

## STRESZCZENIE

Enzymy jako katalizatory większości procesów w organizmach żywych stanowią istotny cel wielu terapii, mają też duże znaczenie przemysłowe, dlatego powtarzalna i dokładna parametryzacja katalizy enzymatycznej jest bardzo istotna nie tylko w badaniach podstawowych, ale też wdrożeniowych. Najbardziej popularna w enzymologii metoda detekcji spektrofotometrycznej, mimo niskich kosztów i szybkości, często nie może być zastosowana bezpośrednio z uwagi na nieodpowiednie właściwości spektralne substratów i produktów. Konieczne jest wtedy korzystanie z pomocniczych enzymów, modyfikacji chemicznej substratów, bądź analizy poreakcyjnej, np. przy użyciu spektrometrii mas, co może zwiększać koszty pomiaru, wydłużać jego czas, bądź wpływać na dokładność oznaczeń. Izotermiczna kalorymetria miareczkowa jest metodą rozpowszechnioną głównie w celu charakterystyki oddziaływań między-molekularnych, jednakże jej użycie w kinetyce enzymatycznej zdobywa coraz większe uznanie z uwagi na bezpośredni pomiar prędkości reakcji przy użyciu uniwersalnego parametru jakim jest ciepło, brak konieczności stosowania sztucznych substratów lub przetwarzania poreakcyjnego, a także wysoką czułość i niskie zużycie reagentów. Niniejsza praca omawia dwie strategie przeprowadzania kinetycznego eksperymentu kalorymetrycznego, a także ich przykładowe zastosowania.

## WPROWADZENIE

Enzymy uczestniczą w większości procesów biologicznych. Chociaż istnieją RNA zdolne do katalizowania niektórych reakcji, katalizatorami większości reakcji biologicznych są białka. W przypadku braku katalizy enzymatycznej większość reakcji biochemicznych przebiegałaby na tyle wolno, że nie zaszłyby w łagodnych warunkach temperatury i ciśnienia, sprzyjających życiu. Komórki zawierają tysiące różnych enzymów, a ich aktywność określa, która z wielu możliwych reakcji chemicznych faktycznie zachodzi w komórce. Dlatego enzymy stanowią jeden z najważniejszych celów terapeutycznych. Znajdują one ponadto zastosowanie w przemyśle chemicznym, spożywczym, czy kosmetycznym. Z tej przyczyny powtarzalna i dokładna parametryzacja katalizy enzymatycznej jest niezwykle ważna. Pozwala ona bowiem nie tylko poznać dokładną rolę danego enzymu w organizmie i porównać procesy zachodzące w różnych organizmach, ale także daje szansę na wyłonienie obiecujących środków farmaceutycznych i jest niezbędna do zrozumienia ich działania. Ponadto, umożliwia kontrolę mutagenyzy w kierunku otrzymania wysokoaktywnych enzymów. Scharakteryzowanie funkcji enzymów ma również kluczowe znaczenie w poszukiwaniu energii odnawialnej (np. przekształceniu biomasy w paliwa płynne), w produkcji i przetwarzaniu żywności oraz w wielu innych procesach przemysłowych [1].

## PROBLEMY POPULARNYCH METOD BADANIA KINETYKI ENZYMATYCZNEJ

Aktywności enzymów rutynowo mierzone są za pomocą metod spektroskopowych poprzez pomiar zmiany absorpcji światła, która jest proporcjonalna do zużycia substratu lub tworzenia produktu. Takie oznaczenia należą do tanich, szybkich i prostych. Niestety, większość enzymów nie nadaje się do badania metodami kolorymetrycznymi z uwagi na fakt, że ich produkty i substraty nie wykazują odpowiedniej absorpcji w zakresie światła ultrafioletowego i widzialnego. Co więcej, spektroskopia jest metodą wysoce niespecyficzną. Wiele cząsteczek absorbuje światło o długości fali w zakresie 220–300 nm, istnieje więc ryzyko, że niespecyficzne składniki preparatu będą stanowiły sztuczny przyczynek do pomiaru absorbancji. Takim ryzykiem szczególnie obarczone są przesiewowe testy inhibitorów, których specyficzne właściwości mogą zaburzać odczyty spektrofotometryczne. Aby przezwyciężyć te ograniczenia często wykorzystuje się sprzężone reakcje enzymatyczne, w których produkt reakcji „bezbarwnej” stanowi substrat dla pomocniczego enzymu/enzymów katalizujących reakcję barwną, podlegającą spektroskopowej detekcji. Takie podejście niestety obarczone jest wieloma ograniczeniami; (i) niską dostępnością enzymów pomocni-

dr Joanna Śliwiak✉,

dr hab. Anna Urbanowicz

Pracownia Inżynierii Białek, Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań

[https://doi.org/10.18388/pb.2021\\_529](https://doi.org/10.18388/pb.2021_529)

✉ autor korespondujący: [sliwiak@man.poznan.pl](mailto:sliwiak@man.poznan.pl)

**Słowa kluczowe:** mikrokalorymetria, kinetyka enzymatyczna, izotermiczna kalorymetria miareczkowa, ITC

**Wykaz skrótów:** AKG – kwas  $\alpha$ -ketoglutarynowy; ALL – ostra białaczka limfoblastyczna (ang. *acute lymphoblastic leukemia*); ITC – izotermiczna kalorymetria miareczkowa (ang. *isothermal titration calorimetry*); ITC-MIM – metoda wielonastrzykowa (ang. *multiple injection method*); ITC-SIM – metoda jednonastrzykowa (ang. *single injection method*)

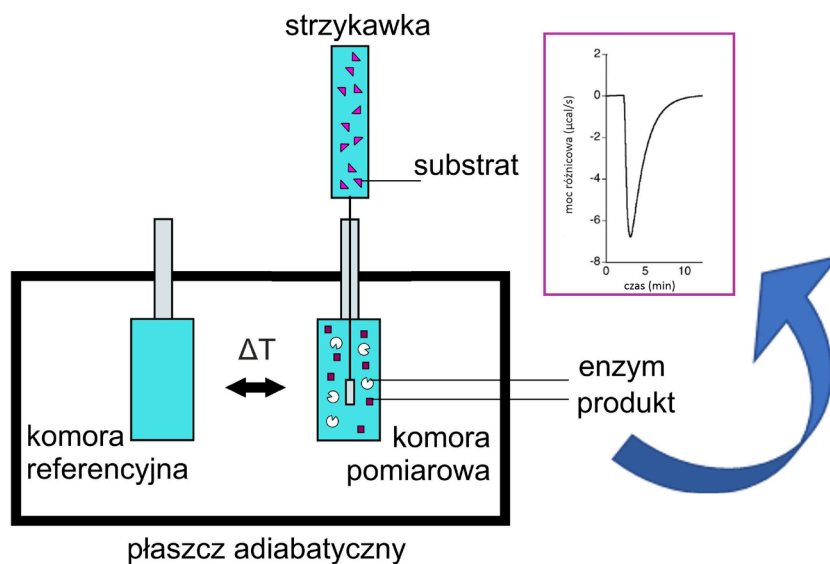
czych oraz ich wysokim kosztem, (ii) trudnością w optymalizacji wspólnych warunków reakcji wraz z jednoczesnym zadaniem o to by tylko badana reakcja była limitująca co do prędkości; (iii) możliwą inhibicją badanego enzymu poprzez pomocnicze substraty i produkty; a także (iv) zróżnicowaną stabilnością enzymów [2]. Innym wyjściem jest modyfikacja substratów celem nadania im własności chromo- bądź fluorogennych poprzez kowalencyjne połączenie ich np. z barwnikami, jednakże kataliza takich sztucznych substratów może skutkować zmienionymi wartościami parametrów kinetycznych (tj.  $K_M$  – stałej Michaelisa i  $k_{cat}$  – liczby obrotów) w porównaniu z naturalnymi substratami [3]. Ponadto, opracowano również testy enzymatyczne oparte na detekcji innych parametrów takich jak lepkość, sygnał elektrochemiczny (pH, tlen itp.), mętność (turbidymetria), czy radioaktywność. Jednakże metody te również mają wiele wad jak np. praca z promieniowaniem, niższa czułość, wysoki koszt odczynników, zapotrzebowanie na duże ilości enzymów oraz żmudna i długotrwała procedura. Często bezpośrednia detekcja produktu jest zupełnie niemożliwa i konieczne jest użycie poreaekcyjnych technik pomocniczych, takich jak chromatografia cieczowa, elektroforeza żelowa czy spektrometria mas, by ilościowo określić ubytek substratu bądź też przyrost produktu. Takie dodatkowe etapy wydłużają czas, zwiększają koszty a także niepewność samego pomiaru [4].

#### MIKROKALORYMETRIA JAKO BEZPOŚREDNIA METODA BADANIA REAKCJI

Izotermiczna kalorymetria miareczkowa (ang. *isothermal titration calorimetry*, ITC), która jest powszechnym narzędziem do badania oddziaływań pomiędzy cząsteczkami o zróżnicowanej naturze (tj. białka, kwasy nukleinowe, związki małowcząsteczkowe czy jony metali), w ostatniej dekadzie staje się coraz popularniejszym narzędziem do pomiaru kinetyki enzymatycznej. Zamiast śledzić zmiany stężenia substratów i produktów w miarę upływu czasu, kalorymetria jako metoda bezpośrednia wykrywa wydzielającą

się bądź absorbowaną podczas katalizy ciepło w czasie rzeczywistym. Ponieważ prawie wszystkie reakcje chemiczne uwalniają lub absorbują ciepło, kalorymetria może być stosowana niemal powszechnie. Co więcej, parametr ciepła jest możliwy do detekcji również w roztworach nieprzezroczystych, zawiesinach, a także układach wielofazowych, bez konieczności znakowania substancji chemicznych. Dostępne obecnie kalorymetry są wysoce czułe, zdolne do wykrycia zmiany ciepła już od 0,1  $\mu\text{cal/s}$  i wymagają stosunkowo małych objętości reakcji (280  $\mu\text{l}$ ). Taka cecha ogranicza koszt odczynników i enzymów, co jest szczególnie ważne gdy mamy do czynienia z drogimi i trudno dostępnymi substratami [5]. Kalorymetria pozwala na prowadzenie pomiarów bez ograniczeń ze względu na charakter chemiczny stosowanego buforu i reagentów. Przy użyciu dowolnego substratu (naturalnego lub sztucznego), oznaczanie kalorymetryczne parametrów kinetycznych ( $k_{cat}$  i  $K_M$ ) enzymu można zakończyć w ciągu 10 minut, podczas gdy typowe procedury spektrofotometryczne/fluorometryczne mogą zająć wiele godzin i obejmować precyzyjne przygotowanie kilku roztworów substratów. Ponadto, różne mechanizmy kinetyki enzymu, które obejmują hamowanie produktu i allosteryczną aktywację substratu, można również łatwo zbadać za pomocą ITC [6,7].

Przy pomocy kalorymetrii scharakteryzowano pracę enzymów opornych na tradycyjne analizy, takich jak np. hydrolazy, oksydaza szczawianowa, heparynaza czy systemy wymagające złożonej mieszaniny cząsteczek [8]. W odróżnieniu od badań oddziaływań międzycząsteczkowych, które wymagają dużych ilości materiału do detekcji entalpii, w testach enzymatycznych ciepło mierzone przez kalorymetr jest generowane przez reakcję chemiczną katalizowaną przez enzym, a nie przez wiązanie i równoczesne zmiany strukturalne, co ma wpływ na projektowanie eksperymentów. Po pierwsze, każdy enzym zazwyczaj wykonuje wiele obrotów w czasie trwania eksperymentu ITC, co skutecznie wzmacnia sygnał cieplny, a ilość enzymu wymaganego jest znacznie mniejsza (nawet na poziomie pikomolarnym)



**Rycina 1.** Schematyczne przedstawienie kalorymetru podczas badania reakcji enzymatycznej. Reakcja zachodząca podczas dozowania substratu do roztworu enzymu obecnego w komorze pomiarowej i wydzielane/pochłaniane przez nią ciepło, skutkuje zmianą mocy cieplnej uwalnianej przez kalorymetr, potrzebnej do utrzymania stałej różnicy temperatury między komorą pomiarową a komórką referencyjną.

niż w przypadku eksperymentów wiązania. Jednocześnie, w wyniku użycia minimalnej ilości materiału ciepło generowane przez wiązanie i dysocjację substratów, produktów i inhibitorów można bezpiecznie zignorować, ponieważ są one znacznie mniejsze od ciepła katalizy [9].

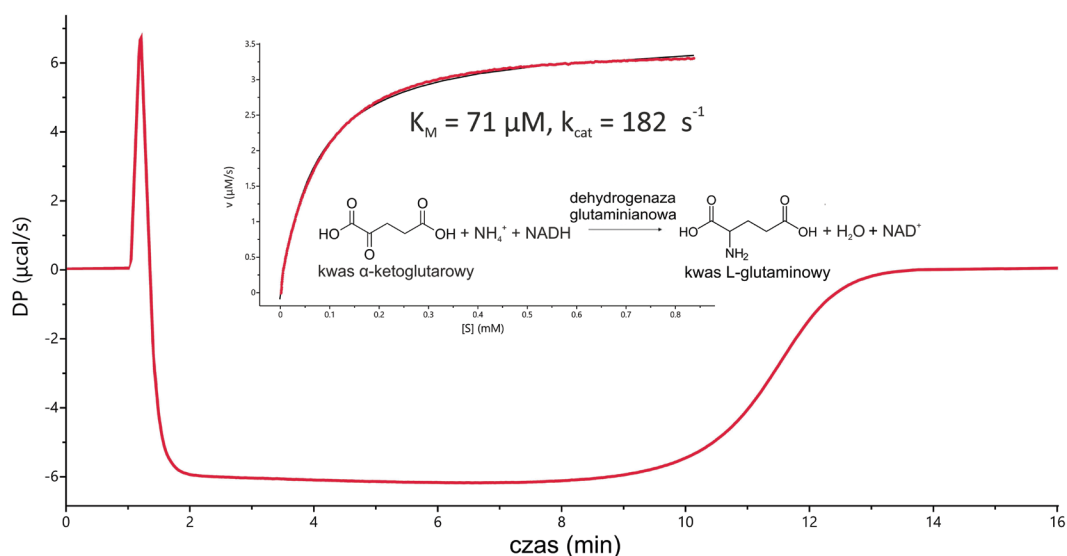
## PODSTAWY DZIAŁANIA KALORYMETRU

Kalorymetr składa się z osłony adiabaticznej, w której umieszczone są dwie komory w kształcie monet (Ryc. 1), do których dostęp zapewniają wąskie kanały. Komora pomiarowa wypełniona jest roztworem enzymu, podczas gdy komora referencyjna zazwyczaj zawiera wodę. W komorze pomiarowej znajduje się obrotowa strzykawka, której długa igła zakończona jest mieszadłem. Termostat mierzy różnicę temperatur między komorą pomiarową i referencyjną na zasadzie „sprzężenia zwrotnego” i utrzymuje tę różnicę na zerowym poziomie poprzez dodawanie lub odejmowanie ciepła. Podczas eksperymentu substrat jest wstrzykiwany do roztworu enzymu przy stałej, wybranej temperaturze. Gdy zachodzi reakcja enzymatyczna, ilość ciepła wydzielanego lub pochłanianego jest proporcjonalna do liczby cząsteczek substratu, które zostają przekształcone w cząsteczki produktu. Ponadto, szybkość przepływu ciepła jest bezpośrednio związana z szybkością reakcji. Zmierzone dane, pojawiające się jako odchylenie śladu ciepła od początkowej linii bazowej, reprezentują moc cieplną dostarczaną przez instrument do komory pomiarowej, która jest proporcjonalna do przepływu ciepła zachodzącego w komorze pomiarowej w czasie [6,10].

W charakterystyce kinetyki enzymatycznej za pomocą kalorymetru można przyjąć jedną z dwóch strategii pomiarowej, tj. metodę jednonastrzykową bądź wielonastrzykową. Decyzja, która strategia będzie dla naszego układu lepsza zależy od specyficzności substratowej i szybkości badanego enzymu, od tego czy jest on podatny na inhibicję produktem, a także od rozpuszczalności substratu i jego ciepła rozcieńczenia.

## METODA JEDNEGO NASTRZYKU (ITC-SIM)

W przypadku metody jednonastrzykowej SIM (ang. *single injection method*) ilość enzymu dobierana jest tak, by umożliwić całkowite przekształcenie substratu w produkt w czasie od kilku do kilkudziesięciu minut. Stężenie substratu użyte w eksperymencie powinno być na tyle duże, by w momencie nastrzyku enzym był początkowo wysycyony substratem ( $[S] \gg K_M$ , gdzie  $[S]$  oznacza stężenie substratu a  $K_M$  stałą Michaelisa). Reakcja przeprowadzana tą metodą może być rozpoczęta zarówno poprzez wstrzyknięcie substratu (w strzykawce) do enzymu (w komorze pomiarowej) lub odwrotnie, poprzez wstrzyknięcie enzymu do komory pomiarowej wypełnionej substratem. W obu przypadkach sygnał ITC wykazuje duże odchylenie natychmiast po wstrzyknięciu, a przepływy ciepła utrzymują się tak długo, jak długo enzym pozostaje nasycony substratem. W miarę ubytku substratu sygnał stopniowo powraca do poziomu stanu linii bazowej (Ryc. 2). Gdy substrat znajduje się w strzykawce, procedurę można powtórzyć kilka razy w ramach tego samego eksperymentu, gdy jednak w strzykawce znajduje się enzym można dokonać tylko jednego powtórzenia eksperymentu, ponieważ cały substrat obecny w komorze zostanie zużyty. Powyższy fakt ma znaczenie przy planowaniu eksperymentów z inhibitorami. Prędkość reakcji ( $v$ ) można odczytać bezpośrednio z przesunięcia sygnału ITC jako funkcji czasu, gdyż zmiana ciepła jest wprost proporcjonalna do szybkości reakcji. Ilość substratu w każdym punkcie czasowym jest obliczana dzięki częściowej integracji sygnału cieplnego, w ten sposób możemy uzyskać pełną krzywą zależności wartości  $v$  od  $[S]$  (krzywą Michaelisa-Menten) (Ryc. 2). W porównaniu do metody wielonastrzykowej MIM (ang. *multiple injection method*) omówionej w następnym rozdziale, metoda SIM jest szybsza i pozwala na wyznaczenie parametrów  $k_{cat}$  i  $K_M$  w jednym, czasem zaledwie kilkudziesięciosiekundowym eksperymencie, ma ona też jednak kilka ograniczeń. Po pierwsze, w tego typu eksperymencie w komorze pomiarowej kumulowana jest duża ilość produktu, co w przypadku występowania inhi-



Rycina 2. Charakterystyka kinetyczna jednej z izoform dehydrogenazy glutaminianowej GDH1 z *A. thaliana* określona metodą ITC-SIM. Nad surowymi danymi ITC umieszczono krzywą zależności stężenia NADH od prędkości reakcji z dopasowaniem równania Michaelis-Menten (na podst.15), pod krzywą kinetyczną umieszczono parametry kinetyczne  $K_M$  i  $k_{cat}$  obliczone z dopasowania, a także schemat obserwowanej reakcji, katalizowanej przez dehydrogenazę.

bicji produktem może być dużym utrudnieniem. Po drugie, w przypadku enzymów bardzo wolnych czy mniej specyficznych może dojść również do technicznych problemów, takich jak brak możliwości całkowitego przerobu substratu w racjonalnej skali czasowej, czy też zmiana właściwości buforu spowodowana dużym nagromadzeniem produktu, co może wywoływać dodatkowe efekty cieplne zaburzające przebieg krzywej katalitycznej [6, 8, 9, 11-13]. Przykładem pokazującym dużą czułość tej metody jest wykorzystanie ITC-SIM do ukazania różnic w parametrach kinetycznych między nieorganicznymi fosfatazami z różnych organizmów (*Arabidopsis thaliana* i *Medicago truncatula*), wpływu na te parametry obecności peptydu sygnałnego kierującego białko do chloroplastu, a także ukazania wpływu różnych mutacji punktowych na katalizę [14]. Przykładem wykorzystania ITC-SIM jako techniki uzupełniającej metodykę spektrofotometryczną jest charakterystyka kinetyki dehydrogenazy glutaminianowej z *A. thaliana*, enzymu katalizującego reakcję 3 substratową, w wyniku której jon amonowy, kwas  $\alpha$ -ketoglutarowy (AKG) i NADH przekształcane są w kwas glutaminowy i NAD<sup>+</sup> [15]. W tym przypadku monitorowano prędkość konsumpcji różnych stężeń AKG przy pomocy zmiany absorpcji ubywającego NADH (użytego w jednym stężeniu) w czasie, otrzymując parametry kinetyczne dla AKG. Jednakże wyznaczenie tych parametrów dla kofaktora NADH okazało się technicznie niemożliwe z uwagi na niemożność użycia wysycających stężeń NADH, które wykraczają poza detekcję spektrofotometru [2], a także zbyt słaby sygnał dla NADH w stężeniach poniżej  $K_M$ . Pomocna okazała się tu metoda ITC-SIM, która pozwoliła na wyznaczenie parametrów konsumpcji NADH wprowadzonego w jednym 10  $\mu$ L nastrzyku do komory pomiarowej (do finalnego stężenia 1mM) zawierającej 20nM enzym w obecności nielimitującego stężenia jonu amonowego i AKG (Ryc. 2).

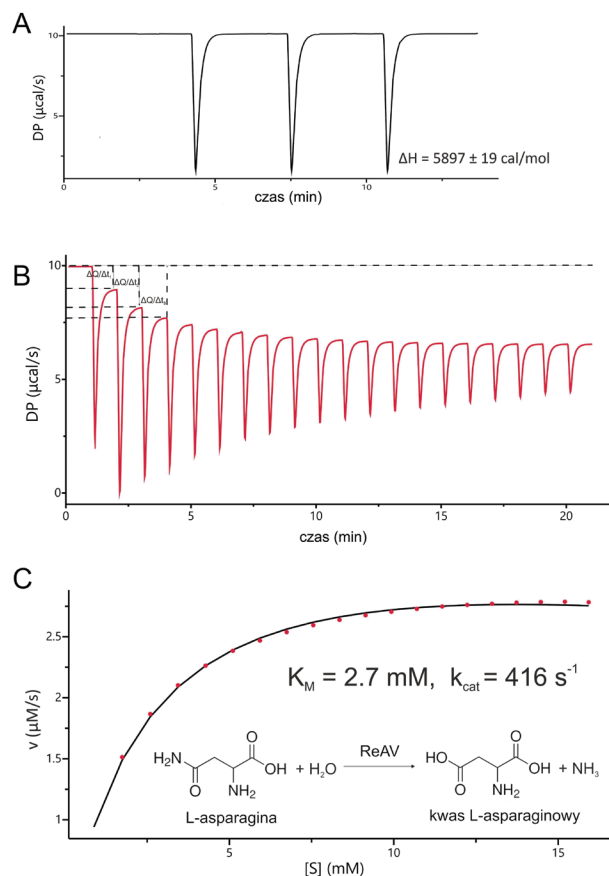
Strategia SIM umożliwia znaczne zmniejszenie zużycia substratu, co w przypadku drogich i trudnych do zdobycia związków, jak np. fosforan imidazolo-glicerolu, będący substratem dla enzymu katalizującego piąty etap roślinnego szlaku syntezy histydyny [5], czasem może stanowić jedyną osiągalną drogę do wyznaczenia parametrów kinetycznych badanego białka.

Metoda SIM może być użyta do wyznaczenia stałej inhibicji  $K_i$  w jednym, zaledwie godzinnym eksperymencie co w popularnych technikach jest czasochłonne i wymaga przygotowywania serii rozcieńczeń substratu i inhibitora. Di Trani i inni zaadaptowali ITC-SIM do wyznaczenia stałej inhibicji reakcji trypsyny dla benzamidyny wypełniając strzykawkę kombinacją inhibitora i substratu [8]. Następnie wykonano serię następujących po sobie eksperymentów SIM, w których inhibitor gromadził się w komorze pomiarowej wraz z każdym kolejnym wstrzyknięciem substratu. W rezultacie parametry kinetyczne uzyskane dla drugiego nastrzyku odpowiadają dwukrotnie większemu stężeniu inhibitora w porównaniu do pierwszego, a te dla trzeciego szczytu trzykrotnie większemu stężeniu inhibitora itd.

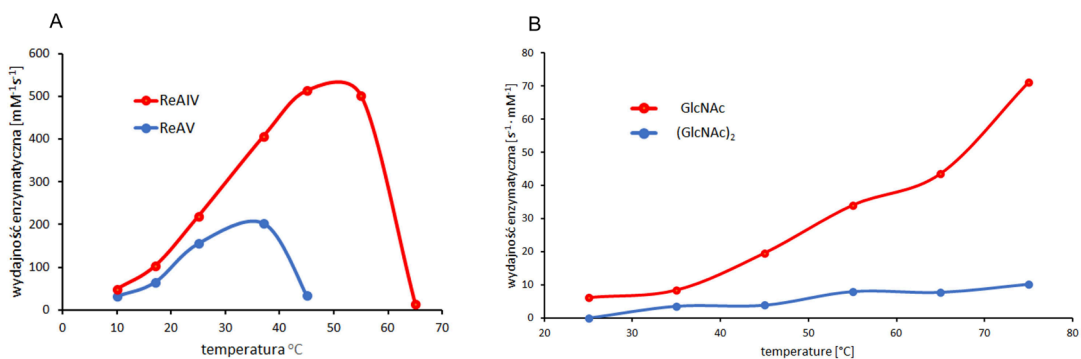
#### METODA WIELONASTRZYKOWA (ITC-MIM)

Strategia ta składa się z dwóch osobnych eksperymentów. W pierwszym należy wyznaczyć średnią całkowitą

molową entalpię reakcji poprzez wprowadzenie do komory pomiarowej wypełnionej enzymem kilku nastrzyków substratu, dobierając tak jego stężenie, a także stężenie enzymu i interwały między nastrzykami, by zapewnić całkowitą przemianę substratu w produkt. Po zintegrowaniu każdego z otrzymanych pików wartości entalpii uśrednia się (Ryc. 3A). Następnie określa się zmianę mocy różnicowej ( $dQ/dt$ ) wynikającą z przemiany substratu w produkt w tzw. eksperymencie przesunięcia prędkości cieplnej, w którym w komorze pomiarowej znajduje się roztwór enzymu w stężeniu na tyle niskim, by zużycie substratu w trakcie trwania eksperymentu było zaniedbywalne. Do takiej komory wstrzykiwany jest substrat w interwałach na tyle krótkich, by również zapewnić minimalne zużycie substratu. W ten sposób sygnał ITC między nastrzykami jest zbliżony do poziomego przypominając serię kroków (Ryc. 3B). Po każdym nastrzyku reakcja jest w stanie pseudo-pierwszorzędowym, a równoległy sygnał ITC oznacza liniową zależność prędkości reakcji od czasu (czyli prędkość początkową reakcji). Nastrzyki są zaprojektowane tak, że wczesne kroki mają  $[S] \ll K_M$ , a końcowe wstrzyknięcia wysycają enzym z  $[S] \gg K_M$ . Przesunięcie każdego kroku



**Rycina 3.** Eksperyment ITC-MIM na przykładzie asparaginazy ReAV (na podst. 18). **A.** Wyznaczenie średniej całkowitej entalpii molowej za pomocą trzech 2  $\mu$ L nastrzyków 10mM asparaginy do komory pomiarowej z 2  $\mu$ M białkiem. **B.** Surowe dane kinetyczne otrzymane poprzez miareczkowanie 10nM białka 100mM asparaginą za pomocą 1,8  $\mu$ L nastrzyków z przerwami 60 sekundowymi. **C.** Wartości  $\Delta Q/\Delta t$  zostały przeliczone na prędkości początkowe i umieszczone na wykresie zależności od stężenia substratu z dopasowaniem równania Michaelis-Menten; pod krzywą kinetyczną umieszczono parametry kinetyczne  $K_M$  i  $k_{cat}$  obliczone z dopasowania, a także schemat obserwowanej reakcji, katalizowanej przez asparaginazę ReAV.



Rycina 4. Wykres zależności wydajności enzymatycznej od temperatury wyznaczony za pomocą metody wielonastrzykowej ITC przeprowadzonej w różnych temperaturach dla izoform ReAIV i ReAV asparaginaz z *Rhizobium etli* [18] (A), a także dla termofilnej deacetylazy (B) [21].

względem początkowej linii bazowej jest wprost proporcjonalne do prędkości reakcji (Ryc. 3B), natomiast wyznaczone wcześniej całkowite molowe ciepło reakcji będzie służyło do przeliczenia prędkości cieplnej na prędkość reakcji. Stężenie substratu obecnego w komorze pomiarowej po każdej iniekcji jest znane na podstawie stężenia substratu w strzykawce i objętości wszystkich wstrzyknięć. Otrzymujemy w ten sposób wykres zależności prędkości początkowych od stężenia substratu (Ryc. 3C) [6,8,10,11,16]. Metoda ta znalazła zastosowanie m.in. w badaniu umiarkowanie specyficznych asparaginaz klasy 3 z *Rhizobium etli*, które wykazują właściwości czyniące je obiecującymi kandydatami do testów w kierunku leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej (ang. *acute lymphoblastic leukemia*, ALL). W leczeniu ALL do tej pory wykorzystuje się asparaginazę EcAII z *Escherichia coli* oraz ErAII z *Erwinia chrysanthemi*. W klinicznym użyciu tych preparatów pojawia się jednak problem z efektami ubocznymi związanymi z ich aktywnością glutaminazową [17]. Co ciekawe, metodą ITC-MIM wykazano brak takiej aktywności u asparaginaz rizobialnych [18]. Strategia ITC-MIM pozwoliła też na ocenę wpływu na aktywność asparaginazową ReAIV i ReAV szeregu czynników, takich jak mutagenesa punktowa, pH, jony cynku i innych metali przejściowych, temperatura czy stężenie soli [18-20]. ITC-MIM umożliwiło też charakterystykę kinetyki termofilnej deacetylazy [21].

#### WYKORZYSTANIE ITC DO OKREŚLENIA OPTIMUM TEMPERATUROWEGO AKTYWNOŚCI ENZYMU

Ponieważ mikrokalorymetry, takie jak iTC-200 czy PEAQ-ITC, wyposażone są w system termostatowania, pozwalający na wykonanie pomiaru w ściśle określonej temperaturze w zakresie od 2°C do 80°C, są one idealnym narzędziem do określania optimum temperaturowego pracy enzymów, co jest szczególnie przydatne w ustaleniu odpowiednich warunków oraz w wyborze wariantów dla celów medycznych i przemysłowych. Dobrym tego przykładem jest określenie optimum temperaturowego aktywności dwóch izoform asparaginaz z *Rhizobium etli* ReAIV i ReAV [18], które pokazuje, iż izoforma ReAIV ma szersze optimum aktywności w zakresie wyższych temperatur (37-55°C) od izoformy ReAV (Ryc. 4A) i tym samym jest bardziej odpowiednia do testów na liniach komórkowych i modelach zwierzęcych w kierunku wykorzystania jej jako leku przeciw ALL.

Przykładem na wykorzystanie górnych zakresów temperatur pracy kalorymetru jest porównanie wydajności enzymatycznej termofilnej deacetylazy pochodzącej z organizmu ekstremofilnego *Pyrococcus chitonophagus* względem dwóch różnych substratów (Ryc. 4B) [21], z którego wynika, że dopiero w wysokiej temperaturze jesteśmy w stanie wyłonić specyficzny dla tego enzymu substrat.

#### PODSUMOWANIE

Izotermiczna kalorymetria miareczkowa (ITC) staje się coraz bardziej uznawanym narzędziem do pomiaru kinetyki enzymów, posiadającym wyraźną przewagę nad tradycyjnymi technikami. ITC mierzy przepływ ciepła, cechę prawie wszystkich reakcji chemicznych i zapewnia natychmiastowy odczyt prędkości enzymu, eliminując potrzebę stosowania sztucznych substratów lub przetwarzania po reakcyjnego. W literaturze pojawia się coraz więcej opracowań pokazujących możliwość użycia kalorymetrii do wyznaczenia stałych inhibicji w pojedynczym eksperymencie. Wysoka czułość metody pozwala na śledzenie zmian parametrów kinetycznych, nawet tych subtelnych, wywołanych przez manipulację w sekwencji aminokwasowej, oraz zmiany warunków reakcji. Funkcja termostatowania reakcji w ściśle kontrolowanej temperaturze stwarza możliwość łatwego technicznie wyznaczenia optymalnej temperatury reakcji, a szeroki zakres termostatowanych temperatur pozwala również na badanie kinetyki enzymów z organizmów ekstremofilnych. Istotną zaletą jest również automatyzacja procesu, komputerowo kontrolowana strzykawka zapewnia wysoką powtarzalność oznaczeń i ogranicza błędy pipetowania występujące w metodach spektroskopowych.

#### PIŚMIENNICTWO

- Hansen LD, Transtrum MK, Quinn C, Demarse N (2016) Enzyme-catalyzed and binding reaction kinetics determined by titration calorimetry. *Biochim Biophys Acta* 1860(5): 957-66
- Bisswanger H. (2014) Enzyme assays. *Perspectives in science* 1(1-6): 41-55
- Manafi M, Kneifel W, Bascomb S (1991) Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Microbiol Rev* 55(3): 335-48
- Eisenthal R, Danson, MJ (2002) Enzyme assays: A practical approach. Oxford University Press
- Witek W, Sliwiak J, Rawski M, Ruszkowski M (2024) Targeting imidazole-glycerol phosphate dehydratase in plants: novel approach for

- structural and functional studies, and inhibitor blueprinting. *Front Plant Sci* 15: 1343980
6. Wang Y, Wang G, Moitessier N, Mittermaier AK (2020) Enzyme Kinetics by Isothermal Titration Calorimetry: Allosteric, Inhibition, and Dynamics. *Front Mol Biosci* 7: 583826
  7. Siddiqui KS, Poljak A, Ertan H, Bridge W (2022) The use of isothermal titration calorimetry for the assay of enzyme activity: Application in higher education practical classes. *Biochem Mol Biol Educ* 50(5): 519-26
  8. Di Trani JM, Moitessier N, Mittermaier AK (2018) Complete Kinetic Characterization of Enzyme Inhibition in a Single Isothermal Titration Calorimetric Experiment. *Anal Chem* 90(14): 8430-35
  9. Falconer RJ, Schuur B, Mittermaier AK (2021) Applications of isothermal titration calorimetry in pure and applied research from 2016 to 2020. *J Mol Recognit* 34(10): e2901
  10. Mazzei L, Ciarli S, Zambelli B (2016) Isothermal Titration Calorimetry to Characterize Enzymatic Reactions. *Method Enzymol* 567: 215-36
  11. Todd MJ, Gomez J (2001) Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity? *Anal Biochem* 296(2): 179-87
  12. Transtrum MK, Hansen LD, Quinn C (2015) Enzyme kinetics determined by single-injection isothermal titration calorimetry. *Methods* 76: 94-200
  13. Quinn CF, Hansen LD (2019) Enzyme Kinetics Determined by Single-Injection Isothermal Titration Calorimetry. *Methods Mol Biol* 1964: 241-49
  14. Grzechowiak M, Ruszkowski M, Sliwiak J, Szpotkowski K, Sikorski M, Jaskolski M (2019) Crystal structures of plant inorganic pyrophosphatase, an enzyme with a moonlighting autoproteolytic activity. *Biochem J* 476(16): 2297-19
  15. Grzechowiak M, Sliwiak J, Jaskolski M, Ruszkowski M (2023) Structural and functional studies of *Arabidopsis thaliana* glutamate dehydrogenase isoform 2 demonstrate enzyme dynamics and identify its calcium binding site. *J Plant Physiol Biochem* 201, 107895
  16. Mazzei L, Ciarli S, Zambelli B (2014) Hot Biological Catalysis: Isothermal Titration Calorimetry to Characterize Enzymatic Reactions. *Jove-Vis Exp* (86): e51487
  17. Radadiya A, Zhu W, Coricello A, Alcaro S, Richards NGJ (2020) Improving the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Biochemistry* 59(35): 3193-3200
  18. Sliwiak J, Worsztynowicz P, Pokrywka K, Loch JL, Grzechowiak M, Jaskolski M (2024) Biochemical characterization of L-asparaginase isoforms from *Rhizobium etli*-the boosting effect of zinc. *Front Chem* 12: 1373312
  19. Loch JL, Imiolczyk B, Sliwiak J, Wantuch A, Bejger M, Gilski M, Jaskolski M (2021) Crystal structures of the elusive *Rhizobium etli* L-asparaginase reveal a peculiar active site. *Nat Commun* 12(1): 6717
  20. Loch JL, Worsztynowicz P, Sliwiak J, Grzechowiak M, Imiolczyk B, Pokrywka K, Chwastyk M, Gilski M, Jaskolski M (2023) *Rhizobium etli* has two L-asparaginases with low sequence identity but similar structure and catalytic center. *Acta Crystallogr D* 79: 775-91
  21. Biniak-Antosiak K, Bejger M, Sliwiak J, Baranowski D, Mohammed ASA, Svergun DI, Rypniewski W (2022) Structural, Thermodynamic and Enzymatic Characterization of N,N-Diacetylchitobiose Deacetylase from *Pyrococcus chitonophagus*. *Int J Mol Sci* 23(24): 15736

# Microcalorimetry as a tool in enzymatic kinetics research

Joanna Śliwiak✉, Anna Urbanowicz

Laboratory of Protein Engineering, Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland

✉corresponding author: sliwiak@man.poznan.pl

**Keywords:** microcalorimetry, enzyme kinetics, isothermal titration calorimetry, ITC

## SUMMARY

Enzymes, as biocatalysts, are an important target of many therapies and are also of great industrial importance, which is why repeatable and accurate parameterization of enzymatic catalysis is very important. The most popular spectrophotometric detection method in enzymology, despite its low cost and speed, often cannot be used directly due to the inappropriate spectral properties of substrates and products. It is then necessary to use auxiliary enzymes, chemical modification of substrates or post-reaction analysis, which may increase the cost of measurement, extend its time or affect the accuracy. Isothermal titration calorimetry is a method widely used mainly for the characterization of inter-molecular interactions, however, its use in enzyme kinetics is gaining more and more recognition due to the direct measurement of the reaction rate using the universal parameter of heat, high sensitivity and low reagent consumption. This work discusses two strategies for conducting a kinetic calorimetric experiment and their applications.

