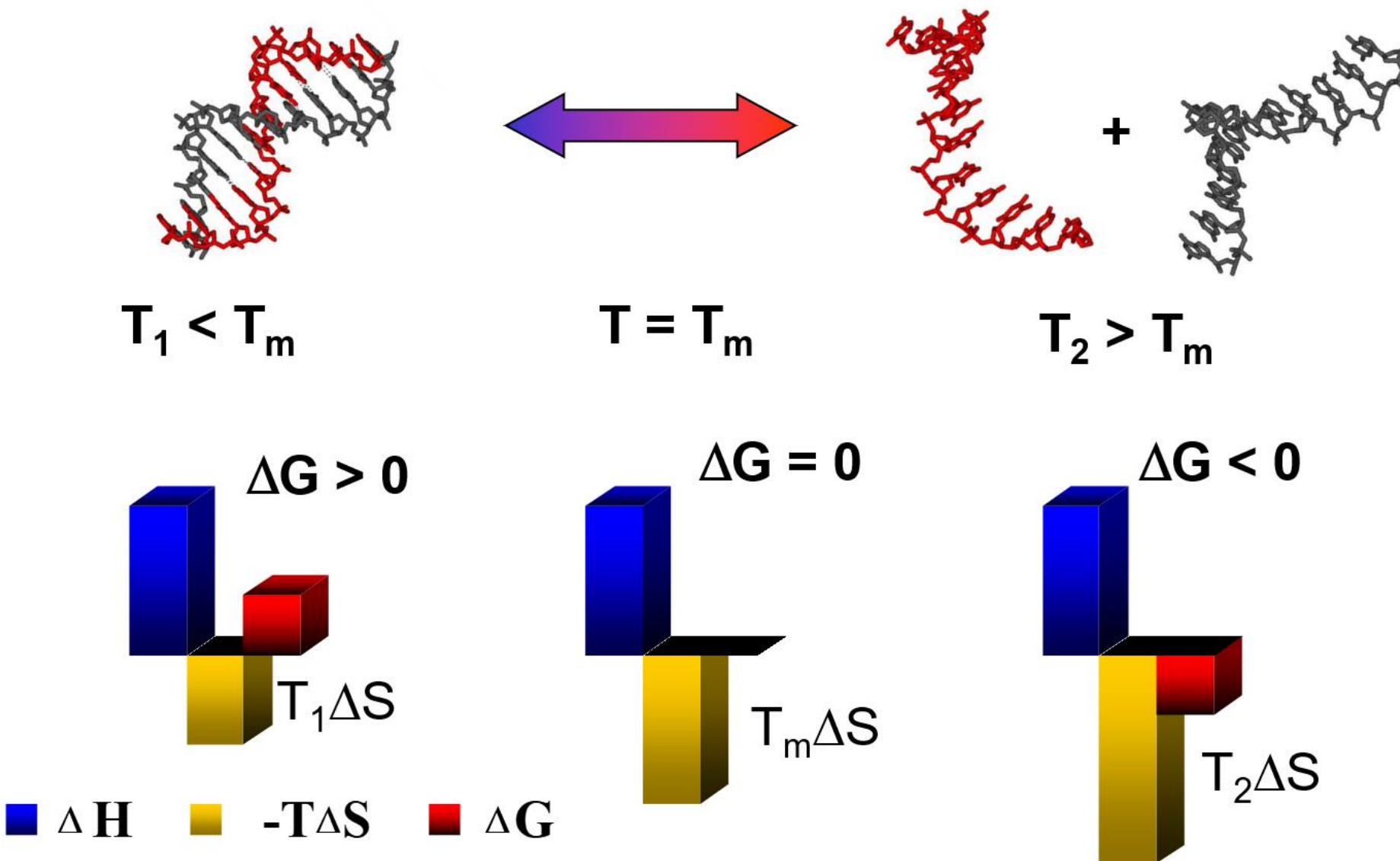
Zlepšení farmakokinetických vlastností léčiva lze dosáhnout jeho navázáním na molekulový nosič

Po podání komplexu nosiče a léčiva dochází k cílenému transportu na místo účinku, kde dochází k uvolňování léčiva



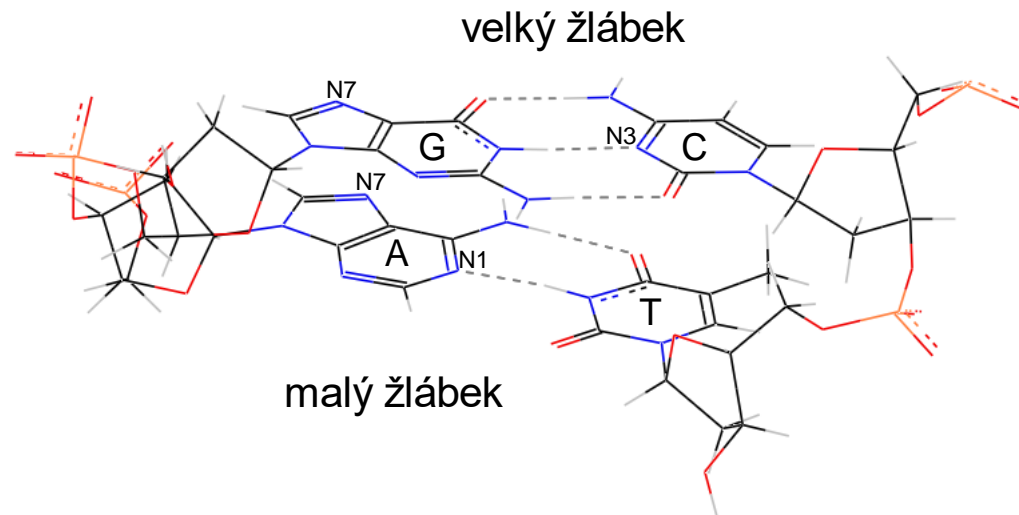
- Cyklodextriny jsou v přírodě se vyskytující cyklické oligosacharidy
- Cyklodextrinové nosiče jsou v současnosti testovány při vývoji nových léčiv proti malárii, rakovině a zánětům

# Termodynamické parametry popisující stabilitu dvoušroubovice DNA v závislosti na teplotě



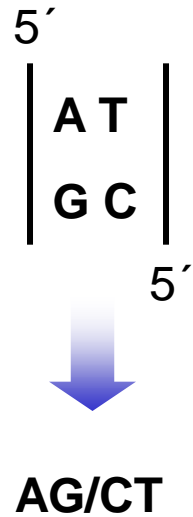
# Výpočet termodynamické stability DNA z primární sekvence

**Model nejbližšího souseda** předpokládá, že termodynamická stabilita dvoušroubovice DNA závisí na typu a orientaci sousedních párů bazí.



Stabilita dvoušroubovice je pak předpovězena pouze na základě primární sekvence, jestliže je známá relativní termodynamická stabilita každého typu interakcí dvou sousedních párů bazí

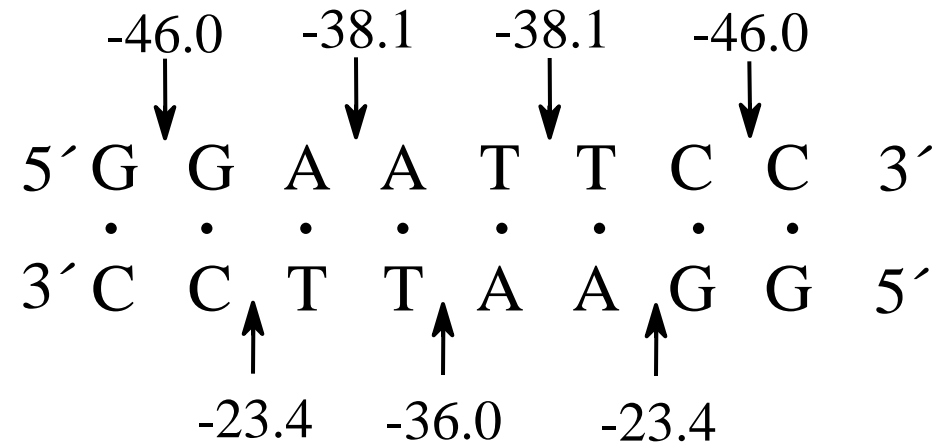
# Termodynamické parametry pro výpočet stability dvoušroubovice DNA



Sequence	Breslauer et al. <sup>5</sup>		SantaLucia <sup>6</sup>		Allawi & SantaLucia <sup>7</sup>		Sugimoto et al. <sup>8</sup>	
	$\Delta H$	$\Delta S$	$\Delta H$	$\Delta S$	$\Delta H$	$\Delta S$	$\Delta H$	$\Delta S$
AA/TT	-9.1	-24.0	-8.4	-23.6	-7.9	-22.2	-8.0	-21.9
AG/CT	-7.8	-20.8	-6.1	-16.1	-7.8	-21.0	-6.6	-16.4
AT/AT	-8.6	-23.9	-6.5	-18.8	-7.2	-20.4	-5.6	-15.2
AC/GT	-6.5	-17.3	-8.6	-23.0	-8.4	-22.4	-9.4	-25.5
GA/TC	-5.6	-13.5	-7.7	-20.3	-8.2	-22.2	-8.8	-23.5
GG/CC	-11.0	-26.6	-6.7	-15.6	-8.0	-19.9	-10.9	-28.4
GC/GC	-11.1	-26.7	-11.1	-28.4	-9.8	-24.4	-10.5	-26.4
TA/TA	-6.0	-16.9	-6.3	-18.5	-7.2	-21.3	-6.6	-18.4
TG/CA	-5.8	-12.9	-7.4	-19.3	-8.5	-22.7	-8.2	-21.0
CG/CG	-11.9	-27.8	-10.1	-25.5	-10.6	-27.2	-11.8	-29.0
Initiation with one or two G·C	0.0	-20.1	0.0	-5.9	-	-	0.6	-9.0
Initiation with A·T only	0.0	-16.8	0.0	-9.0	-	-	0.6	-9.0
Symmetry correction	0.0	-1.3	0.0	-1.4	0.0	-1.4	0.0	-1.4
5' T·A correction	-	-	0.4	0.0	-	-	-	-
A·T base pair end	-	-	-	-	2.3	4.1	-	-
G·C base pair end	-	-	-	-	0.1	-2.8	-	-

# Výpočet entalpie tvorby dvoušroubovice DNA

$$\Delta H_{cel} = \sum \Delta H_x$$



$$\Delta H_{cel} = (2 \times GG/CC) + (2 \times GA/TC) + (2 \times TC/GA) + (1 \times AT/AT)$$

$$\Delta H_{cel} = (2 \times -46.0) + (2 \times -38.1) + (2 \times -23.4) + (1 \times -36.0)$$

$$\Delta H_{cel} = -251 \text{ kJ mol}^{-1}$$

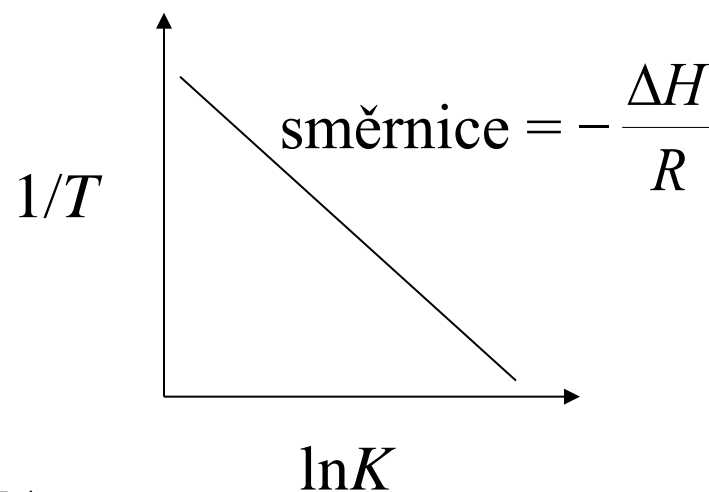
# Van't Hoffova rovnice



Jacobus Van't Hoff  
(1852-1911)

**Nobelova cena 1901**

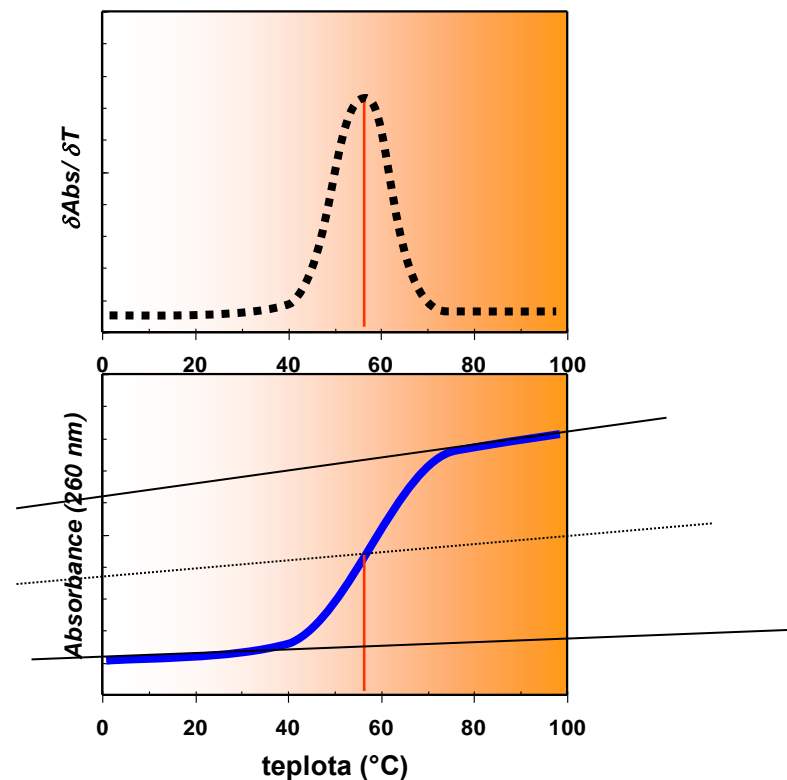
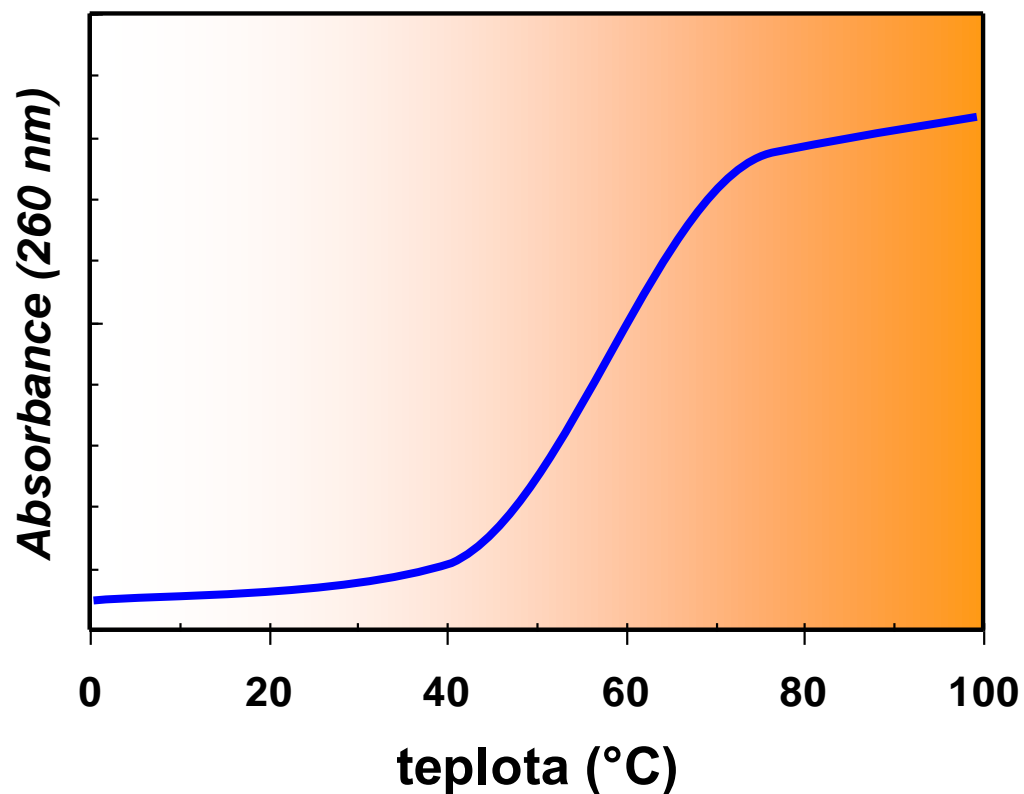
$$\frac{\partial \ln K}{\partial(1/T)} = -\frac{\Delta H}{R}$$



**VR pro tání DNA:**

$$\frac{1}{T_m} = \frac{R}{\Delta H} \ln C_{Tot} + \frac{\Delta S - \ln 4R}{\Delta H}$$

# Spektroskopické sledování tání DNA



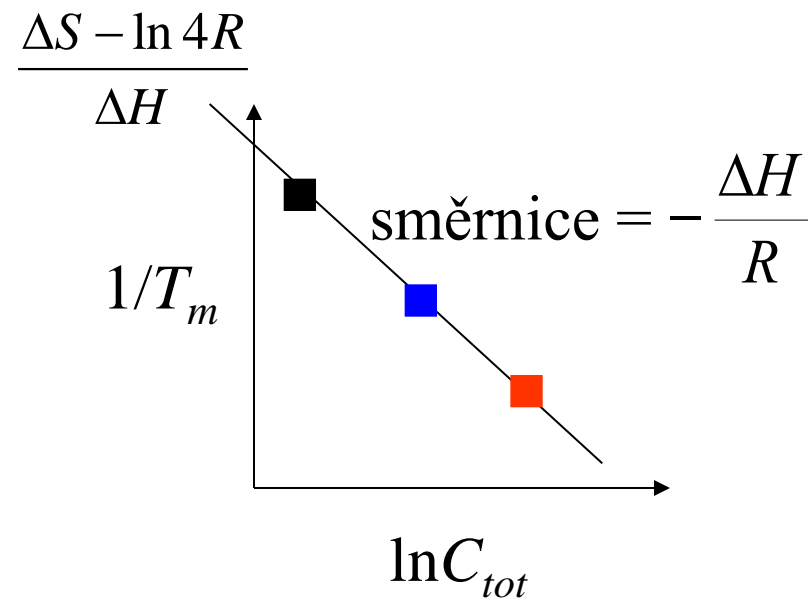
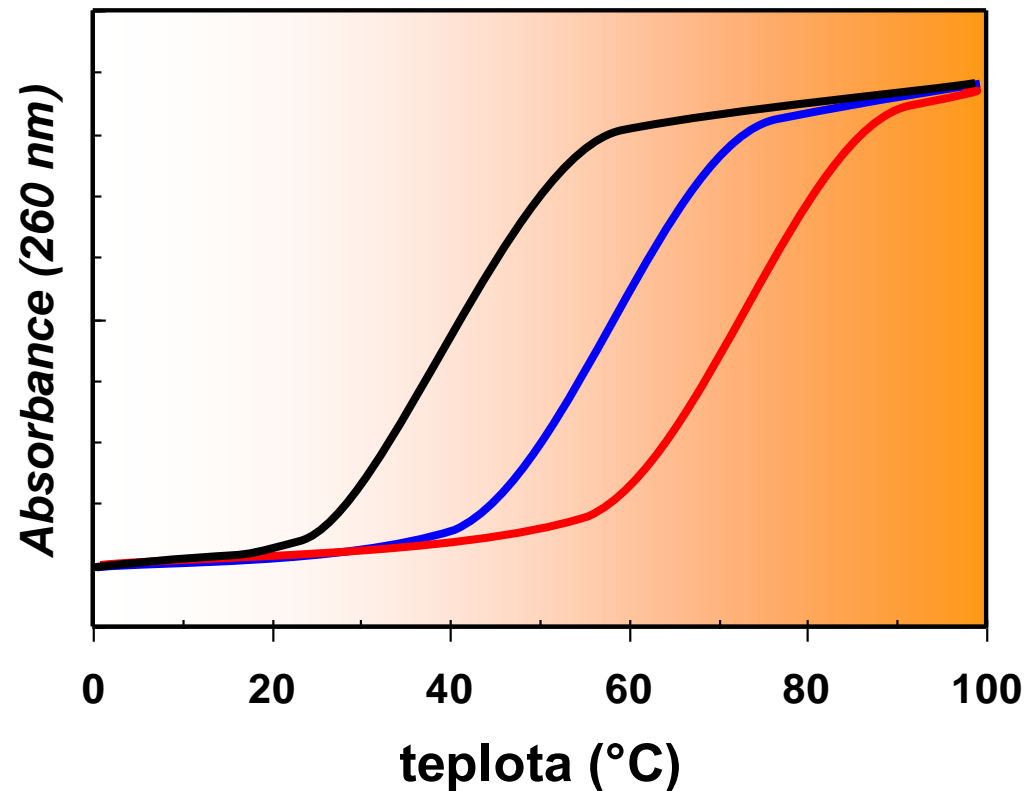
Využívá se **hyperchromického efektu** DNA:

Po oddělení komplementárních řetězců se zvýší absorbance při 260 nm

Ze závislosti lze určit  $T_m$  **výpočtem** jako hodnotu  $T$ , při které je první derivace maximální,

nebo **graficky** jako hodnotu  $T$ , ve které se protíná křivka tání a osa směrnic počátku a konce křivky tání.

# Praktické určení DHVH



$$\frac{1}{T_m} = \frac{R}{\Delta H} \ln C_{Tot} + \frac{\Delta S - \ln 4R}{\Delta H}$$

Při zvyšování koncentrace DNA dochází ke zvyšování teploty tání  $T_m$   
Ze směrnice závislosti reciproké hodnoty  $T_m$  na celkové koncentraci řetězců se určí  $\Delta H$   
z průsečíku závislosti s osou  $1/T_m$  se určí  $\Delta S$  a vypočte se  $\Delta G$ .



# Vztah mezi $\Delta H_{vH}$ a $\Delta H_{Cal}$

$\Delta H_{vH}$  závislá na modelu - předpokládá dvoustavové chování

$\Delta H_{Cal}$  přímo a nezávisle určená velikost

$\Delta H_{vH} = \Delta H_{Cal}$  dvoustavový proces

$\Delta H_{vH} < \Delta H_{Cal}$  při tání se systém nachází v „mezistavech“  
poměr  $\Delta H_{vH} / \Delta H_{Cal}$  definuje velikost kooperativní jednotky

# Obecné odvození Van't Hoffovy rovnice

$$\frac{\partial \ln K}{\partial T} = \frac{\Delta H}{RT^2}$$

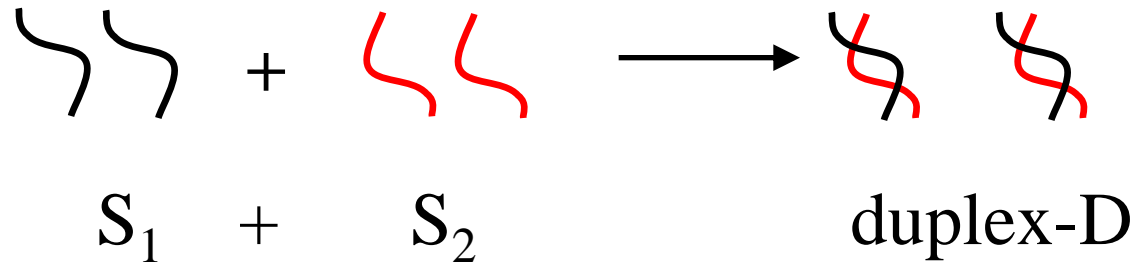
$$\Delta G = -RT \ln K \quad \frac{\Delta G}{T} = \frac{\Delta H}{T} - \Delta S$$

$$\Delta H = Q = \int C_P dT, \quad \Delta S = \frac{Q}{T} = \int \frac{C_P}{T} dT$$

$$\frac{\partial}{\partial T} = -\frac{1}{T^2} \frac{\partial}{\partial(1/T)}$$

# Odvození VR pro vznik dvoušroubovice DNA

$$\frac{1}{T_m} = \frac{R}{\Delta H} \ln C_{Tot} + \frac{\Delta S - R \ln 4}{\Delta H}$$



$$\Delta G = -RT \ln K \quad K = \frac{[D]}{[S_1][S_2]} \quad C_{tot} \text{—celková koncentrace obou řetězců}$$
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Pro  $T = T_m$ :  $[S_1] = [S_2] = [D] = C_{tot}/4$   $K_{T_m} = ?$

# Výpočet teploty tání DNA

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln \left( \frac{C_{tot}}{4} \right)} - 273.15 + 16.6 \log[Na^+]$$

Př.: **GGAATTCC**

$\Delta H = -251$  kJ

$\Delta S = -686$  J K<sup>-1</sup>mol<sup>-1</sup>

$C_{Tot} = 5$  μM.  $[Na^+] = 1$ M

$T_m = 45.6$  °C

# Zajímavé odkazy

## Oligonucleotide Properties Calculator

<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>



<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>

**Biophysical Society**

<http://www.biophysics.org/Education/WhatisBiophysics/tabid/2287/Default.aspx>