

C6200–Biochemické metody

14E_VAZBA

MAKROMOLEKULS LIGANDY

Petr Zbořil

Interakce molekul

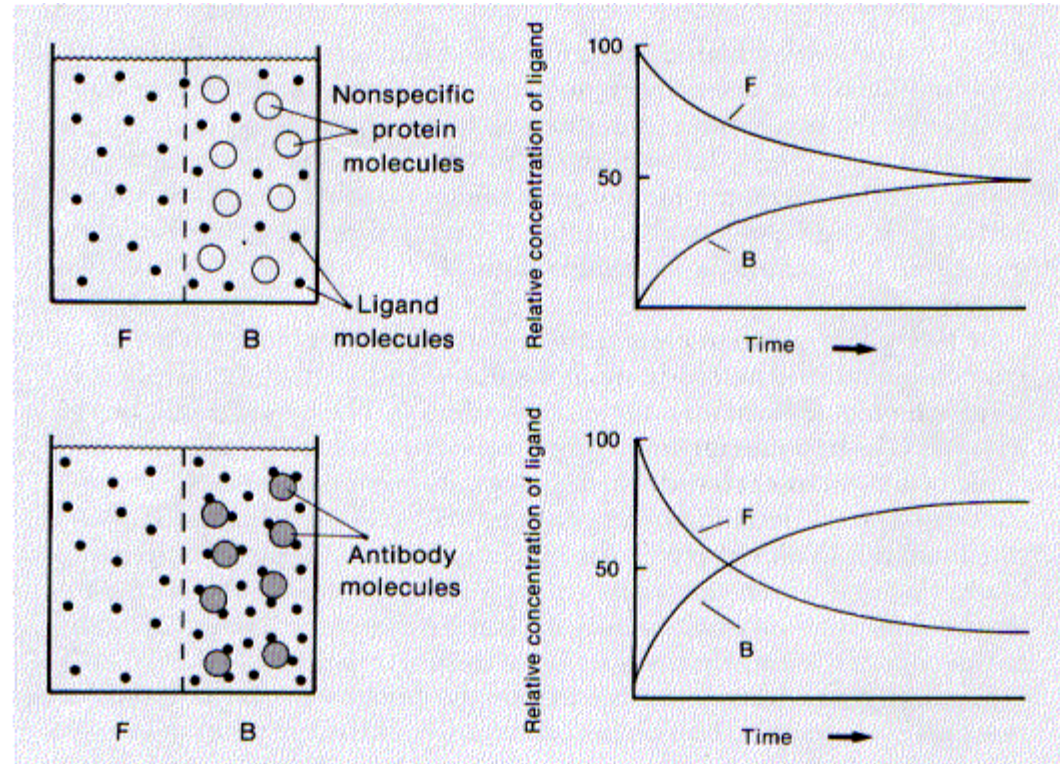
- Makromolekula + ligand (nízkomolekulární)
 - Obdoba E + S
 - Efektory, modulátory apod.
- Interakce makromolekul
 - Protein-protein
 - Protein-NK
- Určení hodnot M_f , L_f , L_b

Stanovení hodnot

- Separace vázaného a volného ligandu
 - rovnovážná dialýza
 - MS
 - GPC
 - centrifugace

Separace vázaného a volného ligandu

- Rovnovážná dialýza
 - Dlouhodobý proces
 - Problém nespecifických interakcí



Separace vázaného a volného ligandu

- MS
 - Separace Ab-hapten komplexu

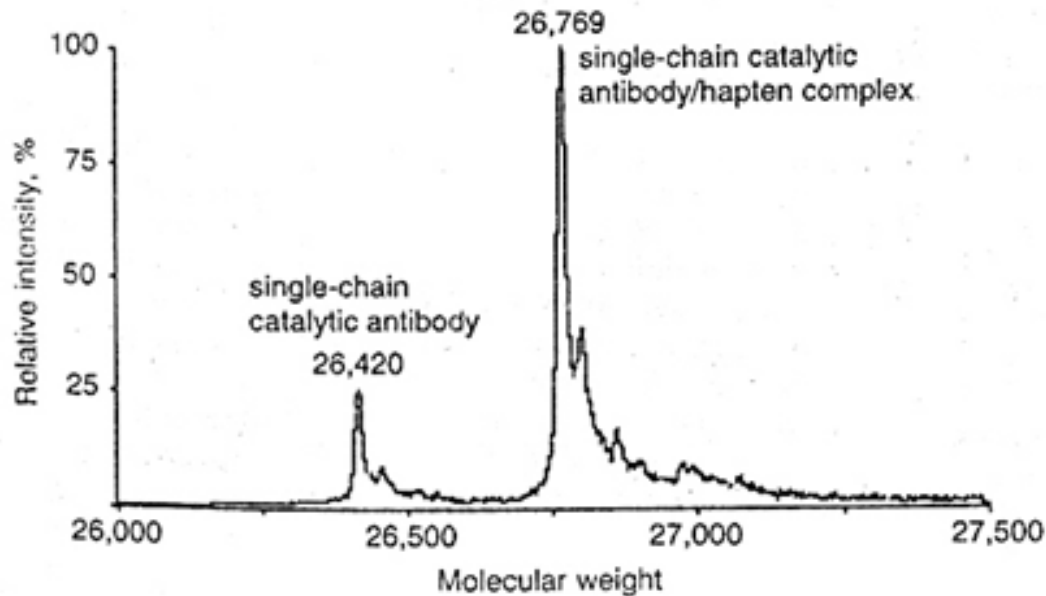


FIG. 8. Noncovalent single-chain catalytic antibody-hapten complex as observed with computationally assisted electrospray (ion spray) mass analysis. Reproduced with permission from ref. 34 (copyright American Chemical Society, Washington, DC).

Separace vázaného a volného ligandu

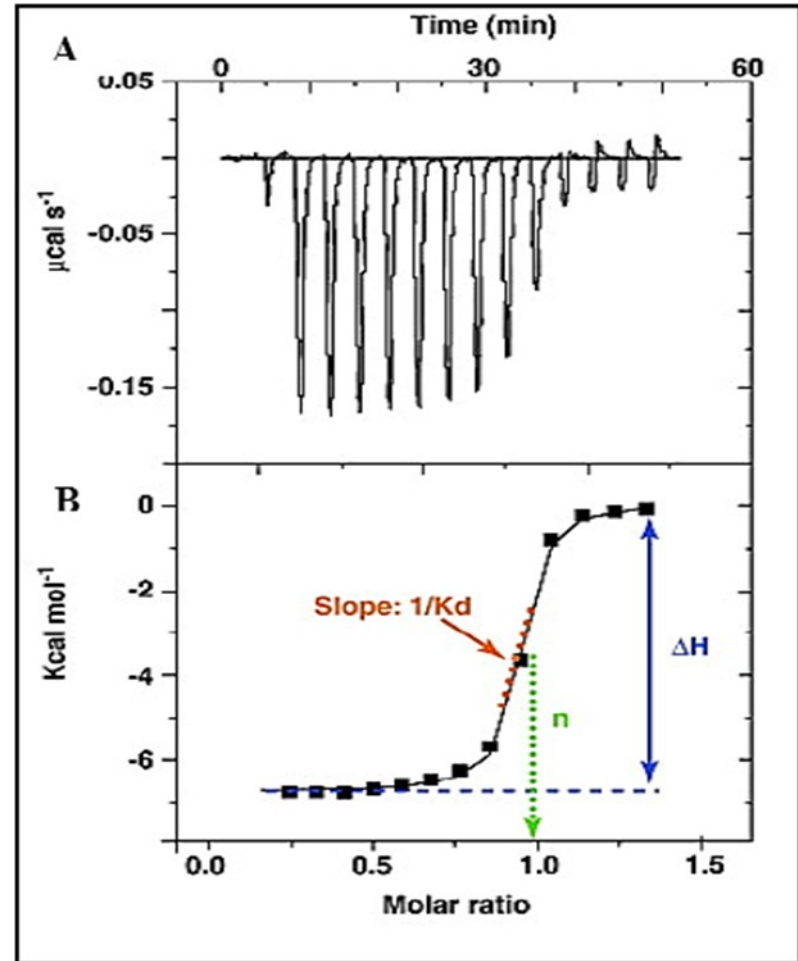
- GPC
 - Ligand v elučním pufru
 - Rovnováhy na patrech
 - Vrchol následovaný depresí
- Centrifugace
 - Partikulární suspenze - částice
 - Problém nespecifické adsorpce - plast

Stanovení hodnot

- Analýza vazby bez separace – změna vlastností
 - spektrální metody
 - fluorescenční sondy, Q, FRET
 - piezoelektrické stanovení komplexu
 - $\Delta f_{\text{res}} = f(\Delta m)$
 - jiné specifické metody
 - Mikrokalorimetrie - titrace

Mikrokalorimetrie

- Titrate ligandem



Analýza vazby - parametry

- Model dle
 - Scatcharda
 - Stejnocenná vazná místa (stejně K)
 - Neovlivňují se
 - Hilla
 - Kooperativita vazných míst – ovlivnění + i -
 - NNEM
 - Negativní kooperativita, vyloučení souseda
 - Speciálně pro DNA

Scatchardův model



$$K_{as} = [L_b] / ([M_f] \cdot [L_f]) = [L_b] / ([M_t](n-v) \cdot [L_f])$$

$$[L_b] / [M_t] = v, \quad [L_b] = v \cdot [M_t], \quad K_{as} = v / (n-v) \cdot [L_f]$$

$$K_{as} \cdot (n-v) = v / [L_f] \quad K_{as} \cdot n - K_{as} \cdot v = v / [L_f]$$

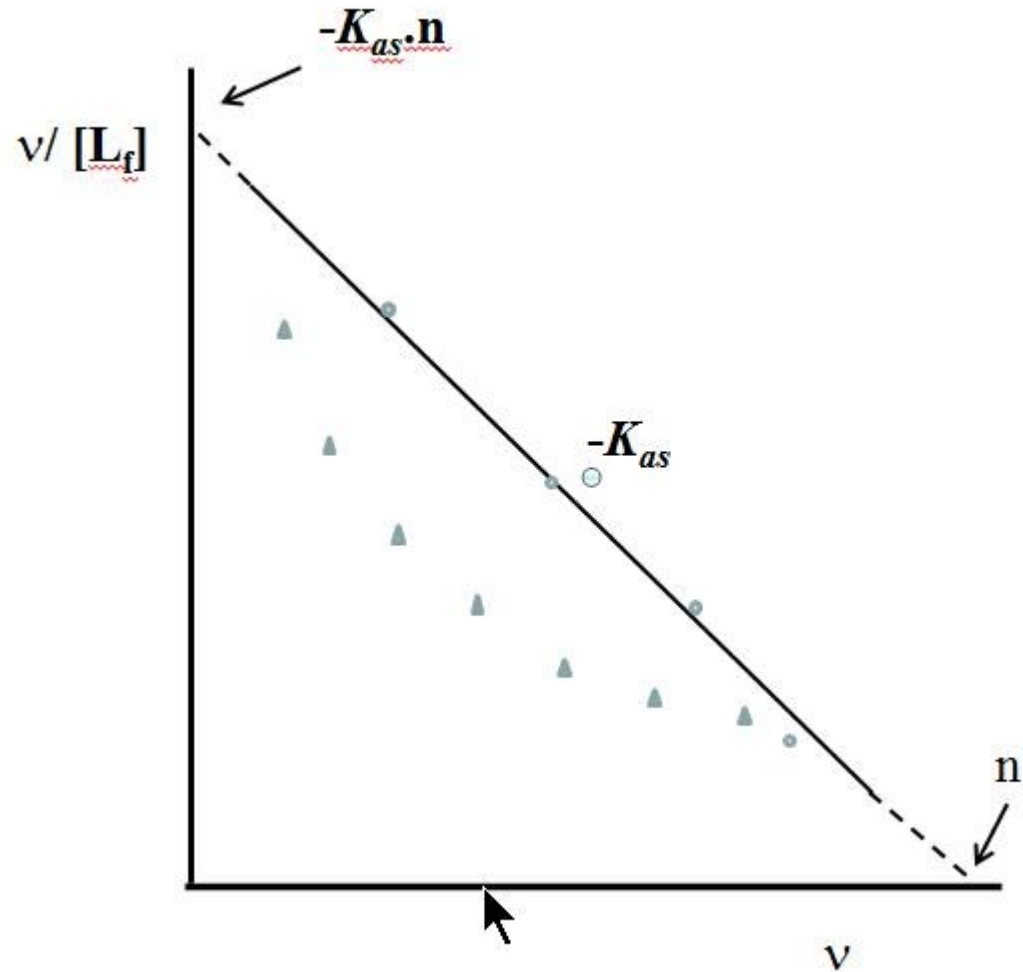
Scatchardův model

Grafické

Znázornění

odpovídá \circ

nesedí \triangle



Kooperující vazná místa – Hill



$$K_H = [L_b]/([L_f]^m \cdot [M_f]) = [L_b] / [L_f]^m \cdot (n - v) \cdot [M] = \\ = v / (n - v) \cdot [L_f]^m$$

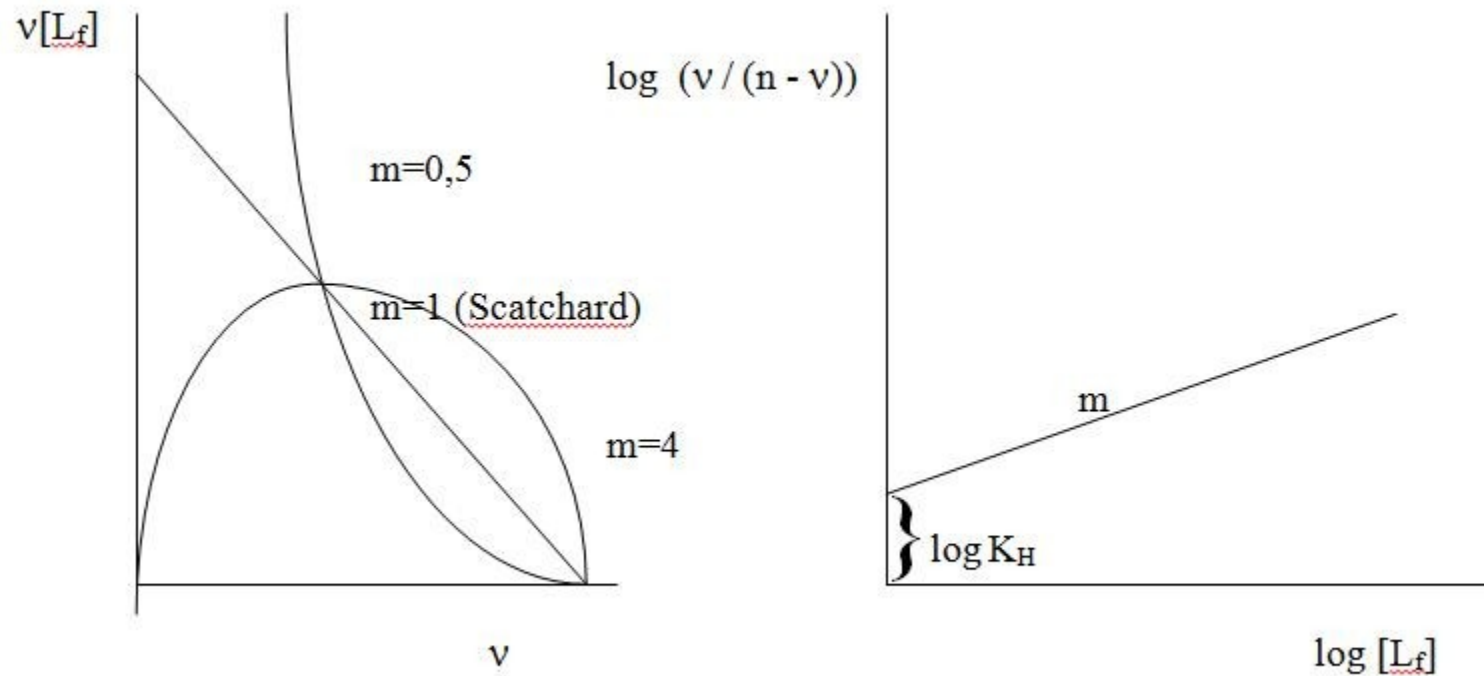
$$K_H \cdot (n - v) = v / [L_f]^m$$

$$K_H \cdot [L_f]^m = v / (n - v)$$

$$\log K_H + m \cdot \log [L_f] = \log (v / (n - v))$$

Kooperující vazná místa – Hill

K_H se nemění



NNEM

Nearest neighbour exclusion model

Typické pro interkalaci ligandů do šroubovice DNA

Rozsah

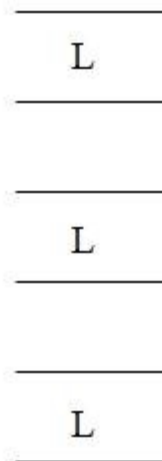
vyloučení

- Nejmenší

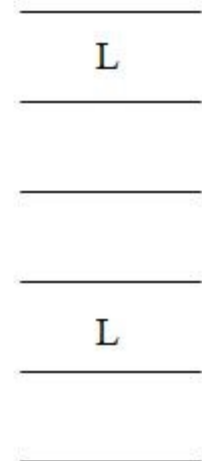
počet bp

mezi ligandy

$N_0=2$



$N_0=3$



NNEM

$$v_0/[L_f] = K_0 \cdot (1 - N_0 v_0) \cdot [(1 - N_0 v_0) / (1 - (N_0 - 1) v_0)]^{N_0 - 1}$$

$$\text{pro } v_0 \rightarrow 0 \quad v_0/[L_f] = K_0$$

$$\text{pro } v_0/[L_f] \rightarrow 0 \quad v_0 = 1/N_0$$

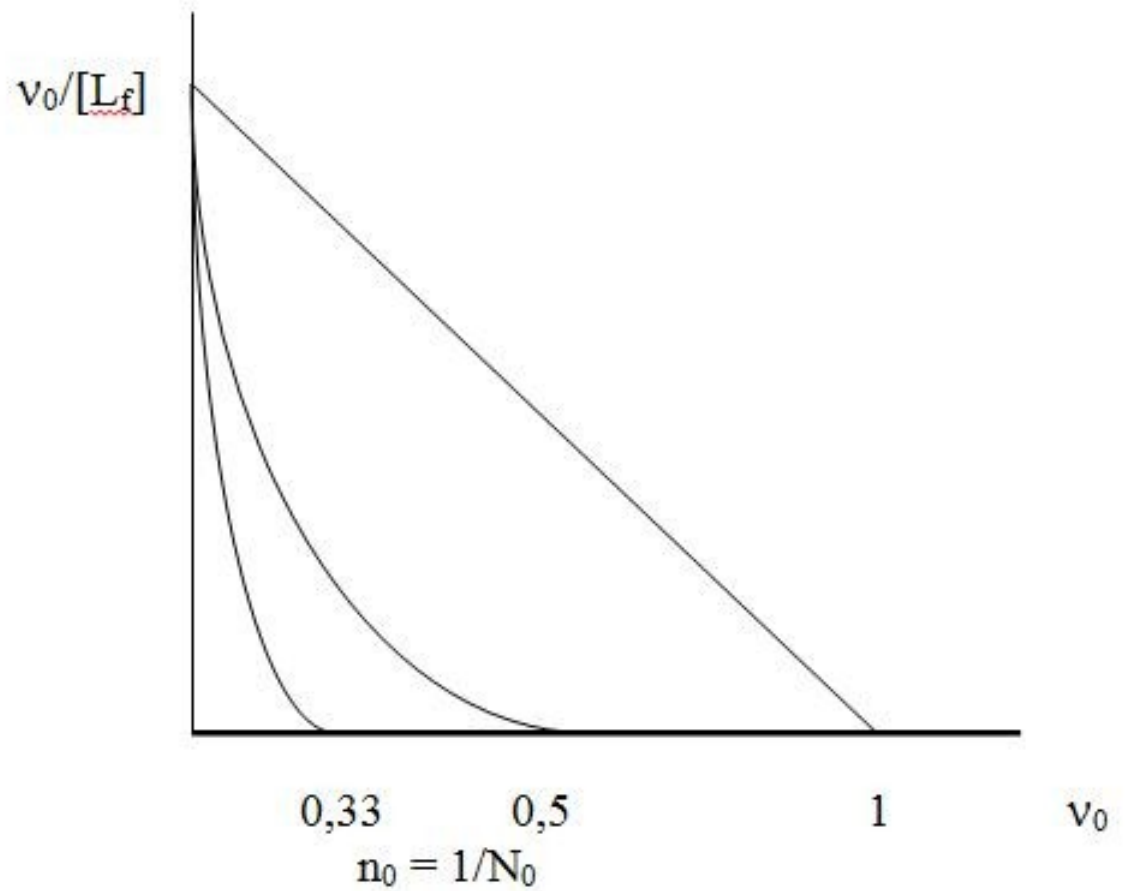
K_0 – vazebná konstanta pro izolované vazné místo

$v_0 = c$ vázaného ligandu / c párů bazí - max. 1

$N_0 =$ rozsah vyloučení, minimální počet párů bazí mezi ligandy (pro 1 žádné vyloučení)

NNEM

Grafické
vyjádření



DĚKUJI ZA POZORNOST