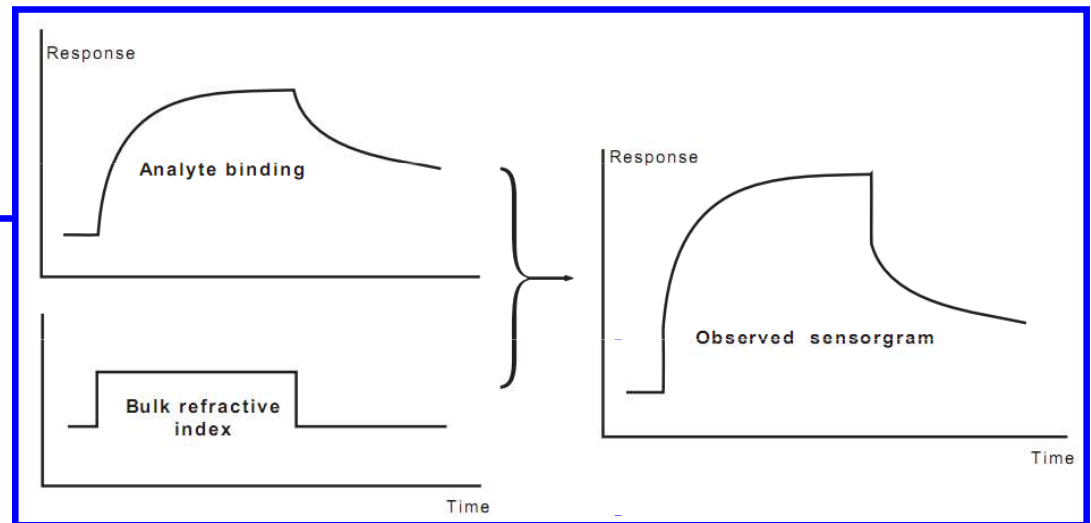
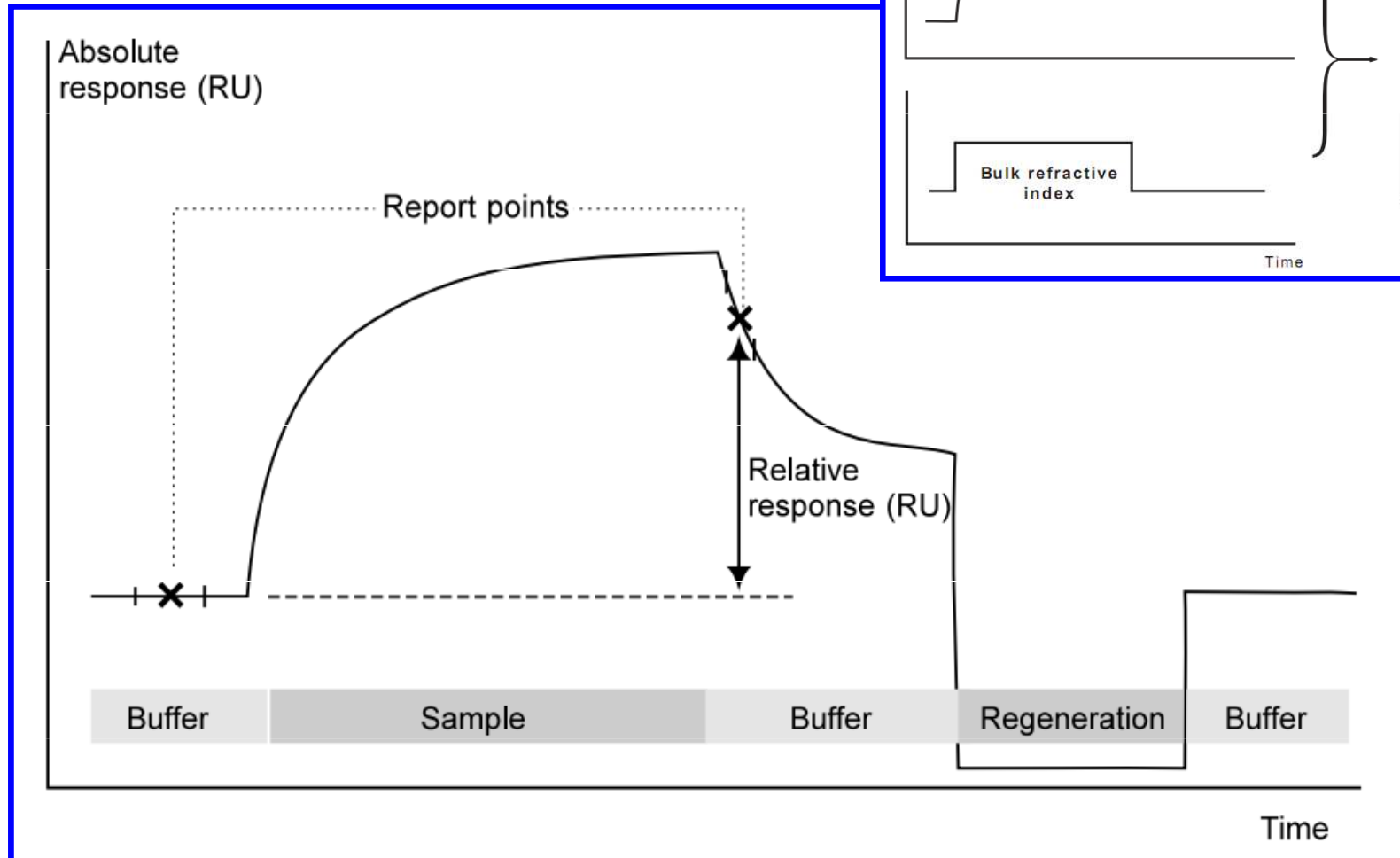


# Sensorgram

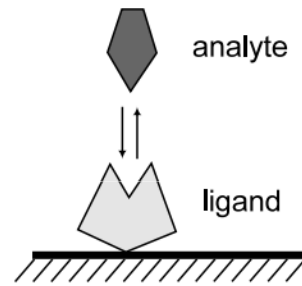


- průběh typického vazebného experimentu
- signál v čase při vazbě biomolekuly na imobilizovaný ligand
- tvořen specifickou interakcí a změnou indexu lomu protékajícího roztoku

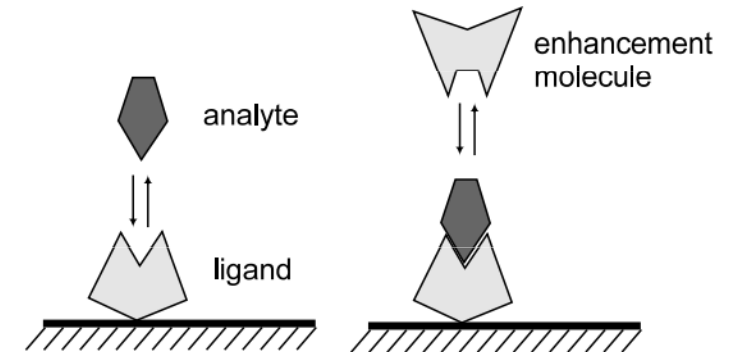


# Stanovení koncentrace

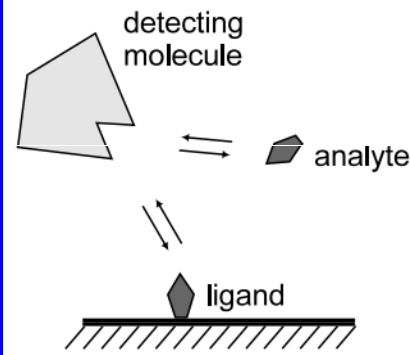
- základní možnosti:
- **přímé měření (se zesílením odezvy)**
- **inhibiční měření (kompetice v roztoku)**
- **kompetice na povrchu sensoru**



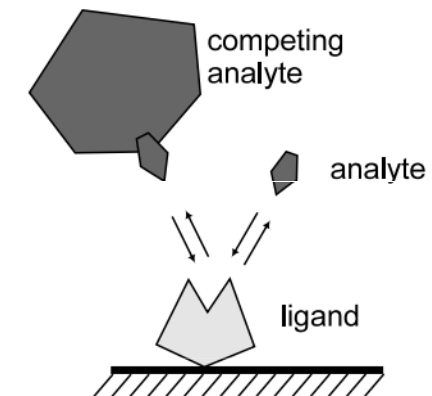
Direct binding assay



Direct binding assay with enhancement



Inhibition assay (solution competition)

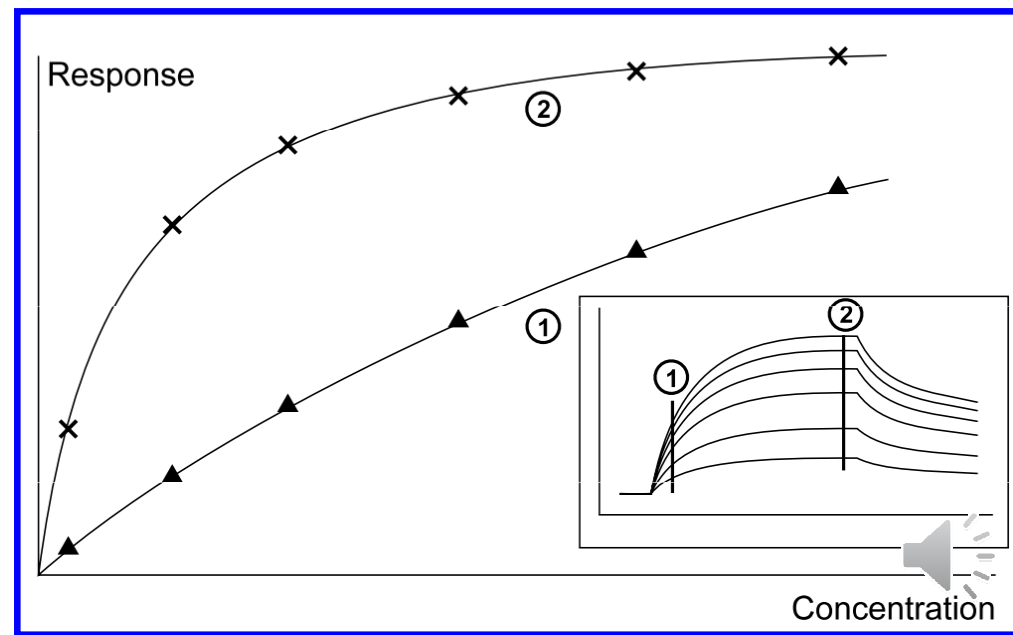
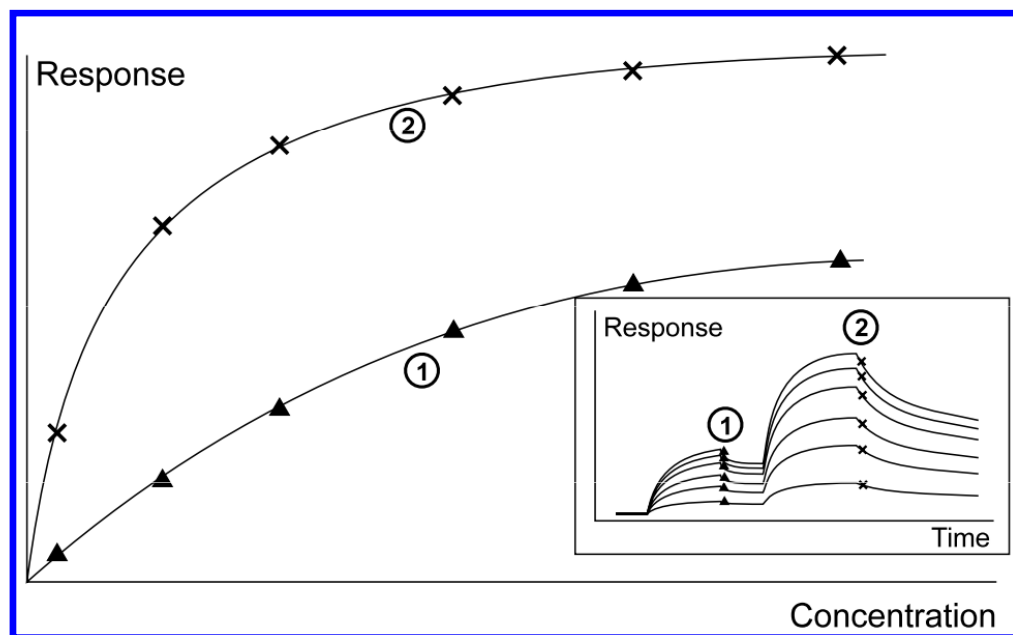
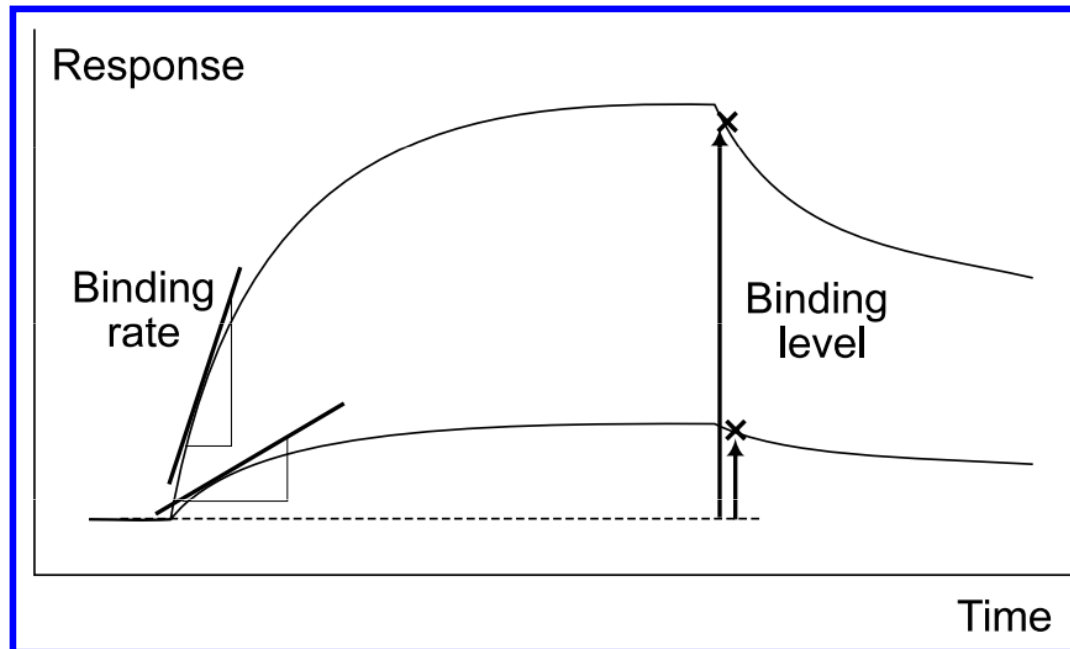


Surface competition assay



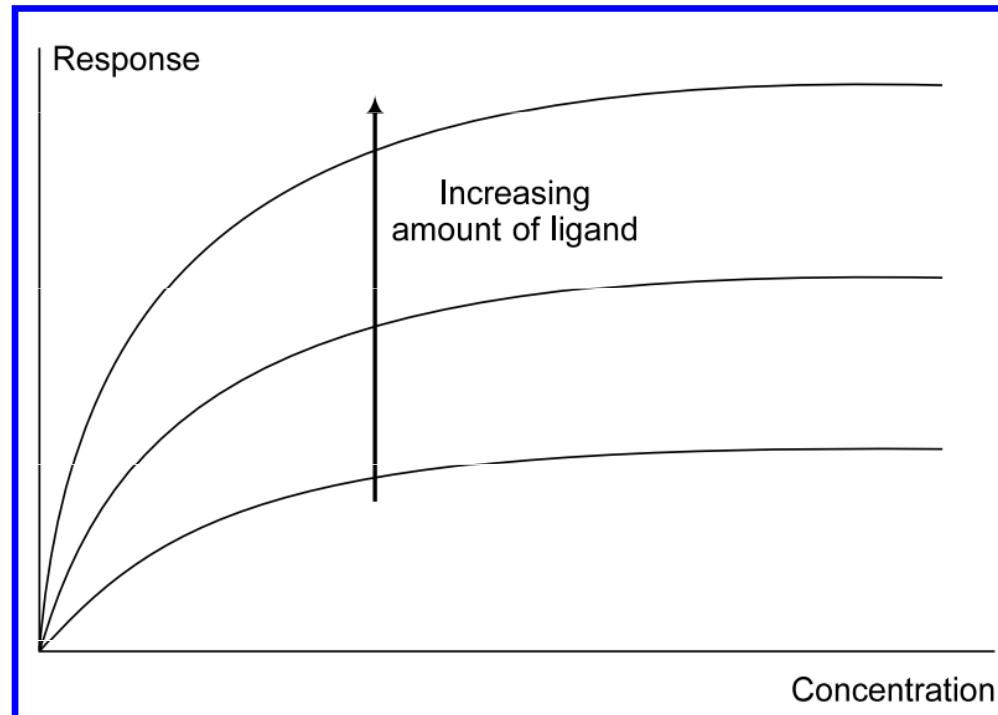
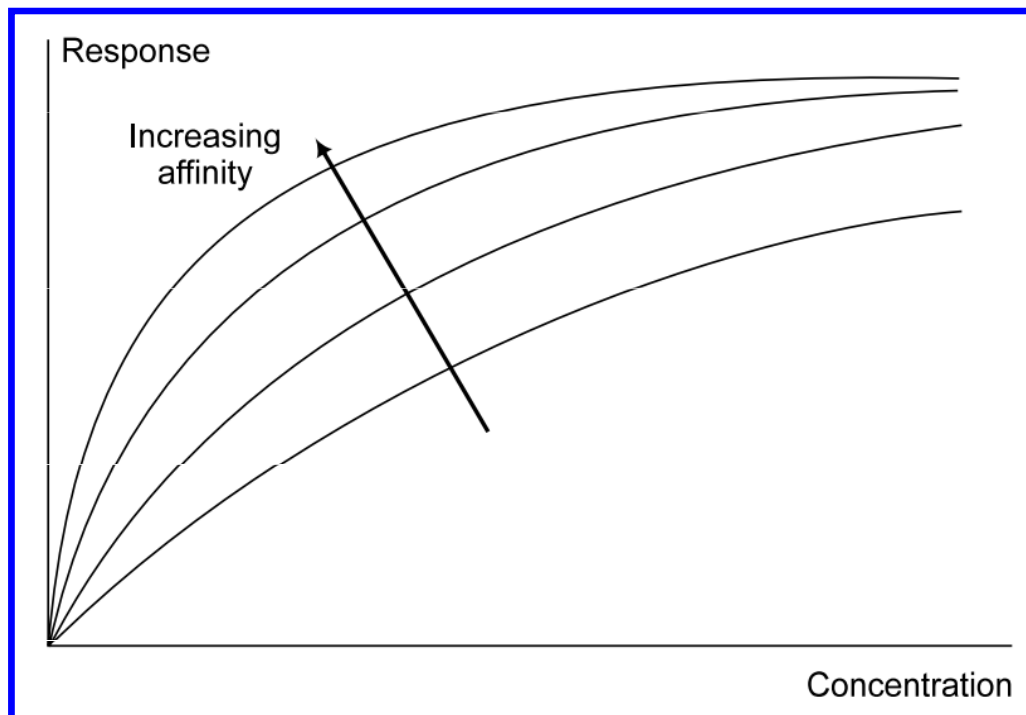
# Přímé měření

- nejčastější způsob stanovení koncentrace analytu ve vzorku
- vyhodnocovat lze buď rychlost vazby v počátku, nebo změnu signálu po ustálení
- zvolený způsob měření ovlivní analytické parametry stanovení
- rychlost, citlivost, limit detekce
- vícevrstevný (sendvičový) komplex zlepšit citlivost (např. nanočástice)



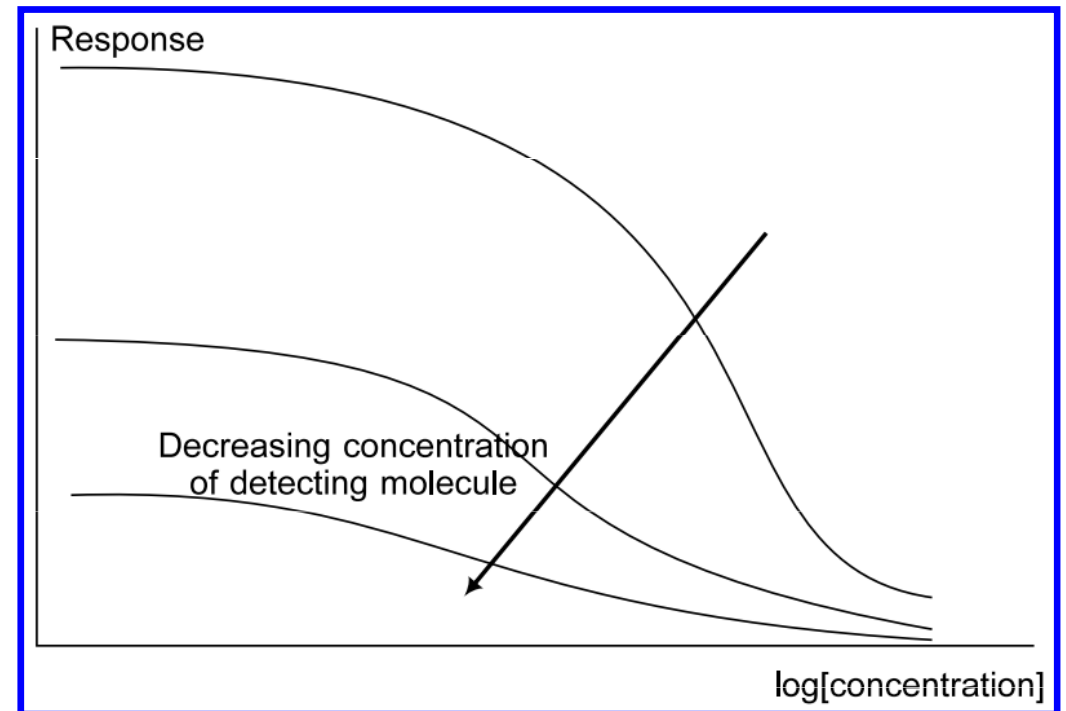
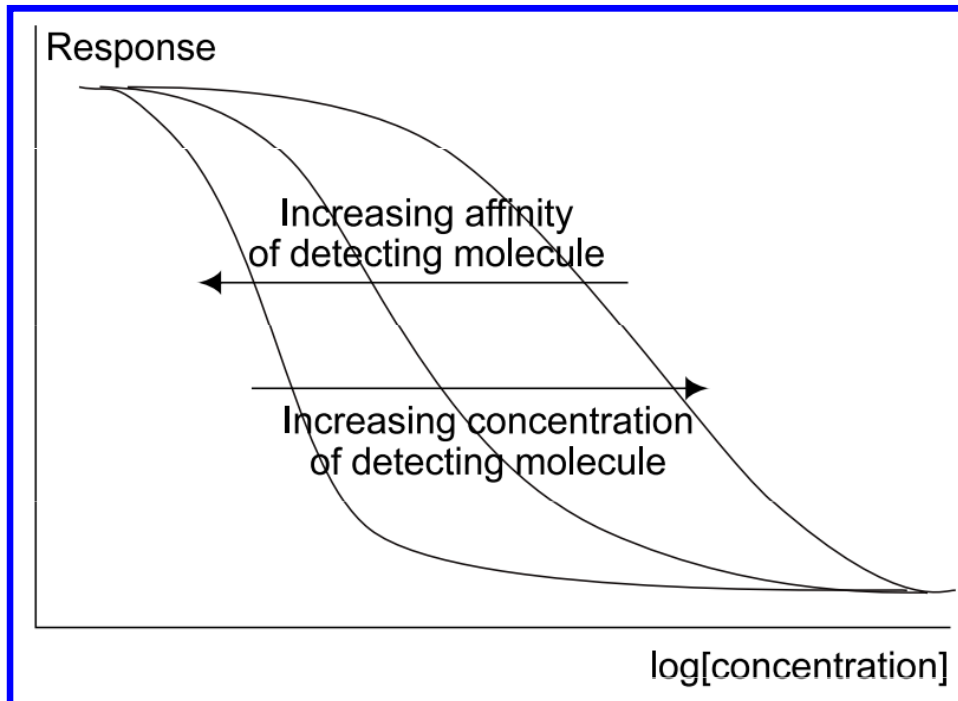
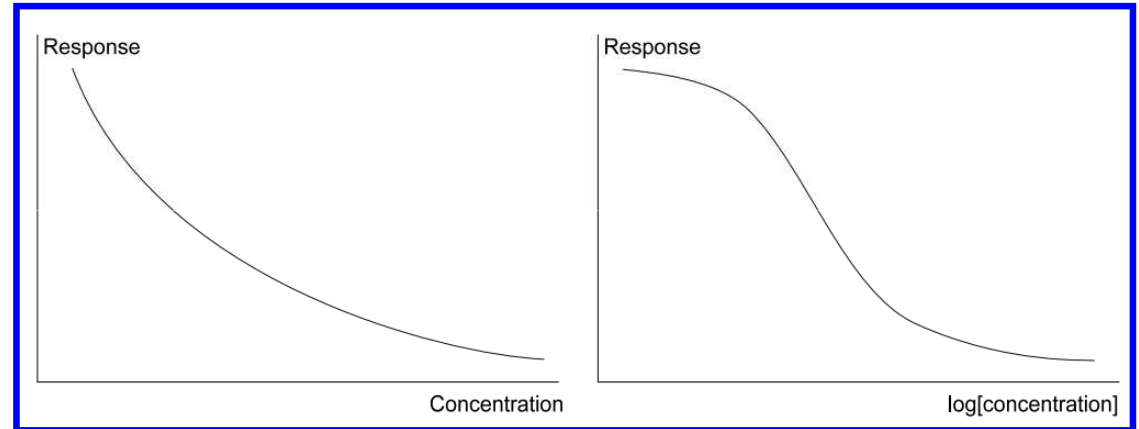
# Vliv afinity a ligandu

- vyšší afinita umožní měřit nižší koncentrace analytu



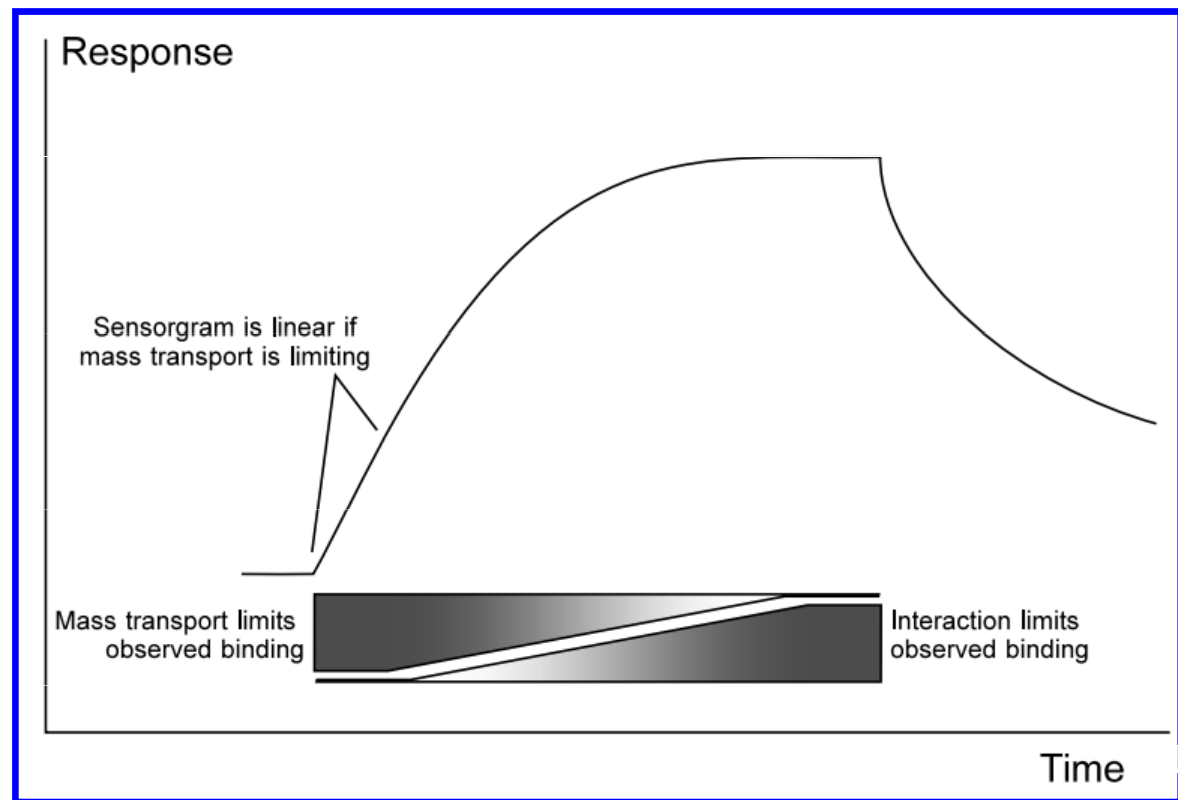
# Inhibiční (kompetiční) stanovení

- pro malé molekuly, jejichž přímá vazba by poskytla nízký signál
- kalibrační závislosti v log závislosti pro osu x
- signál vyvolá vazba pomocné detekční molekuly; její afinita a koncentrace ovlivní výrazně průběh stanovení



# Přímé měření (bez kalibrace)

- pokud není k dispozici standard, lze za podmínek difúzní limitace určit koncentraci analytu z rychlosti vazby (lineární oblast) se znalostí (přibližnou) difúzního koeficientu analytu
- je potřeba vysoká hustota ligandu, dostatečná velikost analytu (přes 5 kDa) a přiměřená afinita interakce
- optimální je odezva 0.3–15 RU/s při 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  aspoň 30 s, to odpovídá asi 0.05–5  $\mu\text{g}/\text{ml}$



# Afinitní interakce

- vznik afinitního komplexu na základě specifické interakce dvou biomolekul s komplementárními vazebnými doménami je základem všech procesů v živých systémech
- experimentální studium interakcí mezi biomolekulami pomáhá objasnit vzájemné vztahy v biologických systémech
- mimo klasické procesy studia afinitních interakcí jsou nyní v biochemii a biologii stále častěji využívány moderní metodiky na bázi biosensorů
- přínosem biosensorů je rychlost, pohodlnost a možnost přímého sledování interakce v reálném čase bez nutnosti značení



# Typy afinitních interakcí

**molekulární reakce mezi partnery:**

**antigen**

**hormon**

**léčiva**

**enzym**

**receptor**

**nukleová kyselina**

**nukleová kyselina**

**protilátka**

**receptor**

**receptor**

**kofaktor / substrát / inhibitor**

**mikroorganismus / buňka**

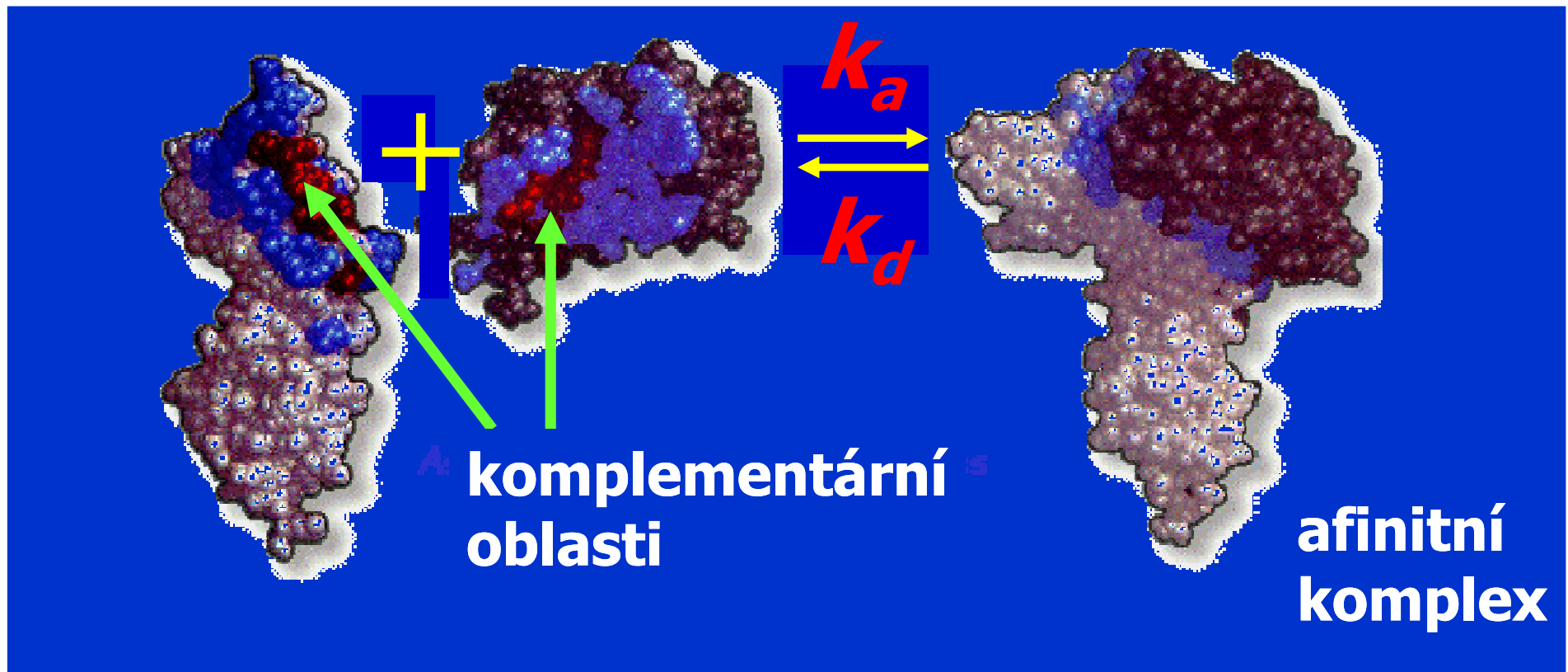
**vazebná bílkovina**

**komplementární řetězec**





# Afinitní interakce



## Kinetické konstanty:

$k_a$  ... asociační rychlostní konstanta

$k_d$  ... disociační rychlostní konstanta

$K_A = k_a/k_d$  asociační rovnovážná konstanta

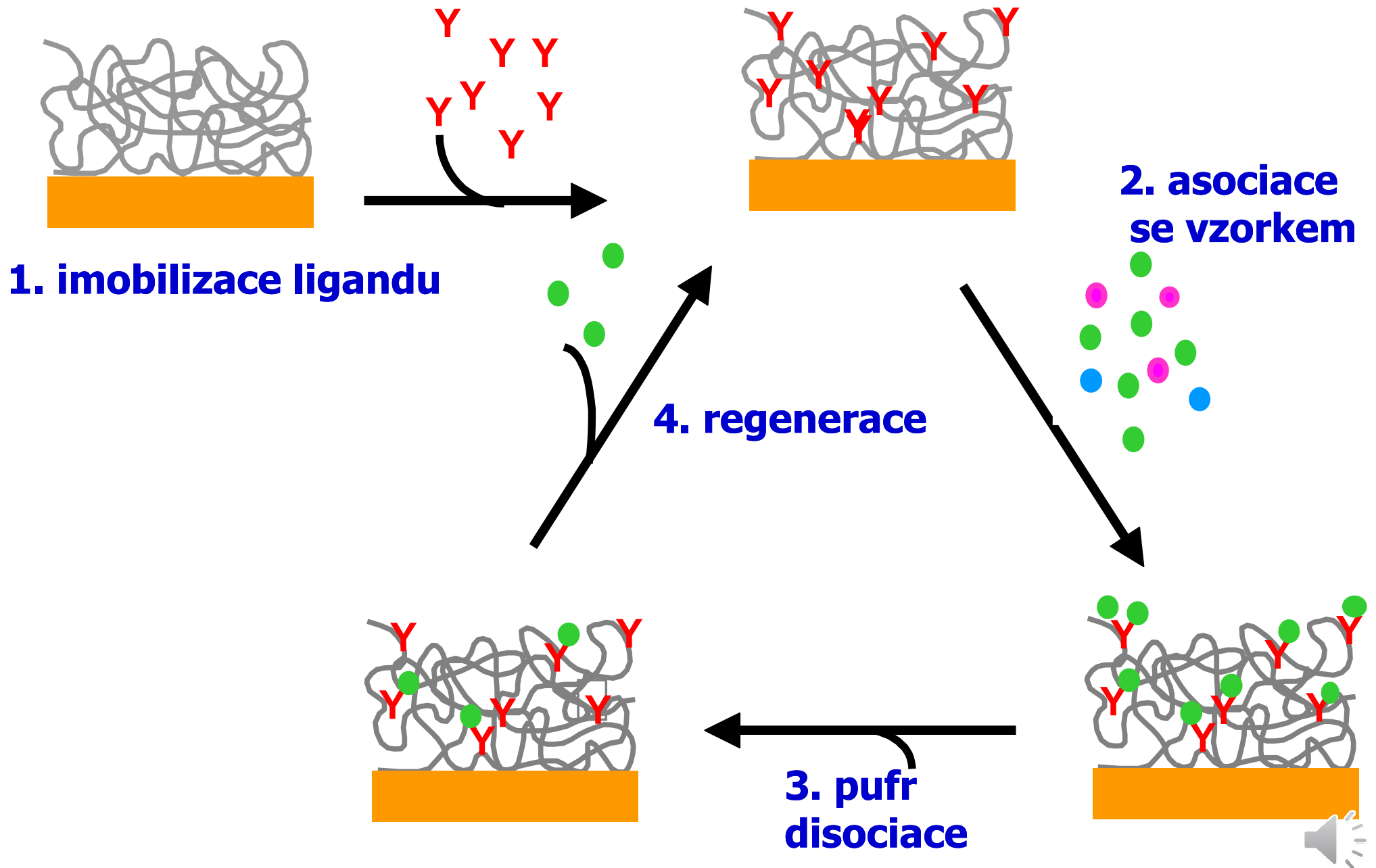


# Rozdělení afinitních sensorů

- vždy je jeden z afinitních partnerů imobilizován na povrchu převodníku; podle generování signálu se pak rozlišují:
- přímé afinitní biosensory
  - vznik biokomplexu je možné sledovat přímo v průběhu afinitní interakce (v reálném čase)
  - jako převodníky slouží speciální optické světlovodné systémy, piezosensory nebo impedimetrická zařízení
- nepřímé afinitní biosensory
  - jeden z afinitních partnerů je vhodně označen, na konci interakce se pak stanoví množství značky navázané na povrchu sensoru
  - podle typu značky (enzym nebo fluorofor) se použije převodník vhodný pro měření enzymové aktivity nebo fluorescence

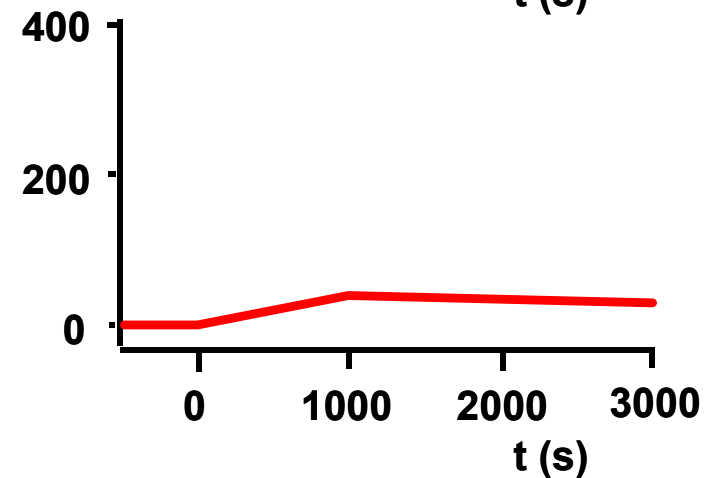
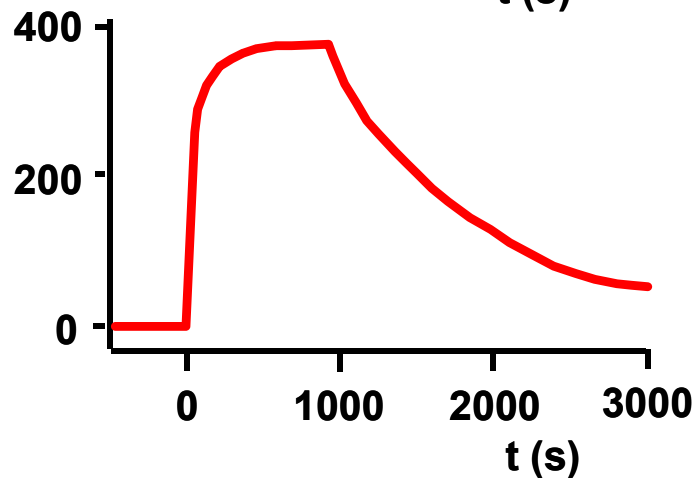
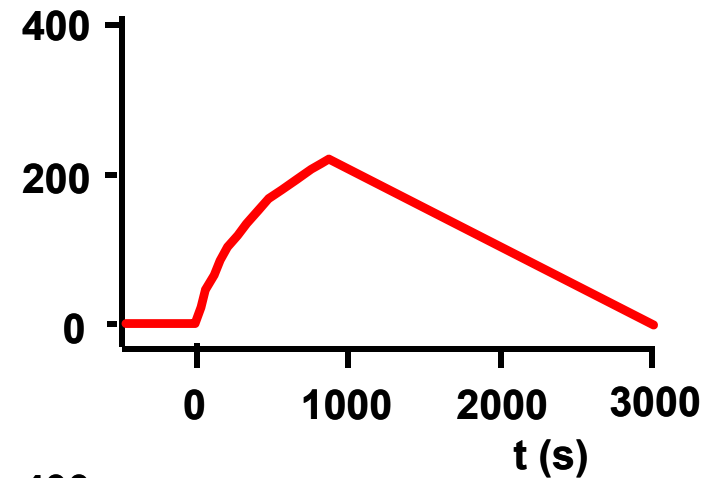
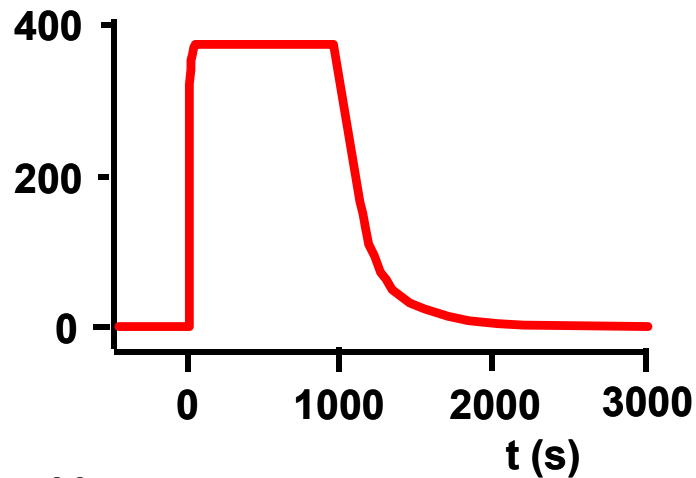


# Schéma měření s biosensorem



# Charakterizace afinitních reakcí

proč měřit rychlostní kinetické konstanty?



všechny tyto interakce mají stejnou rovnovážnou konstantu, liší se rychlostními konstantami



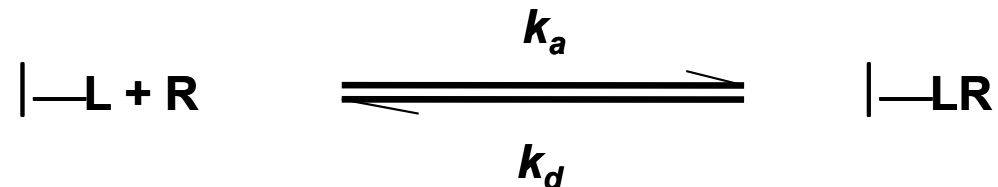
# Kinetická analýza

- kvantitativní charakterizace afinitních interakcí má základní význam pro řadu oblastí biochemie, biotechnologie i biologie
- klasické metody pro měření afinity jsou obvykle založeny na smísení interagujících partnerů, dosažení rovnovážného stavu, separaci volných a vázaných molekul a kvantifikaci jednoho z partnerů
- užívají se vhodné detekční **značky** - radioaktivita, fluorescence, enzymy
- nezískají se kompletní kinetická data a navíc může dojít ke změnám nativní molekuly
- nejvíce informací lze vždy získat při **průběžném** sledování vazebného děje pomocí biosensorů
- jedna z interagujících látek – ligand - je navázána na povrchu citlivé oblasti vhodného fyzikálního sensoru
- při specifické vazbě druhé látky se změní fyzikální charakteristiky citlivého povrchu, na které sensor reaguje změnou signálu
- vazebnou interakci tak lze sledovat v **reálném čase** a **přímo** bez nutnosti používat značení.



# Uspořádání experimentu

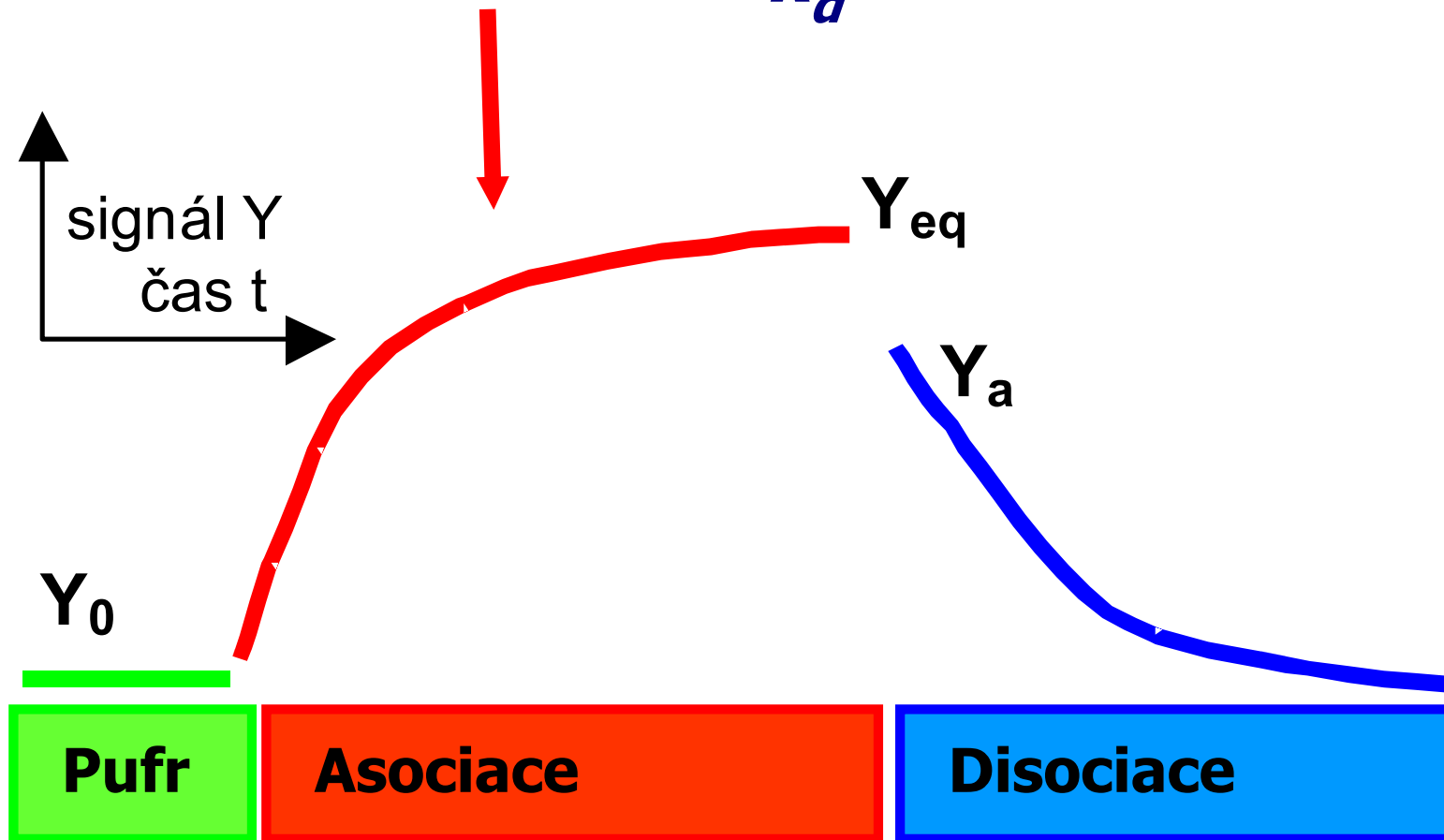
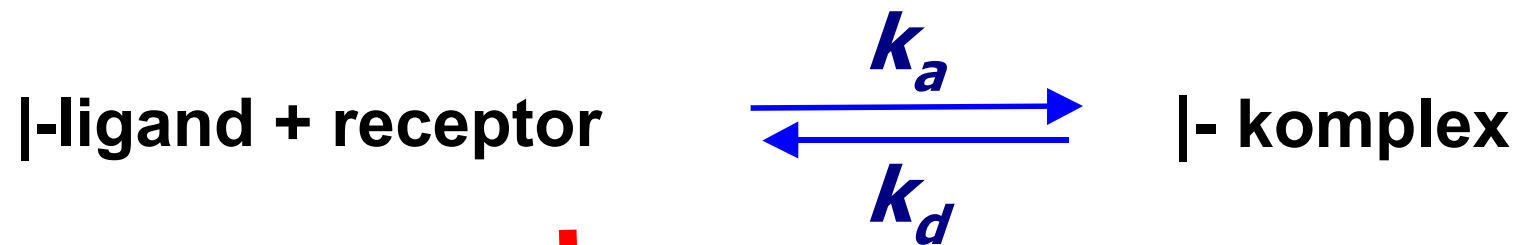
- nejčastěji používaná metoda studia bioafinitních interakcí je schématicky znázorněna na obrázku
- jedna z reagujících látek (ligand L) je imobilizována na citlivém povrchu sensoru (|—)
- druhá (receptor R) je přítomná v roztoku v koncentraci  $c$ , ta je obvykle během měření prakticky neměnná, např. při průtočném uspořádání
- sleduje se tvorba komplexu RL:



- interakci popisují kinetické rychlostní konstanty  $k_a$  (asociační) a  $k_d$  (disociační).
- rychlost tvorby komplexu je:
- Po ustavení rovnováhy ( $d[\text{RL}]/dt = 0$ ) jsou koncentrace všech forem dány rovnovážnými konstantami  $K_A$  resp.  $K_D$ ; platí pro ně vztahy  $K_A = [\text{RL}]/([\text{R}][\text{L}] = k_a/k_d$ ,  $K_D = 1/K_A$ .

$$d[\text{RL}]/dt = k_a [\text{R}][\text{L}] - k_d [\text{RL}]$$





- měřený signál je úměrný množství vznikajícího komplexu
- u všech typů sensorů signál závisí na hmotnosti molekul navázaných na citlivý povrch



# Výpočet kinetických konstant

- výchozí signál  $Y_0$  se bere nulový
- vazebná kapacita  $Y_{max}$  povrchu je úměrná celkové změně signálu po obsazení všech přítomných molekul ligandu L
- v průběhu vazby bude zbývající množství volného neobsazeného ligandu L přímo úměrné rozdílu  $Y_{max} - Y$
- množství navázaného partnera R je přímo úměrné Y:

$$d[RL]/dt = dY/dt = k_a c (Y_{max} - Y) - k_d Y$$

- a další úpravou získat:

$$dY/dt = k_a c Y_{max} - (k_a c + k_d) Y$$

- k určení kinetických parametrů z experimentálních závislostí Y na čase t lze použít dva odlišné postupy, linearizaci transformací nebo nelineární regresi





# Linearizace

- experimentální závislost  $Y = f(t)$  se numerickou transformací (derivace) převede na tvar  $dY/dt = f(Y)$
- nově získaná závislost by měla být lineární tvaru  $dY/dt = a + bY$
- pro absolutní člen (úsek na ose y) platí  $a = k_a c Y_{max}$ ,
- pro směrnici  $b = -k_a c - k_d$ .
- pokud se provedou vazebná měření pro řadu koncentrací  $c$  volného partnera  $L$ , lze kinetické rychlostní konstanty  $k_a$ ,  $k_d$  jednoduše zjistit vynesáním závislostí  $a$ ,  $b$  na koncentraci  $c$
- na základě grafu směrnic se určí velikosti konstant  $a$  z grafu úseků vazebná kapacita  $Y_{max}$
- lineární transformace primárních naměřených dat bohužel vede také k transformaci chyb počítaných parametrů, a tak jsou kvalitní naměřené údaje částečně znehodnoceny...
- v současnosti používána zřídka





ELSEVIER

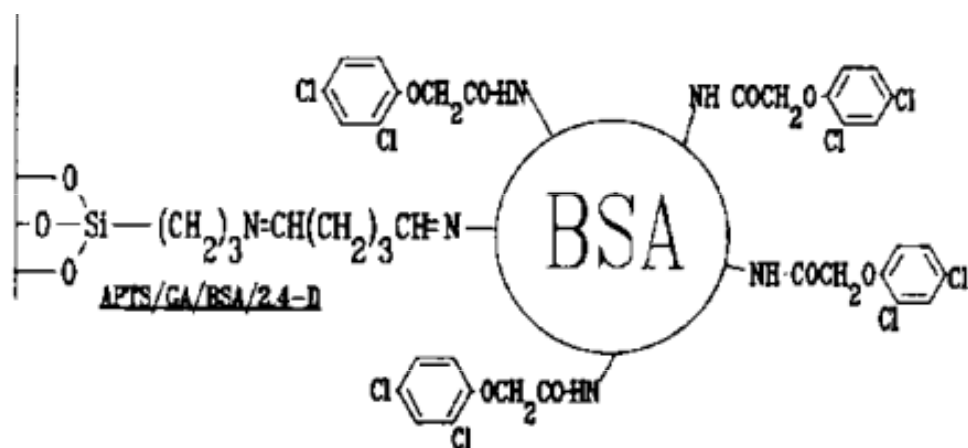
# Ukázka použití

Journal of Immunological Methods 176 (1994) 117–125

JOURNAL OF  
IMMUNOLOGICAL  
METHODS

## Characterization of monoclonal antibodies to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using a piezoelectric quartz crystal microbalance in solution

Petr Skládal <sup>a,b,\*</sup>, Maria Minunni <sup>a</sup>, Marco Mascini <sup>a</sup>, Vladimír Kolář <sup>c</sup>, Milan Fránek <sup>c</sup>



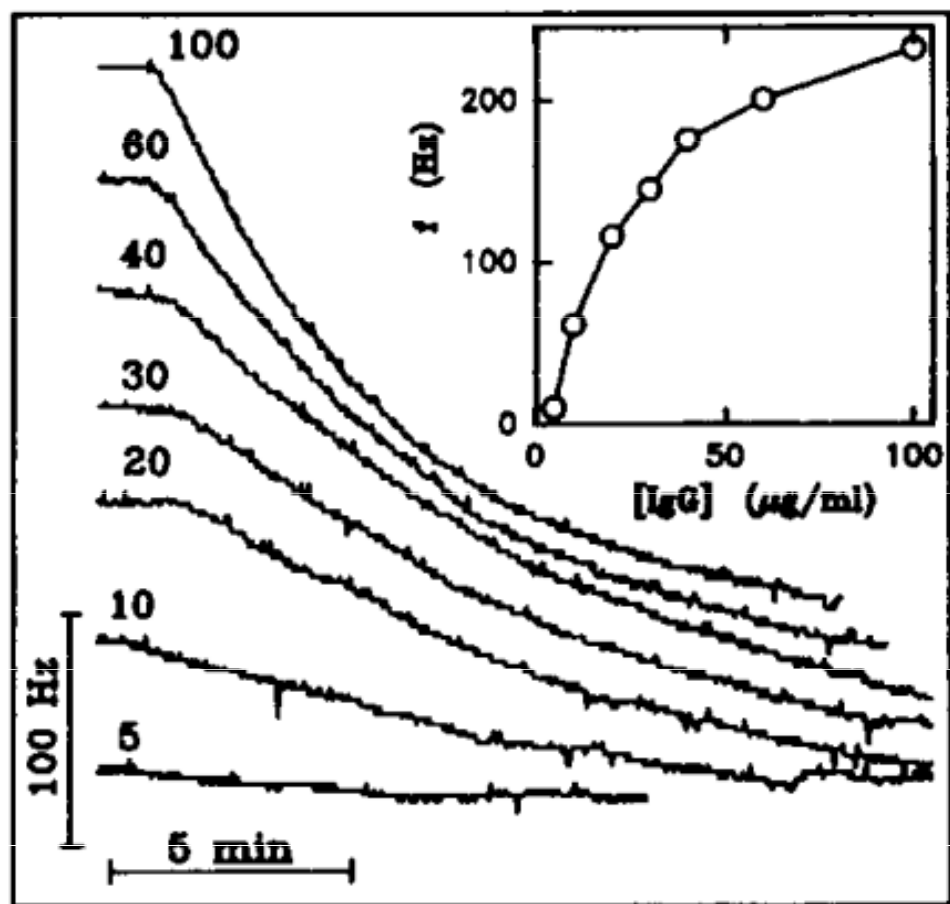


Fig. 2. Experimental tracings obtained during the flow of solutions of the monoclonal antibody E2/G2 through the cell with the APTS/GA/BSA/2,4-D modified piezoelectric crystal. The individual curves were shifted vertically for better resolution and the concentrations of IgG solutions ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) are indicated above the curves. In the inset graph, the frequency changes at the end of the 15 min binding period are plotted vs. corresponding IgG concentrations.

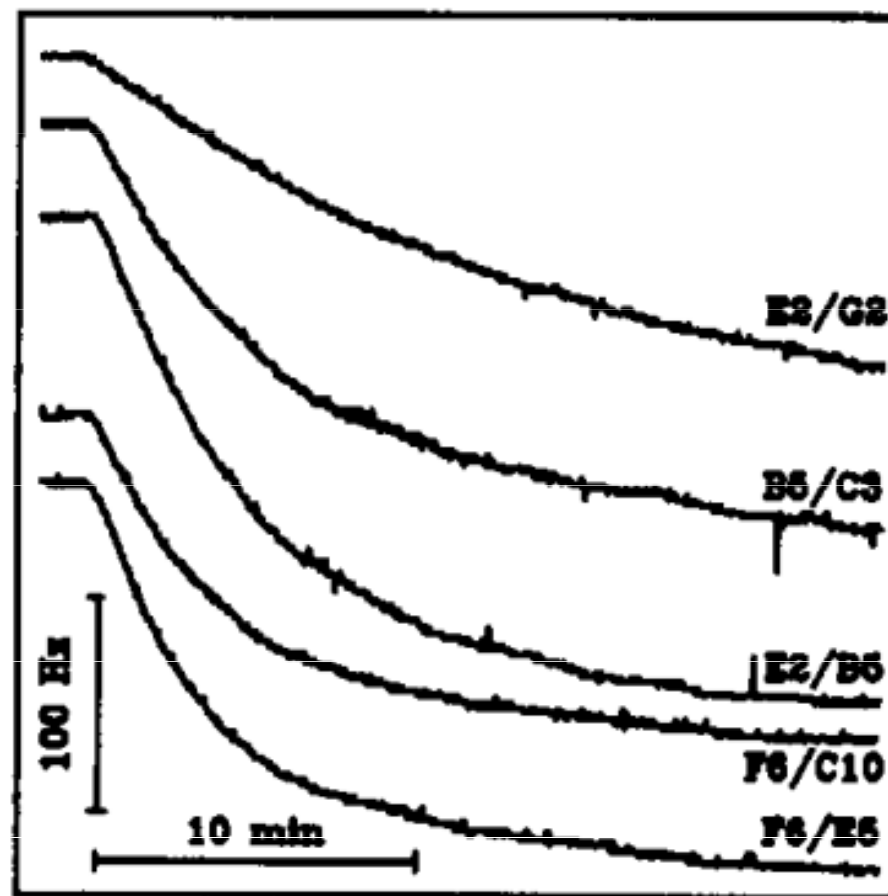


Fig. 5. Experimental binding curves obtained from flow of the individual MAb solutions ( $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) through the cell containing the APTS/GA/BSA/2,4-D modified piezoelectric crystal.



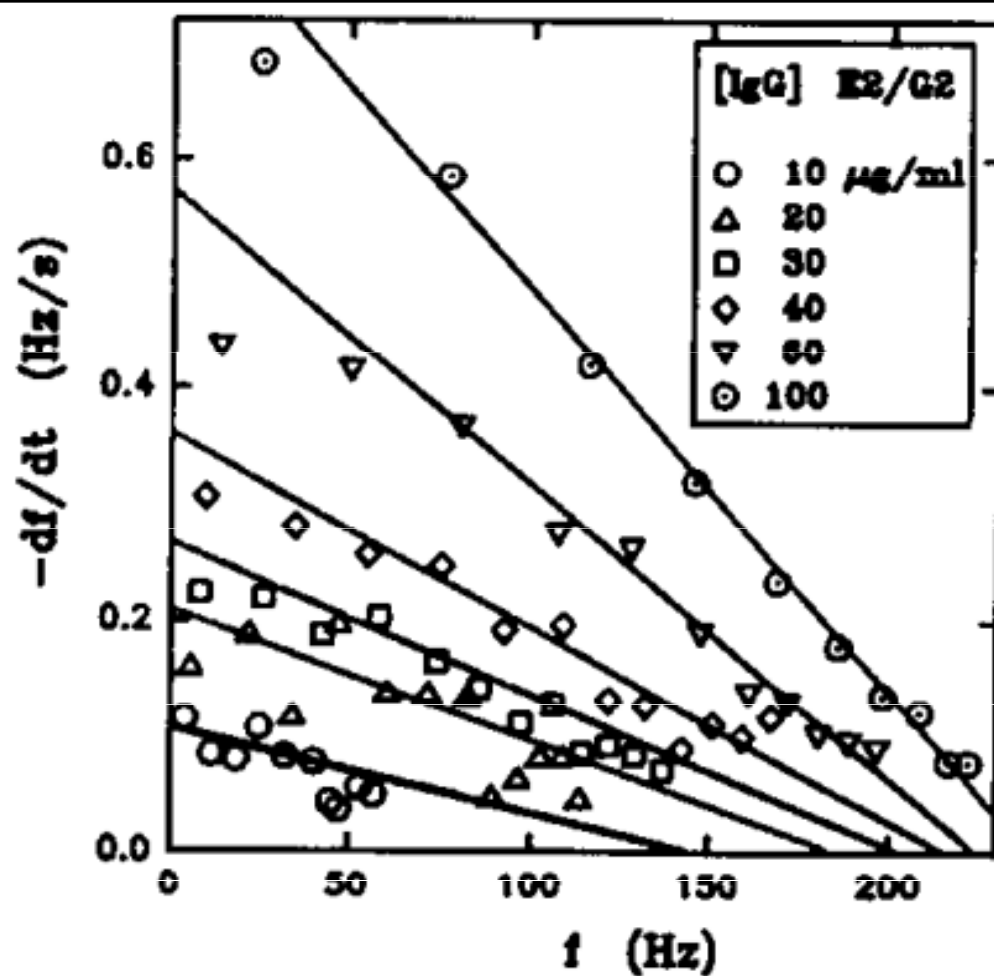


Fig. 3. The results of transformations of the  $f-t$  curves (Fig. 2) to the dependencies of  $(df/dt)$  on  $f$  (details are explained in the text). The concentrations of IgG E2/G2 corresponding to the individual curves (symbols) are shown in the figure.

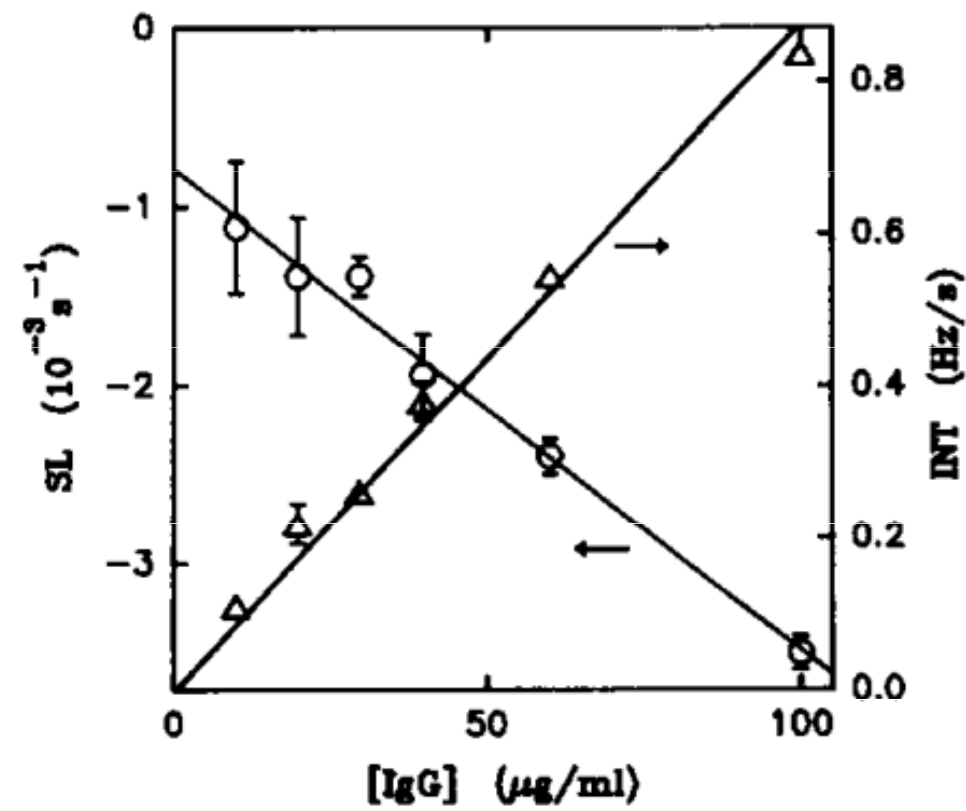


Fig. 4. The dependence of slopes SL ( $\circ$ ) and intercepts INT ( $\Delta$ ) (parameters characterizing the straight lines  $(df/dt)$  vs.  $f$  from Fig. 3) on concentrations of the monoclonal antibody E2/G2. The error bars represent the calculated standard deviations.

$$k_a = 4540 \pm 270 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_d = 7.89 \times 10^{-4} \pm 8.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$$



# Nelineární regrese

- je exaktnější postup vycházející z integrace rovnice výchozí podle času, to přímo vede k výrazu závislosti velikosti signálu  $Y$  na čase  $t$ :

$$Y = \frac{k_a c Y_{\max} \{1 - \exp[-(k_a c + k_d)t]\}}{k_a c + k_d}$$

- z jediného experimentu tak je možné určit přímo žádané kinetické konstanty (takto se používá zřídka)
- pro usnadnění numerického výpočtu lze zavést  $Y_{eq}$ , tj. velikost signálu při dosažení rovnovážného stavu:

$$Y_{eq} = k_a c Y_{\max} / (k_a c + k_d) = c Y_{\max} / (c + K_D) = K_A c Y_{\max} / (c + K_A)$$

- rovnice pak přejde na tvar:

$$Y = Y_{eq} \{1 - \exp[-(k_a c + k_d)t]\}$$



- dalšího zjednodušení výpočtu lze dosáhnout zavedením  $k_{obs} = k_a c + k_d$

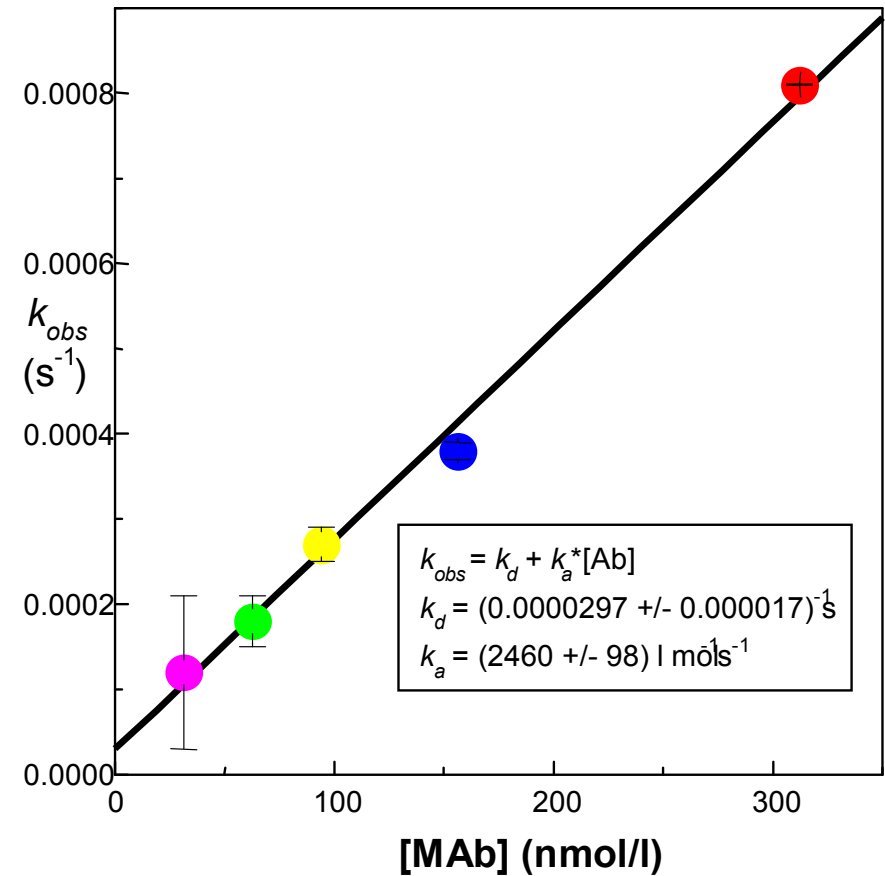
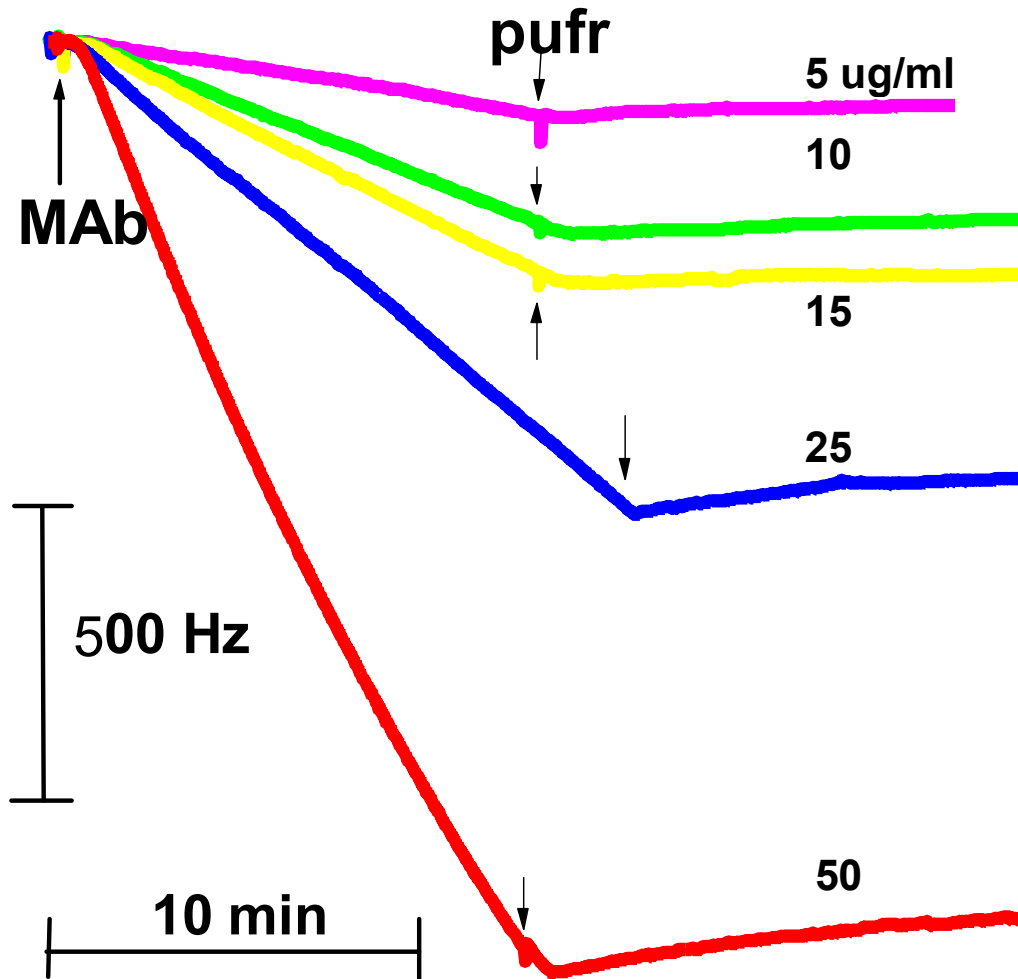
- hodnoty kinetických rychlostních konstant pak lze určit vynesáním  $k_{obs}$  proti koncentraci volného vazebného partnera

$$Y = Y_{eq} \{ [1 - \exp(-k_{obs} t)] \}$$

- nelineární regrese umožňuje vyhodnotit vazebné křivky tvořené ze dvou nezávislých kinetických interakcí (např. nespecifická adsorpce ligandu), je možné uvažovat vliv nestability základní linie, lze korigovat změny signálu vyvolané výměnou pracovního roztoku
- po nástřiku vzorku dochází obvykle k výrazné změně indexu lomu okolního prostředí, které se projeví jako prudká změna signálu u optických sensorů, stejně působí změny viskozity u piezoelektrických sensorů
- nelineární regrese je univerzální, lze použít i tam, kde linearizace selhává nebo není principiálně použitelná vůbec



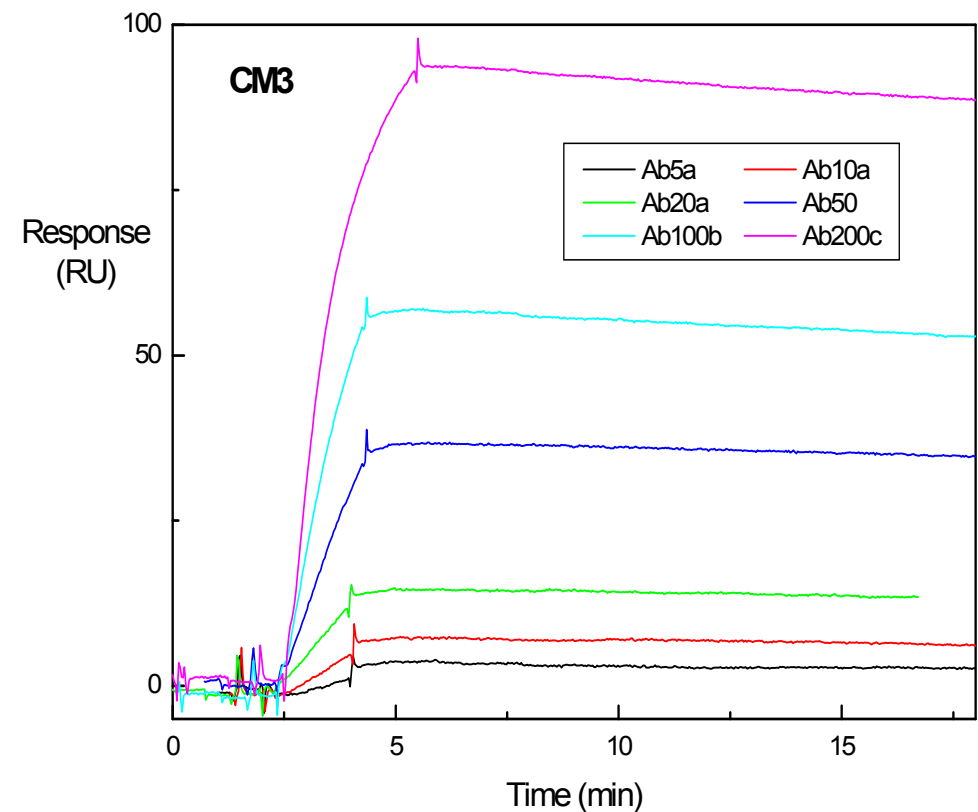
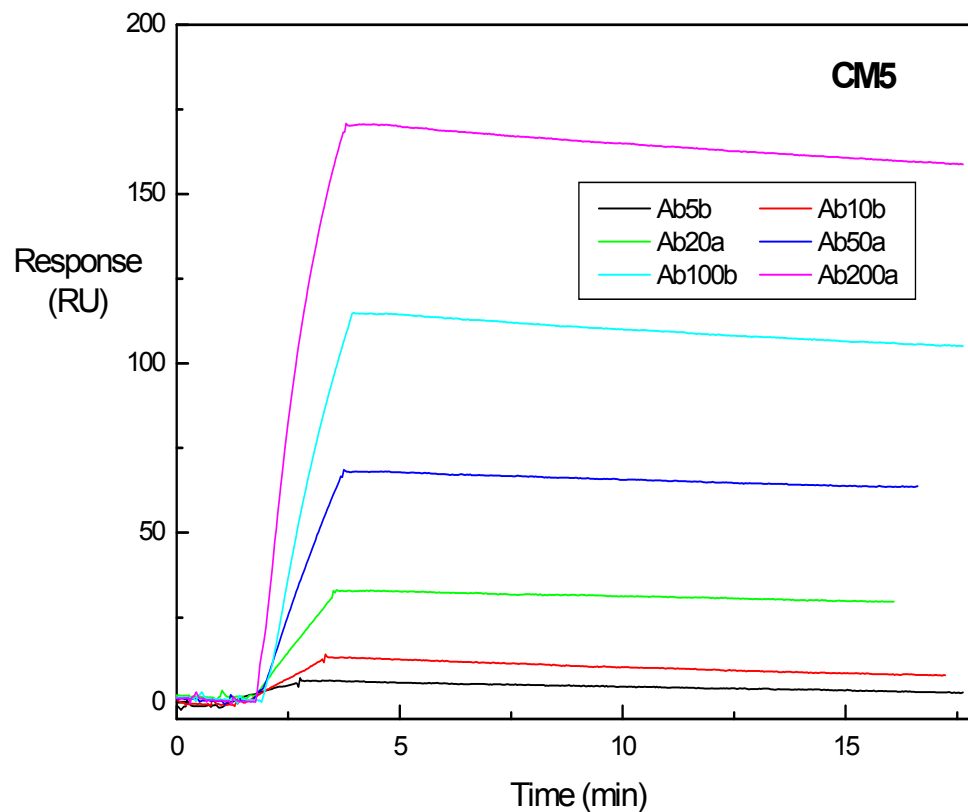
# Ukázka kinetické analýzy



Studium interakce protilátky s imobilizovaným hapténem pomocí piezoelektrického biosensoru



# Interakce antigenu (imobiliz) s fragmentem protilátky (scFv)



**Biacore 3000, Ag imobilizován na čipy CM5 a CM3, interakční závislosti pro různé koncentrace protilátek**  
**ukázky průběhu interakčních křivek pro různé koncentrace protilátky (nM)**

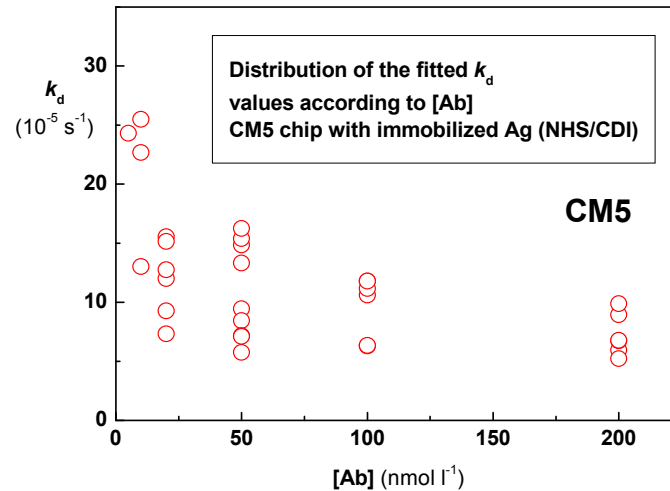
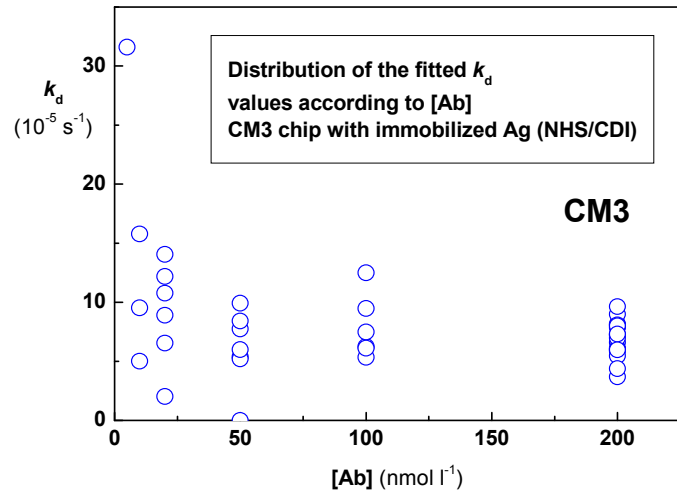
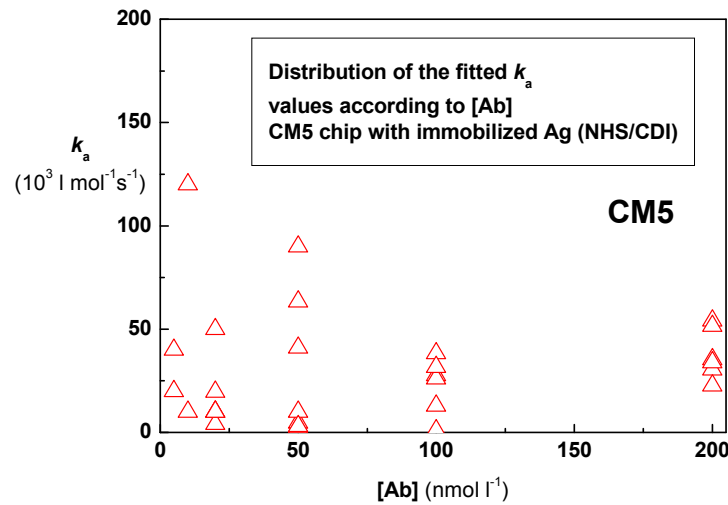
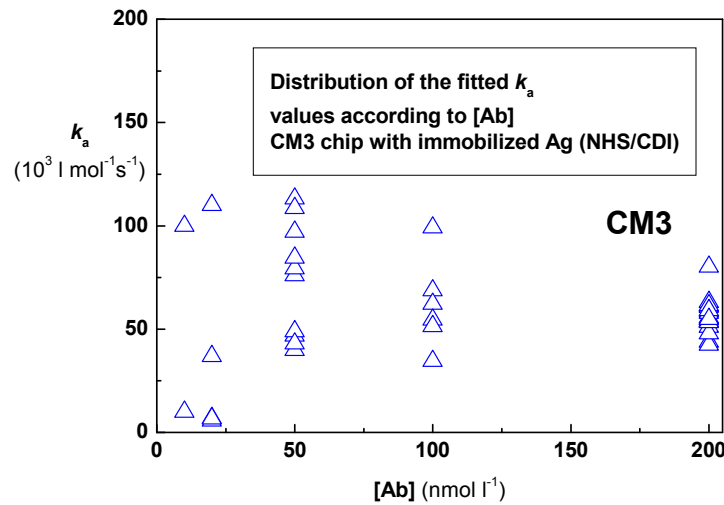




# Vyhodnocení

ref. kanál 1 – BSA, povrchové hustoty antigenů (RU, v kanálu č.) :  
CM3: 2 – 264, 3 – 920, 4 – 647; CM5: 2 – 1206, 3 – 513, 4 – 2550  
průtočná rychlost 25 ul/min (bez vlivu)

Ukázky nalezených kinetických konstant – v závislosti na použité konc. Ab  
(nezávislá regrese každé křivky použitím Scrubber2, Biaevaluate použit pro extrakci dat)



## Výsledky:

**CM3:**

$$k_a = 56300. \pm 8300 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_d = (6.9 \pm 1.5) \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$$

**CM5:**

$$k_a = 38000 \pm 12000 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_d = (7.3 \pm 1.8) \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$$



# Disociační fáze interakce

- po vytvoření komplexu LR na povrchu sensoru se z okolí odstraní volný receptor R a lze pozorovat zpětný rozpad (disociaci) komplexu na výchozí složky
- kineticky tento proces odpovídá dříve uvedené rovnici

$$dY/dt = k_a c Y_{max} - (k_a c + k_d) Y$$

- kde se položí  $[R] = c = 0$ , odtud pak plyne:

$$dY/dt = -k_d Y$$

- je-li výchozí množství komplexu LR na povrchu sensoru dáno signálem  $Y_a$ , integrace vede ke vztahu:

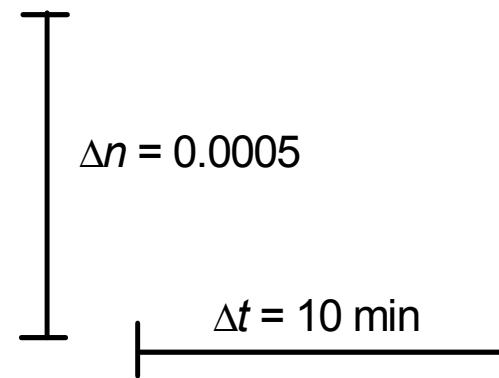
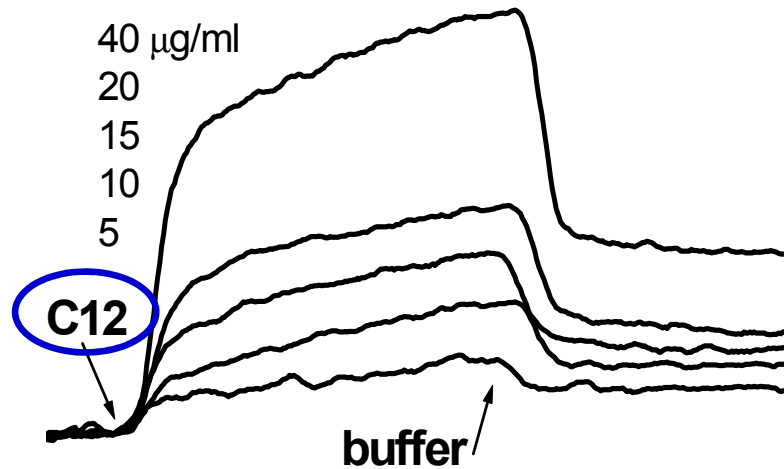
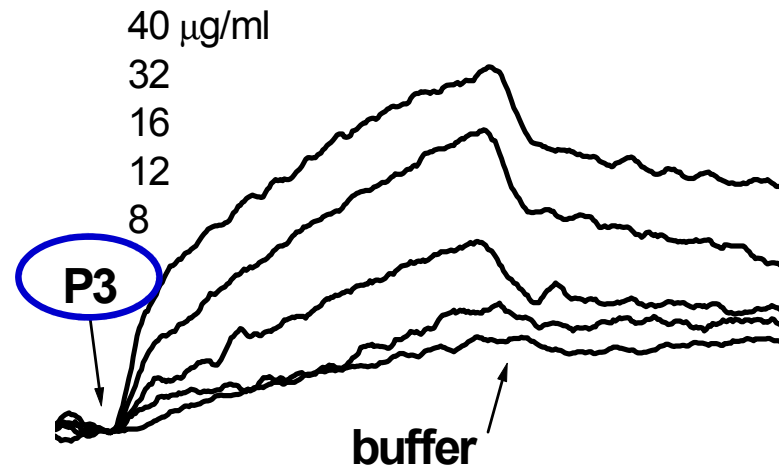
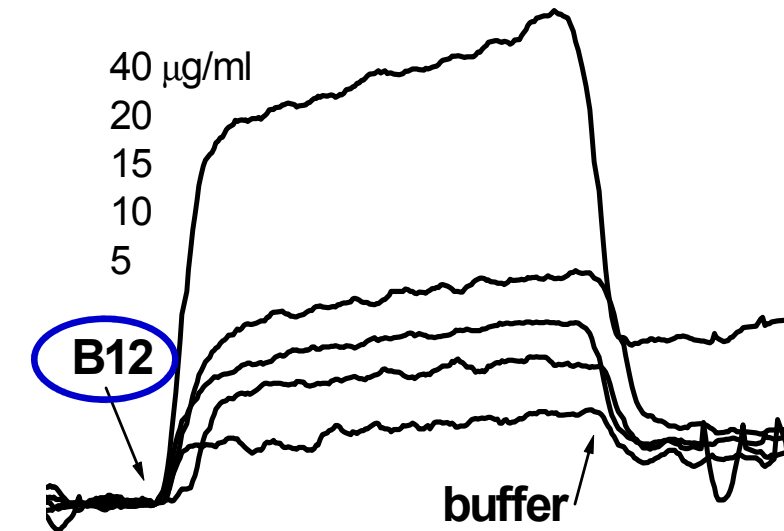
$$Y = Y_a \exp(-k_d t)$$

- z experimentální disociační křivky lze pak parametry  $k_d$  a  $Y_a$  určit nelineární regresí, případně po úpravě na rovnici přímky lineární regresí:

$$\ln Y = \ln Y_a - k_d t$$



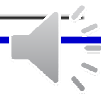
# Interakce proteinu GP41 (imob.) a sdV protilátek (Spreeta)



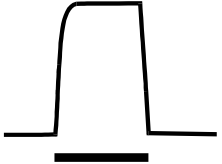
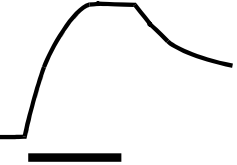
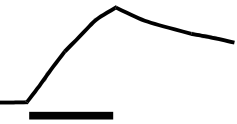
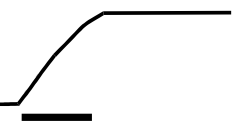
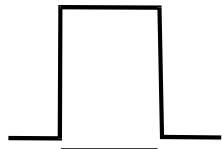
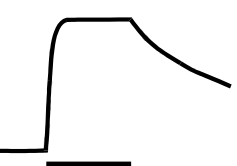
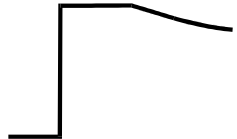
Dissociation rate constants determined from dissociation parts of the interaction curves

Antibody	B12	C12
$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$0.0015 \pm 0.0020$	$0.00039 \pm 0.00048$

biotinylovaný protein gp41 byl imobilizován na Au sensor přes cystamin, glutaraldehyd a avidin



# Kinetika u Biacore

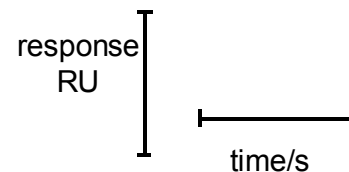
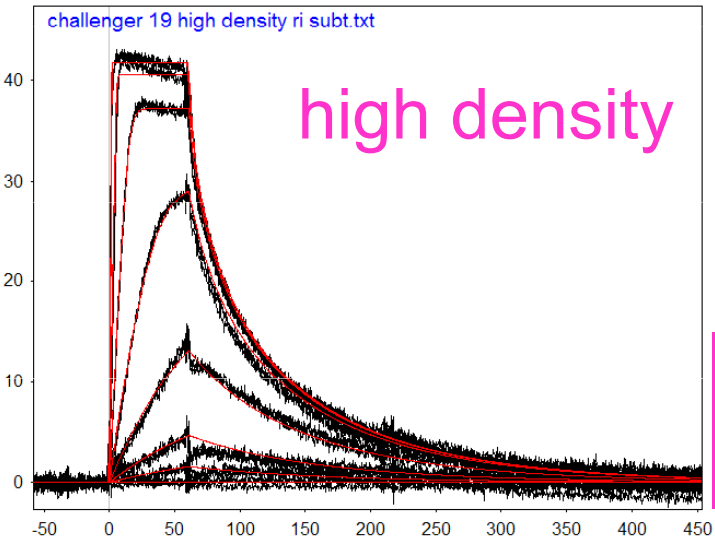
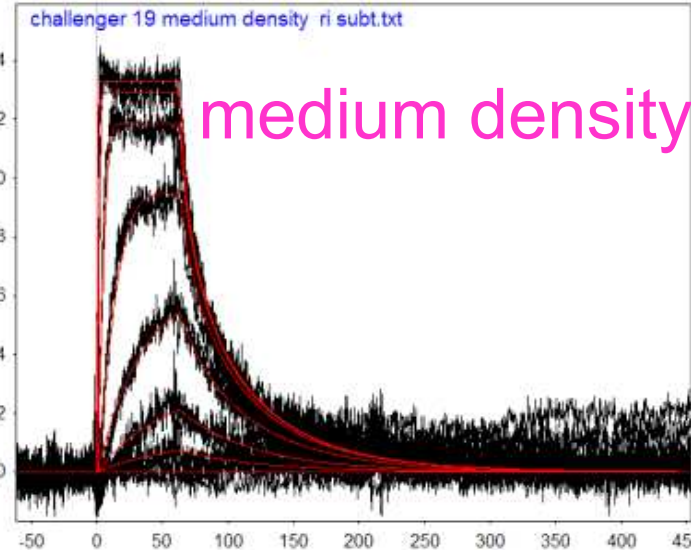
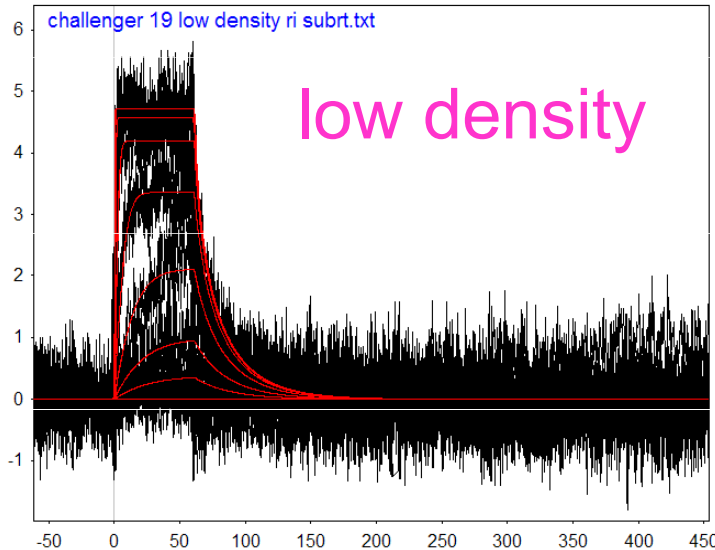
Asociace $k_a$ ( $\text{mol}^{-1} \text{l s}^{-1}$ )	Disociace $k_d$ ( $\text{s}^{-1}$ )	Tvar závislosti	Způsoby určení konstant
středně rychlá rychlá 100 až $5 \cdot 10^6$	velmi rychlá $\approx 0.01$		asociace $\Rightarrow k_a$ rovnováhy $\Rightarrow K_A$ disociace příliš rychlá
středně rychlá rychlá 100 až $5 \cdot 10^6$	rychlá 0.001 až 0.01		asociace $\Rightarrow k_a$ rovnováha $\Rightarrow K_A$ disociace $\Rightarrow k_d$
středně rychlá rychlá 100 až $5 \cdot 10^6$	středně rychlá $10^{-5}$ až 0.001		asociace $\Rightarrow k_a$ rovnováha nenastává disociace $\Rightarrow k_d$
středně rychlá rychlá 100 až $5 \cdot 10^6$	pomalá $< 10^{-5}$		asociace $\Rightarrow k_a$ rovnováha nenastává disociace příliš pomalá
rychlá $> 5 \cdot 10^{-5}$	velmi rychlá $\approx 0.01$		asociace příliš rychlá rovnováha $\Rightarrow K_A$ disociace příliš rychlá
rychlá $> 5 \cdot 10^{-5}$	rychlá 0.001 až 0.01		asociace příliš rychlá rovnováha $\Rightarrow K_A$ disociace $\Rightarrow k_d$
rychlá $> 5 \cdot 10^{-5}$	středně rychlá $10^{-5}$ až 0.001		asociace příliš rychlá disociace $\Rightarrow k_d$

ukázky průběhu interakčních křivek pro různé kombinace hodnot rychlostních konstant

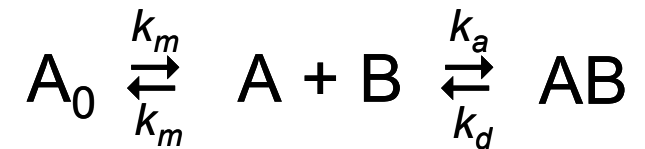


# Kinetika u BIACORE

interakce imobilizované karbonátanhydrasy II (30 kDa)  
a acetazolamidu (222 Da)



$$k_a = 1.141 \times 10^7 \text{ l.mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$
$$k_d = 0.178 \text{ s}^{-1}$$



$$k_m = 1.282 \left( \frac{vD^2}{hl} \right)^{1/3}$$

Evaluation  
software:  
**SCRUBBER** –  
data layout  
**CLAMP** – kinetic  
calculation

# V praxi to bývá komplikovanější -

- při disociaci ligandu z povrchu sensoru se může někdy vyskytovat tzv. "**rebinding**„ - partner R se sice uvolní z komplexu LR, ale než se stačí dostat do volného roztoku, je zachycen jinými neobsazenými ligandy L na povrchu
  - nastává pokud je povrchová hustota ligandu L vysoká (L je nízkomolekulární)
  - nebo pokud biovrstva není monovrstvou a má větší tloušťku (imobilizace v dextranové matici)
  - projevem bývají velmi nízké hodnoty  $k_d$  oproti očekávání
- při analýze interakcí protilátek (IgG) s imobilizovanými antigeny se obvykle uvažuje stechiometrie interakce 1 : 1, nicméně při interakci s imobilizovanými hapteny (R) je možná i **bivalentní vazba**
- různé orientace (**nehomogenita**) ligandu
- transport látek z roztoku k sensoru
- obvykle existuje na povrchu sensoru nemíchaná vrstva - mimo vlastní afinitní interakce je tedy nutné uvažovat **difúzní transport** partnera R
  - bude diskutováno v další části



# Jak získat dobrá data -

- ujasnit si předem, o co nám vlastně jde, kinetické parametry, nebo vůbec pochopení interakce? – **plánovat** předem experiment
- nebojme se **sbírat data nejvyšší rychlostí** (10x za 1 s) u Biacore
  - získáme dokonalejší popis interakce a lépe odlišíme přechodové fáze
- pro kinetiku je vhodné **malé množství imobilizovaného** ligandu
  - zmenší se lokální úbytek vázané biomolekuly (depletion) a omezí se možné sterické problémy (molekuly ligandů si budou „zavazet“)
  - nejlépe zkusit několik imobilizovaných hladin pro porovnání
- použít přiměřeně rozsáhlý **rozsah koncentrací** volného partnera
  - omezí se systematická chyba
  - měřit jednotlivé koncentrace v náhodném pořadí
  - na konci tu první ještě zopakovat – ověřit zachování vazebné kapacity a aktivity ligandu
  - rozsah koncentrací přibližně od  $K_D/10$  po  $10K_D$
- udržujme **měřicí systém v perfektním stavu**
  - dodržovat intervaly údržby (Desorb, Sanitize)
  - kontrola komponent
  - filtrovat roztoky, kvalitní spotřební materiál



# další zásady -

- provádět **kompletní regeneraci** pokud možno až k výchozí základní linii
  - při použití např. vysoké koncentrace nemusí být standartní regenerace dostatečná – zopakovat ještě jednou
  - generovat data až do značného stavu saturace povrchu
  - omezí se možný „rebinding“ při disociaci – uvolněná molekula se nemá kam znovu navázat
  - zaznamenat dostatečně dlouhé asociační a disociační křivky (zbytečně nespěchat...)
  - zvýší se šance dosažení rovnovážného stavu – alternativní vyhodnocení kinetických asociačních/disociačních **rovnovážných** konstant
- používat **referenční kanál** pro eliminaci změn indexu lomu roztoků („bulk changes“) a nespecifické vazby
  - analyzovat diferenciální data





# ještě je třeba -

- jak ligand, tak volný vazebný partner by měly být
  - **v čistém stavu** (minimálně musí být známá koncentrace toho volného...)
  - je nutná i konformační homogenita (monomer – dimer – oligomery se budou chovat značně rozdílně...) – ušetříme si „vymýšlení“ složitých interakčních modelů
- **nesnažit se „over analyse“** naměřená data
  - pokud data mají odpovídat jednoduchému modelu, ale fitování nevychází, tak přidávání „korekčních“ parametrů situaci matematicky samozřejmě zlepší, i když výsledná rovnice už nemá smysl z biologického hlediska...
- porovnat **různé imobilizační metodiky**
  - různé způsoby kovalentní vazby ligandu
  - např. vazba přes aminoskupiny je často náhodná a může vést k heterogenitě imobilizovaného ligandu
  - zkusit různé afinitní imobilizace (proteiny A / G / L)
  - různé „tagy“ (biotin, His, GST, ...) mohou poskytnout homogenní orientaci / vazbu ligandu



# Problémy a jejich řešení

## Cause of deviation

Samples are chemically or conformationally impure

Samples self associate or aggregate

Multivalent interactions/avidity effects

Chemical heterogeneity in ligand imposed by immobilization procedure

Mass transport effects/rebinding

Crowding/steric hindrance

Dilution and depletion of analyte within sample plug

Sample carry-over

Matrix effects, bulk refractive index changes, instrument drift and injection noise

Nonspecific binding of analyte to surface

pH or temperature effects

Experimental noise

Complex binding mechanism

## Possible solution

Purify proteins

Check proteins using analytical centrifugation

Keep monovalent ligand in solution

Orient the immobilization of the ligand or use a capture step

Use low surface densities and high flow rates

Account for mass transport during data analysis

Use low surface densities

Use KINJECT and high flow rates\*

Use EXTRACLEAN and WASH procedures\*

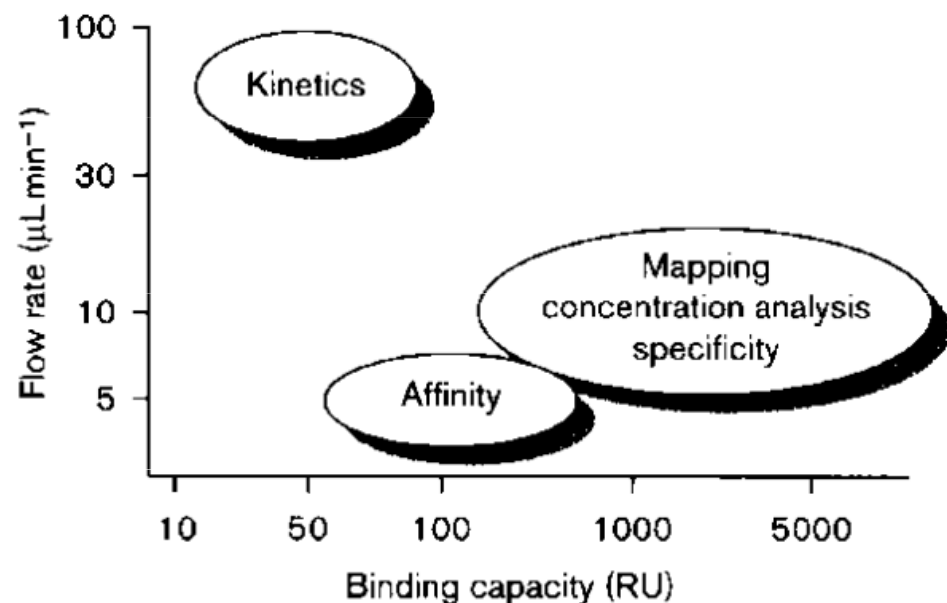
Match sample and running buffers and set up a reference cell

Use reference cell

Equilibrate sample and running buffer

Replicate and randomize samples

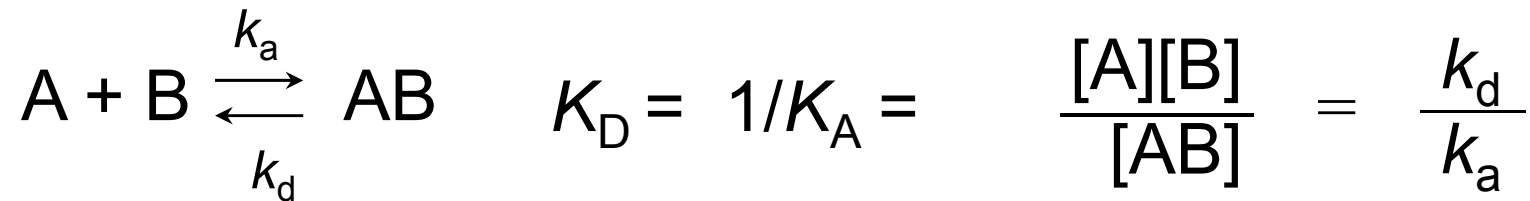
Use numerical integration and global data analysis



# Pro zopakování -

**rovnovážné** konstanty ...  $K_D$  nebo  $K_A$

**rychlostní** asociační a disociační konstanty  $k_a$  a  $k_d$



konstanty mají jednotky:

$k_{\text{obs}}, k_{\text{ON}} (\text{s}^{-1})$

zdánlivá rychlostní nebo pseudo-prvního řádu  
rychlostní konstanta (koncentračně závislá)

$k_a, k_{\text{ass}}, k_{+1} (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$  kinetická asociační rychlostní konstanta

$k_d, k_{\text{diss}}, k_{-1} (\text{s}^{-1})$  kinetická disociační rychlostní konstanta

$K_D (\text{M})$

kinetická disociační rovnovážná konstanta ( $1/K_A$ )

$K_A (\text{M}^{-1})$

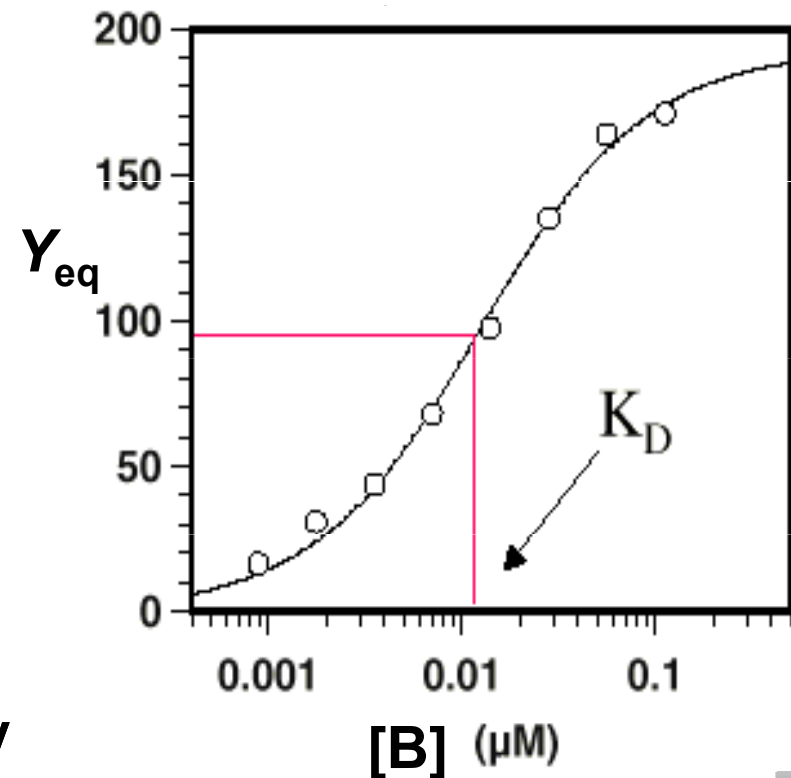
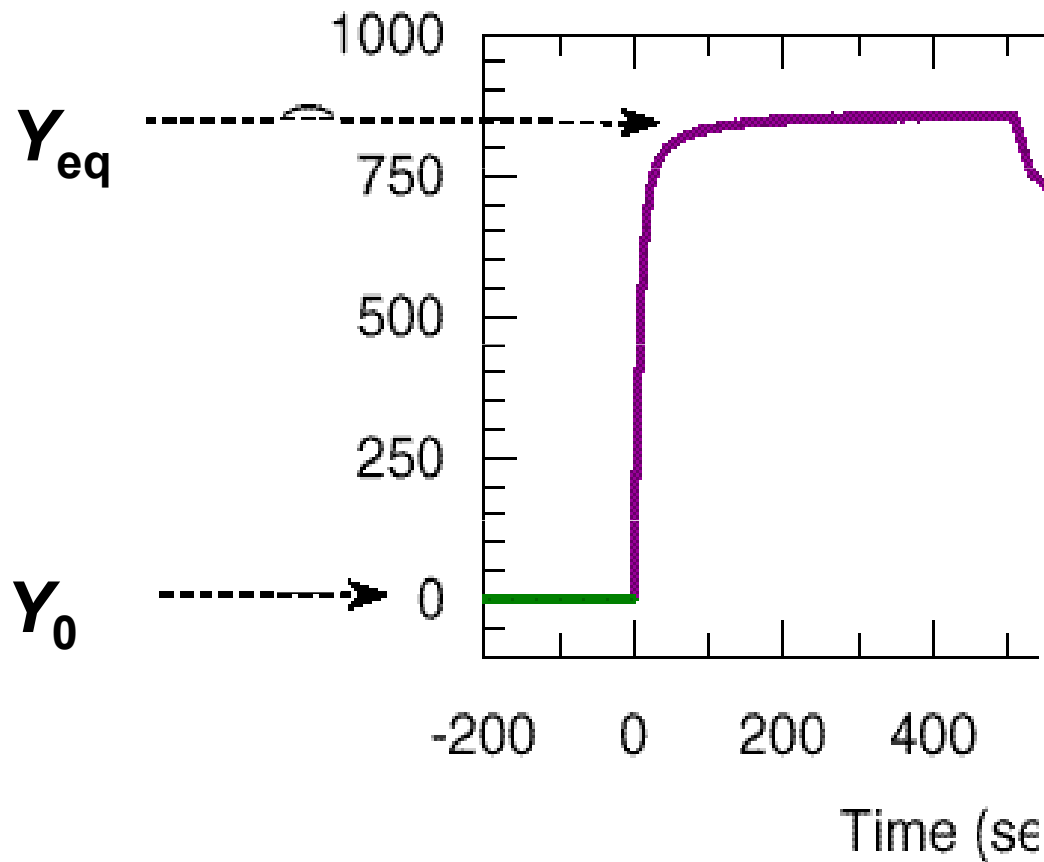
kinetická asociační rovnovážná konstanta ( $1/K_D$ )

také se někdy nazývá afinitní konstanta...



# Rovnováha

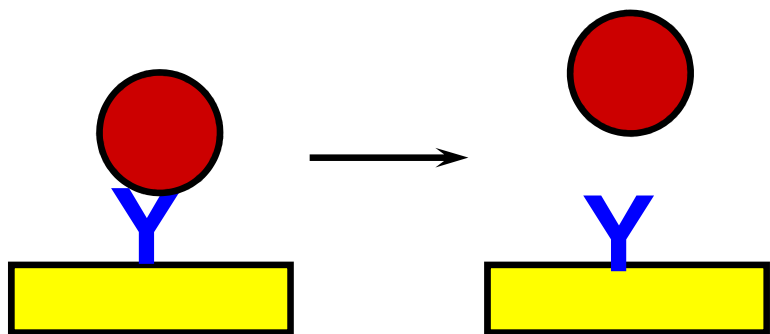
$$Y_{eq} = \frac{Y_{max}[B]}{K_D + [B]}$$



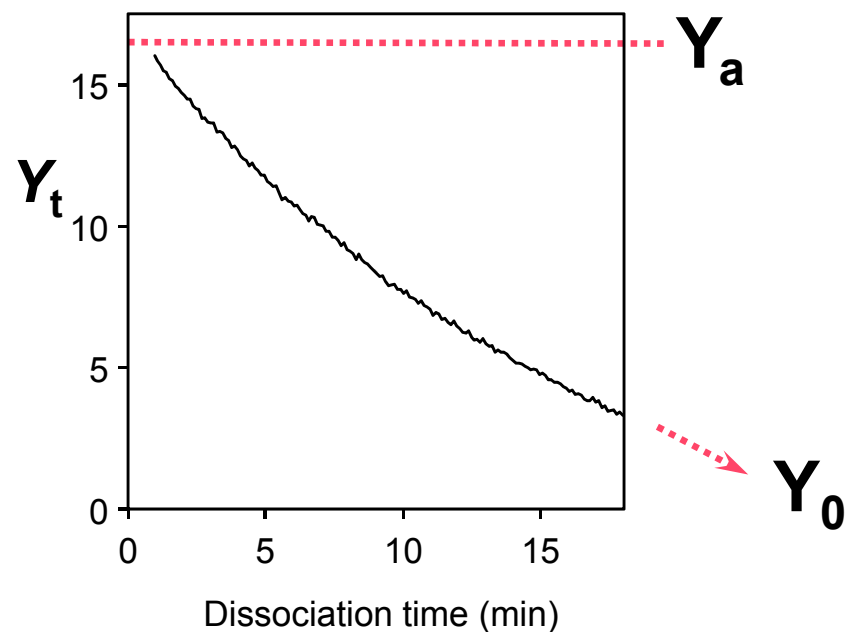
- když nastane, tak ji využijme!
  - nezávislé určení rovnovážné konstanty



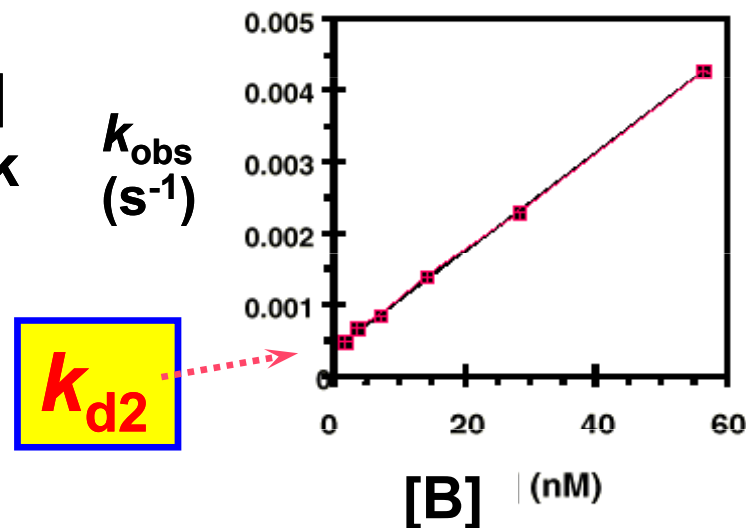
# Srovnejme $k_D$ získané různě



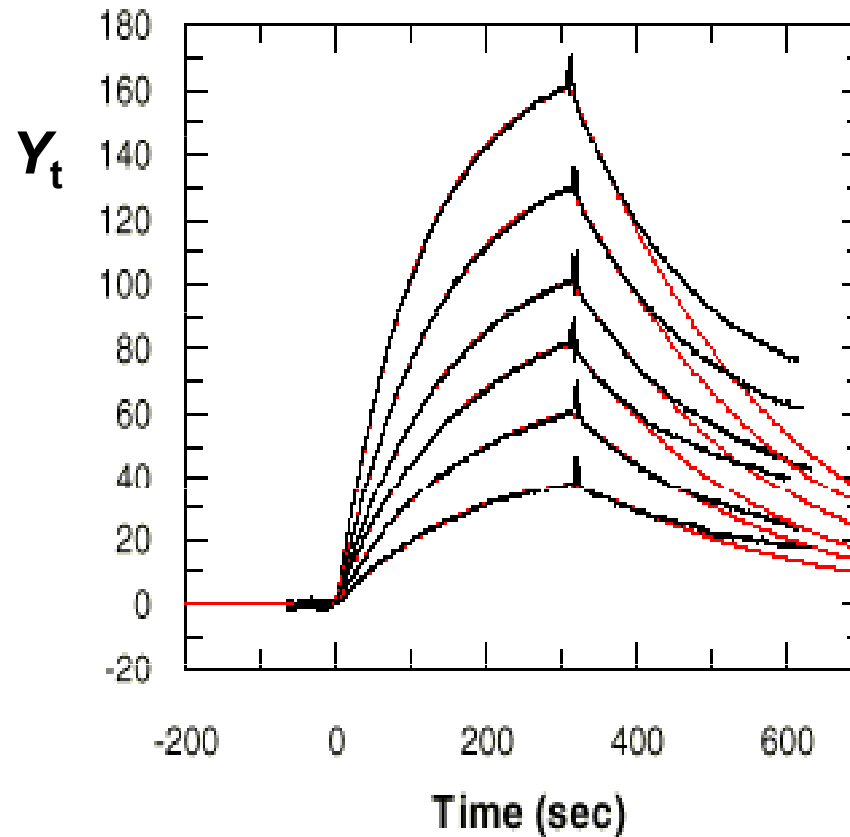
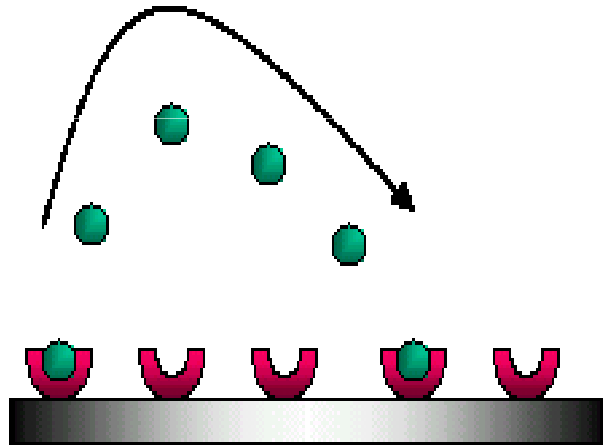
$$Y_t = [Y_a - Y_0] \exp(-k_{d1} t)$$



- 1) z fitování disociační fáze interakčních křivek
- 2) z výnosu  $k_{obs}$  proti koncentraci [B] při hodnocení asociačních fází křivek
- měly by vyjít shodné ...



# Co je „rebinding“ ?

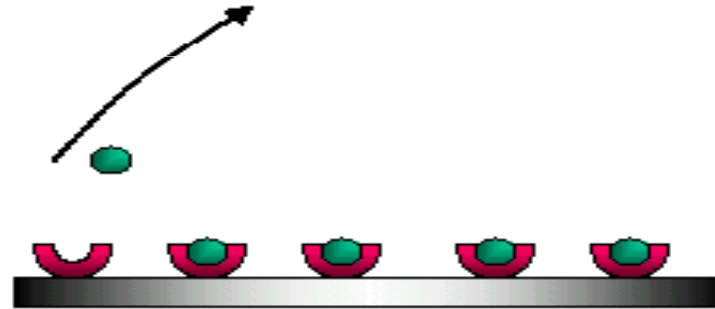


- vazebný partner B uvolněný při disociaci z komplexu  $\Gamma$ -ligand-B se místo úniku do roztoku a odplavení z cely **zase naváže** na nějaký volný ligand, co potká po cestě...
  - disociační konstanty  $k_d$  vychází příliš nízké
  - chybné interpretování zdánlivě vyšší stability komplexu

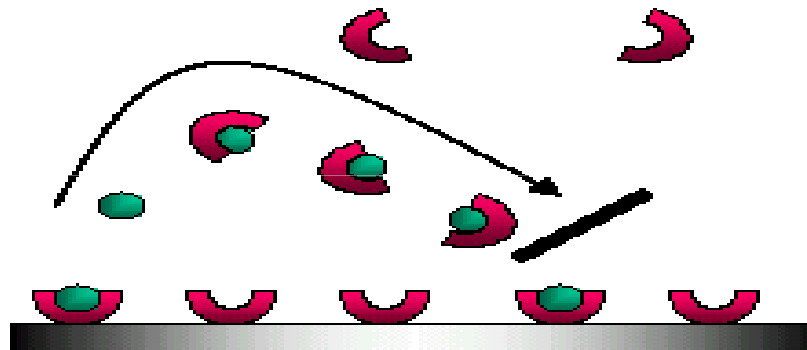


# Jak omezit „rebinding“

- použít disociační data z rané fáze křivky, kdy jsou molekuly imobilizovaného ligandu ještě vesměs obsazené
  - a nemohou tedy zpětně B navázat

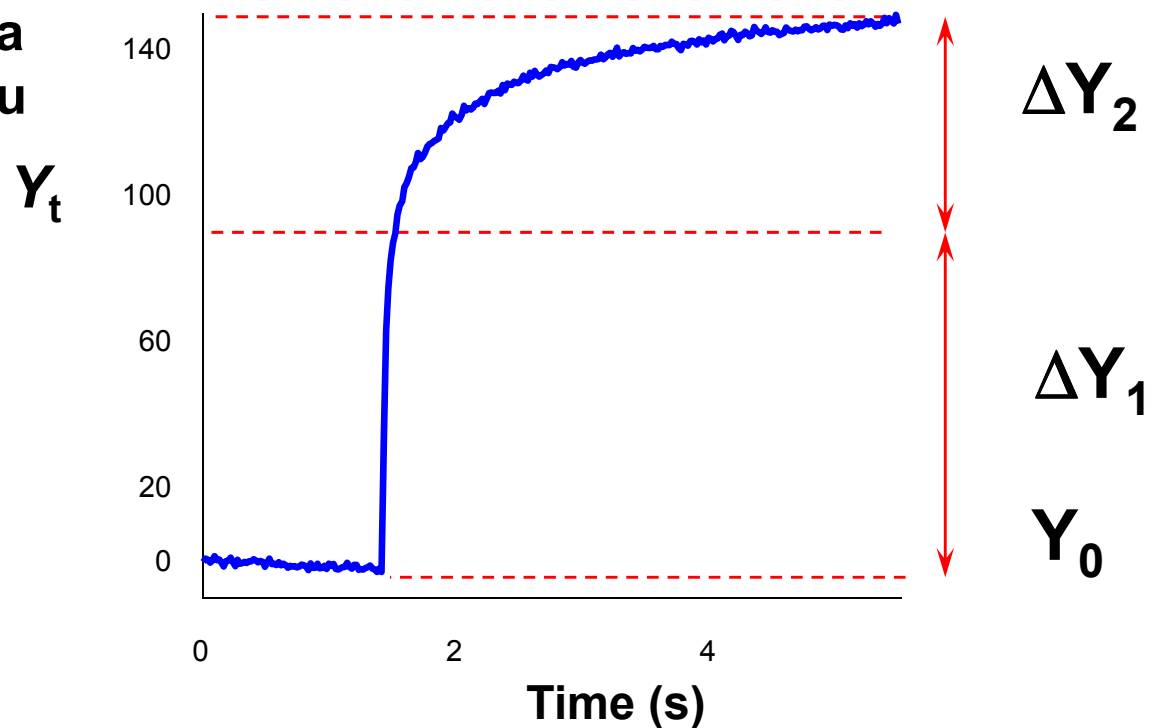


- přidat do roztoku při disociaci volný ligand – odchytlí uvolněné B a zabrání jeho zpětné vazbě na imobilizovaný ligand



# Dvoufázové asociace

data mohou být přesně fitována  
s předpokladem existence dvou  
vazebných interakcí



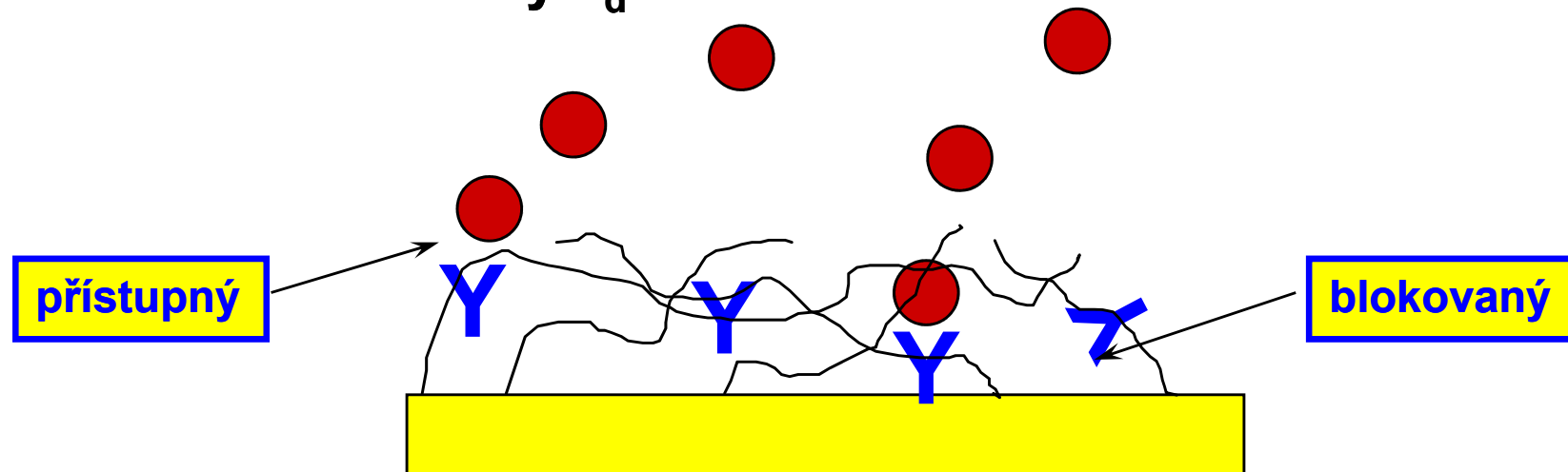
$$Y_t = Y_0 + \Delta Y_1(1 - \exp(-k_{obs1}t)) + \Delta Y_2(1 - \exp(-k_{obs2}t))$$





# Proč vzniká „dvoufázovost“ ?

- při interakci probíhají alespoň **dva nezávislé vazebné děje**
- **nehomogenní vazebná místa** imobilizovaného ligandu
  - již před imobilizací
  - problém vzniklý při imobilizaci – rozdílné orientace
  - sterické zábrany, mohou se prohloubit po vzniku komplexu
- **nehomogenost partnera v roztoku**
  - již před interakcí
  - při interakci – částečně nespecifická vazba, rebinding
- použít pouze počáteční část asociační fáze
- zkontrolovat hodnoty  $k_d$  získané různě

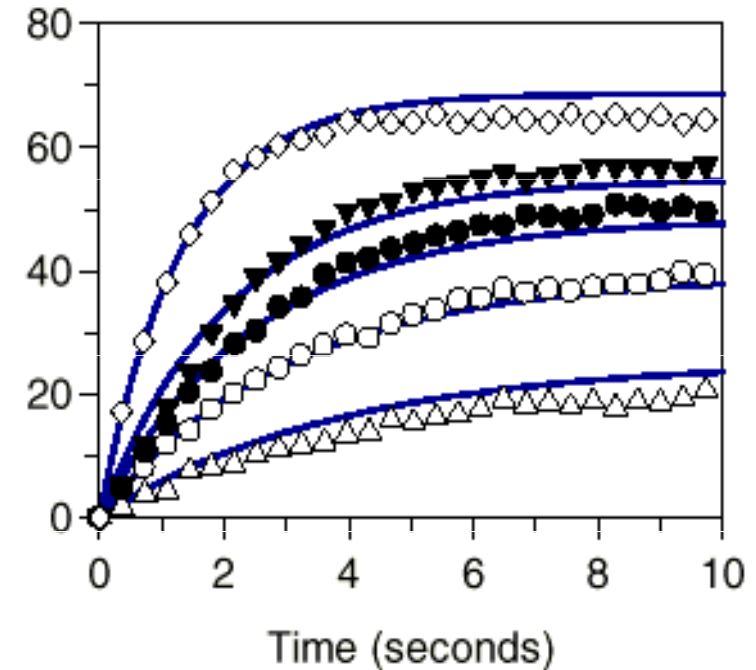


# Globální analýza

**všechna data** z jednoho experimentu (různé koncentrace, asociační i disociační fáze) jsou **fitována současně**

nalezené kinetické parametry tedy musí vyhovovat pokud možno všem naměřeným křivkám

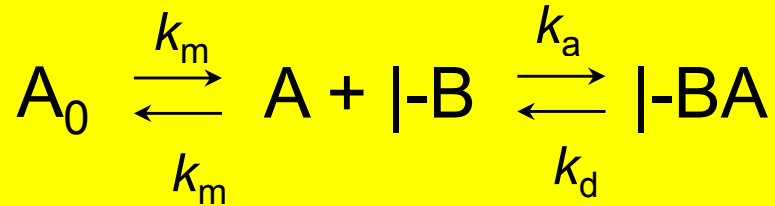
$$R_t = \frac{k_{ass} R_{max} [L]}{k_{ass} [L] + k_{diss}} \left(1 - \exp^{-(k_{ass} [L] + k_{diss}) t}\right)$$



Parameter	Value	Std. Error
association rate constant	1417399.1547	39392.886
dissociation rate constant	0.1884	0.006
Ligand capacity	91.5479	1.321



# Limitace látkovým transportem



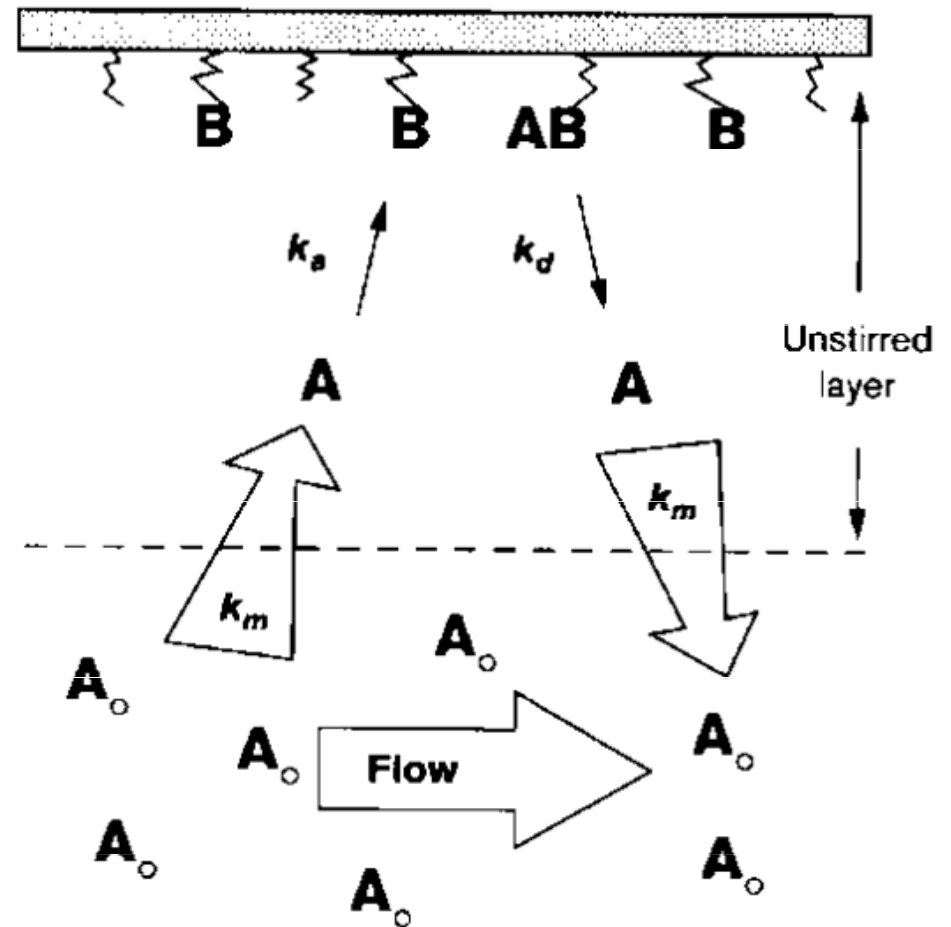
- nastává tehdy, pokud rychlost kinetiky interakce je shodná nebo vyšší než difúze volného partnera k povrchu sensoru
- do modelu se musí zahrnout transportní člen

$$k_m = 0.98 \left( \frac{D}{h} \right)^{2/3} \left( \frac{f}{0.3 \cdot w \cdot l} \right)^{1/3}$$

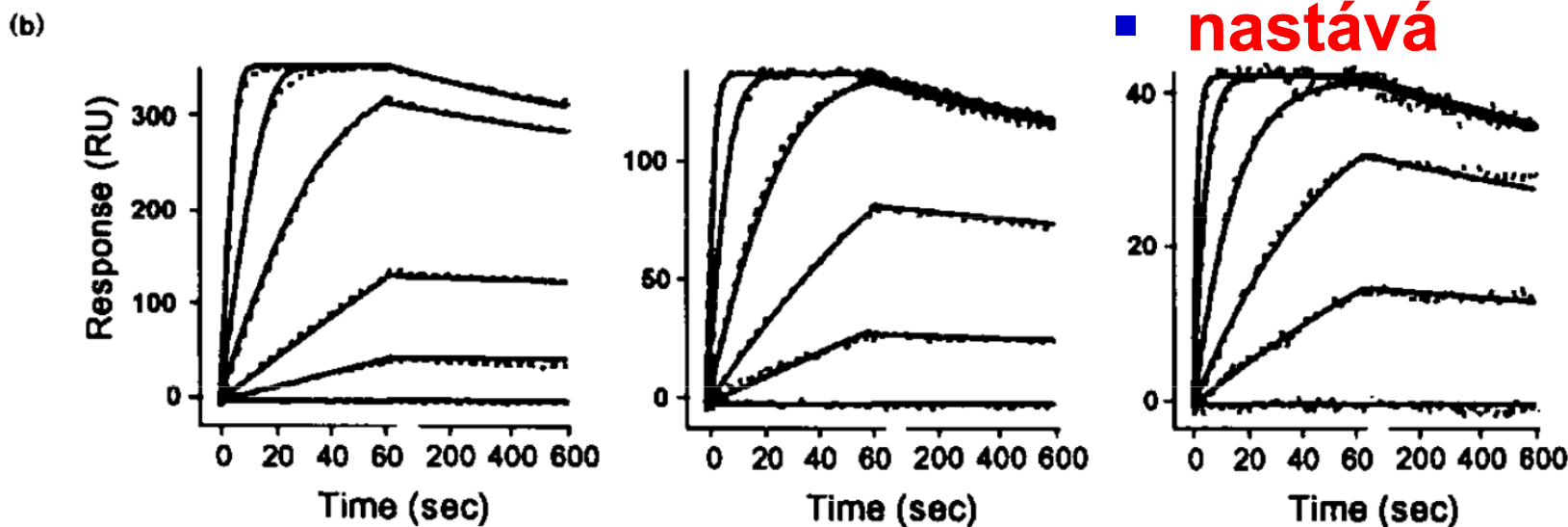
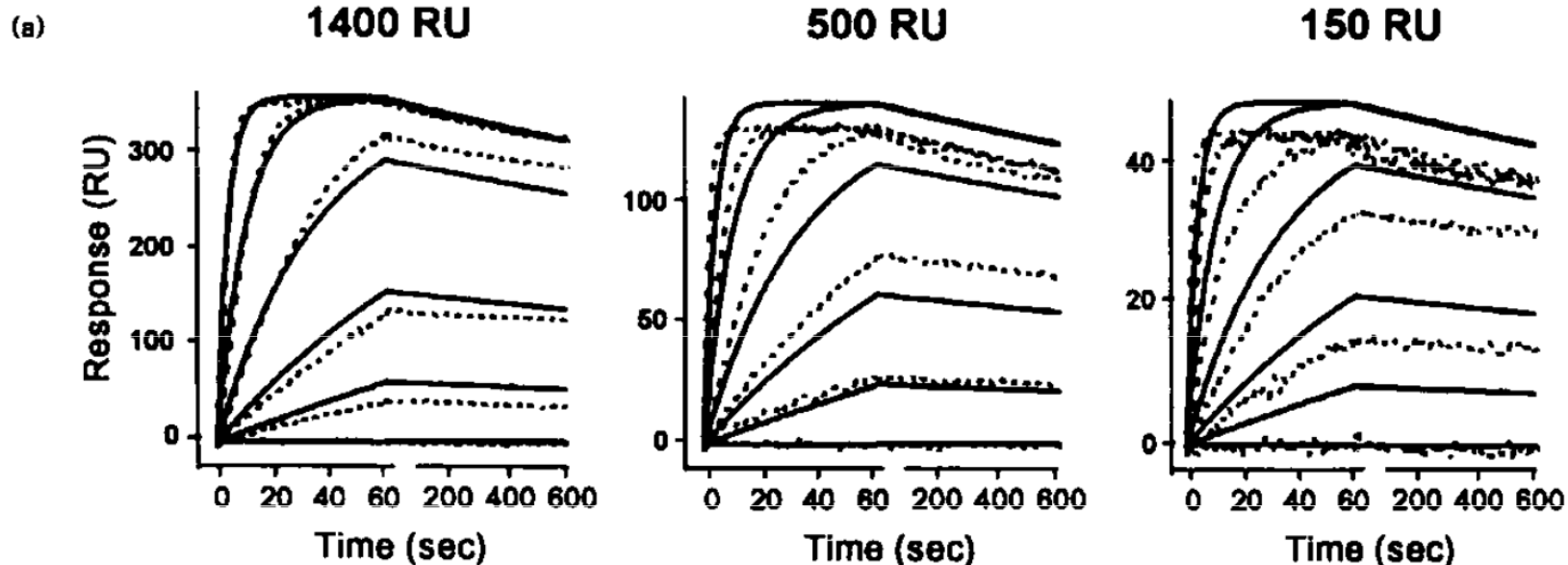
where  $D$  is the diffusion coefficient of the analyte in  $\text{m}^2/\text{s}$

$f$  is the volumetric flow rate of liquid through the flow cell in  $\text{m}^3/\text{s}$

$h, w, l$  are the flow cell dimensions (height, width, length in m)



# Detekce při globální analýze



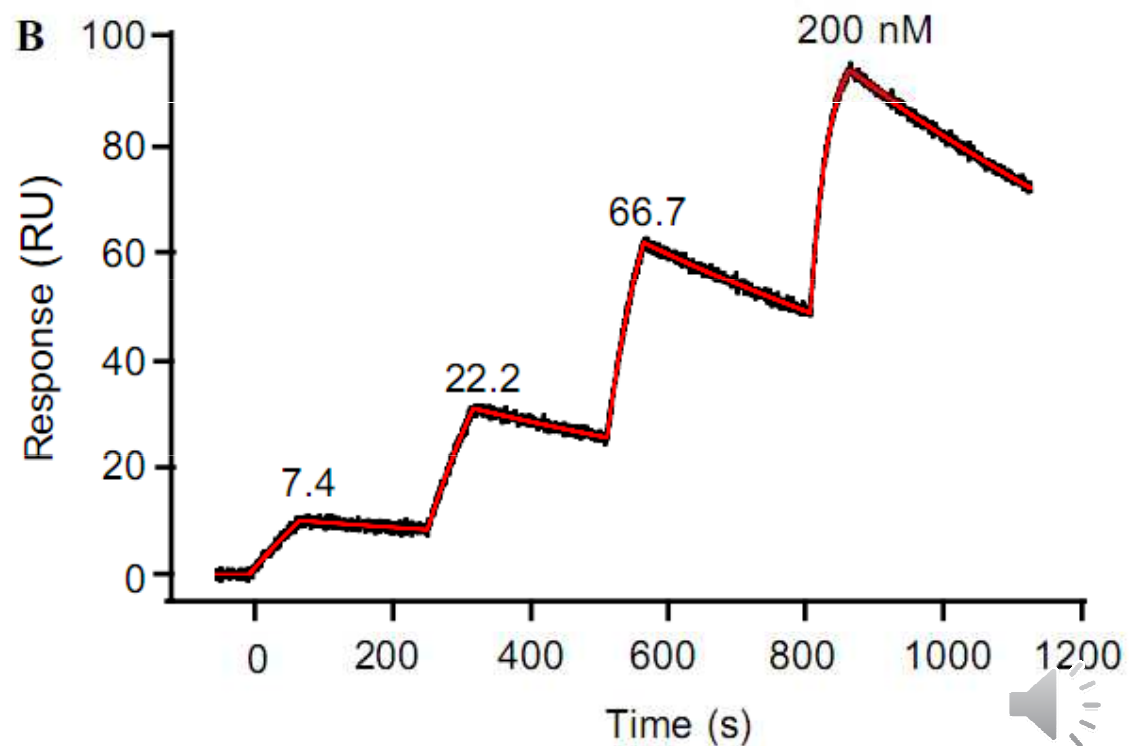
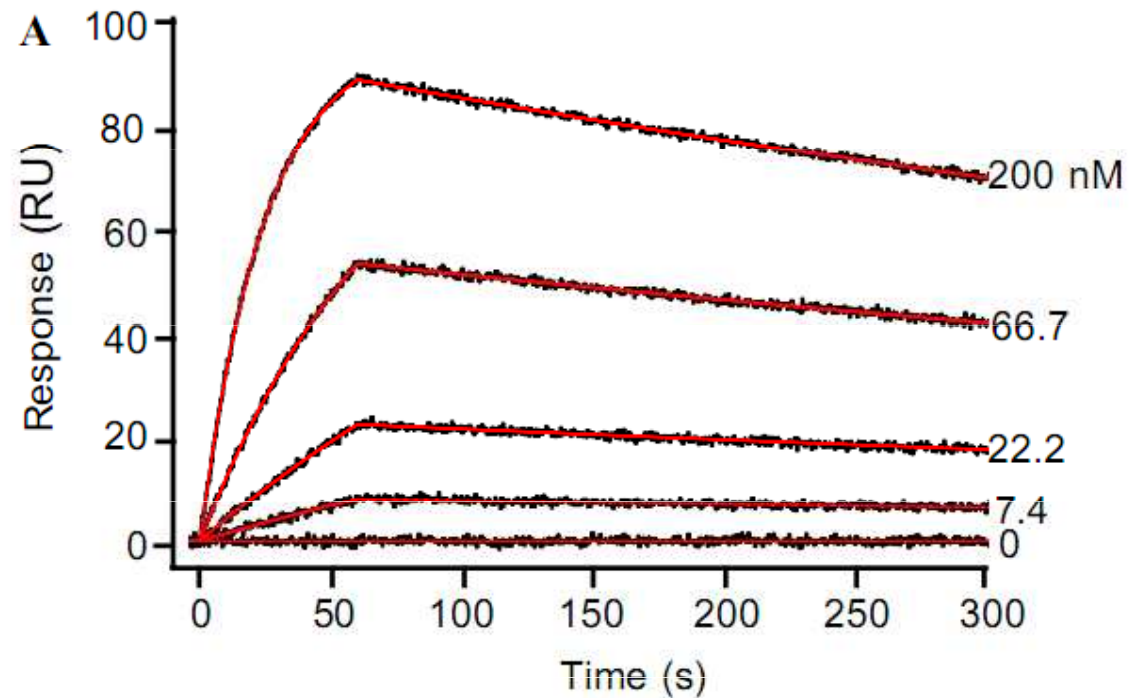
■ **nastává**

■ **nenastává**



# Kinetická „titrace“

- nestřídá se interakce a regenerační krok, ale interakce následují těsně za sebou
- hodnocení – globální analýza (program CLAMP)



# I složené systémy lze „rozpočítat“

- analýza interakce na povrchu s heterogenním ligandem

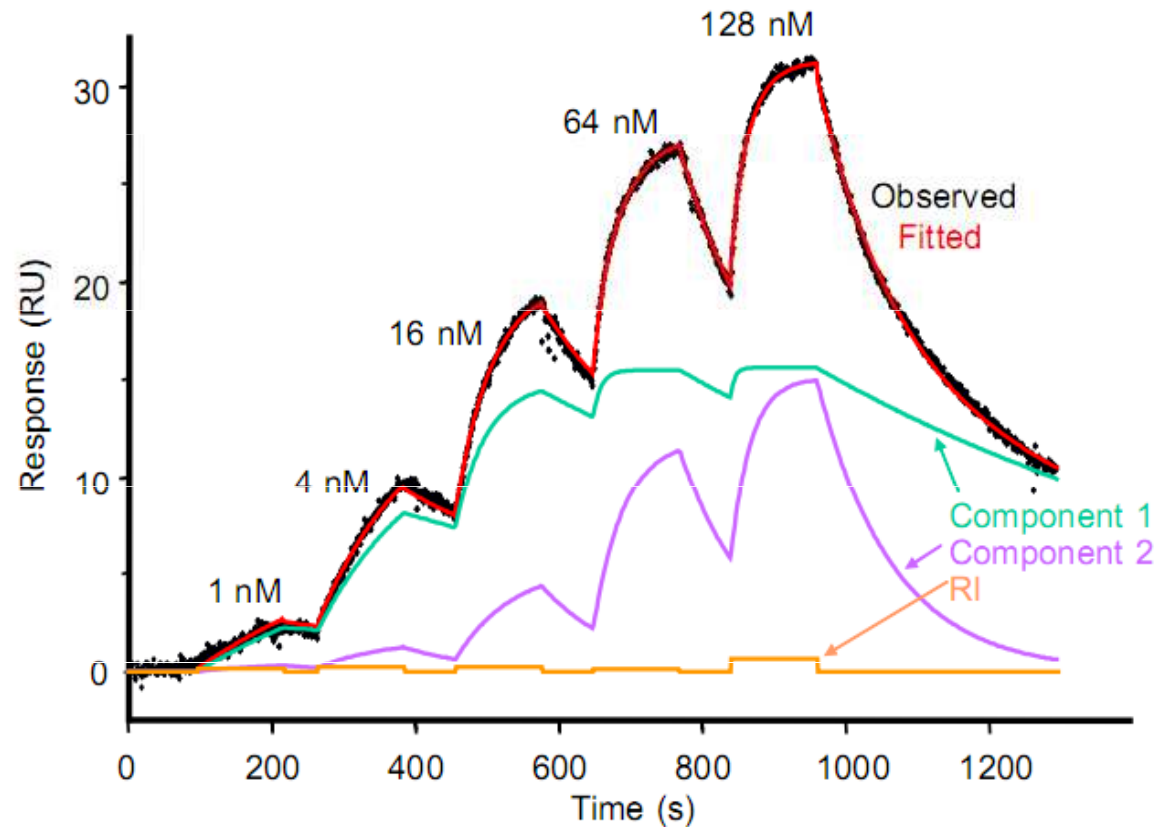


Fig. 10. Kinetic titration analysis of complex systems. The interaction of  $\beta$ 2- $\mu$  with an antibody was tested at concentrations of 1, 4, 16, 64, and 128 nM. Each analyte concentration was injected over the surface at a flow rate of 30  $\mu$ L/min for 120 s. The plot shows the observed response data (shown in black) and the fit to a kinetic titration model for surface heterogeneity (shown in red). Based on the fit, the data consist of components 1 and 2 (deconvoluted individual components are shown in green and purple). The refractive index (RI) correction applied to the fitted data set is indicated in orange at the bottom of the plot.



**Se vším  
pomůže  
software.**

## **Predefined models**

**Models for simultaneous ka/kd**

*1:1 (Langmuir) binding*

*1:1 binding with drifting baseline*

*1:1 binding with mass transfer*

*Bivalent analyte*

*Heterogeneous analyte (competing reactions)*

*Heterogeneous ligand (parallel reactions)*

*Two-state (conformational change)*

**Models for separate ka/kd**

*1:1 (Langmuir) association*

*1:1 (Langmuir) dissociation*

**Models for general fitting**

*4-parameter equation*

*Linear fit*

*Solution affinity*

*Steady state affinity*

**Additional models**

*1:1 binding with exponential baseline drift*

*1:1 binding with mass transfer km(m/s)*

*1:1 Langmuir association (kobs)*

*Average*

