

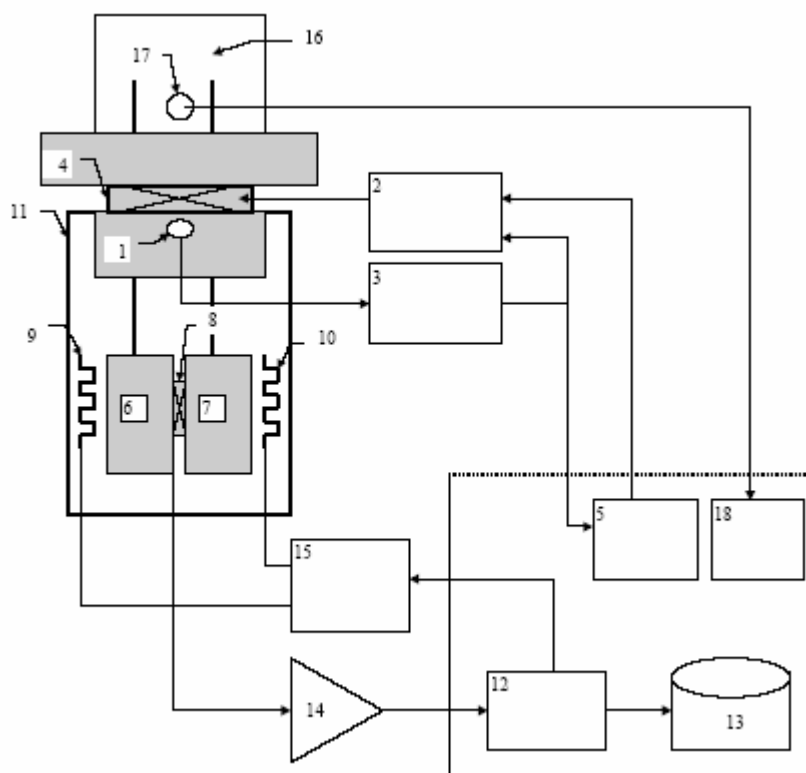
Badanie stabilności termodynamicznej białka metodą DSC

Budowa aparatu

Mikrokalorymetry DSC obecnie stosowane do pomiarów pojemności cieplnej roztworów biologicznych makromolekuł to precyzyjne urządzenia pracujące w modzie różnicowym to znaczy wyposażone w dwie termicznie izolowane, identyczne komory: komorę referencyjną i komorę na próbkę. Komory mogą to mieć kształt cylindryczny lub też kapilarny realizowany poprzez wydrążenia w wykonanym ze złota (24 K) lub tantalu bloku, zwanym płaszczem grzewczym, charakteryzującym się bardzo dobrym przewodnictwem cieplnym. Zastosowanie komory kapilarnej zapewnia mniejszy gradient temperatury wewnątrz komory, pozwalana osiągać wyższe ciśnienia i umożliwia łatwiejsze wypełnianie komór z uniknięciem wprowadzenia bąbelków powietrza, jednak wymaga większej objętości próbki w stosunku do komory cylindrycznej. Płaszcz grzewczy jest jednocześnie zastosowany jako siła napędowa grzania i chłodzenia komór, przy czym zmiana temperatury odbywa się ze stałą prędkością (skanowanie, $dT/dt = const.$) i jest kontrolowana przez komputer. Ciepło jest doprowadzana/odprowadzane do płaszcza przez precyzyjne grzejąco/chłodzące elementy Peltier. Temperatura płaszcza jest mierzona przez termometr platynowy. Mikrokalorymetr pracuje w trybie kompensacyjnym polegającym na pomiarze ilości energii potrzebnej do utrzymania tej samej temperatury w obydwu komorach (inaczej mówiąc stałej, bliskiej zero różnicy temperatur, $\Delta T = const.$). Dopóki pochłanianie/ wydzielanie ciepła jest identyczne w obydwu komorach ich temperatura pozostaje taka sama. W momencie kiedy próbka zaczyna podlegać przejściu termotropowemu (np. endotemiczny proces taki jak rozwijanie białka, przejście fazowe lipidów, dysocjacja podwójnej nici DNA itp.), ciepło wcześniej zużywane na podniesienie temperatury teraz zostaje wykorzystane w zachodzącym procesie biochemicznym w wyniku czego wzrost temperatury (rozpatrujemy skan grzania) w komorze próbkowej opóźnia się w porównaniu do komory referencyjnej. Różnica temperatur pomiędzy komorami jest mierzona przez półprzewodnikową termobaterię umożliwiającą detekcję nawet bardzo małych różnic temperatur. Indukowana procesem biochemicznym różnica temperatur pomiędzy komorami powoduje zmianę napięcia półprzewodnikowej termobaterii, które po wzmocnieniu uruchamia dodatkową grzałkę elektryczną obsługującą komorę na próbkę (komora referencyjna jest wyposażona w analogiczna grzałkę) i w ten sposób utrzymywana jest równowaga temperatur pomiędzy komorami. Mierzonym sygnałem jest różnica dostarczonej do komór mocy.

Zastosowanie podwyższonego ciśnienia pozwalana na pomiar roztworów wodnych od -10 do 130°C bez wydzielania bąbelków gazu czy zamrażania/zagotowania wody w próbce.

Nadmiarowe ciśnienie 3 atm. jest wywierane przez aparat tłokowy i jest kontrolowane przez czujnik piezoelektryczny. Podczas pomiaru jest utrzymywane stałe ciśnienie co pozwala na bezpośrednie utożsamianie ciepła reakcji ze zmianą entalpii ($dQ = \Delta H$).



Rys.1 Budowa kalorymetru NanoII SCS 6100

1. termometr platynowy
2. blok kontrolujący temperaturę
3. obwód mierzący temperaturę
4. chłodząco-grzejące elementy Peltier
5. algorytm kontrolujący temperaturę
6. 7. cylindryczne komory pomiarowe
8. termoczuźnik
- 9,10. grzałki kompensujące moc
11. płaszcz
12. zwrotny algorytm kontrolujący
13. dane pomiarowe
14. wzmacniacz sygnału
15. mostek kompensujący moc
16. manostat
17. czujnik ciśnienia
18. miernik ciśnienia

Podsumowując, aparat DSC mierzy różnicę mocy potrzebną do utrzymania tej samej temperatury dla roztworu makromolekuł znajdującego się w komorze próbkowej i dla rozpuszczalnika umieszczonego w komorze referencyjnej podczas ciągłej, zachodzącej ze stałą prędkością zmiany temperatury układu w trybie grzania lub chłodzenia. Surowe dane DSC to zatem zależność mocy (dQ/dt , [μW]) od temperatury

Celem pomiaru DSC jest wyznaczenie temperaturowej zależności cząstkowej pojemności cieplnej makromolekuły, C_p^M , (*ang. partial heat capacity*). Z pomiaru różnicy mocy bezpośrednio dostępna jest $C_p^{\text{roztwór / rozp}}$ i odpowiada ona różnicy pojemności cieplnej pomiędzy roztworem (makromolekuła + rozpuszczalnik) a rozpuszczalnikiem. Z definicji pojemność cieplną przy stałym ciśnieniu określa wzór $C_p = dQ/dT$ (bo $C_p = (dH/dT)_p$) i jest otrzymywana przez podzielenie szybkości grzania (dQ/dt , [$J \cdot s^{-1} = W$]) przez szybkość zmiany temperatury (dT/dt , [$K \cdot s^{-1}$]).

$$C_p^{\text{roztwór / rozp}} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{dt}{dT}$$

Dla wyjaśnienia. DSC mierzy *de facto* **cząstkową** pojemność cieplną próbki. $C_p^{\text{roztwór}}$ roztworu zawierającego makrocząsteczkę jest mierzona w stosunku do C_p^{rozp} buforu niezawierającego makrocząsteczki, zatem instrument mierzy tylko część z całości (wartość cząstkowa) tzn. różnicę pojemności (czyli $C_p^{\text{roztwór / rozp}}$) pomiędzy komorą na próbkę a komorą referencyjną.

Wyliczenie molowej cząstkowej pojemności cieplnej makromolekuły, C_p^M , wymaga dokładnej wiedzy co do masy makromolekuły (m_M) i masy rozpuszczalnika wymienionego przez makromolekułę ($m_M \frac{V_M}{V_{\text{rozp}}}$), a także cząstkowej objętości specyficznej makromolekuły (v_M), która jest wielkością addytywną i można ją wyznaczyć znając cząstkowe objętości specyficzne składników makromolekuły i cząstkowej objętości specyficznej rozpuszczalnika (v_{rozp}), a także masy molowej makromolekuły (M_w). [Privalov, 1995, Plotnikov, 1997].

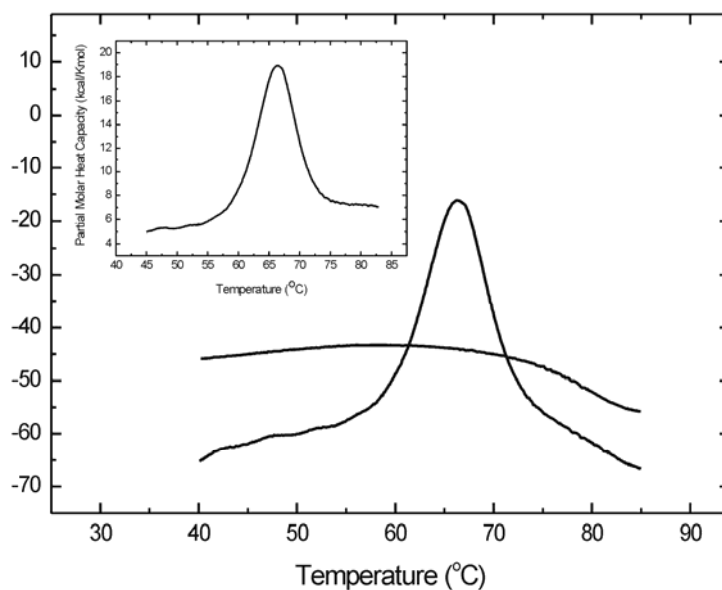
$$C_p^M(T) = \left[\frac{C_p^{\text{rozp}}}{v_{\text{rozp}}} v_M + \frac{C_p^{\text{roztwór / rozp}}}{m_M} \right] M_w$$

gdzie C_p^{rozp} pojemność cieplna rozpuszczalnika w temperaturze T . Parametr $\frac{C_p^{\text{rozp}}}{v_{\text{rozp}}}$ może zostać uznany za niezależny od temperatury i wynosi dla roztworów wodnych $4,2 \text{ J}/(\text{K} \cdot \text{cm}^{-3})$.

Krzywa DSC, zwana termogramem, przedstawia cząstkową pojemność C_p w funkcji temperatury. Przed właściwym pomiarem, podczas którego komora próbkowa jest wypełniona roztworem makromolekuły a komora referencyjna buforem dializacyjnym należy wykonać pomiar tzw. instrumentalnej linii podstawowej z obiema komorami wypełnionymi buforem dializacyjnym. Instrumentalna linia podstawowa nie jest liniowa i odbiega od zera

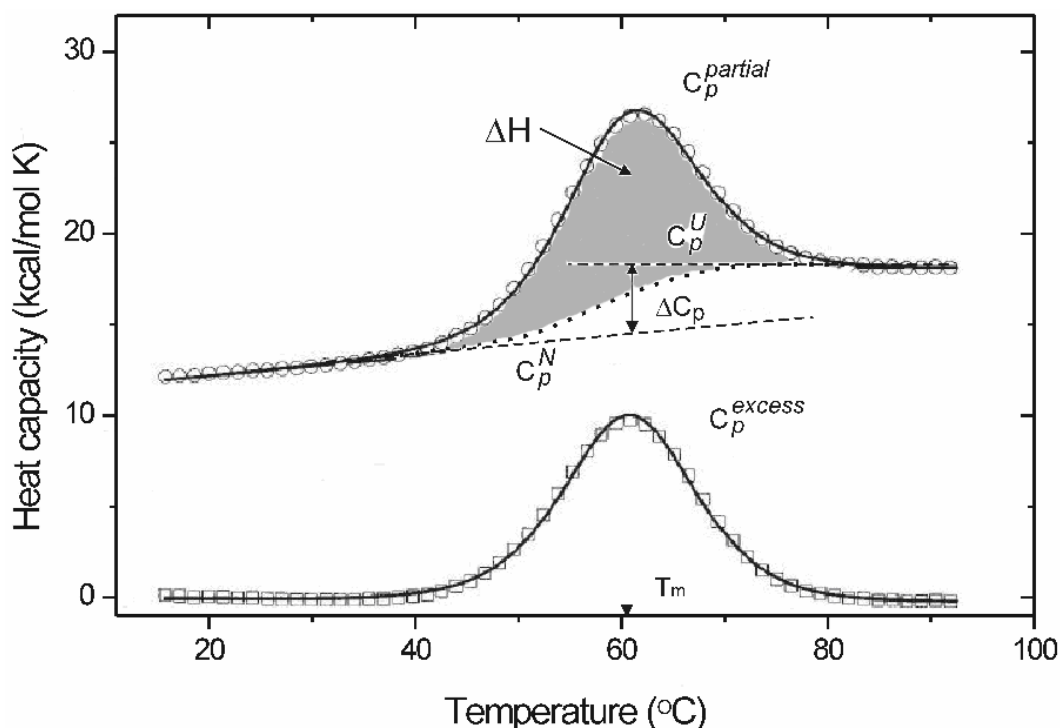
ponieważ w praktyce wykonanie dwóch absolutnie identycznych komór jest niemożliwe. Przebieg linii referencyjnej zależy od parametrów pomiaru, między innymi od szybkości skanowania dlatego jej pomiar musi być wykonany w identycznych warunkach jak pomiar właściwy.

Równowagowym kryterium odwracalności jest odtwarzalność wielkości i położenia endotermicznego pików w powtórnych skanach grzania (Edge i wsp., 1985), zatem konieczne jest wykonanie jeszcze jednego pomiaru, podczas którego komora próbkowa wypełniona jest identycznym roztworem białka.



Rys. 2 Wykres przedstawia surowe dane DSC dla białka i buforu czy zależność różnicy mocy dostarczonej do komór od T. Wykres wewnętrzny przedstawia zależność molowej cząstkowej pojemności cieplnej od T.

Krzywa DSC uzyskana w pomiarze rozwijania białka zawiera trzy obszary. Obszar niskotemperaturowy (przed przejściem) odpowiadający pojemności cieplnej natywnej formy białka, obszar przejścia fazowego tzw. pik, gdzie pojemność cieplna gwałtownie rośnie (dostarczane ciepło jest zużywane najpierw na zrywanie wiązań niekowalencyjnych, a potem na wzrost temperatury, przejścia fazowe I-rodzaju) oraz obszar za przejściem (wysokotemperaturowy) odpowiadający pojemności cieplnej stanu rozwiniętego białka.



Rys. 3 Wykres górny przedstawia zależność molowej (cząstkowej) pojemności cieplnej od T. Wykres dolny zależności nadmiarowej molowej pojemności cieplnej od T.

Analiza krzywej DSC uzyskanej dla procesu odwracalnego dostarcza pełnego opisu termodynamicznego badanego procesu poprzez możliwość bezpośredniego wyznaczania parametrów termodynamicznych takich jak T_m , ΔH_{kal} , (wtórne wyliczenie ΔS_{kal}) oraz ΔC_p , bez zakładanie *ad hoc* modelu rozwijania/topnienia. Temperatura przejścia, T_m , zwykle odnosi się do wartości temperatury w maksimum krzywej DSC, czyli w maksimum molowej pojemności cieplnej. Dla poprawnego wyliczenia entalpii kalorymetrycznej krytyczne jest przeprowadzenie tzw. chemicznej linii podstawowej zamykającej powierzchnię poddawaną całkowaniu. Ponieważ pojemność cieplna stanu natywnego jest słabą liniową funkcją temperatury (wiedza empiryczna) rejon przed przejściem przybliża się linią prostą, natomiast pojemność cieplna stanu rozwiniętego początkowo jest niezależna od temperatury, a następnie maleje ze wzrostem temperatury i jest przybliżana poprzez funkcję kwadratową (parabolę). Ze złożenia tych dwóch funkcji w rejonie przejścia powstaje sigmoida, która ogranicza całkowaną powierzchnię. Często, gdy absolutna wartość molowej pojemności cieplnej nie jest wymagana, dane DSC są prezentowane się w postaci tzw. nadmiarowej pojemności cieplnej (C_p^{exc} , *ang. excess heat capacity*) w funkcji temperatury, gdzie C_p^{exc} jest molową (cząstkową) pojemnością cieplną białka mierzoną od odpowiedniego poziomu referencji. Referencję często stanowi pojemność cieplna natywnej formy białka lub też chemiczna linia

podstawowa (Sanchez-Ruiz 1995). Entalpia kalorymetryczna, ΔH_{kal} , jest to pole powierzchni pod krzywą DSC wyznaczone przez całkowanie:

$$\Delta H_{kal} = \int_{T_1}^{T_2} C_p^{exc} \cdot dT$$

Entropię kalorymetryczną, ΔS , można wyznaczyć jedynie dla procesu odwracalnego poprzez proste podzielenie:

$$\Delta S = \frac{\Delta H_{kal}}{T_m}$$

Dla procesu rozwijania białka charakterystyczny jest wzrost pojemności cieplnej, ΔC_p , oznacza to, że pojemność cieplna stanu rozwiniętego białka jest wyższa niż stanu natywnego. Powodem tego zjawiska towarzysząca rozwijaniu zmiana w dostępnej dla rozpuszczalnika polarnych (ΔASA_{pol} , *ang. change polar accessible surface area*) i niepolarnych (ΔASA_{apol} , *ang. change apolar accessible surface area*) powierzchni białka. Najprostszą metodą wyznaczania ΔC_p jest metoda graficzna polegająca na liniowej ekstrapolacji pojemności cieplnej uzyskanej dla stanu natywnego i pojemności uzyskanej dla stanu rozwiniętego do temperatury przejścia T_m , patrz Rys 2. Zastosowanie tej metody wymaga bardzo dobrej jakości danych eksperymentalnych niestety często niedostępnych.

Innym sposobem wyznaczania ΔC_p jest wykonanie serii pomiarów dla różnych wartości pH (oczywiście zakres pH obejmujący rejon stabilności białka) lub czasem stężenia białka (ten sposób należy jednak stosować z ostrożnością ze względu na możliwość zmiany stopnia oligomeryzacji białka, w praktyce stosuje się tylko do białek monomerycznych) przy zachowaniu identyczności pozostałych warunkach pomiaru. Zależność ΔH_{kal} od T jest funkcją liniową ($\Delta C_p = (d\Delta H/dT)_p$), której współczynnik nachylenia wyznacza wartość ΔC_p . Jednakże ten sposób wyznaczania różnicy pojemności cieplnej jest mniej dokładny niż bezpośrednia metoda graficzna. Konsekwencją zmian pojemności cieplnej w procesie rozwijania jest temperaturowa zależność entalpii i entropii kalorymetrycznej opisana równaniem Kirchoff'a:

$$\Delta H(T) = \Delta H(T_m) + \int_{T_m}^T \Delta C_p \cdot dT$$

$$\Delta S(T) = \frac{\Delta H(T_m)}{T_m} + \int_{T_m}^T \frac{\Delta C_p}{T} \cdot dT,$$

Zatem wyznaczenie zmiany entalpii/entropii w dowolnej temperaturze jest możliwe jeśli znana jest zmiana entalpii/entropii w temperaturze referencyjnej (tutaj w temperaturze przejścia) i zmiana pojemności cieplnej procesu.

Zmiana entalpii swobodnej w procesie rozwijania jest zdefiniowana jako różnica pomiędzy entalpia swobodną stanu rozwiniętego, U , i natywnego, N :

$$\Delta G_U = G_U - G_N$$

Przy założeniu, że wartość ΔC_p jest stała w badanym zakresie temperatur powyższe równania upraszczają się:

$$\Delta H(T) \cong \Delta H(T_m) + \Delta C_p (T - T_m)$$

$$\Delta S(T) \cong \frac{\Delta H(T_m)}{T_m} + \Delta C_p \ln \frac{T}{T_m}$$

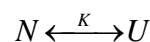
natomiast znane równanie Gibbs'a-Helmholtz'a, ($\Delta G_U(T) = \Delta H(T) - T\Delta S(T)$), przyjmuje postać:

$$\Delta G_U(T) = \Delta H(T_m) \cdot \left[1 - \left(\frac{T}{T_m} \right) \right] + \Delta C_p \cdot \left[T - T_m - T \cdot \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \right]$$

Krzywa zależności ΔG_U od T dla procesu rozwijania białka nosi nazwę krzywej stabilności.

ΔG_U czyli zmiana entalpii swobodnej procesu rozwijania białka to funkcja stanu zdefiniowana jako różnica pomiędzy entalpią swobodną stanu końcowego tzn. rozwiniętego (U) i początkowego-zwiniętego (N), $\Delta G_U = G_U - G_N$. Z tej definicji wynika, że białko znajduje się w stanie natywnym w zakresie temperatur odpowiadających dodatniej wartości entalpii swobodnej ($\Delta G_U > 0$).

Proces rozwijania małych (do 20 kDa) białek globularnych przebiega zwykle według modelu dwu-stanowego (zwanego też jednoprzejściowym lub kooperatywnym) zapisywanego schematem:



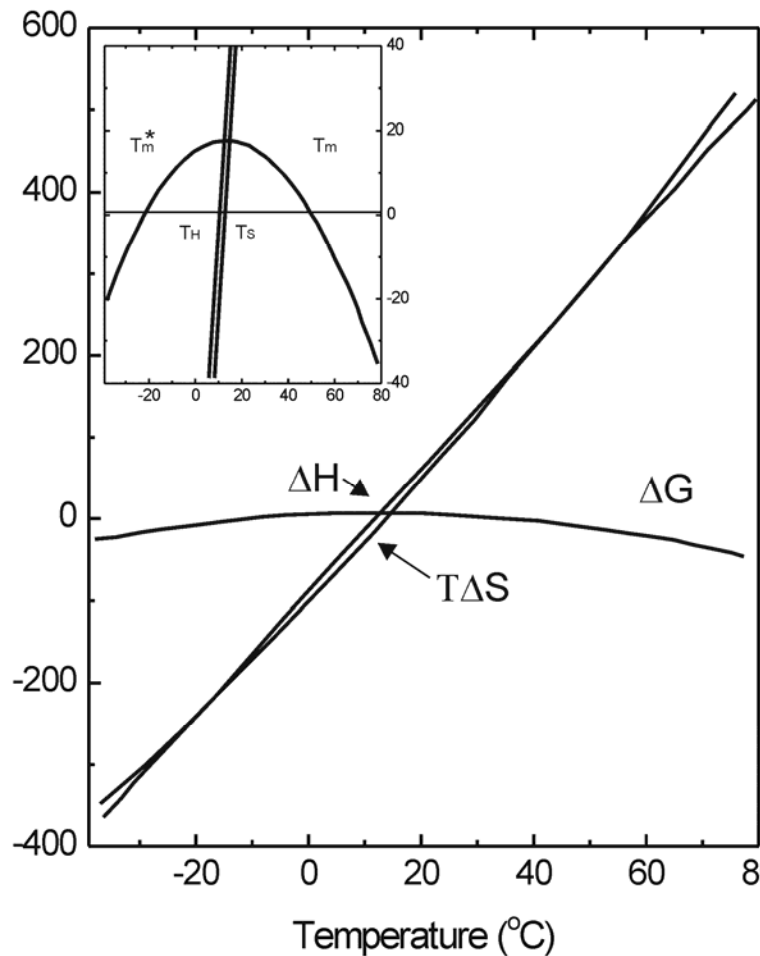
według którego znacząco reprezentowane są tylko dwa stany białka: stan N odnoszący się do formy natywnej białka i stan U oznaczający formę rozwiniętą. Stała równowagi K wyrażana jest wzorem:

$$K = \frac{[U]}{[N]} = \frac{f_u}{f_n} \exp \left[-\frac{\Delta H_u}{R(1/T - 1/T_{1/2})} \right],$$

gdzie f_u i f_n frakcjami molowymi stanów: rozwiniętego i natywnego, ΔH_u entalpią rozwijania, a $T_{1/2}$ oznacza temperaturę, w której $K = 1$.

$$f_u(T) = \frac{[U]}{[N] + [U]} = \frac{K(T)}{1 + K(T)}$$

Dla wielu białek, których rozwijanie zachodzi według najprostszego dwu-stanowego modelu, krzywa stabilności ma charakterystyczny przebieg, (parz Rys. 4, wewnętrzny)



Rys. 4 Zależność ΔH , $T\Delta S$ i ΔG od temperatury. T_m temperatura cieplnej denaturacji, T_m^* temperatura zimnej denaturacji T_H temperatura dla której $\Delta H = 0$, T_S temperatura, dla której $T\Delta S = 0$.

Krzywa stabilności dla monomerycznych białek rozwijających się według modelu dwustanowego posiada dwa punkty przecięcia z osią x zwane punktami przejścia, dla których $\Delta G_U = 0$. W przypadku białek monomerycznych punkty przejścia odpowiadają temperaturom gdzie stężenia formy natywnej i rozwiniętej są takie same ($\Delta G_U = -RT \ln K$, $K=1$). Niskotemperaturowy punkt przejścia będący wynikiem extrapolacji przewiduje niestabilność białka w procesie zwanym zimną denaturacją. Zjawisko jest wynikiem destabilizującego

efektu hydratacyjnego. Temperatura w której ΔG_U osiąga maksymalną wartość ($\Delta S=0$) zwana jest temperaturą maksymalnej stabilności białka (T_S). Dla $T=T_m$ można wyliczyć wartość zmiany entropii dla procesu rozwijania na podstawie wzoru:

$$\Delta S(T_m) = \Delta H(T_m)/T_m$$

Wyznaczenie entalpii kalorymetrycznej umożliwia także pozyskanie pewnych informacji dotyczących modelu rozwijania białka. Kooperatywność procesu rozwijania można sprawdzić porównując kalorymetryczną entalpię (ΔH_{kal}) denaturacji z entalpią van't Hoff'a (ΔH_{vH}) (Privalov and Potekhin, 1985):

$$\left(\frac{\partial \ln K(T)}{\partial T} \right)_p = \frac{\Delta H_{vH}(T)}{RT^2} \text{ - równanie van't Hoffa}$$

$$\Delta H_{vH} = \frac{4RT_m^2 C_p^{exc,max}}{\Delta H_{cal}}, \text{ wzór van't Hoffa}$$

gdzie $C_p^{exc,max}$ jest wartością nadmiarowej pojemności cieplnej w maksimum piku. Jeśli $\Delta H_{vH}/\Delta H_{kal} \approx 1$ ($1,05 \pm 0,03$) model jest dwustanowy, co oznacza, że pojedyncza cząsteczka białka stanowi kooperatywną jednostkę. Jeśli $\Delta H_{vH}/\Delta H_{kal} > 1$ np. oznacza denaturację kooperatywną białka złożonego z podjednostek, ale też proces denaturacji stowarzyszony z oligomeryzacją. Jeśli $\Delta H_{vH}/\Delta H_{kal} < 1$ oznacza model inny niż dwustanowy, w którym istnieją stany pośrednie.

W przypadku gdy w procesie rozwijania obecne są stany pośrednie możliwe jest wyznaczenie ich liczby oraz charakterystyka termodynamiczna każdego z nich poprzez dekonwolucję złożonego termicznego profilu według algorytmu Freire'a and Biltonem'a., 1978. Ponadto złożone krzywe DSC mogą być interpretowane jako bardziej lub mniej niezależne rozwijanie domen białkowych (Privalov, 1982) i dostarczać informacji o oddziaływaniu pomiędzy nimi (Brands i wsp., 1989, Ramsey and Freire, 1990).

$$H(T) = fu(T)\Delta H$$

Profil DSC dla małych (do ok. 15 kDa) białek globulach wykazuje zwykle pojedynczy pik (zwany przejściem lub endotermem) ale w przypadku bardziej skomplikowanych białek o budowie podjednostkowej lub/i domenowej krzywa DSC jest poszerzona i zawiera mniej lub bardziej pokrywające się piki

Wiele czynników zniekształca przejścia DSC i czyni analizę równowagową niewiarygodną. Zniekształcenia spowodowane długim czasem odpowiedzi kalorymetru lub

wolną kinetyką procesu zwijanie-rozwijanie (aczkolwiek ten drugi powód wydaje się mieć stosunkowo małe znaczenie, przynajmniej przy umiarkowanych szybkościach skanowania) mogą być w pewnych przypadkach skorygowane (Lopez-Moyorga and Freire, 1987).

Jednak wiele, szczególnie większych białek (powyżej 20 kDa) o budowie wielodomenowej lub/i podjednostkowej ulega nieodwracalnej denaturacji na drodze agregacji, autolizy, zmianie wewnątrzcząsteczkowych mostków dwusiarczkowych czy też chemicznej modyfikacji bocznych łańcuchów aminokwasowych (Zale and Klibanov, 1986) co manifestuje się właśnie zniekształceniem profilu DSC i brakiem przejścia endotermicznego przy powtórnych skanie grzania. Obserwuje się znaczny wzrost asymetrii wraz ze zmniejszaniem szybkości skanowania, ponadto występują zaburzenia profilu związane z towarzyszącym procesem egzotermicznym i ze zmianą molekularności.

Podsumowując, równowagowa analiza termodynamiczna termogramu DSC odnoszącego się do odwracalnego procesu denaturacji białka dostarcza szczegółowych informacji o energii i mechanizmie rozwijania (Priovalov, 1979, 1982).

Cel ćwiczenia:

Celem ćwiczenia jest zbadanie stabilności termodynamicznej lizozymu białka jaja kurzego.

Wykonanie ćwiczenia:

1. Przygotowanie aparatury pomiarowej.
2. Omówienie sposobu przygotowania próbki do pomiarów DSC i zasady pomiaru.
2. Wypełnienie komory na próbkę roztworem białka o $c = 1\text{ mg/ml}$. Objętość komory wynosi $0,3228\text{ ml}$.
3. Zmierzenie krzywej DSC
4. Opracowanie wyników przy pomocy programu komputerowego CpCalc w celu wyliczenia wartości parametrów termodynamicznych ΔH_{kal} , T_m . Sprawdzenie odwracalności procesu rozwijania białka. Dobór chemicznej linii podstawowej.
5. Przedstawienie otrzymanych wyników w postaci wykresu nadmiarowej molowej pojemności cieplnej w celu wyznaczenia parametru $C_p^{\text{exc max}}$.

Jak napisać sprawozdanie:

1. Opisać wykonanie ćwiczenia.
2. Narysować wykres zależności $C_{p, \text{mol}}$ od T .
3. Wyznaczyć w sposób graficzny ΔC_p , skomentować uzyskany wynik.
4. Znając wartości ΔH_{kal} , T_m oraz ΔC_p narysować krzywą stabilności dla badanego białka zakresie temperatur -100 do 100 . Określić temperaturę maksymalnej stabilności białka oraz wartość ΔG_U dla tej temperatury a także temperaturę zimnej denaturacji. Skomentować uzyskany wynik.
5. Korzystając z tych samych parametrów narysować wykres zależności ΔH od T oraz $T \Delta S$ od T . Skomentować uzyskany wynik.
6. Wyliczyć stosunek $\Delta H_{\text{vH}}/\Delta H_{\text{kal}}$. Skomentować uzyskany wynik.
7. Napisać jakie są wady i zalety metody DSC w badaniach stabilności białek.

Wymagane wiadomości:

1. Zasady termodynamiki, definicja i znaczenie funkcji termodynamicznych.
2. Równanie van't Hoffa.
3. Znajomość sił stabilizujących i destabilizujących strukturę białka.
4. Dokładna znajomość instrukcji.

Literatura:

P.W. Atkins - Chemia fizyczna

L. Stryer - Biochemia