

C6200–Biochemické metody

14E\_VAZBA

MAKROMOLEKULS LIGANDY

Petr Zbořil

# Interakce molekul

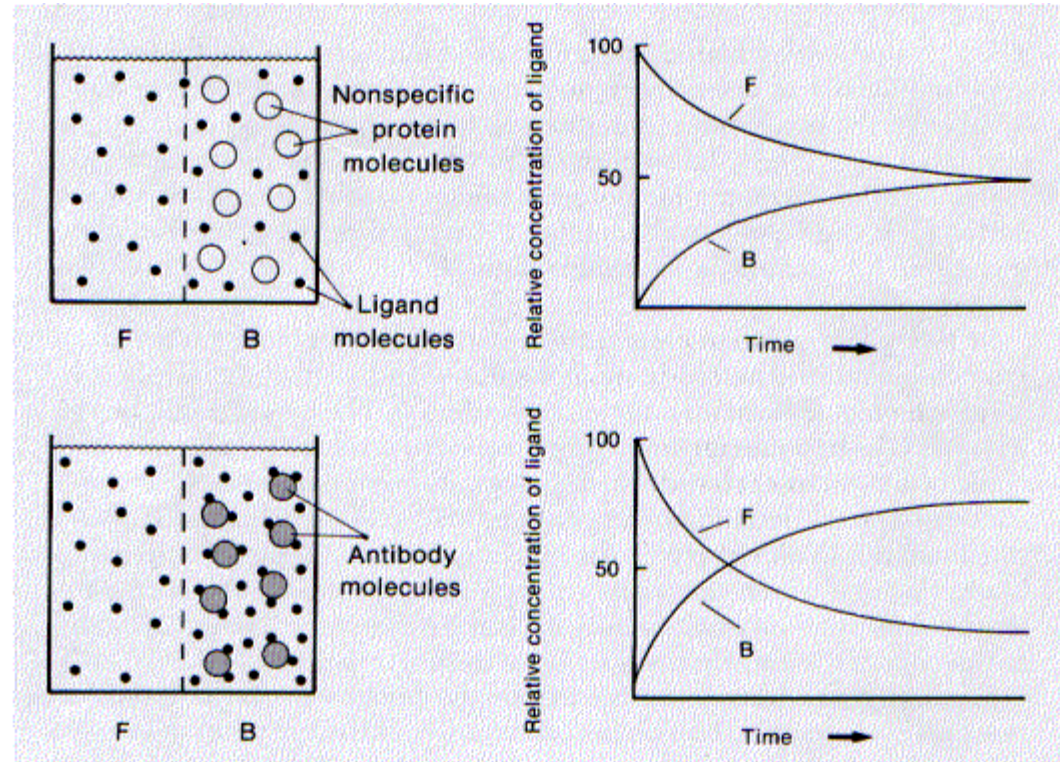
- Makromolekula + ligand (nízkomolekulární)
  - Obdoba E + S
  - Efektory, modulátory apod.
- Interakce makromolekul
  - Protein-protein
  - Protein-NK
- Určení hodnot  $M_f$ ,  $L_f$ ,  $L_b$

# 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

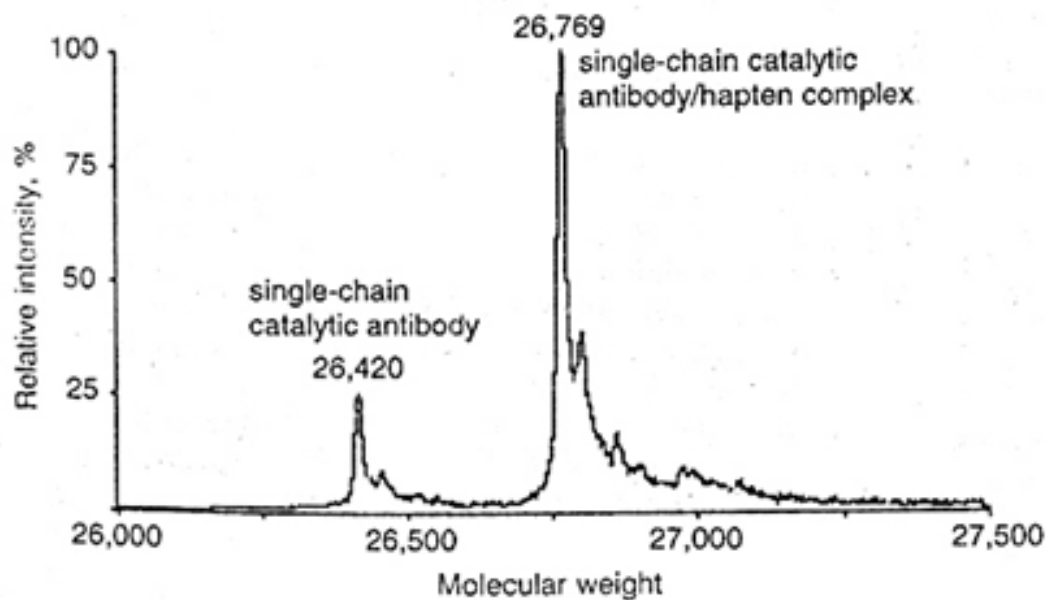


FIG. 8. Noncovalent single-chain catalytic antibody-hapten complex as observed with cumulatively assisted electrospray (ion spray) mass analysis. Reproduced with permission from ref. 34 (copyright American Chemical Society, Washington, DC).

# Separace vázaného a volného ligandu

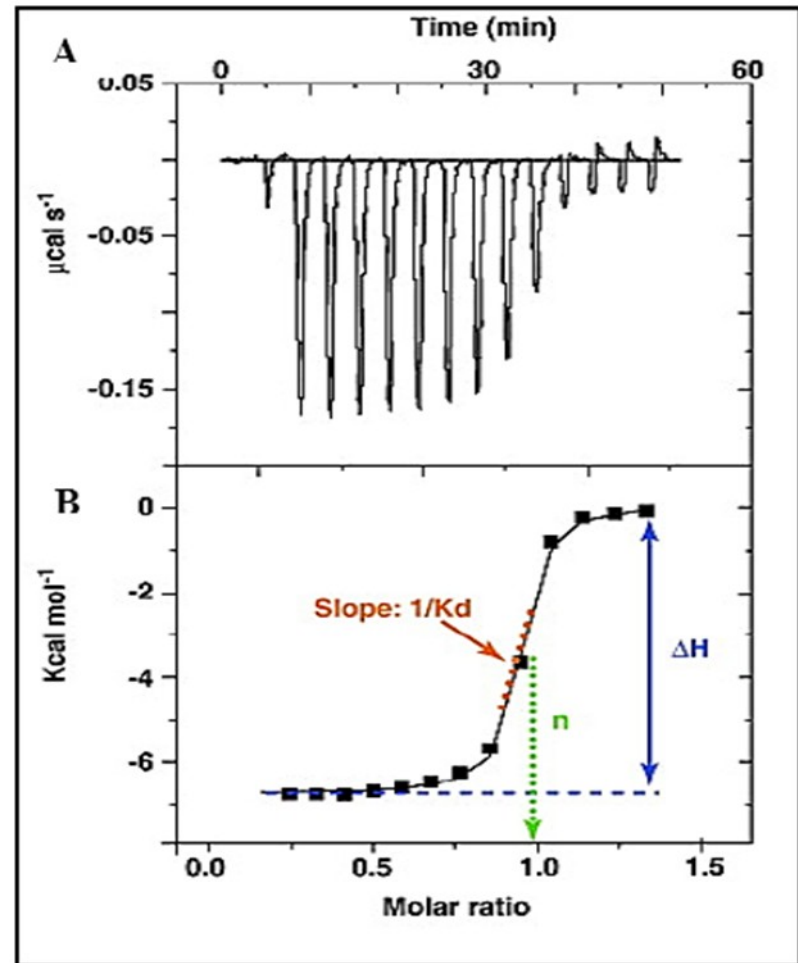
- GPC
  - Ligand v elučním pufru
  - Rovnováhy na patrech
  - Vrchol následovaný depresí
- Centrifugace
  - Partikulární suspenze - částice
  - Problém nespecifické adsorpce - plast

# 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



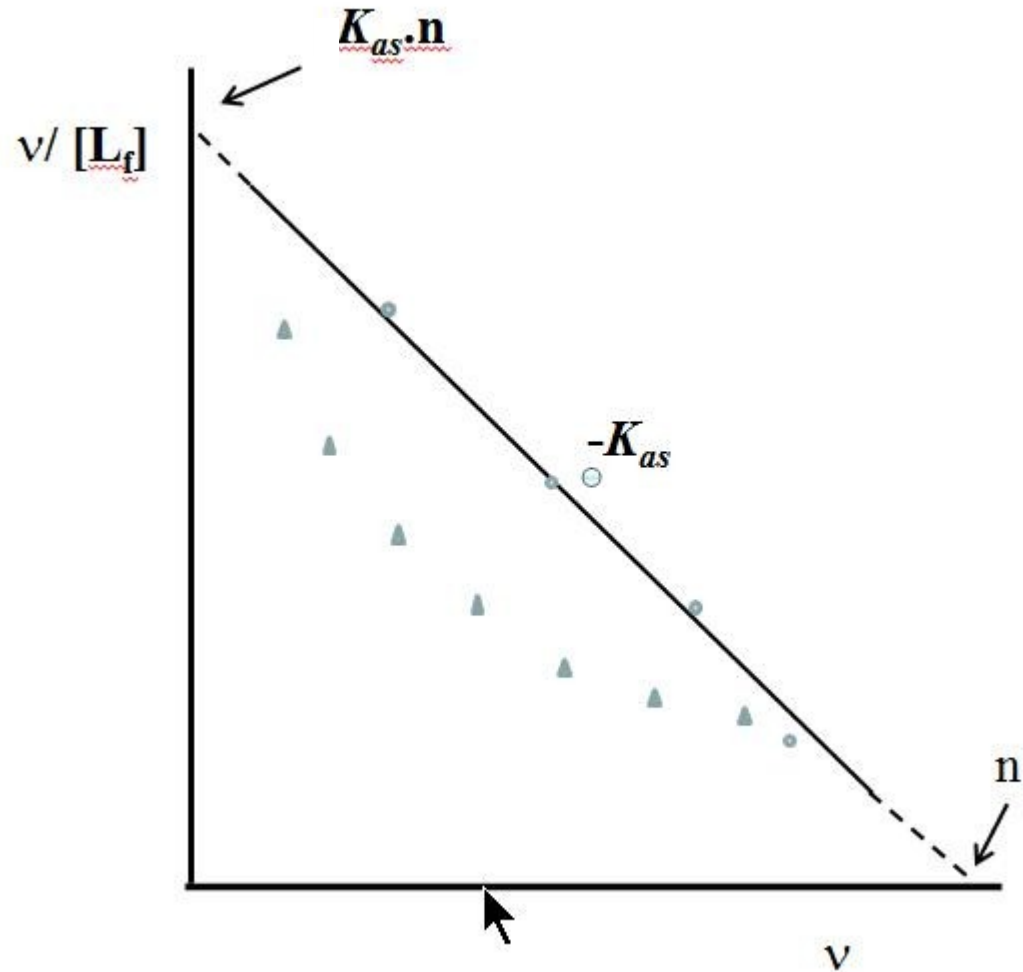
$$K_{as} = [L_b] / ([M_f] \cdot [L_f]) = [L_b] / ([M_t](n-v) \cdot [L_f])$$

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

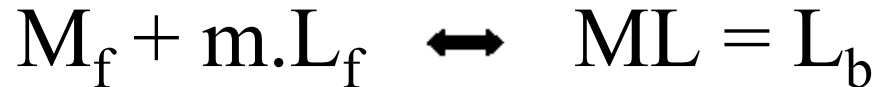
$$K_{as} \cdot (n-v) = v / [L_f] \quad K_{as} \cdot n - K_{as} \cdot v = v / [L_f]$$

# Scatchardův model

Grafické  
Znázornění  
odpovídá  $\circ$   
nesedí  $\triangle$



# Kooperující vazná místa – Hill



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

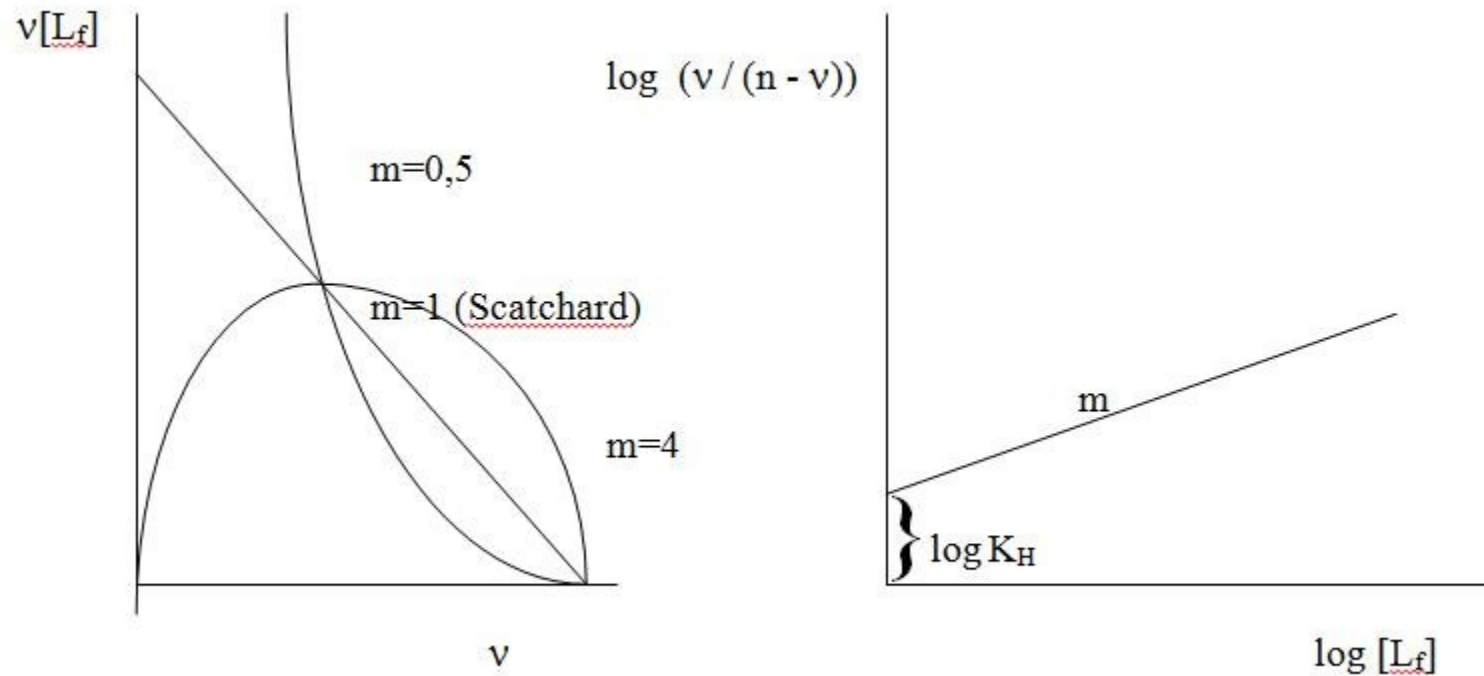
$$K_H \cdot (n - v) = v / [L_f]^m$$

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

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

# Kooperující vazná místa – Hill

$K_H$  se nemění



# NNEM

Nearest neighbour exclusion model

Typické pro interkalaci ligandů do šroubovice DNA

Rozsah

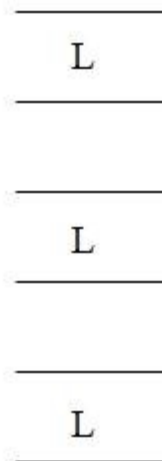
vyloučení

- Nejmenší

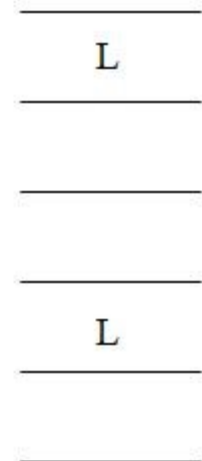
počet bp

mezi ligandy

$N_0=2$



$N_0=3$



# NNEM

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

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

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

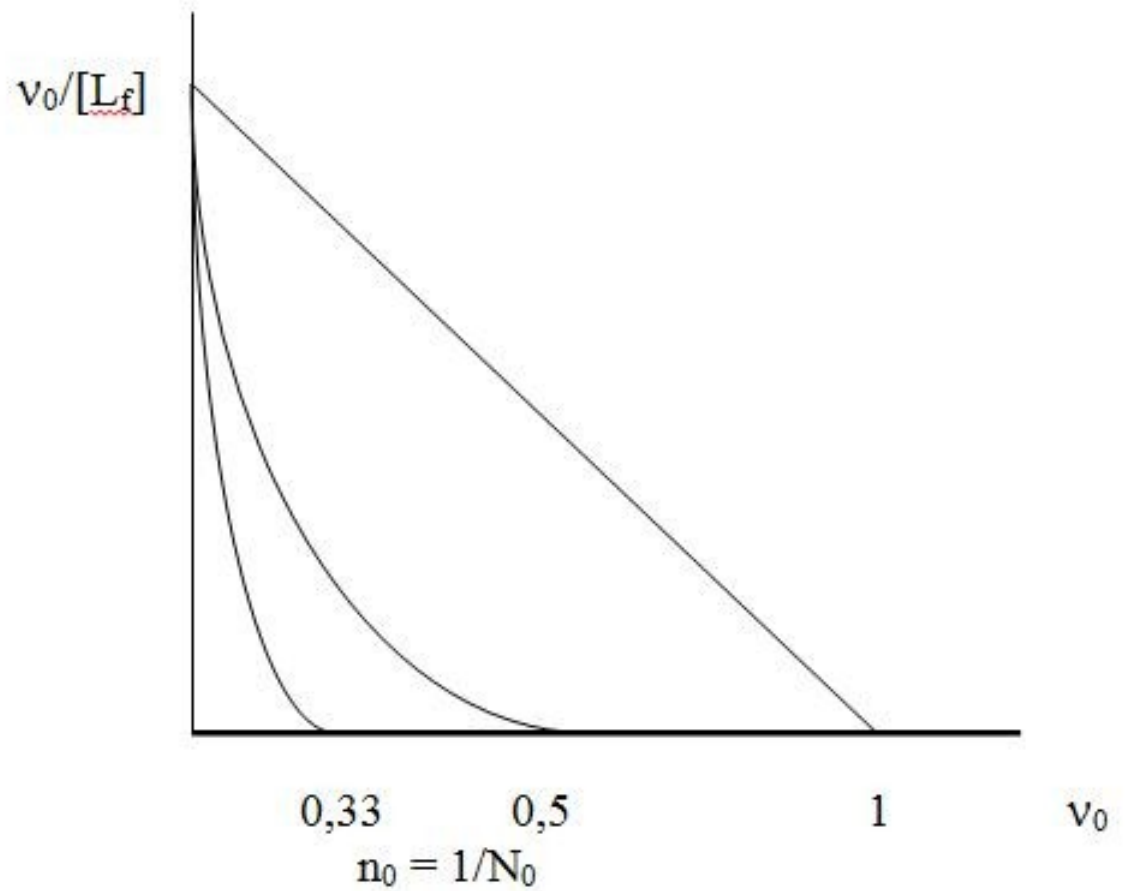
$K_0$  – vazebná konstanta pro izolované vazné místo

$v_0 = c$  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