

Vpogled v vezave molekul in metode za merjenje interakcij

- Kadar se molekularna stanja močno razlikujejo, je pri oceni njihove verjetnosti (p_i) potrebno upoštevati tudi razliko v entropiji:

$$p_i \propto P_i e^{-E_i/kT} = e^{-E_i/kT + \ln P_i}$$

$$p_i \propto e^{-G_i/kT}$$

- Kadar se število delcev N_j lahko spreminja, prosto energijo na posamezen delec (molekulo vrste j) opisuje *kemijski potencial* (μ_j):

$$\mu_j = \frac{\partial G_i}{\partial N_i}$$

- Pri zmesih je vedno prisoten entropijski prispevek zaradi koncentracije:

$$\mu_j = \mu_j^0 + kT \ln(c_j/M)$$

Dinamika kemijskih reakcij

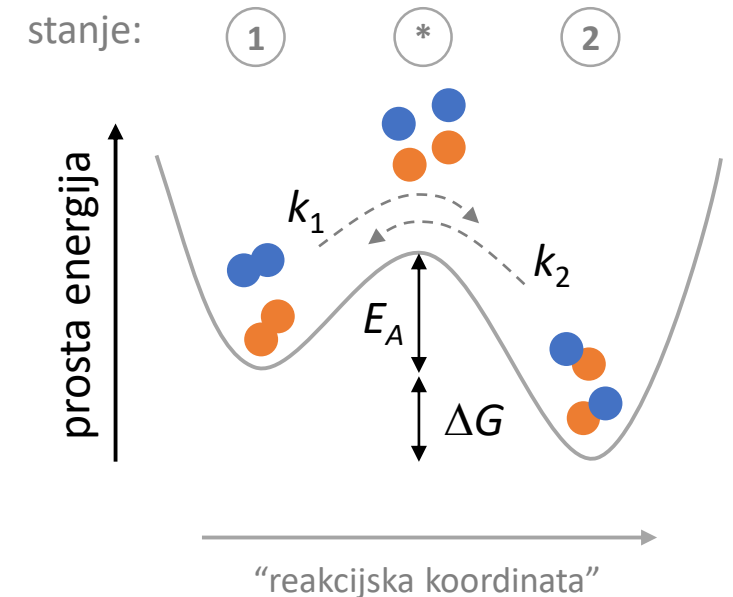
- Hitrost reakcije (spreminjanje koncentracij) je odvisna od verjetnosti vmesnega stanja:
 - koncentracije snovi v izhodiščnem stanju (c_i) ter
 - “neugodnosti” vmesnega stanja * (*aktivacijska energija, E_A*):

$$\frac{dc_2}{dt} = k_1 c_1 - k_2 c_2 \quad k_1 = A e^{-(E_A - G_1)/kT}$$
$$k_2 = A e^{-(E_A - G_2)/kT}$$

- Razmerje koncentracij snovi v ravnovesju ($dc/dt = 0$), ki jih opisuje *ravnotežna konstanta reakcije (K)*, določa razlika proste energije med stanjema (ΔG):

$$\frac{c_2}{c_1} = \frac{k_1}{k_2} = K = e^{-\Delta G/kT}$$

- Reakcija teče spontano ($K > 1$), če imajo produkti nižjo prosto energijo od reaktantov ($\Delta G < 0$).



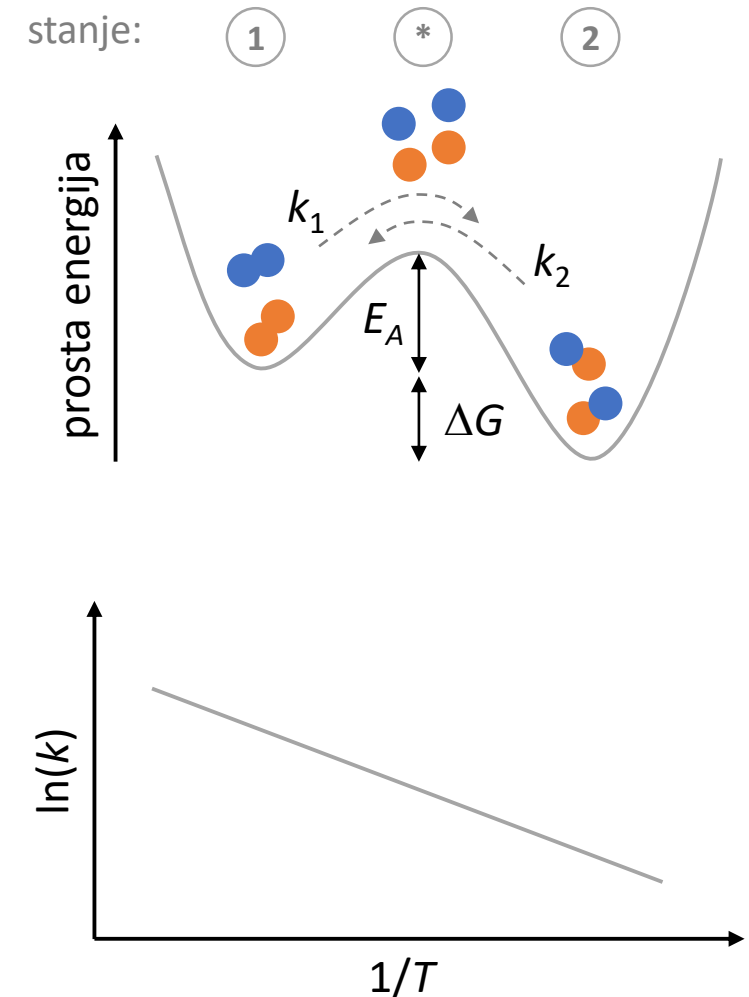
Katalizatorji (encimi) pospešijo reakcijo (znižajo E_A), ne spremenijo pa ravnovesnih koncentracij!

Dinamika kemijskih reakcij

- Katalizatorji (encimi) pospešijo reakcijo (znižajo E_A), ne spremenijo pa ravnovesnih koncentracij!
- Aktivacijsko energijo lahko določimo iz temperaturne odvisnosti hitrosti reakcije (Arrheniusova relacija):

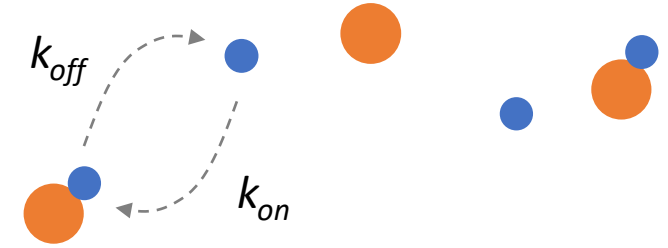
$$\ln(k_1) = \ln(A) - \frac{E_A}{k} \frac{1}{T}$$

- Tudi pri kompleksnih bioloških kaskadah reakcij celokupno hitrost navadno določa ena od stopenj (“*rate-limiting step*”).



Dinamika vezave med molekulami

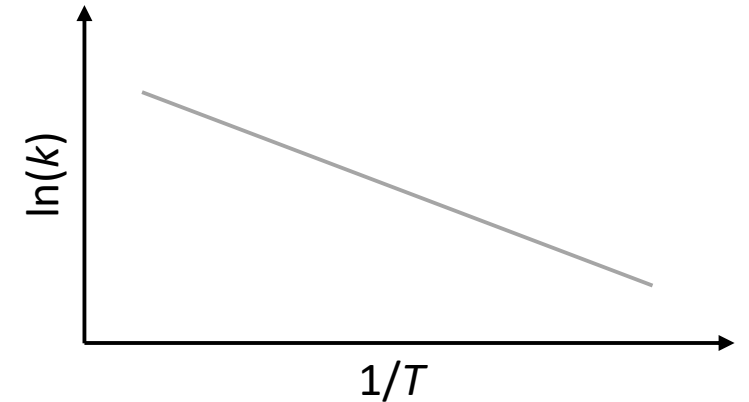
- Tudi pri vezavi liganda na receptor $A + B \leftrightarrow AB$ gre za dinamično ravnovesje med reakcijama vezave (k_{on}) in odcepljanja (k_{off}). Nekaj liganda vedno ostane prostega.
- Ravnovesne koncentracije ponovno določa razlika v prosti energiji med vezanim in nevezanim ligandom:
- Jakost vezave namesto s K pogosto izrazimo z *disociacijsko konstanto* $K_d = 1/K$, ki ima enoto c . Pri $c_A = K_d$ bo zasedena polovica vezavnih mest.



$$\frac{c_{AB}}{c_A c_B} = \frac{k_{on}}{k_{off}} = K = e^{-\Delta G/kT}$$

Ali spremembe vodi energija ali entropija?

- Prosto energijo lahko zniža
 - znižanje energije (tvorba novih vezi)
 - eksotermna reakcija
 - povišanje entropije (možnost novih konfiguracij)
 - endotermna reakcija
- Prispevka energije in entropije lahko določimo
 - preko temperaturne odvisnosti ravnotežne konstante (Arrheniusova relacija):
 - z merjenjem sproščene/absorbirane toplote (kalorimetrija)



$$\ln(K) = -\frac{\Delta G}{k} \frac{1}{T} = \frac{\Delta S}{k} - \frac{\Delta E}{k} \frac{1}{T}$$

Kalorimetrija

- Energijska vrednost hrane, **kalorija**
- V bioloških sistemih nas pri **kalorimetriji** zanima količina energije (**TOPLOTE**), ki se sprosti ali porabi pri nastanku ali razdiranju vezi, npr. pri
 - razvijanju ali denaturacijo proteinov
 - faznih prehodih v lipidnih membranah
 - interakcijah encim/inhibitor, antigen/protitelo
- Toplota je povezana z entalpijo in entropijo:
(pri kalorimetriji je specifična toplota izražena na mol, ne kg!)

100g izdelka vsebuje povprečno:		
energijska vrednost kJ/kcal	301/71	
beljakovine	2,9 g	
ogljikovi hidrati	12,4 g	
od teh sladkorj	11 g	
maščoba	1,1 g	

H₂O: $c_p = 4180 \text{ J/kgK} = 4.18 \text{ kJ/kg K} = 1 \text{ kcal/kg K}$

tipična potreba po energiji za odraslega človeka
→ cca. **2500 kcal/dan = 10000 kJ/dan**

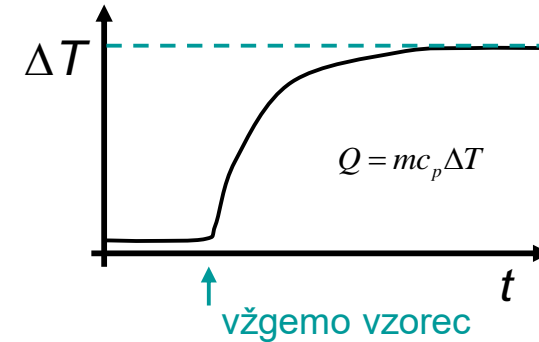
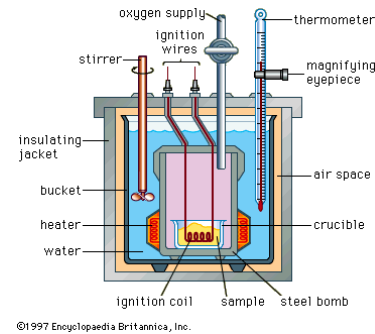
$$Q = mc_p \Delta T$$

$$dH = c_p dT, \quad dS = \frac{c_p}{T} dT$$

Q ... toplota
m ... masa
 c_p ... specifična toplota
T ... temperatura

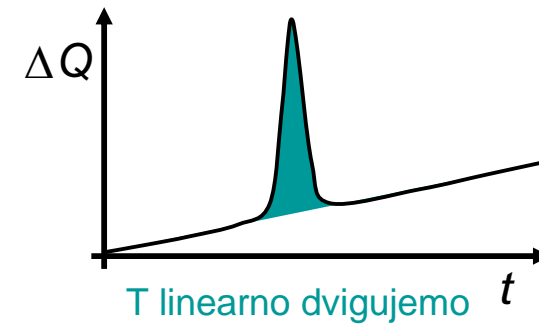
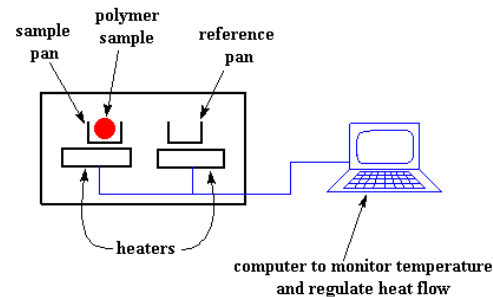
Kalorimetrija – tri izvedbe

- **Adiabatna kalorimetrija**
(meri toploto zgorovanja)

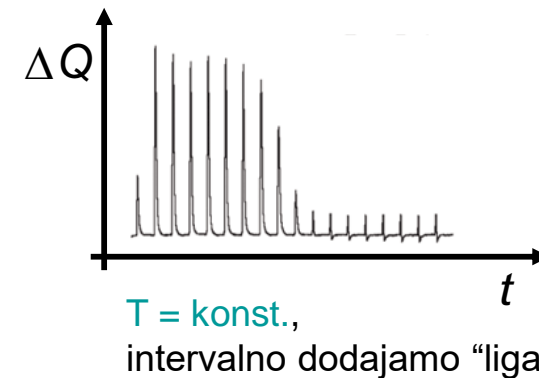
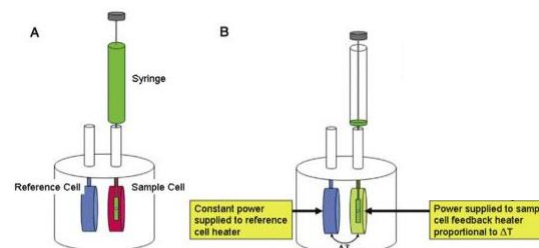


V bioloških sistemih:

- **Diferencialna dinamična kalorimetrija**
(spremljamo podiranje vezi v molekuli)



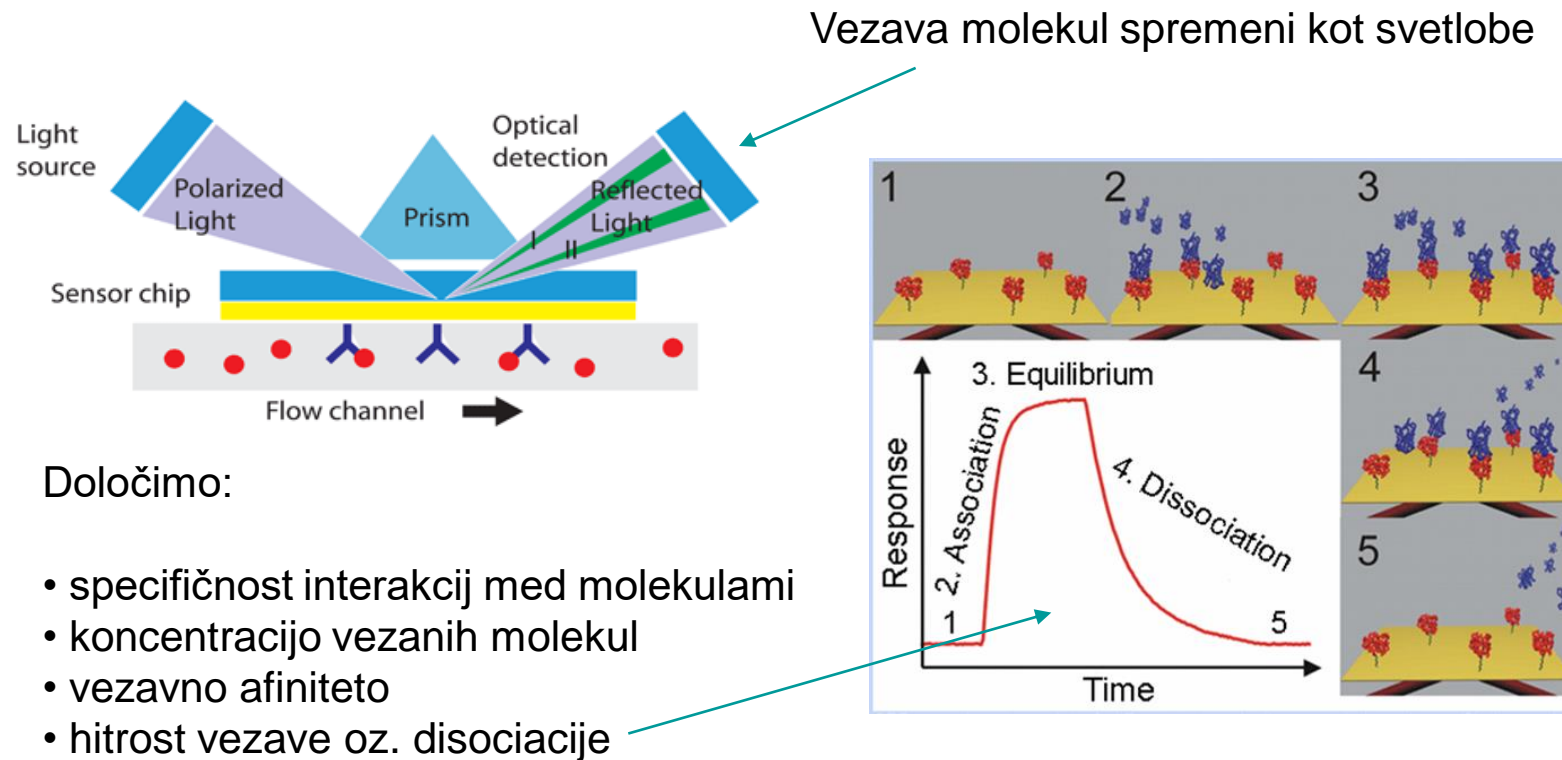
- **Izotermna titracijska kalorimetrija**
(spremljamo vezavo med molekulami)



Površinska plazmonska resonanca (SPR)

ko zastavice zatemnijo nebo

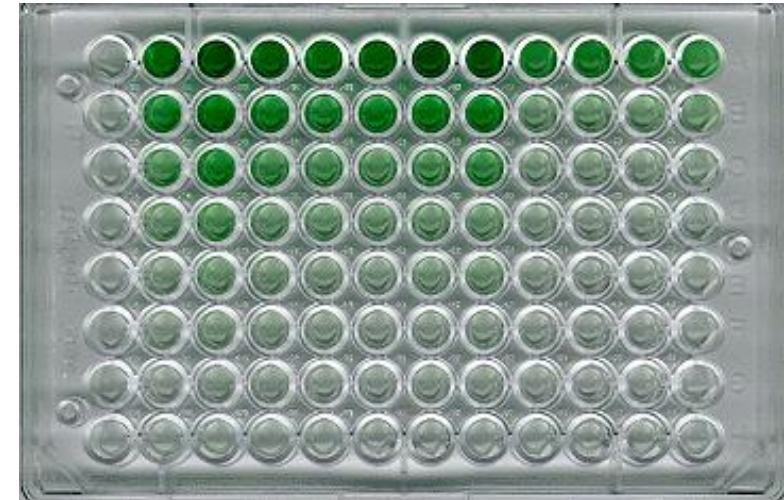
- Ko spremenimo opazovano tekočino, spremenimo lastnosti odbite svetlobe !



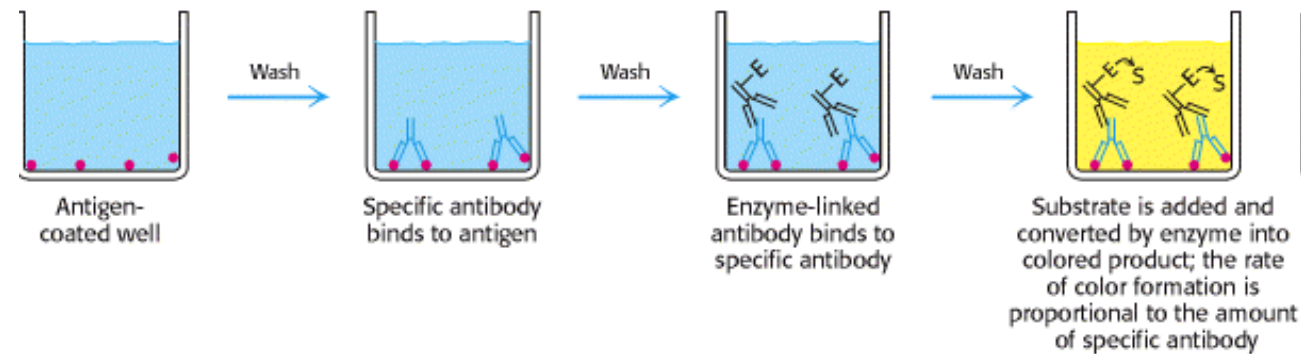
Encimskoimunski test

z molekularnim ojačevalcem vidimo dlje

- Že vezava enega samega encima preko antigena ali protitelesa pretvori mnogo molekul substrata v molekule drugačne barve!



(A) Indirect ELISA



(B) Sandwich ELISA

