

PRACOWNIA PODSTAW BIOFIZYKI

Ćwiczenia laboratoryjne dla studentów III roku kierunku
„Zastosowania fizyki w biologii i medycynie”
Biofizyka molekularna

Wyznaczanie parametrów termodynamicznych reakcji chemicznych metodą izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego

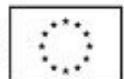
Ćwiczenie PB4 w2



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



1. Kalorymetria

Kalorymetria (łac *calor* = ciepło) to dział nauki zajmujący się mierzaniem przepływów ciepła.

Praktycznie wszystkim procesom chemicznym i fizycznym towarzyszą efekty cieplne, związane ze zmianą energii wewnętrznej układu. Dlatego wydzielanie lub pochłanianie ciepła jest uniwersalnym parametrem przemian.

Ta uniwersalność powoduje, że technikami kalorymetrycznymi można badać praktycznie wszystkie procesy a biorące w nich udział cząsteczki nie muszą wykazywać się żadnymi cechami szczególnymi (jak chromofory konieczne przy pomiarach absorpcyjnych i fluorescencyjnych, jądra o szczególnym spinie potrzebne przy NMR, etc).

1.1. Dwie techniki kalorymetryczne

1.1.1. ITC – izotermiczna kalorymetria miareczkująca (*isothermal titration calorimetry*)

ITC jest jedyną techniką eksperymentalną pozwalającą na bezpośredni pomiar zmiany entalpii zachodzącej podczas badanego procesu. Kalorymetr ITC bezpośrednio mierzy ilość ciepła pochłanianego lub wydzielanego w roztworze reagenta do którego w ustalonych odstępach czasu dodajemy niewielkie porcje drugiego reagenta.

Zastosowania: procesy asocjacji i dysocjacji, wyznaczanie mechanizmów oddziaływań cząsteczek (białek z małymi cząsteczkami, DNA/RNA, innymi białkami), wpływ zmian struktury cząsteczek na stabilność i mechanizmy wiązania (mutanty białkowe), badania aktywności cząsteczki i kinetyka reakcji chemicznych.

Tą techniką można badać oddziaływania międzycząsteczkowe praktycznie bez ograniczeń na masę reagentów, gęstość optyczną roztworu, czy przezroczystość roztworu.

Na podstawie pojedynczego miareczkowania kalorymetrycznego można wyznaczyć wszystkie parametry termodynamiczne reakcji: stechiometrię (N), stałą asocjacji (K_a), zmianę entalpii (ΔH) i entropii (ΔS). Dwa ostatnie parametry dają wgląd w mechanizm reakcji.

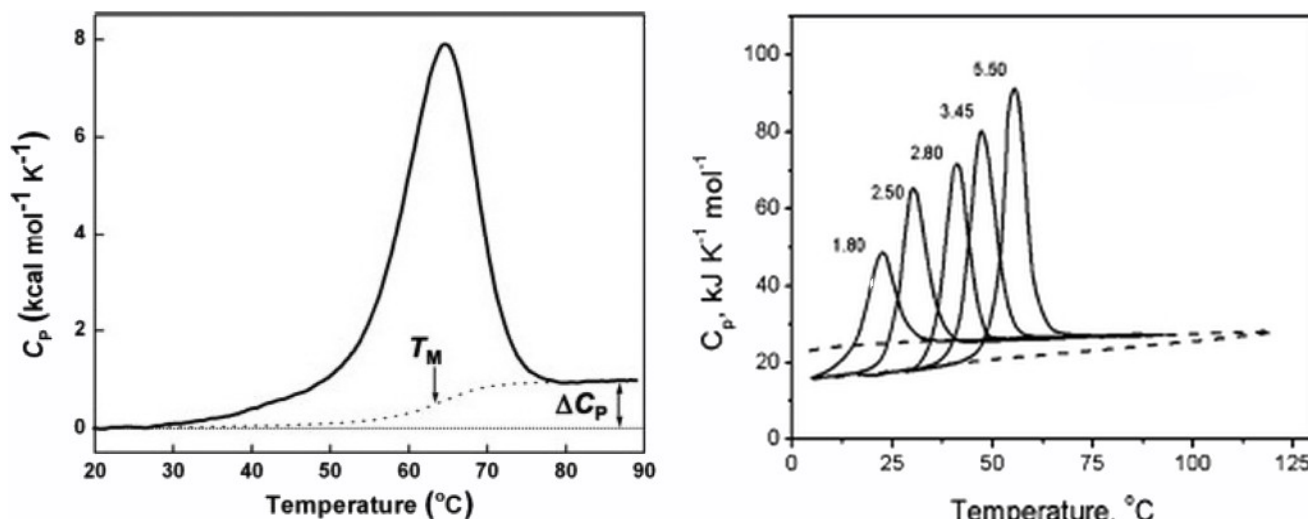
Ponadto powtarzając eksperyment w kilku temperaturach można uzyskać zmianę pojemności cieplnej ΔC_p [1].

1.1.2. DSC – skanująca (skaningowa) kalorymetria różnicowa (*differential scanning calorimetry*)

Umożliwia badanie przemian fazowych poprzez pomiar zmiany pojemności cieplnej układu w funkcji temperatury. Układ jest ogrzewany, lub chłodzony, w quasi-adiabatyczny sposób, za stałą szybkością kilku stopni na minutę.

Zastosowania: odwracalność procesów termicznych, badania zwijania i rozwijania białek, topnienie DNA, rozpad białek oligomerycznych na podjednostki, badania stabilności zmutowanych białek, badania stabilności oddziaływań międzycząsteczkowych białko-białko, białko-polimer.

W eksperymencie DSC można wyznaczyć zmianę ciepła właściwego Δc_p , temperaturę przejścia fazowego, zmianę entalpii (ΔH) związaną z przejściem fazowym.



Rys. 1: Przykładowe wyniki eksperymentów DSC. Z lewej topnienie podwójnej helisy DNA, z prawej rozwijanie białka barnazy w funkcji pH [2]

2. Opis termodynamiczny eksperymentów ITC

Dla prostej reakcji asocjacji $A + B \xrightleftharpoons[k_{off}]{k_{on}} AB$ stała asocjacji zdefiniowana jest $K_a = \frac{[AB]}{[A][B]}$, gdzie $[A]$, $[B]$, $[AB]$ to stężenia reagentów i kompleksu. Stała dysocjacji jest odwrotnością stałej asocjacji.

W stanie równowagi stała asocjacji/dysocjacji związana jest z entalpią swobodną Gibbsa i wyraża się następującą relacją:

$$\Delta G = -RT \ln K_a = RT \ln K_d \quad (1)$$

gdzie: R – uniwersalna stała gazowa,

T – temperatura

Pomiary kalorymetryczne na ogół prowadzone są w warunkach stałego ciśnienia (ciśnienie atmosferyczne, celka pomiarowa jest otwarta do otoczenia) i stałej temperatury (kalorymetria izotermiczna). W takich warunkach całkowity efekt cieplny (Q_{tot}), czyli zmiana energii wewnętrznej układu, towarzysząca badanemu procesowi jest równy zmianie entalpii (ΔH):

$$\Delta H = H_2 - H_1 = Q_{tot} \quad (2)$$

Znak zmiany entalpii informuje czy reakcja zachodzi z wydzielaniem ciepła czy też wymaga jego dostarczenia:

$\Delta H > 0$ – reakcja egzotermiczna

$\Delta H < 0$ – reakcja endotermiczna

Na zmianę entalpii układu wpływa przede wszystkim tworzenie i rozrywanie wiązań.

Funkcją termodynamiczną, dla której naturalnymi zmiennymi są temperatura (T), ciśnienie (p) oraz liczba moli reagentów (N), jest potencjał Gibbsa, zdefiniowany następująco

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (3)$$

gdzie ΔS jest zmianą entropii układu.

Entropia opisuje swobodę konformacyjną układu (jest związana z liczbą dostępnych stopni swobody). Opisuje naturalną tendencję układu do uzyskania stanu o największym stopniu „nieuporządkowania”, czyli o największej możliwej liczbie stopni swobody, jest sumą zmian entropii solwatacji, entropii konformacyjnej i

dynamiki wiązań oraz entropii związanej z translacją i rotacją cząstek.

Zgodnie z drugim prawem termodynamiki:

$\Delta S > 0$ – reakcja nieodwracalna

$\Delta S = 0$ – reakcja odwracalna

W eksperymentach ITC jest wyznacza na podstawie różnicy zmiany energii swobodnej Gibbsa ΔG i zmiany entalpii ΔH

Wartość zmiany entalpii swobodnej Gibbsa określa możliwość zajścia procesu samorzutnego:

$\Delta G < 0$ – reakcja samorzutna, układ dąży do minimalizacji energii (ujemna zmiana entalpii $\Delta H < 0$) i wzrostu nieuporządkowania (dodatnia wartość zmiany entropii $\Delta S > 0$)

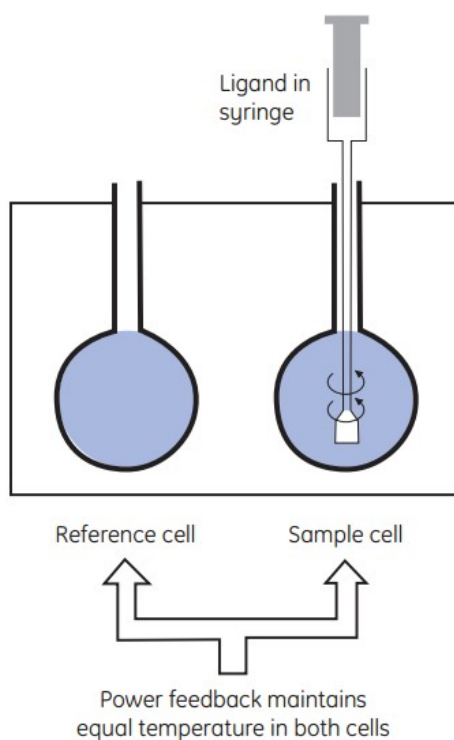
$\Delta G = 0$ – stan równowagi

$\Delta G > 0$ – proces wymuszony

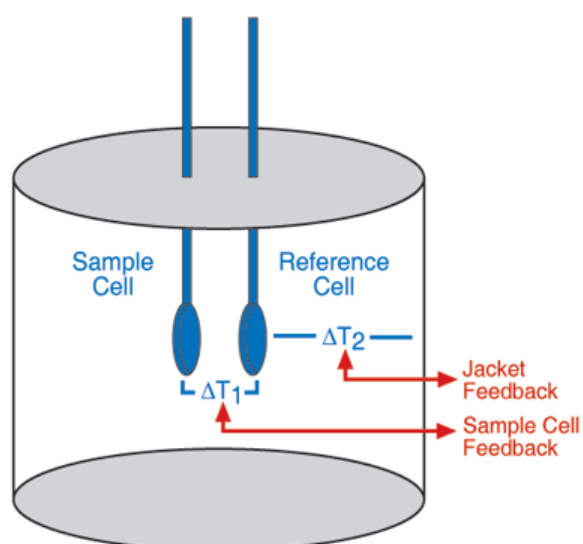
3. ITC

3.1. Zasada działania izotermicznego kalorymetru miareczkującego

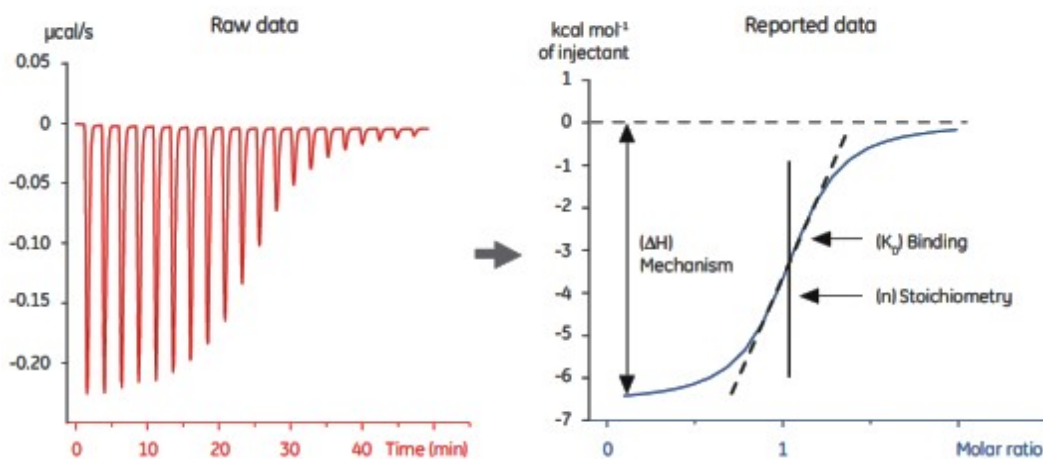
Kalorymetr ITC składa się z dwóch celiek umieszczonych w osłonie adyabatycznej oraz strzykawki miareczkującej. Celki są identyczne i umieszczone symetrycznie wewnątrz osłony adyabatycznej. W jednej z nich, zwanej celką odniesienia (*reference cell*) znajduje się najczęściej woda, w drugiej, celce pomiarowej (*sample cell*), umieszcza się roztwór jednego z badanych reagentów. Roztworem drugiego z reagentów napelnia się strzykawkę miareczkującą, którą następnie umieszcza się w celce pomiarowej w sposób widoczny na schemacie (rys. 2) Strzykawka zakończona jest mieszadłem i podczas pomiaru obraca się z zadaną prędkością zapewniając ciągle mieszanie reagentów w celce pomiarowej.



Rys. 2 Uproszczony schemat budowy kalorymetru [3]



Rys. 3 Uproszczony schemat pomiaru temperatury [3]



Rys. 4 Termogram i izoterma wiązania dla tworzenia kompleksu o stechiometrii jeden [3]

Ilość ciepła wydzieloną w danym kroku oblicza się obliczając powierzchnię odpowiadającego mu pikowi termogramu. Istotne jest, aby między kolejnymi pikami widoczny był wyraźny odcinek linii bazowej, ponieważ poprzez ekstrapolowanie fragmentów linii bazowej zmierzonej pomiędzy pikami otrzymuje się linię bazową ograniczającą powierzchnię pików. Po wycałkowaniu wszystkich pików otrzymuje się krzywą obrazującą przebieg reakcji, czyli izotermę reakcji. Dla prostego układu w którym powstaje kompleks o stechiometrii jeden interpretacja izoterm nie jest trudna (prawy panel rys. 4). Odległość między górnym i dolnym plateau wyznacza zmianę entalpii (ΔH), współczynnik kierunkowy prostej stycznej do stożka krzywej miareczkowania wyznacza stałą asocjacji (K_a), punkt na osi X odpowiadający połowie zmiany entalpii wyznacza stechiometrię (N).

3.2. Ograniczenia metody

Kalorymetr mierzy całkowite ciepło wydzielone w celce. Zatem jeśli w celce zachodzą również procesy inne niż badana reakcja, dające dodatkowe wkłady cieplne, uzyskane wyniki będą trudne lub niemożliwe do interpretacji.

Jednym z podstawowych problemów jest dopasowanie buforów. pH, siła jonowa, stężenie soli, stężenie dodatków stabilizujących białko (np. DMSO) muszą być identyczne w obu roztworach reagentów. Mieszanie buforów, nawet dwóch próbek tego samego buforu, o nieco innych stężeniach lub pH związane jest z reakcjami protonacji/deprotonacji cząsteczek buforu. Zależnie od buforu energia jonizacji wynosi od ułamków do kilkunastu kcal/mol, co jest porównywalne z energią tworzenia lub zrywania wiązań wodorowych.

W tabeli poniżej przedstawiono ciepła jonizacji kilku popularnych buforów [4]

bufor	ΔH_{ion} [kcal/mol]
fosforanowy	1,22
HEPES	5,02
Tris	11,34

Dla procesów, którym towarzyszy niewielka ilość wydzielanego lub pochłanianego ciepła problem może stanowić uzyskanie odpowiednio dużych stężeń reagentów. Jest to istotne szczególnie dla białek, pozyskiwanych metodami inżynierii genetycznej z niewielką wydajnością, lub dla białek słabo rozpuszczalnych, mających tendencję do agregowania w wyższych stężeniach. Dla procesów o bardzo dużej zmianie ciepła możemy

przekroczyć zakres pracy aparatu. W obu przypadkach, zmiana stężenia próbek, odpowiednio zatężenie lub rozcieńczenie próbek może nie być dobrym rozwiązaniem, ponieważ optymalnych kształt krzywej miareczkowania zależy od iloczynu stężenia reagenta i stałej asocjacji, czyli tak zwanego parametru Wisemanna, który posiada pewien optymalny zakres (patrz niżej).

3.3. Przygotowanie próbek

Jednym ze sposobów rozwiązania problemu niedopasowania buforów, wspomnianego powyżej, jest dializa roztworu makromolekuły i liganda względem tego samego buforu, lub, dla ligandów drobnocząsteczkowych, rozpuszczenie liganda w buforze w którym dializowana była makromolekuła.

Tak uzyskane próbki należy jeszcze przefiltrować a następnie odgazować. Obie te czynności pozwalają znacząco ograniczyć szum rejestrowany podczas pomiaru i uniknąć „igieł”, czyli wysokich, wąskich pików, które mogą pojawić się na termogramie, gdy pęcherzyki powietrza uwalniają się z roztworu.

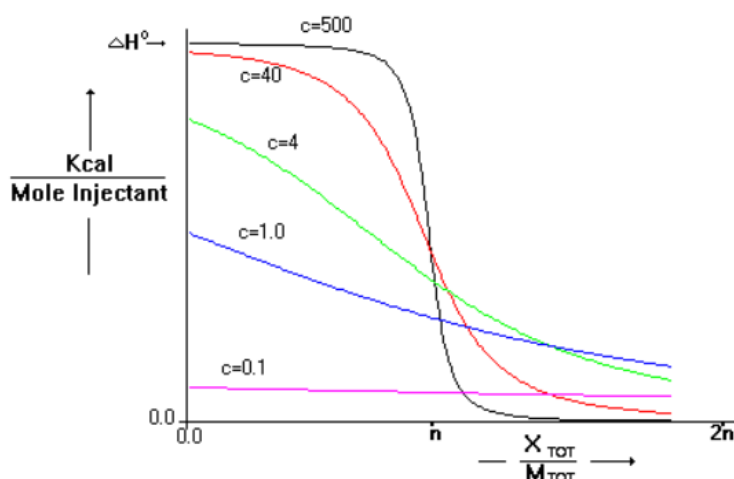
3.4. Sigmoidalność krzywej miareczkowania i parametr Wisemanna

Krzywa miareczkowania dla dowolnego układu receptor-ligand ma zasadniczo kształt sigmoidalny. Na początku, gdy ilość cząsteczek ligandu jest znacząco mniejsza od liczby cząsteczek receptora wszystkie dodane cząsteczki są bardzo szybko wiązane i wartość obserwowanego sygnału nie zmienia się – początkowe plateau. Kolejne dodawane porcje ligandu wysycają kolejne miejsca aktywne, i liczba wolnych cząsteczek receptora zmniejsza się, więc obserwowany sygnał również zmienia swoją wartość (rośnie lub maleje), aż do momentu gdy wysyczone zostaną wszystkie miejsca aktywne i obserwować będziemy tylko wydzielanie ciepła związane z rozpuszczaniem ligandu.

Współczynnik Wisemanna[5], zwany również współczynnikiem sigmoidalności, zdefiniowany jest w następujący sposób:

$$c = K_a \cdot [M]_{tot} \cdot N \quad (4)$$

gdzie K_a - stała asocjacji, $[M]_{tot}$ - całkowite stężenie miejsc wiążących, N - współczynnik stechiometryczny



Rys. 5 Kształt izotermi wiązania w funkcji parametru c [3]

Jak w każdym eksperymencie kompleksowania stężenia reagentów muszą być w odpowiednim zakresie, tak, żeby zarówno stężenie wolnych reagentów jak i substratów było znaczące. Jeśli stężenie miejsc wiążących jest znacząco wyższe niż $1/K_a = K_d$ prawie cały dodany ligand zostanie związany w pojedynczym kroku, miejsca

aktywne wysyczone, a krzywa miareczkowania, będzie niemalże prostokątna, ze współczynnikiem nachylenia stoku dążącym do nieskończoności. W przypadku przeciwnym, gdy stężenie miejsc wiążących jest znacznie niższe niż K_d bardzo trudno jest osiągnąć pełne nasycenie miejsca aktywnych i krzywa wiązania staje się bardzo płaska. Aby oznaczenie stałej wiązania było dokładne, stężenie miejsc aktywnych w roztworze nie powinno znacząco przekraczać K_d .

Parametr Wisemana ułatwia takie dobranie stężenia ligandu i makromolekuły aby krzywa miareczkowania nie była zbyt stroma ani zbyt płaska. Warunki te są spełniane przez krzywe, które charakteryzują się współczynnikiem sigmoidalności z przedziału 10 – 1000.

ΔH i K_a są wyznaczone jako parametry dopasowania do krzywej miareczkowania otrzymanej dla optymalnych wartości stężeń reagentów. Jednak najbardziej precyzyjną metodą pomiaru tych parametrów, jest wykonanie dwóch miareczkowań, w dwóch różnych warunkach. ΔH Najlepiej jest wyznaczyć z krzywej miareczkowania o wysokim c , wtedy miejsca aktywne są wysyczone, górne i dolne plateau jest dobrze zaznaczone. Z takiej krzywej oczywiście trudno jest wyznaczyć poprawnie K_a , zatem należy wykonać jeszcze jedno miareczkowanie w niższym zakresie wartości parametru c aby precyzyjnie wyznaczyć stałą wiązania.

4. Równania funkcji do fitowania krzywych miareczkowań kalorymetrycznych

Ponieważ w ramach Pracowni Podstaw Biofizyki badane będą tylko cząsteczki o jednym miejscu wiążącym, tworzące z ligandami kompleksy o stechiometrii jeden poniżej pokazane zostaną równania tylko dla najprostszego modelu wiązania.

4.1. Model identycznych nieoddziałujących miejsc wiążących

Model ten jest oparty na dwóch założeniach (i) wszystkie miejsca aktywne są identyczne (czyli wiążą ligand z tą samą stałą asocjacji) (ii) wszystkie miejsca aktywne są całkowicie niezależne (brak kooperacji między miejscami aktywnymi)

Oznaczenia:

Θ - frakcja miejsc aktywnych zajętych przez ligand

$1 - \Theta$ - frakcja miejsc wolnych

K_a - stała asocjacji

V_θ - aktywna objętość celki pomiarowej (to objętość „okrągłej” części celki, bez rurki doprowadzającej, ponadto podczas eksperymentu objętość mieszaniny reakcyjnej wzrasta, nadmiar płynu rozlewa się powyżej celki pomiarowej i również nie jest uwzględniany w obliczeniach)

N - stechiometria

$[M]_{tot}$ - całkowite stężenie makromolekuły

$[L]_{tot}, [L]$ - całkowite stężenie ligandu, stężenie wolnego(niezwiązanego) ligandu

Całkowite ciepło Q wydzielone lub pochłonięte przez roztwór makromolekuły o Θ wysyczonych miejsc aktywnych

$$Q = N \Theta [M]_{tot} V_\theta \Delta H \quad (5)$$

Tę wartość ciepła można policzyć po każdym kolejnym wstrzyknięciu porcji liganda.

Ale kalorymetr dokonuje pomiaru różnicy ciepła wydzielonego między danym (i) i poprzednim (i-1) dodaniem porcji liganda, zatem sygnał, który mierzy kalorymetr zdefiniowany jest następująco:

$$\Delta Q_i = Q_i - Q_{i-1} + \frac{dV_i}{V_\theta} \left[\frac{Q_i + Q_{i-1}}{2} \right] \quad (6)$$

gdzie dV_i to zmiana objętości związana z dodaniem porcji liganda.

Wzory (5) i (6) są wzorami ogólnymi, niezależnymi od mechanizmu reakcji zachodzącej w celce. Dopiero podstawienie we wzorze (5) frakcji zajętych miejsc aktywnych wyliczonych dla rozpatrywanego modelu prowadzi do wyznaczenia równanie funkcji do fitowania do otrzymanych wyników.

Wyprowadźmy wzór na ΔQ_i w rozpatrywanym modelu identycznych niezależnych miejsc wiążących.

Stała asocjacji wyrażona za pomocą frakcji zajętych miejsc aktywnych dana jest wzorem:

$$K_a = \frac{\Theta}{(1-\Theta)[L]} \quad (7)$$

następnie wyrażmy stężenie wolnego ligandu [L] przez całkowite stężenie ligandu $[L]_{tot}$

$$[L]_{tot} = [L] + n[M]_{tot}\Theta \quad (8)$$

Wyznaczając stężenie wolnego ligandu [L] z (8) i podstawiając do (7) a następnie przekształcając otrzymany wzór, tak aby wyznaczyć frakcję zajętych miejsc aktywnych Θ otrzymuje się

$$\Theta^2 - \Theta \left[1 + \frac{[L]_{tot}}{N[M]_{tot}} + \frac{1}{N K_a [M]_{tot}} \right] + \frac{[L]_{tot}}{N[M]_{tot}} = 0 \quad (9)$$

Podstawiając rozwiązanie powyższego równania kwadratowego do (5) otrzymujemy

$$Q = \frac{N[M]_{tot} V_\theta \Delta H}{2} \left[1 + \frac{[L]_{tot}}{N[M]_{tot}} + \frac{1}{N K_a [M]_{tot}} - \sqrt{\left(1 + \frac{[L]_{tot}}{N[M]_{tot}} + \frac{1}{N K_a [M]_{tot}} \right)^2 - \frac{4[L]_{tot}}{N[M]_{tot}}} \right] \quad (10)$$

Z powyższego równania można wyliczyć całkowite ciepło wydzielone lub pobrane po wybranym (i-tym) dodaniu porcji liganda. Policzenie tego ciepła dla dwóch kolejnych wstrzyknięć liganda Q_{i-1} i Q_i i podstawienie do (6) prowadzi do otrzymania wzoru funkcji, którą należy dopasować do uzyskanych danych eksperymentalnych.

Funkcja ta jest zaimplementowana w oprogramowaniu służącym do analizy uzyskanych wyników, dostarczonym przez producenta aparatury

5. Bibliografia

- [1] Ilian Jelesarov, Hans Rudolf Bosshard: Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition, 1999,12:3–18
- [2] Pooria Gill, Tahereh Tohidi Moghadam, Bijan Ranjbar: Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience, 2010,21(4): 167–193
- [3] strona producenta MicroCal (part of GE Healthcare) <http://www.gelifesciences.com/>
- [4] Alexander G. Kozlov, Timothy M. Lohman: Large Contributions of Coupled Protonation Equilibria to the Observed Enthalpy and Heat Capacity Changes for ssDNA Binding to Escherichia coli SSB Protein, 2000,4:8 –22
- [5] T. Wiseman, S. Williston, J.F. Brandts, L.N. Lin: Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter, 1989,179(1):131-7

6. Kolokwium wstępne

Warunkiem przystąpienia do części eksperymentalnej ćwiczenia jest zaliczenie kolokwium wstępnego.

Wybór sposobu przeprowadzenia kolokwium wstępnego tj forma pisemna lub ustna, pytania otwarte lub zamknięte – należy do prowadzącego ćwiczenie.

Materiał dotyczący kalorymetrii wymagany podczas kolokwium wstępnego oraz wykonywania części eksperymentalnej ćwiczenia został podany podczas wykładu „Metody biofizyki molekularnej” oraz w niniejszej instrukcji.

6.1. Polecana literatura

1. Ilian Jelesarov, Hans Rudolf Bosshard: Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition, 1999,12:3–18
2. John E. Ladbury (ed.) & Michael L. Doyle (ed.): biocalorimetry 2. Applications of calorimetry on the biological sciences. Wiley. 2004

6.2. Zagadnienia do kolokwium wstępnego.

1. Co to jest kalorymetria. Na czym polegają techniki ITC i DSC? Jakie parametry termodynamiczne można przy ich zastosowaniu wyznaczyć?
2. Reakcje endo- i egzo-termiczne. Jakie procesy zachodzące podczas asocjacji cząsteczek są związane z wydzielaniem i pochłanianiem ciepła?
3. Jakie procesy, zachodzące podczas asocjacji cząsteczek, są związane ze zmianą entalpii i entropii?
4. Co to jest parametr c ? Jak ma znaczenie przy planowaniu eksperymentu kalorymetrycznego.
5. Zasada działania kalorymetru ITC.

7. Wykonanie ćwiczenia

7.1. Badane próbki

W zależności od decyzji prowadzącego ćwiczenie badana będzie jedna z poniższych reakcji:

1. kompleksowanie eteru koronowego 18-korona-6 z jonami baru
2. wiązanie chitotriozy przez lizozym
3. wiązanie naproksenu przez albuminę wołową (BSA)

Studenci otrzymają od prowadzącego bufor, oraz stężone roztwory białka i ligandu w tym buforze.

7.2. Przebieg eksperymentu

1. Przygotowanie układu pomiarowego odbywa się pod kierunkiem asystenta.
2. Ustalenie warunków eksperymentu z uwzględnieniem stałej Wiesmanna oraz literaturowych wartości stałych dysocjacji.
3. Przygotowanie roztworów o wyznaczonych stężeniach, przefiltrowanie i odgazowanie próbek.
4. Umieszczenie roztworów w kalorymetrze, zmontowanie układu pomiarowego, wprowadzenie wybranych parametrów pomiarów do oprogramowania sterującego kalorymetrem i uruchomienie pomiaru.
5. Opracowanie wyników przy pomocy dedykowanego oprogramowania.

8. Raport

Raport powinien zawierać

1. krótki opis badanego zjawiska
2. krótki opis metody zastosowanej do pomiarów, oraz użytych odczynników
3. prezentację otrzymanych wyników (wartość i błąd) wraz z ich analizą i interpretacją, w tym wyznaczenie potencjału Gibbsa dla badanej reakcji,
4. porównanie uzyskanych wyników z danymi literaturowymi.



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY

