C5855

KALORIMETRIE
ITC & DSC

Jan Novotný
2019

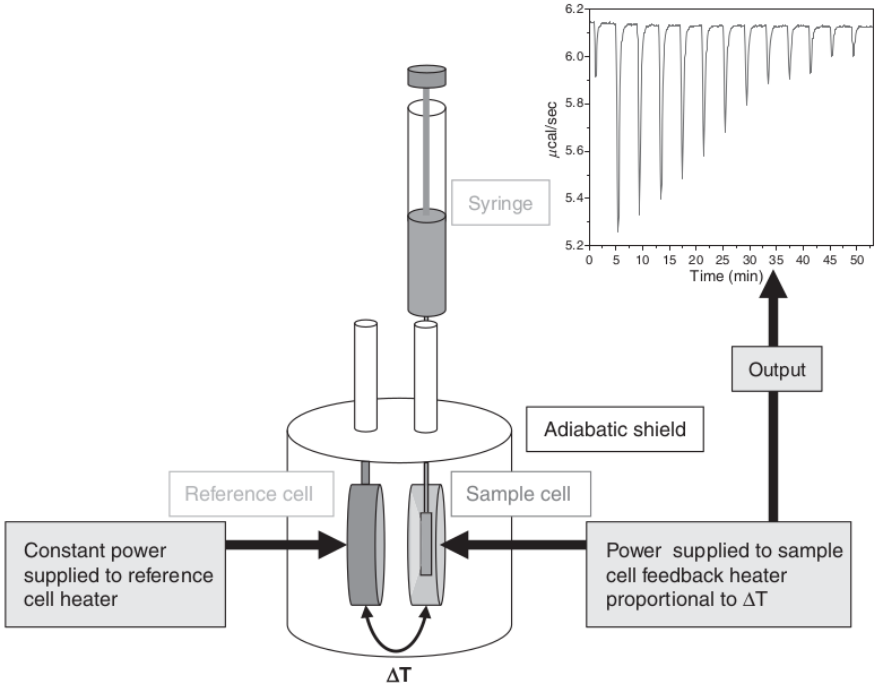
Zdroje

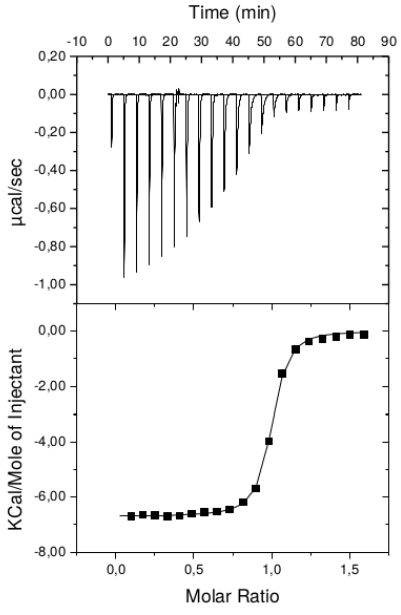
- **Matthew W. Freyer and Edwin A. Lewis**: Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions
- **Jerome M. Fox, Mengxia Zhao, Michael J. Fink, Kyungtae Kang, and George M. Whitesides**: The Molecular Origin of Enthalpy/Entropy Compensation in Biomolecular Recognition
- **Jose C. Martinez, Javier Murciano-Calles, Eva S. Cobos, Manuel Iglesias-Bexiga, Irene Luque and Javier Ruiz-Sanz**: Isothermal Titration Calorimetry: Thermodynamic Analysis of the Binding Thermograms of Molecular Recognition Events by Using Equilibrium Models

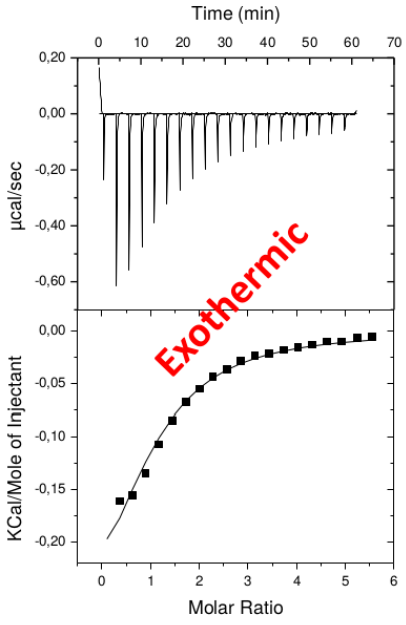
Na úvod ...

- Jak se změní rovnovážná konstanta, pokud ΔG vzroste o 1 kcal/mol?
- Vyjádřete K_A komplexace $M+L \rightarrow ML$ pomocí veličin [L] a $\nu=L_b/M_t$.
- Jaký je vztah mezi enthalpií a specifickým teplem fázového přechodu?
- Nakreslete vazebnou isothermu a popište její parametry.
- Vysvětelete pojem kooperativita v kontextu interakce ligand-receptor.

ITC - Kalorimetrická křivka

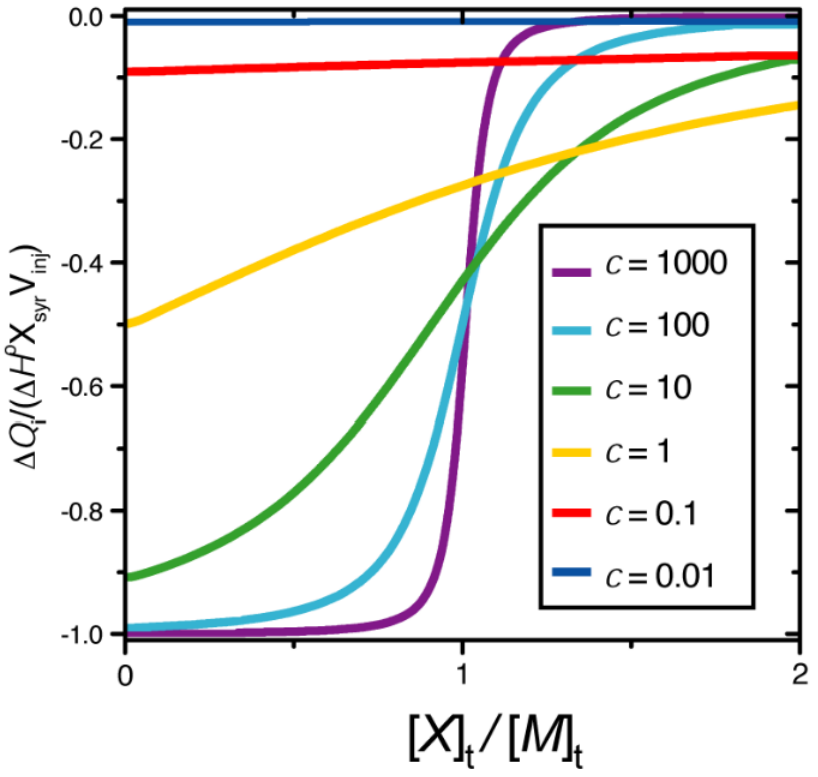






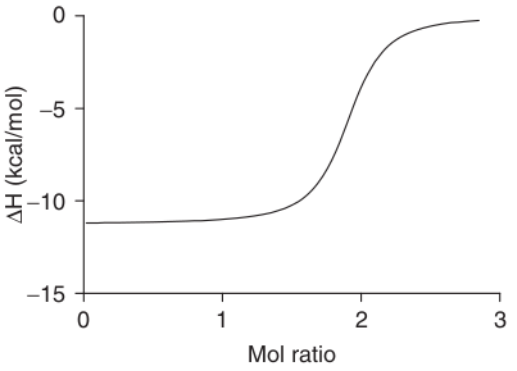
ITC – optimalizace experimentu

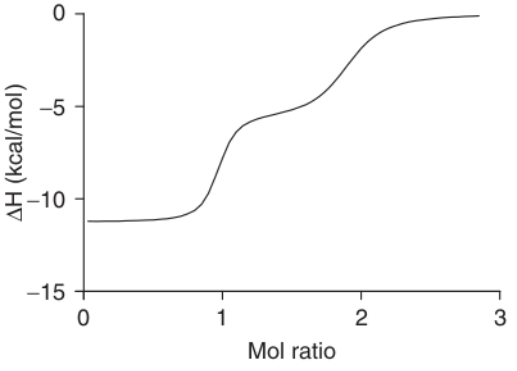
Vysvětlete účel kalorimetrické konstanty $c=n.K_A.[M]_t$

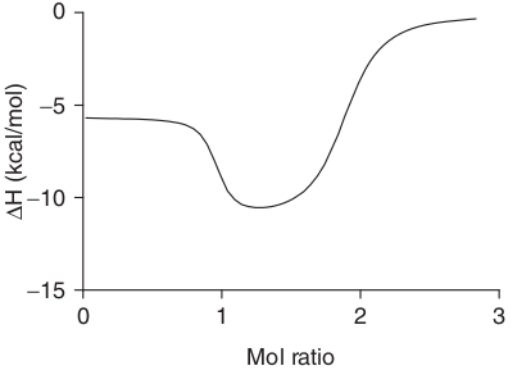


ITC – vazebná místa

Vyhodnoťte povahu vazebných míst pro uvedené ITC křivky, srovnejte K_A a ΔH.

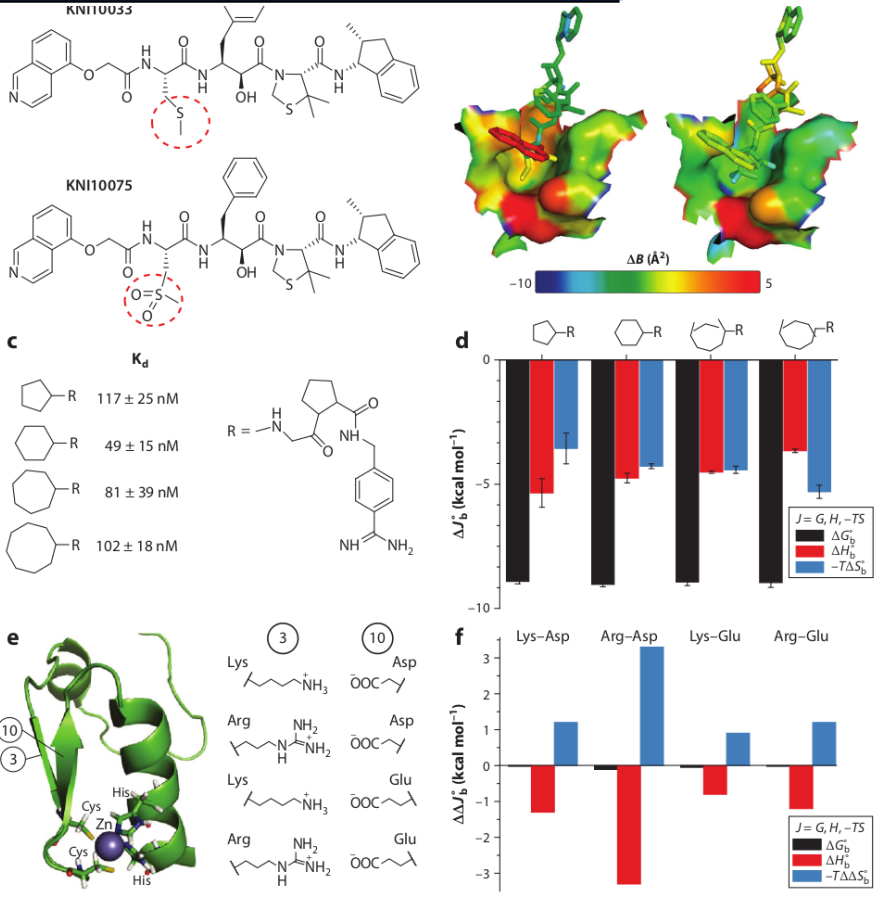




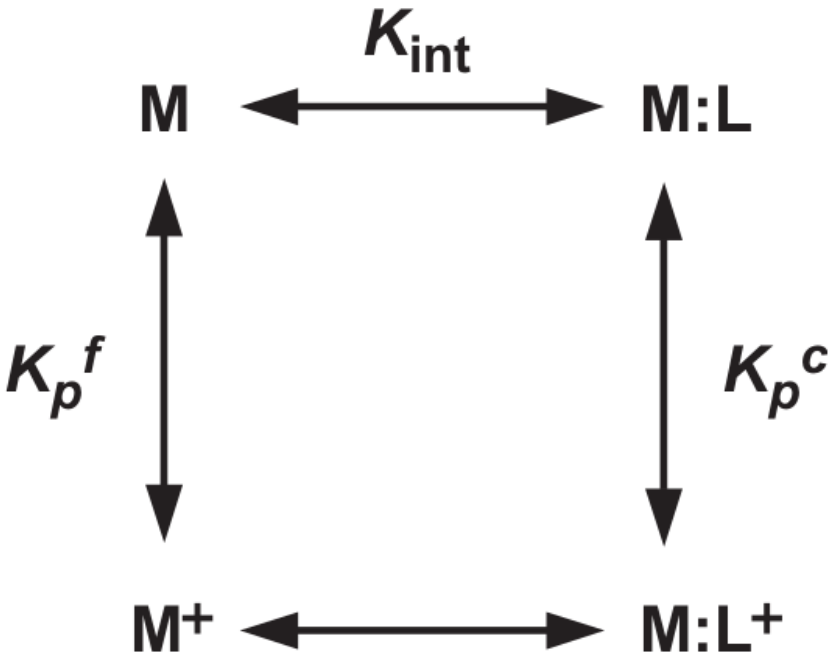


Hnací síly interakce ΔG=ΔH-TΔS

Vysvětlete, proč je zvýšený entalpický příspěvek často kompenzován poklesem entropického členu.



Vliv pH na K_A



Ověřte platnost uvedeného vztahu popisujícího vliv protonace makromolekuly(M) na afinitu interakce s ligandem. Jaký je význam K_{obs}?

$$K_{obs} = K_{int} \frac{1 + K_P^c 10^{-pH}}{1 + K_P^f 10^{-pH}}$$

Kompetiční titrace

Odvoďte vztah mezi vlastní asociační konstantou K_2 a jejím analogem K_2^{obs} v přítomnosti slabého kompetitoru A o afinitě K_1.

Nápověda:
$K_2^{obs}=[MB]/(([M]+[MX])[B])$

Displacement Experiments

As an alternative approach for measuring tight binding constants, a displacement experiment can be carried out. The protein of interest is presaturated with a more weakly binding ligand whose binding parameter can be determined directly, and this ligand is displaced by injecting a ligand that binds more strongly. The first ligand will compete with the second and thus reduce the apparent binding constant (43–46).

A first experiment yields the thermodynamic parameters for the first ligand A $(\Delta H_1, K_1)$, the second titration gives apparent values for the second ligand B $(\Delta H_2^{obs}, K_2^{obs})$. The observed association constant for binding of B (K_2^{obs}) in the presence of A is given by:

$$K_2^{obs} = \frac{K_2}{1 + K_1[A]} \qquad (34)$$

DSC

Vysvětlete dle zjednodušeného schématu rozdíl mezi C_p nativního a denaturovaného proteinu.