

a.a. 2021-2022

Corso di  
**Proprietà di Biopolimeri**

*Prof. Ranieri URBANI*

*Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche*  
rurbani@units.it

**Calorimetria di Titolazione Isoterma (ITC)**

**Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC)**

La calorimetria differenziale a scansione misura la capacità termica molare apparente di una proteina o di un'altra macromolecola in funzione della temperatura.

La successiva manipolazione di questa quantità fornisce una **completa caratterizzazione termodinamica** di una transizione.

In generale, possono essere ottenuti tre diversi tipi di informazioni dalla DSC:

1. La **capacità termica parziale assoluta** di una molecola;
2. I parametri termodinamici complessivi (variazione di entalpia [ $\Delta H$ ], di entropia [ $\Delta S$ ], e di capacità termica [ $\Delta C_p$ ] associati con una transizione indotta dalla temperatura;
3. La **funzione di partizione** e contemporaneamente la popolazione di stati intermedi e i loro parametri termodinamici.

In questa sessione limiteremo la nostra discussione alle proteine monomeriche che subiscono transizioni reversibili di ripiegamento/denaturazione in condizioni di equilibrio.

Le due celle del DSC funzionano in modo **differenziale** in modo tale che la quantità misurata è la differenza di capacità termica tra loro. Questo si ottiene monitorando continuamente la potenza elettrica differenziale necessaria per mantenere la differenza di temperatura tra le due celle uguale a zero, mentre la temperatura viene aumentata ad una velocità costante.

Questa **potenza elettrica differenziale** (di solito data in  $\mu\text{W} = \mu\text{J/s}$  o in  $\mu\text{cal/s}$ ) dopo la normalizzazione per la velocità di scansione produce la differenza di capacità termica tra le due celle (unità di  $\mu\text{J/deg}$  o  $\mu\text{cal/deg}$ ).

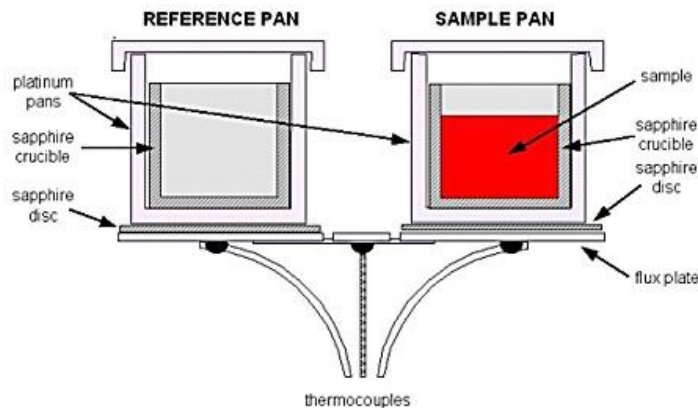
In generale, una singola scansione sarebbe sufficiente per determinare la differenza di capacità termica tra il campione e la soluzione di riferimento.

## DSC - Compensazione di potenza

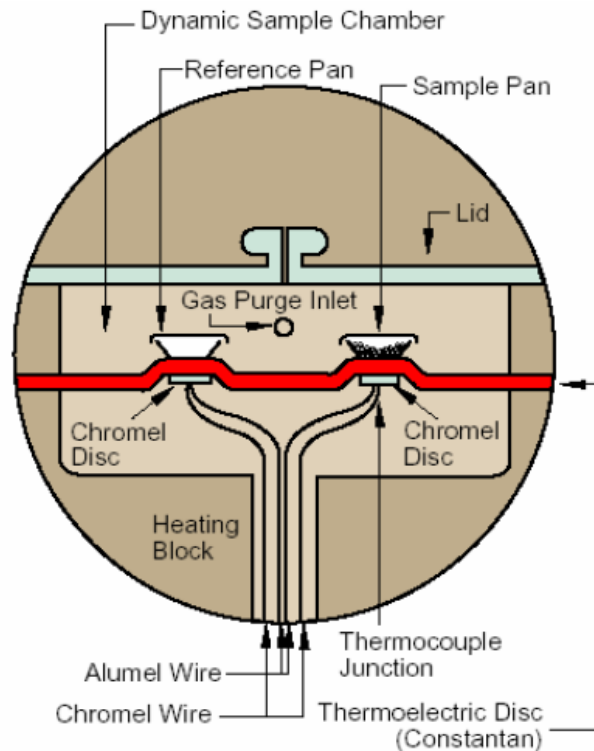
Due forni separati

Portacampioni in cui sono inseriti I termometri a resistenza di platino

Tramite un circuito di controllo viene regolata la potenza di alimentazione dei due forni in modo da eguagliare le loro temperature.



## DSC – Flusso Calore



Il calore fluisce nel campione e nel riferimento attraverso una piattaforma termoelettrica di costantana riscaldata elettricamente

La differenza tra i flussi di calore del campione e del riferimento viene misurata dalle termocoppie poste sotto i campioni.

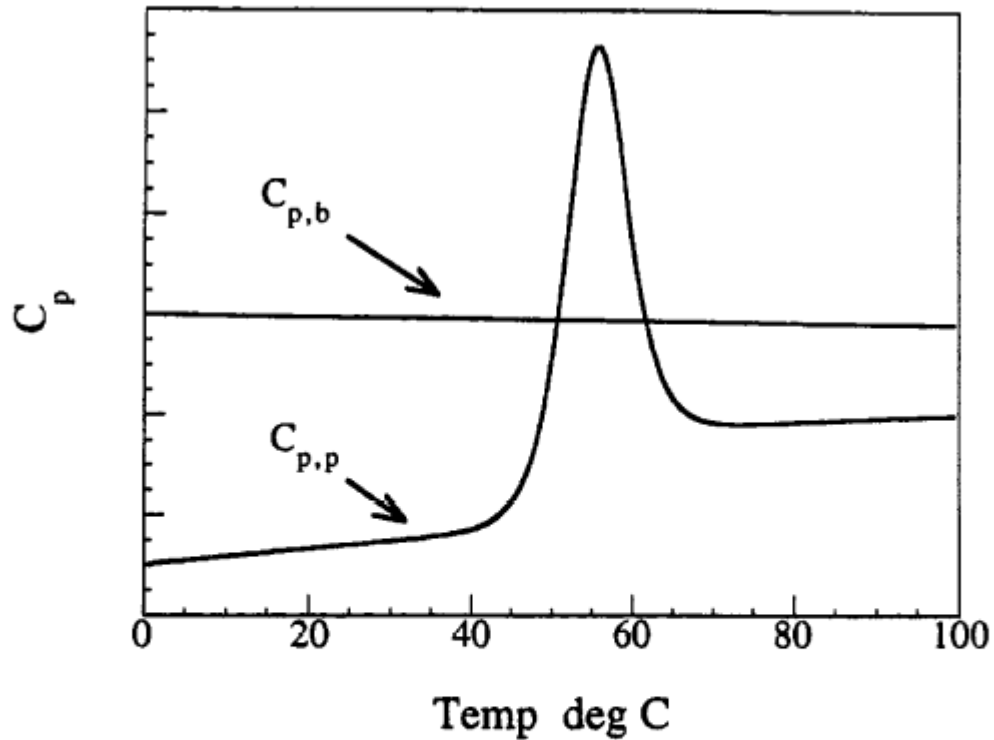
**Il flusso di calore differenziale è direttamente proporzionale alla differenza tra i segnali in uscita dalle termocoppie”**

$$H = H(T, P, n)$$

$$dH = \left( \frac{\partial H}{\partial T} \right)_{P, n} dT$$

$$dH = dQ_p = C_p dT$$

$$\Phi = \frac{dQ_p}{dt} = \left( \frac{\partial H}{\partial T} \right)_{P, n} \frac{dT}{dt} = C_p \beta \quad [\beta] = [^\circ\mathbf{C}/\mathbf{min}]$$



La figura illustra una tipica curva per una proteina globulare.

La quantità ottenuta da una scansione calorimetrica è la capacità termica della soluzione presente nella cella del calorimetro.

Per determinare la capacità termica della proteina, sono necessari i dati della scansione della soluzione proteica ( $C_{p,p}$ ) e della scansione del solvente ( $C_{p,b}$ ).

Dalla scansione del tampone (solvente) la capacità termica misurata può essere scritto come:

$$C_{p,b} = m_b \cdot C_{p,b}^o \quad (1)$$

dove  $m_b$  è la massa del solvente nella cella e  $C_{p,b}^o$  è la **capacità termica specifica** della soluzione tampone. Allo stesso modo, la capacità termica della proteina in soluzione può essere scritta come:

$$C_{p,p} = m_p \cdot C_{p,p}^o + m_b' \cdot C_{p,b}^o$$

dove  $C_{p,p}^o$  è la capacità termica della proteina per unità di massa,  $m_p$  è la massa della proteina nella cella calorimetrica, e  $m_b'$  è la massa del solvente.  $C_{p,p}^o$  può essere ottenuto come segue:

$$C_{p,p}^o = [(C_{p,p} - C_{p,b}) + (m_b - m_b') \cdot C_{p,b}^o] / m_p$$



La quantità  $(m_b - m_b')$  è uguale alla massa di solvente spostata dalla proteina e può essere scritta in termini di **volume specifico parziale** della proteina come nell'Eq. (1):

$$(m_b - m_b')/m_p = V_p^o/V_b^o$$

$$C_{p,p}^o = (C_{p,p} - C_{p,b})/m_p + C_{p,b}^o \cdot (V_p^o/V_b^o) \quad (4)$$

dove  $V_p^o$  e  $V_b^o$  sono rispettivamente i volumi specifici parziali della proteina e del solvente.

La funzione di capacità termica molare ( $C_p$ ) è semplicemente uguale a  $C_{p,p}^o$  moltiplicato per il peso molecolare della proteina.

**$C_p$  è la quantità principale misurata dal DSC.**

## Capacità termica «eccesso»

In termodinamica una grandezza in **eccesso** è definita come la differenza tra i valori di una grandezza termodinamica in condizioni reali (o attuali) e in condizioni ideali.

In altre parole, le grandezze in eccesso esprimono le deviazioni di una miscela dall'idealità.

La DSC è stata utilizzata principalmente per studiare le **transizioni strutturali indotte dalla temperatura**.

Se una proteina presenta una transizione, la funzione capacità termica mostrerà un'anomalia ad una certa temperatura caratteristica, di solito chiamata temperatura di transizione ( $T_m$ ).

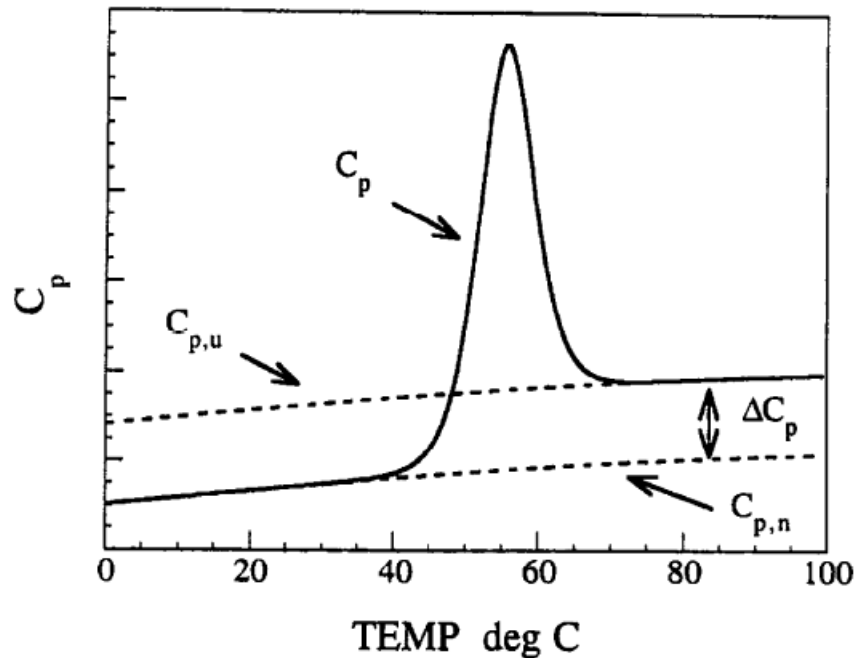
In queste condizioni, la  $C_p$  non può più essere attribuita a un singolo stato strutturale poiché contiene i contributi di tutti gli stati che si popolano durante la transizione (contributi **in eccesso**) derivanti dall'esistenza di fluttuazioni entalpiche entro l'intervallo di transizione.

Questi **contributi in eccesso** danno origine al caratteristico picco associato alle transizioni indotte termicamente.

La quantità più importante nell'analisi termodinamica di una proteina è la funzione di capacità termica in eccesso ( $\langle \Delta C_p \rangle$ ) che si ottiene sottraendo la capacità termica dello stato nativo dalla capacità termica misurata

$$\langle \Delta C_p \rangle = C_p - C_{p,n}$$

La figura illustra la procedura necessaria per stimare  $\langle \Delta C_p \rangle$  dai dati sperimentali.

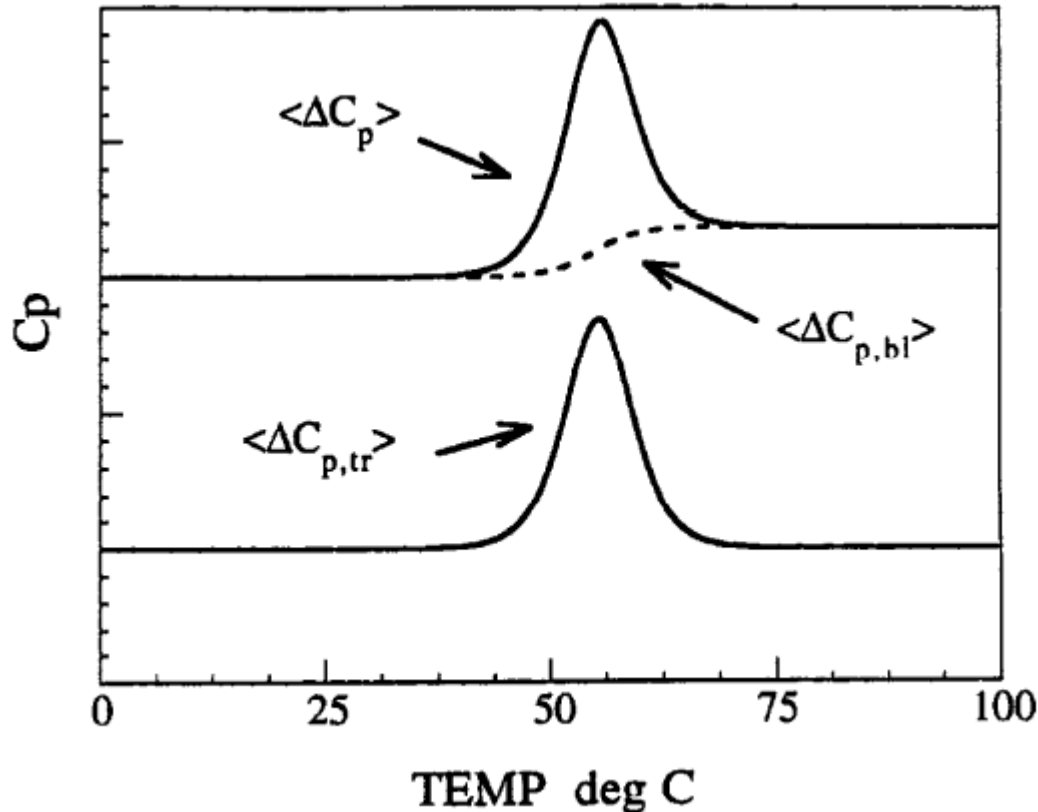


La funzione  $C_p$  è ottenuta dalla **Eq. (4)**. Le capacità termiche molari degli stati denaturato ( $C_{p,u}$ ) e nativo ( $C_{p,n}$ ) sono indicati dalle linee tratteggiate. La differenza tra questi valori definisce la capacità termica per la transizione, ossia

$$\Delta C_p = C_{p,u} - C_{p,n}$$

# Termodinamica statistica della funzione capacità termica «eccesso»

Nell'analisi dei dati DSC, la quantità più importante che deve essere definita utilizzando gli strumenti della termodinamica statistica è la **funzione entalpia eccesso** ( $\langle \Delta H \rangle$ ). Questa quantità è la somma dei contributi entalpici di tutti gli stati che esistono durante la transizione.



La funzione di capacità termica eccesso ( $\langle \Delta H \rangle$ ) si ottiene sottraendo la capacità termica molare dello stato nativo  $C_{p,n}$  dalla capacità termica molare della la proteina  $C_p$ .

$\langle \Delta C_p \rangle$  è composto da due contributi: la capacità termica di transizione *eccesso*  $\langle \Delta C_{p,tr} \rangle$  e la funzione sigmoideale  $\langle \Delta C_{p,bl} \rangle$  che dà origine allo spostamento della linea di base caratteristico delle transizioni accompagnate da  $\Delta C_p$  positivo.

L'entalpia eccesso ( $\langle \Delta H \rangle$ ) è la somma dei contributi entalpici di tutti gli stati che si popolano durante la transizione:

$$\langle \Delta H \rangle = \sum_{i=0}^N P_i \cdot \Delta H_i$$

dove  $P_i$  rappresenta la popolazione o la probabilità dello stato  $i$ , e  $\Delta H_i$  l'entalpia dello stato  $i$ -esimo rispetto a quella dello stato nativo che viene preso come lo stato di riferimento.

$\langle \Delta C_p \rangle$  è uguale alla derivata della temperatura di  $\langle \Delta H \rangle$  a pressione costante:

$$\begin{aligned} \langle \Delta C_p \rangle &= \sum_{i=1}^N \Delta H_i \cdot (\partial P_i / \partial T) + \sum_{i=1}^N P_i \cdot \Delta C_{p,i} \\ &= \langle \Delta C_{p,tr} \rangle + \langle \Delta C_{p,bl} \rangle \end{aligned}$$

$\langle \Delta C_{p,tr} \rangle$  = capacità termica di transizione «eccesso» che caratterizza il picco di transizione (in Figura)

$\langle \Delta C_{p,bl} \rangle$  = Definisce lo shift della linea di base (sigmoidale) associata alla denaturazione (variazione positiva del  $\Delta C_p$ )

L'entalpia in eccesso  $\langle \Delta H \rangle$  è l'integrale cumulativo di  $\langle \Delta C_p \rangle$ :

$$\langle \Delta H \rangle = \int_{T_o}^T \langle \Delta C_p \rangle dT$$

dove  $T_o$  è la temperatura a cui la proteina è allo stato nativo (Figura).

Le equazioni precedenti sono **funzioni della popolazione** di molecole nei diversi stati accessibili alla proteina.

La popolazione (probabilità  $P_j$ ) di molecole nello stato  $j$  è uguale a:

$$P_j = \frac{\exp(-\Delta G_j/RT)}{[1 + \sum_{i=1}^N \exp(-\Delta G_i/RT)]} \quad (5)$$

con  $\Delta G_j = \Delta H_j - T\Delta S_j$

la differenza di energia libera di Gibbs tra lo stato  $j$  e lo stato nativo (stato  $o$ )

La quantità al denominatore nell'equazione precedente è la **funzione di partizione di folding/unfolding  $Q$**  definita come:

$$Q = 1 + \sum_{i=1}^N \exp(-\Delta G_i/RT)$$

La funzione di partizione contiene tutte le informazioni termodinamiche del sistema ed è quindi sufficiente per descrivere la denaturazione termica di una proteina.

Si deve notare che il trattamento termodinamico statistico di cui sopra **non** richiede ipotesi *a priori* riguardo al numero di stati o l'entità dei parametri termodinamici associati all'equilibrio di folding/unfolding.

Possiamo riscrivere l'equazione di  $Q$  come:

$$Q = 1 + \sum_{i=1}^{N-1} \exp(-\Delta G_i/RT) + \exp(-\Delta G_N/RT)$$

dove i termini in sommatoria includono **tutti gli intermedi possibili** durante la transizione. Il primo e l'ultimo termine sono i **pesi statistici degli stati nativo e denaturato**. Per una transizione **a due stati** la funzione di partizione si riduce a:

$$Q = \hat{1} + \exp(-\Delta G_N/RT).$$

## Parametri termodinamici generali

I più importanti parametri termodinamici complessivi associati alla denaturazione termica delle proteine sono l'entalpia ( $\Delta H$ ), l'entropia ( $\Delta S$ ) e la capacità termica ( $\Delta C_p$ ).

L'energia libera è data dall'equazione standard:

$$\Delta G(T) = \Delta H(T_R) + \int \Delta C_p dT - T[\Delta S(T_R) + \int \Delta C_p d \ln T]$$

$$\Delta G(T) = \Delta H(T_R) + \Delta C_p \cdot (T - T_R) - T \cdot [\Delta S(T_R) + \Delta C_p \cdot \ln(T/T_R)]$$

in quest'ultima equazione il  $\Delta C_p$  è indipendente dalla temperatura.

Tutti questi parametri sono **funzioni di stato**, cioè il loro valore dipende solo dalla natura degli stati denaturato e nativo e non dallo specifico percorso di transizione o dalla presenza di intermedi parzialmente ripiegati.

Da un punto di vista pratico, questi parametri sono indipendenti dalla forma della funzione di capacità termica misurata. La variazione della capacità termica è definita dal valore di  $\langle \Delta C_p \rangle$  dopo il completamento della transizione.

La variazione entalpica ed entropica sono le **aree** sotto le curva di capacità termica in eccesso ( $\langle \Delta C_{p,tr} \rangle$ )

$$\Delta H = \int_{T_o}^{T_f} \langle \Delta C_{p,tr} \rangle dT \qquad \Delta S = \int_{T_o}^{T_f} \langle \Delta C_{p,tr} \rangle d \ln T$$



## Valutazione sperimentale della funzione di partizione

Come indicato sopra, la funzione di entalpia eccesso gioca un ruolo centrale nell'analisi termodinamico-statistica dei dati DSC perché fornisce un collegamento diretto tra l'esperimento e la funzione di partizione di folding/unfolding.

$\langle \Delta H \rangle$  può essere calcolata in termini di integrale cumulativo del  $\langle \Delta C_p \rangle$  misurato ed è anche collegato alla funzione di partizione dall'equazione:

$$\langle \Delta H \rangle = RT^2(\partial \ln Q / \partial T)$$

Freire e Biltonen (1978, *Biopolymers* 17, 463) si sono resi conto per la prima volta che, riscrivendo l'equazione in **forma integrale**, il DSC potrebbe fornire un'espressione numerica diretta della funzione di partizione di folding/unfolding.

$$\ln Q = \int_{T_0}^T \langle \Delta H \rangle / RT^2 dT$$

$$\ln Q = \int_{T_0}^T 1/RT^2 \left( \int_{T_0}^T \langle \Delta C_p \rangle dT \right) dT$$

Le equazioni di cui sopra forniscono un fondamento rigoroso alla teoria della deconvoluzione della funzione di capacità termica in eccesso, poiché stabiliscono un collegamento matematico tra i dati sperimentali e la funzione fondamentale della termodinamica statistica.

L'unicità della funzione entalpica come osservabile fisica può essere illustrata confrontandola con le osservabili misurate con altre tecniche.

# Deconvoluzione della funzione di capacità termica in eccesso

L'obiettivo principale dell'analisi di deconvoluzione della funzione di capacità termica è la determinazione del **numero di stati** che si popolano durante la denaturazione termica ed i **parametri termodinamici** per ciascuno di questi stati.

Gli algoritmi più efficaci coinvolgono una procedura di **deconvoluzione iterativa** che include cicli multipli attraverso ogni singolo passo di transizione combinato con la minimizzazione non lineare di minimi quadrati.

Come esempio vediamo l'analisi della transizione multi-stato del chaperone molecolare DnaK. La figura seguente illustra alcuni dei risultati ottenuti per questa proteina.

Nell'eseguire un'analisi di deconvoluzione, bisogna prestare particolare attenzione ai seguenti punti:

- 1. Calcolo della funzione di capacità termica in eccesso.**  $\langle \Delta C_p \rangle$  è ottenuta sottraendo la capacità termica dello stato iniziale dalla capacità termica molare ( $C_p$ ). È importante che alla temperatura iniziale per l'integrazione tutte le molecole siano nello stato nativo, altrimenti un sostanziale errore viene introdotto in tutti i parametri termodinamici.
- 2. Strategia generale.** Il fitting non lineare di  $\langle \Delta C_p \rangle$  si ottiene usando l'equazione precedente:

$$\begin{aligned}\langle \Delta C_p \rangle &= \sum_{i=1}^N \Delta H_i \cdot (\partial P_i / \partial T) + \sum_{i=1}^N P_i \cdot \Delta C_{p,i} \\ &= \langle \Delta C_{p,tr} \rangle + \langle \Delta C_{p,bl} \rangle\end{aligned}$$

che è l'equazione esatta per una transizione di folding/unfolding. Dopo la convergenza, la procedura non lineare dei minimi quadrati determina il miglior set di parametri che minimizza la somma dei quadrati residui (*sum of squared residuals*, SSR) tra i valori calcolati e valori sperimentali :

$$(\overline{\text{SSR}} = \sum (\langle \Delta C_p \rangle_{\text{calculated}} - \langle \Delta C_p \rangle_{\text{experimental}})^2)$$

L'analisi inizia assumendo la situazione più semplice, cioè il caso **a due stati** per poi aumentare progressivamente tale numero.

Dopo il completamento del primo stadio, la qualità del fitting viene essere valutata in termini di deviazione standard.

Poiché ci sono tre parametri di fitting ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $\Delta C_p$ ) per ogni stato aggiunto nell'analisi, la qualità del fitting aumenta con il numero di stati.

**3. *Stima dell'errore dei parametri di fitting:*** metodi statistici per stimare gli intervalli di confidenza



$$K = \frac{[U]}{[N]} = \frac{\alpha}{1-\alpha} \quad \alpha = \frac{[U]}{[U]+[N]} = \frac{K}{1+K}$$

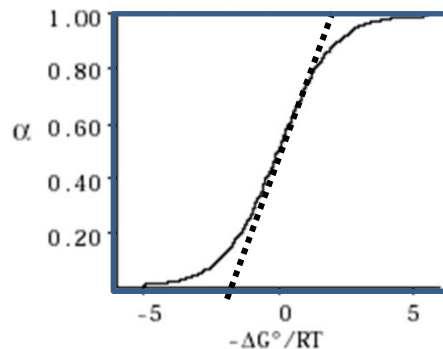
$$\Delta G^0 = -RT \ln K$$

$$\Delta S^0 = (\Delta H^0 - \Delta G^0)/T$$

$$K_{app} = \frac{\alpha_{app}}{1-\alpha_{app}} ; \quad \Delta H_{app} = -R \left[ \frac{\partial(\ln K_{app})}{\partial \left(\frac{1}{T}\right)} \right]$$

$$\Delta C_p^0 = \left( \frac{\partial \Delta H^0}{\partial T} \right)_p = \left( \frac{\partial \Delta S^0 / T}{\partial T} \right)_p$$

$$\Delta H_{vHoff} = -R \left[ \frac{\partial \ln K}{\partial (1/T)} \right] = -R \frac{\partial}{\partial (1/T)} [\ln \alpha - n \ln(1-\alpha)] = -R \left( \frac{1}{\alpha} + n \frac{1}{1-\alpha} \right) \frac{\partial \alpha}{\partial (1/T)}$$



$$\Delta H_{vHoff} = -R(2 + 2n) \left[ \frac{\partial \alpha}{\partial (1/T)} \right]_{T=T_m}$$

**NB:**

Una **proprietà molare apparente** di un componente di una soluzione in una miscela o soluzione è una quantità definita allo scopo di isolare il contributo di ciascun componente alla **non idealità** della miscela.

Mostra il cambiamento nella proprietà della soluzione corrispondente (ad esempio, volume ) quando tutto quel componente viene aggiunto alla soluzione, per mole di componente aggiunto.

È descritto come **apparente** perché sembra rappresentare la proprietà molare di quel componente in soluzione, a condizione che si supponga che le proprietà degli altri componenti della soluzione rimangano costanti durante l'addizione.

Tuttavia, questa ipotesi **spesso non è giustificata**, poiché i valori delle proprietà molari apparenti di un componente possono essere molto diversi dalle sue proprietà molari allo stato puro.

Le proprietà apparenti (molari) non sono costanti (anche a una data temperatura), ma sono **funzioni della composizione**.

**A diluizione infinita, una proprietà molare apparente e la proprietà molare parziale corrispondente diventano uguali.**

## Transizione a due stadi: $N \rightleftharpoons U$

I profili di denaturazione termico delle macromolecole sono solitamente ottenuti monitorando i cambiamenti indotti dalla temperatura di qualche appropriata osservabile sperimentale,  $Y$ .

La frazione di molecole che sono passate allo stato U è dato da una frazione **apparente** di molecole,  $\alpha_{app}$  dalla quale vengono calcolate le quantità termodinamiche (apparenti) associate alla transizione.

$$\alpha_{app} = \frac{(\langle Y \rangle - Y_N)}{(Y_U - Y_N)} ; \quad K_{app} = \frac{\alpha_{app}}{1 - \alpha_{app}} ; \quad \Delta H_{app} = -R \left[ \frac{\partial(\ln K_{app})}{\partial \left(\frac{1}{T}\right)} \right]$$

dove  $Y_N$  ed  $Y_U$  sono i valori dell'osservabile negli stati nativo e denaturato e  $\Delta H_{app}$  è il calore di van't Hoff per la transizione.

Quando la transizione è del tipo a due stadi, cioè, nessun intermedio termodinamicamente stabile è presente, gli unici contributi ad  $\alpha_{app}$  sono quelli dello stato nativo  $N$  e dello stato denaturato finale  $U$ .

In questo caso, l'equazione  $\alpha_N + \alpha_U = 1$  vale a qualsiasi temperatura e le equazioni sopra forniscono i veri parametri termodinamici per la reazione di denaturazione



La situazione è completamente diversa, tuttavia, **se sono presenti intermedi stabili**. In questo caso  $\langle Y \rangle$  contiene i contributi di tutte le specie in equilibrio e la transizione non può più essere espressa in funzione di una sola variabile, la frazione di molecole native o denaturate (cioè,  $\alpha_N + \alpha_U = 1$  non è più vero). In generale,  $\langle Y \rangle$  è uguale a:

$$\langle Y \rangle = \sum_{i=0}^n \alpha_i Y_i$$

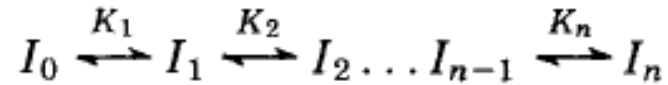
Con  $Y_i$  e  $\alpha_i$  il valore dell'osservabile termodinamica e la frazione dell'**i-esimo** stato.

Non è possibile estrarre i vari  $\alpha_i$  da una misura di  $\langle Y \rangle$  e, ad eccezione degli stati iniziale e finale, i valori caratteristici  $Y_i$  **non sono accessibili sperimentalmente**.

Se sono presenti intermedi stabili, i profili di fusione non saranno indipendenti dall'osservabile usata per seguire la transizione e i parametri termodinamici apparenti calcolati con le Eq. precedenti non saranno uguali ai veri parametri termodinamici che definiscono la transizione.

# La transizione a più stadi

Consideriamo un meccanismo generale di denaturazione termica del tipo:



in cui una macromolecola nel suo stato nativo ( $I_0$ ) mostra una transizione verso uno stato denaturato ( $I_n$ ) attraverso ( $n - 1$ ) stati intermedi.

La funzione di partizione di un tale sistema è:

$$Q = 1 + \sum_{i=1}^n \omega_i \exp(-\Delta G_i/RT)$$

dove lo stato iniziale è preso come stato di riferimento; i  $\omega_i$  sono le degenerazioni di ogni stato di energia accessibile e  $\Delta G_i = G_i - G_0$ , l'energia di Gibbs tra l'**i-esimo** e lo stato di riferimento.

Un tale sistema di un numero fisso di particelle è, a qualsiasi temperatura, specificato da un'energia media descritta da una distribuzione canonica e le quantità termodinamiche importanti possono essere espresse **in termini della funzione di partizione**. In particolare, la frazione di molecole nell'**i-esimo** stato,  $\alpha_i$ , definita come il rapporto tra la concentrazione di molecole nell'**i-esimo** stato,  $[I_i]$ , e la concentrazione totale di tutte le molecole, è data da:

$$\alpha_i = [I_i] / \sum_{i=0}^n [I_i] = \omega_i \exp(-\Delta G_i/RT)/Q$$

Esaminiamo il caso in cui l'eccesso di entalpia rispetto allo stato iniziale,  $\langle \Delta H \rangle$ , è l'osservabile utilizzata per seguire la transizione. L'equazione vista è ancora valida e  $\langle \Delta H \rangle$  è dato da

$$\langle \Delta H \rangle = \sum_{i=0}^n \Delta H_i \alpha_i \quad \Delta H_i = (H_i - H_0).$$

Ogni termine  $\alpha_i$  nella somma può essere scritto in termini della funzione di partizione,  $Q$ , del sistema. Si ottiene pertanto:

$$\langle \Delta H \rangle = \frac{\sum_{i=0}^n \Delta H_i \omega_i \exp(-\Delta G_i/RT)}{Q}$$

Di primaria importanza nello sviluppo della teoria della deconvoluzione è il fatto che ogni quantità  $\Delta H_i$  si presenta sia come coefficiente che nell'esponentiale di ogni termine.

La funzione di partizione si può scrivere come:

$$d(\ln Q) = \frac{\langle \Delta H \rangle}{RT^2} dT$$

che può essere valutata numericamente per ottenere la funzione di partizione,  $Q$ , se la dipendenza dalla temperatura di  $\langle \Delta H \rangle$  è nota.

**Avendo la funzione di partizione, si può descrivere la termodinamica del sistema.**

# Relazioni integrali

$$\ln Q = \int_{T_0}^T \frac{\langle \Delta H \rangle}{RT^2} dT$$

dove  $T_0$  è una temperatura alla quale tutte le molecole esistono nello stato iniziale. A rigore dovrebbe essere lo zero assoluto. Per scopi pratici, tuttavia, si osserva un errore trascurabile utilizzando come  $T_0$  la più bassa temperatura finita alla quale può essere osservato un cambiamento fisico (abbastanza minore della  $T_M$ ).

L'equazione permette di calcolare la funzione di partizione del sistema se l'entalpia media in eccesso è nota. Avendo  $Q$  come funzione della temperatura, la frazione di molecole nello stato iniziale ( $F_0$ ) può essere calcolata notando che:

$$F_0 = \frac{1}{Q} = \exp \left( - \int_{T_0}^T \frac{\langle \Delta H \rangle}{RT^2} dT \right)$$

Anche la frazione di molecole nello stato finale denaturato ( $F_n$ ) può essere calcolata dall'equazione:

$$\frac{dF_n}{dT} = \frac{F_n}{RT^2} (\Delta H_n - \langle \Delta H \rangle)$$

$$F_n = \exp \left[ - \int_T^{T_n} (\Delta H_n - \langle \Delta H \rangle) \frac{1}{RT^2} dT \right]$$

$$F_n = \exp \left[ - \int_T^{T_n} (\Delta H_n - \langle \Delta H \rangle) \frac{1}{RT^2} dT \right]$$

dove  $T_n$  è definito in forma analoga a  $T_o$  (tutte le molecole esistono nello stato finale) e  $\Delta H_n$  è la variazione entalpica associata alla transizione completa transizione,  $I_o \rightarrow I_n$ .

Bisogna notare che  $F_o$  e  $F_n$  sono le frazioni termodinamiche, che se sono presenti stati intermedi, la loro quantità totale può essere valutata.

La frazione di molecole che popolano tutti gli stati intermedi,  $F_I$  è

$$F_I = 1 - F_o - F_n$$

Per una transizione a due stati,  $F_I$  è uguale a zero a qualsiasi temperatura e  $F_n$  definito dalla Eq. sopra, è uguale alla frazione apparente di molecole denaturate,  $F_{app}$  data dall'Eq. Sopra definita.

## Equazioni iterative

Le equazioni precedenti permettono di calcolare la funzione di partizione,  $Q$ , e la frazione di molecole nello stato iniziale,  $F_0$ , a qualsiasi temperatura.

A questo punto, può essere eseguita la deconvoluzione della curva di fusione in sottofrazioni di popolazione. L'espressione  $(1 - F_0)$  è, per definizione, uguale alla frazione di molecole che popolano tutti tranne lo stato iniziale.

In termini della funzione di partizione,  $(1 - F_0)$  è data da:

$$1 - F_0 = \sum_{i=1}^n \omega_i \exp(-\Delta G_i/RT) / Q$$

Se l'entalpia molare apparente in eccesso del sistema,  $\langle \Delta H \rangle$ , viene ora divisa per  $(1 - F_0)$ , segue che:

$$\frac{\langle \Delta H \rangle}{1 - F_0} = \frac{\sum_{i=1}^n \Delta H_i \omega_i \exp(-\Delta G_i/RT)}{\sum_{i=1}^n \omega_i \exp(-\Delta G_i/RT)} = \frac{\sum_{i=1}^n \Delta H_i \omega_i \exp(-\Delta G_i/RT)}{Q_1}$$

abbiamo definito una nuova entalpia media sugli stati da 1 a  $n$ . Se la transizione è a due stati,  $\langle \Delta H \rangle / (1 - F_0)$  è identicamente uguale alla variazione di entalpia totale per la transizione.

Per una transizione multi-stato  $\langle \Delta H \rangle / (1 - F_0)$  è una curva a forma di S il cui limite inferiore è uguale alla differenza di entalpia,  $\Delta h_1$  tra il primo intermedio e lo stato iniziale.

Una nuova entalpia media in eccesso  $\langle \Delta H_1 \rangle$  può ora essere definita come

$$\langle \Delta H_1 \rangle = (\langle \Delta H \rangle / (1 - F_0) - \Delta h_1)$$

e in modo simile a quello usato per calcolare  $Q$ , una seconda funzione di partizione,  $Q_1$  può essere calcolata dall'equazione:

$$Q_1 = \exp \left( \int_{T_0}^T \frac{\langle \Delta H_1 \rangle}{RT^2} dT \right)$$

Come una funzione di partizione,  $Q_1$  è la somma di tutti gli stati energetici tranne il primo; quindi, può essere usata per definire una sottofrazione ( $F'_1 = Q_1^{-1}$ ) di molecole nel primo stato intermedio.

Bisogna notare che  $F'_1$  non è una media su tutti gli stati energetici accessibili del sistema, ma solo su quegli stati inclusi in  $Q_1$ .

Se la procedura descritta sopra viene ripetuta iterativamente, si può ricavare un insieme di equazioni iterative da cui possono essere determinati tutti gli  $\Delta h_i = \Delta H_i - \Delta h_{i-1}$ ,  $F'_1$  e  $Q_i$ .

In generale:

$$\langle \Delta H_{i+1} \rangle = \frac{\langle \Delta H_i \rangle}{1 - F'_i} - \Delta h_{i+1}$$
$$F'_i = Q_i^{-1} = \exp \left( - \int_{T_0}^T \frac{\langle \Delta H_i \rangle}{RT^2} dT \right)$$

da cui si possono determinare tutti i parametri termodinamici che descrivono ogni transizione di unfolding.

In particolare, ogni  $T_{mi}$  è uguale alla temperatura alla quale  $F_{i-1} = F_i$ , così che  $\Delta s_i = \Delta h_i / \Delta T_{mi}$ .

Ciascuna delle costanti di equilibrio,  $K_i$ , può essere anche calcolata da

$$K_i = \exp(-\Delta h_i/RT + \Delta s_i/R)$$

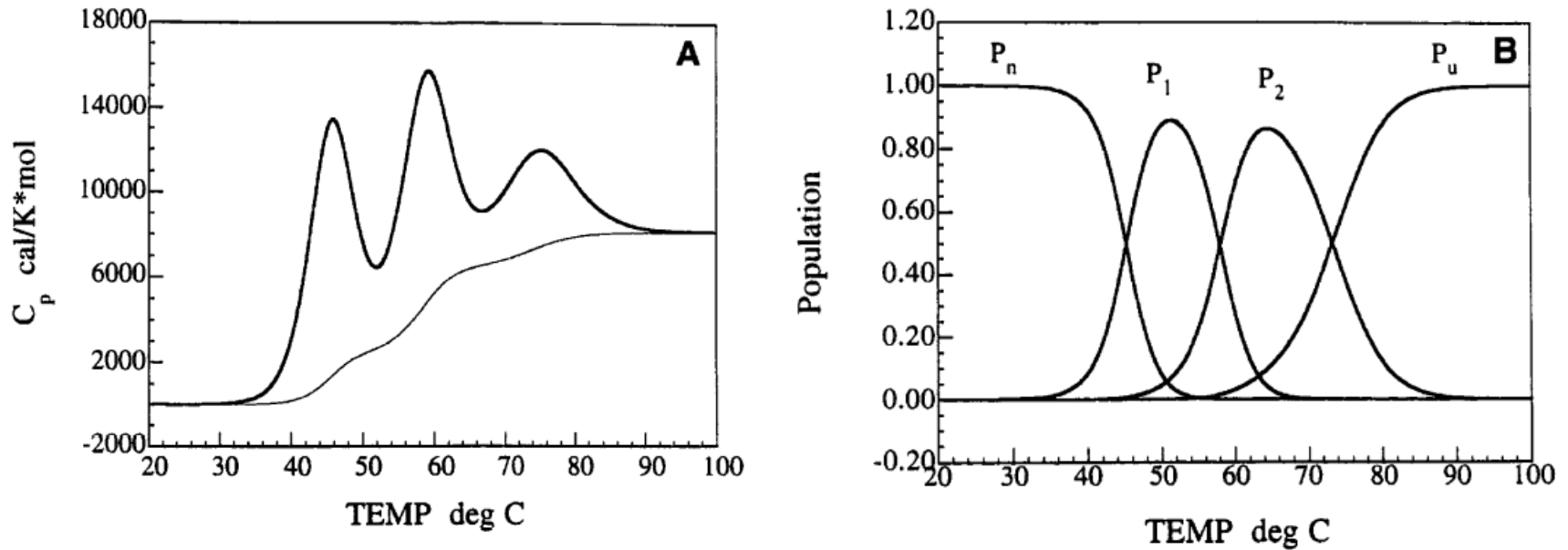
Oppure:

$$K_i = \frac{Q_{i-1} - 1}{Q_i}$$

$$F_i = F_{i-1} K_i$$
$$= F_{i-1} \frac{Q_{i-1} - 1}{Q_i}$$



In figura è riportata la funzione di capacità termica in eccesso per il chaperone molecolare DnaK ottenuta a pH 7.6 , in 25 mM tampone fosfato (A) e la popolazione di stati risultante dalla deconvoluzione della funzione di capacità termica (B).



L' unfolding termico di questa proteina coinvolge **quattro stati**, ognuno dei quali è caratterizzato da variazioni di entalpia, entropia e capacità termica.

Tutti i parametri termodinamici possono essere ottenuti deconvolvendo la funzione di capacità termica.

# Capacità termica assoluta delle proteine

In passato, la maggior parte delle analisi dei dati DSC erano volte ad ottenere parametri termodinamici legati alla transizione.

Recentemente ci si è resi conto, tuttavia, che i valori assoluti di  $C_{p,p}^o$  e  $C_p$  contengono anche informazioni fondamentali sullo stato strutturale di una proteina.

Per esempio, è stato dimostrato che la capacità termica di una proteina nello stato denaturato ( $C_{p,u}$ ) può essere calcolata con buona precisione dalla **sequenza aminoacidica**.

Se tutti i gruppi costituenti sono esposti all'acqua, allora  $C_{p,u}$  obbedisce a semplici regole di additività e può essere espresso in termini di singoli contributi delle catene laterali degli aminoacidi e della catena principale del peptide:

$$C_{p,u} = \left( \sum_{i=1}^{20} n_i \cdot C_{p,i} \right) + (N_{AA} - 1) \cdot C_{p,bb} + C_{p,NH_2} + C_{p,COOH}$$

$$C_{p,u} = \left( \sum_{i=1}^{20} n_i \cdot C_{p,i} \right) + (N_{AA} - 1) \cdot C_{p,bb} + C_{p,NH_2} + C_{p,COOH}$$

Dove:

la sommatoria si riferisce ai 20 aminoacidi;

- $n_i$  il numero di aminoacidi di tipo  $i$  ;
- $C_{p,i}$  la capacità termica molare della sua catena laterale;
- $N_{AA}$  il numero di aminoacidi nella proteina;
- $C_{p,bb}$  la capacità termica di un'unità peptidica (-CHCONH-)
- $C_{p,NH_2}$  la capacità termica del terminale amminico;
- $C_{p,COOH}$  la capacità termica del terminale carbossilico.

La tabella riassume i parametri necessari per stimare  $C_{p,u}$  dalla sequenza aminoacidica della struttura primaria di una proteina. I parametri in Tabella 1 sono stati ottenuti dal fitting polinomiale dei dati sperimentali pubblicati.

Table 1  
Heat Capacity of Proteins in Unfolded State<sup>a</sup>

Amino acid	A	B	C	D
A. Side chain contributions				
ALA	177.957	-0.450	0.000153	
ARG	299.558	0.627	-0.00267	
ASN	68.395	0.884	-0.00160	
ASP	68.731	0.8206	-0.00107	
CYS	222.58	0.636	-0.0017	
GLN	165.183	0.6360	-0.0017	
GLU	164.742	0.636	-0.00168	
GLY	83.505	-0.226	$-9.54 \times 10^{-05}$	
HIS	212.367	-1.699	0.0230	$-8.36 \times 10^{-05}$
ILE	408.045	-0.233	0.000115	
LEU	386.787	-0.198	0.000225	
LYS	316.945	-1.365	0.0188	$-7.434 \times 10^{-05}$
MET	200.523	-1.0456	0.00487	
PHE	398.560	-0.6340	0.00130	
PRO	218.452	-1.623	0.0075	
SER	74.736	0.233	-0.000108	
THR	196.165	-0.571	0.00589	
TRP	474.060	-0.634	0.00130	
TYR	314.312	-0.716	0.00785	$-2.2 \times 10^{-05}$
VAL	325.226	-0.361	-0.000586	
B. Peptide backbone unit contribution (-CHCONH-)				
	1.273	0.613	-0.00286	
C. Amino terminal contribution (NH <sub>2</sub> )				
	-192.630	6.178	-0.0666	0.000157
D. Carboxy terminal contributions (COOH)				
	1.273	0.613	-0.00286	

$$C_{p,u}(T) = A + BT + CT^2 + DT^3$$

Similmente, la capacità termica di una proteina allo stato nativo,  $C_{p,n}$ , è stata dimostrata essere una funzione lineare della temperatura nell'intervallo in cui può essere misurata (cioè l'intervallo di temperatura in cui lo stato nativo costituisce oltre il 99% della popolazione totale).

In questo intervallo la capacità termica dello stato nativo è molto simile per tutte le proteine quando normalizzata per la massa.

L'espressione del  $C_{p,u}$  è :

$$C_{p,n} = (a_N + b_N \cdot T) \cdot M_r$$

con  $a_N = 0.3161 \pm 0.013$  cal/K g

$b_N = 0.0016 \pm 0.0003$  cal/K g

$M_r$  = peso molecolare della proteina

Supponendo che gli effetti dell'idratazione siano additivi, è stato determinato il contributo dell'idratazione dei vari residui. Si è dimostrato che la differenza di capacità termica ( $\Delta C_p$ ) tra gli stati denaturato e nativo è direttamente proporzionale alle variazioni delle superfici **polari e apolari accessibili al solvente**, ossia:

$$\Delta C_p = \Delta C_{p,ap}^{\circ} \cdot \Delta A_{ap} + \Delta C_{p,pol}^{\circ} \cdot \Delta A_{pol}$$

dove

- $C_{p,ap}^{\circ}$  (0,45 cal/K[mole-Å<sup>2</sup>]) e  $C_{p,pol}^{\circ}$  (-0,26 cal/K/[mole-Å<sup>2</sup>]) sono i contributi apolari e polari elementari all'incremento di capacità termica totale;
- $\Delta A_{ap}$ , e  $\Delta A_{pol}$  sono le differenze tra le aree superficiali apolari e polari accessibili al solvente dei due stati.

Gli approcci di cui sopra predicono in modo soddisfacente i valori di capacità termica ottenuti per lo stato nativo delle proteine globulari e l'entità della variazione di capacità termica associata alla completa denaturazione della proteina.

Tali valori di capacità termica forniscono un mezzo per valutare il grado di denaturazione di una proteina confrontandoli con i valori determinati sperimentalmente

TABLE IV  
 Normalized Values of Heat Capacities, Enthalpies, Entropies, and Gibbs Energies of Hydration for  
 Various Surfaces<sup>a</sup>

Surface	Property <sup>b</sup>	Temperatures					
		5°C	25°C	50°C	75°C	100°C	125°C
Nonpolar							
Aliphatic	$\Delta\hat{C}_p^{\text{hyd}}$	2.24	2.14	2.03	1.91	1.80	1.66
	$\Delta\hat{H}^{\text{hyd}}$	-166	-122	-70	-21	26	69
	$\Delta\hat{S}^{\text{hyd}}$	-730	-578	-409	-263	-134	-22
	$\Delta\hat{G}^{\text{hyd}}$	37	50	62	71	75	77
Aromatic	$\Delta\hat{C}_p^{\text{hyd}}$	1.65	1.55	1.41	1.29	1.19	1.09
	$\Delta\hat{H}^{\text{hyd}}$	-180	-148	-111	-77	-46	-18
	$\Delta\hat{S}^{\text{hyd}}$	-430	-319	-199	-98	-12	62
	$\Delta\hat{G}^{\text{hyd}}$	-61	-53	-47	-43	-42	-43
Polar							
Arg	$\Delta\hat{C}_p^{\text{hyd}}$	-0.38	-0.20	-0.12	-0.04	0.01	0.08
	$\Delta\hat{H}^{\text{hyd}}$	-821	-827	-831	-833	-834	-833
	$\Delta\hat{S}^{\text{hyd}}$	-458	-478	-492	-497	-498	-495
	$\Delta\hat{G}^{\text{hyd}}$	-694	-685	-672	-660	-647	-635
Asn	$\Delta\hat{C}_p^{\text{hyd}}$	-1.27	-1.01	-0.67	-0.41	-0.16	0.09
	$\Delta\hat{H}^{\text{hyd}}$	-871	-894	-915	-928	-936	-936
	$\Delta\hat{S}^{\text{hyd}}$	-575	-654	-723	-763	-783	-785
	$\Delta\hat{G}^{\text{hyd}}$	-711	-699	-681	-663	-643	-623
Asp	$\Delta\hat{C}_p^{\text{hyd}}$	-1.72	-1.40	-1.07	-0.71	-0.40	-0.11
	$\Delta\hat{H}^{\text{hyd}}$	-684	-715	-746	-768	-782	-788
	$\Delta\hat{S}^{\text{hyd}}$	-360	-469	-569	-636	-675	-691
	$\Delta\hat{G}^{\text{hyd}}$	-584	-575	-562	-547	-530	-513
Cys	$\Delta\hat{C}_p^{\text{hyd}}$	1.80	2.01	2.23	2.42	2.54	2.70
	$\Delta\hat{H}^{\text{hyd}}$	-309	-271	-218	-160	-98	-32
	$\Delta\hat{S}^{\text{hyd}}$	-535	-402	-232	-59	113	283
	$\Delta\hat{G}^{\text{hyd}}$	-160	-151	-143	-139	-140	-145
Gln	$\Delta\hat{C}_p^{\text{hyd}}$	-0.38	-0.22	-0.06	0.07	0.17	0.30
	$\Delta\hat{H}^{\text{hyd}}$	-697	-703	-706	-706	-703	-697
	$\Delta\hat{S}^{\text{hyd}}$	-571	-591	-604	-603	-594	-579
	$\Delta\hat{G}^{\text{hyd}}$	-538	-527	-511	-497	-481	-467
Glu	$\Delta\hat{C}_p^{\text{hyd}}$	-0.71	-0.55	-0.35	-0.17	-0.05	0.09
	$\Delta\hat{H}^{\text{hyd}}$	-549	-562	-573	-580	-583	-582
	$\Delta\hat{S}^{\text{hyd}}$	-392	-436	-473	-492	-500	-498
	$\Delta\hat{G}^{\text{hyd}}$	-440	-432	-420	-409	-396	-383
His	$\Delta\hat{C}_p^{\text{hyd}}$	-1.96	-2.43	-2.38	-2.26	-2.07	-1.82
	$\Delta\hat{H}^{\text{hyd}}$	-1084	-1128	-1188	-1247	-1301	-1349
	$\Delta\hat{S}^{\text{hyd}}$	-542	-693	-888	-1060	-1211	-1337
	$\Delta\hat{G}^{\text{hyd}}$	-933	-922	-901	-878	-848	-816
Lys	$\Delta\hat{C}_p^{\text{hyd}}$	-1.31	-1.53	-1.59	-1.36	-1.15	-0.94
	$\Delta\hat{H}^{\text{hyd}}$	-685	-714	-753	-789	-821	-847

(continues)

TABLE IV (Continued)

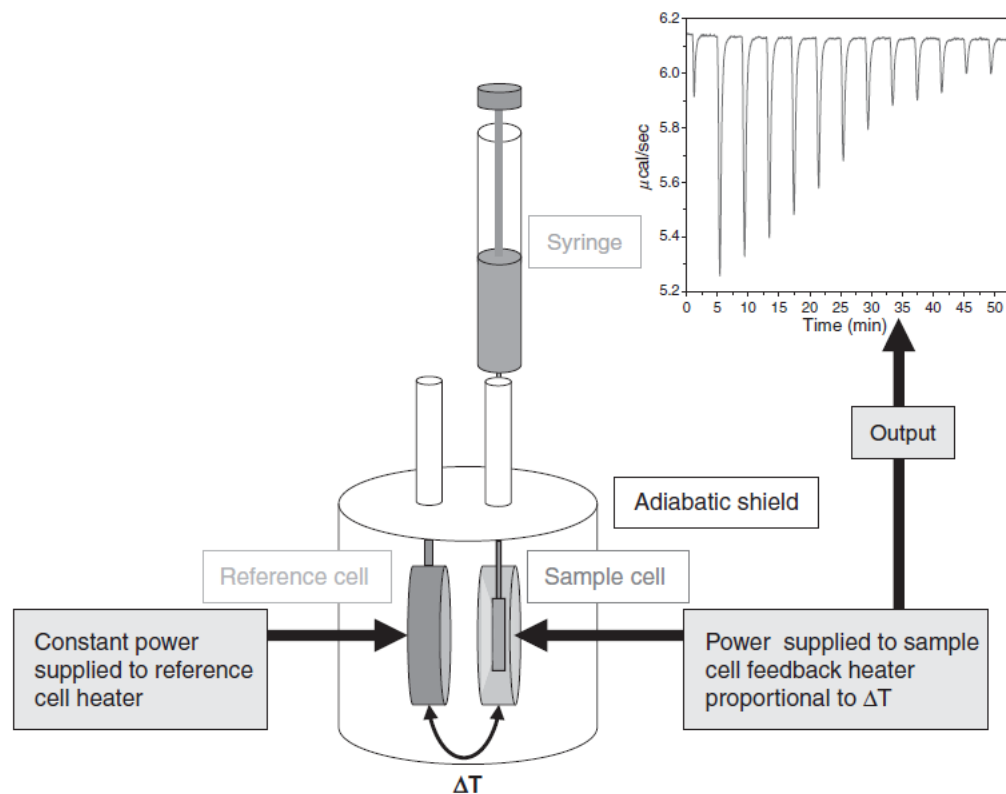
Surface	Property <sup>b</sup>	Temperature					
		5°C	25°C	50°C	75°C	100°C	125°C
Met	$\Delta\hat{S}^{\text{hyd}}$	-384	-482	-609	-716	-804	-870
	$\Delta\hat{G}^{\text{hyd}}$	-578	-570	-556	-540	-519	-498
	$\Delta\hat{C}_p^{\text{hyd}}$	-3.51	-3.83	-4.07	-4.04	-3.91	-3.75
	$\Delta\hat{H}^{\text{hyd}}$	-399	-473	-572	-672	-774	-869
	$\Delta\hat{S}^{\text{hyd}}$	-158	-412	-732	-1031	-1308	-1555
Ser	$\Delta\hat{G}^{\text{hyd}}$	-356	-350	-335	-315	-283	-247
	$\Delta\hat{C}_p^{\text{hyd}}$	-1.62	-1.40	-1.20	-0.96	-0.72	-0.48
	$\Delta\hat{H}^{\text{hyd}}$	-1015	-1045	-1078	-1104	-1126	-1140
	$\Delta\hat{S}^{\text{hyd}}$	-878	-983	-1089	-1168	-1227	-1265
	$\Delta\hat{G}^{\text{hyd}}$	-771	-752	-726	-698	-667	-636
Thr	$\Delta\hat{C}_p^{\text{hyd}}$	-1.09	-1.29	-1.22	-0.89	-0.29	0.55
	$\Delta\hat{H}^{\text{hyd}}$	-1262	-1287	-1318	-1343	-1359	-1356
	$\Delta\hat{S}^{\text{hyd}}$	-971	-1053	-1156	-1232	-1274	-1265
	$\Delta\hat{G}^{\text{hyd}}$	-992	-972	-944	-916	-881	-850
	$\Delta\hat{C}_p^{\text{hyd}}$	1.05	0.96	1.07	1.08	1.03	1.05
Trp	$\Delta\hat{H}^{\text{hyd}}$	-1181	-1161	-1135	-1110	-1084	-1055
	$\Delta\hat{S}^{\text{hyd}}$	-766	-693	-615	-534	-460	-392
	$\Delta\hat{G}^{\text{hyd}}$	-968	-954	-936	-924	-912	-899
	$\Delta\hat{C}_p^{\text{hyd}}$	-1.46	-1.48	-1.36	-1.15	-0.86	-0.59
	$\Delta\hat{H}^{\text{hyd}}$	-824	-854	-889	-921	-946	-963
Tyr	$\Delta\hat{S}^{\text{hyd}}$	-314	-415	-531	-625	-695	-742
	$\Delta\hat{G}^{\text{hyd}}$	-735	-730	-717	-703	-686	-667
	$\Delta\hat{C}_p^{\text{hyd}}$	-2.08	-1.81	-1.56	-1.53	-1.49	-1.55
	$\Delta\hat{H}^{\text{hyd}}$	-1662	-1702	-1745	-1785	-1823	-1862
	$\Delta\hat{S}^{\text{hyd}}$	-890	-1026	-1162	-1278	-1383	-1481
CONH	$\Delta\hat{G}^{\text{hyd}}$	-1415	-1396	-1370	-1340	-1307	-1272

<sup>a</sup> Data from Makhatadze and Privalov (1990, 1993) and Privalov and Makhatadze (1990, 1992, 1993).

<sup>b</sup>  $\Delta\hat{C}_p^{\text{hyd}}$  in  $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{\AA}^{-2}$ ;  $\Delta\hat{H}^{\text{hyd}}$  and  $\Delta\hat{G}^{\text{hyd}}$  are in  $\text{J mol}^{-1} \text{\AA}^{-2}$ ;  $\Delta\hat{S}^{\text{hyd}}$  is in  $10^{-3} \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{\AA}^{-2}$ .



# Calorimetria di Titolazione Isotherma (ITC)

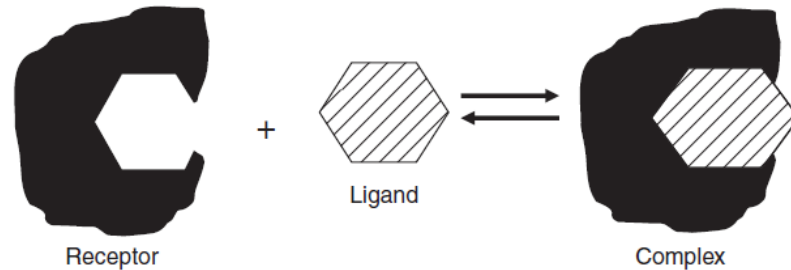


**Fig. 2** Representative diagram of a typical power compensation ITC. Major features of this type of instrument such as the reference and sample cells, syringe for adding titrant, and the adiabatic shield are noted in the figure. This diagram shows an oversimplification of how the power applied by the instrument to maintain constant temperature between the reference and sample cells is measured resulting in the instrument signal.

Una tipica interazione di legame tra un ligando e una molecola recettore è illustrata in Figura.

In termini biologici, il ligando potrebbe essere:

- un substrato,
- un inibitore,
- un farmaco,
- un cofattore,
- un coenzima,
- un gruppo prostetico,
- uno ione metallico,
- un polipeptide,
- una proteina,
- un oligonucleotide,
- un acido nucleico,
- .....
- una qualsiasi delle numerose molecole che possano interagire in modo non covalente interagire con un sito specifico di una seconda molecola (tipicamente una proteina o acido nucleico).



Come si nota nella figura, ci sono tre specie in equilibrio in soluzione

Per descrivere l'interazione sono necessari:

- La costante di equilibrio  $K$
- La stechiometria del processo,  $n$
- La variazione di  $\Delta H$  e  $\Delta S$ .

Le relazioni fondamentali termodinamiche sono:

$$K_{eq} = \left[ \frac{[complesso]}{[recettore]} [ligando] \right]_{eq}$$

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq}$$

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \left\{ \frac{[complesso]}{[recettore]} [ligando] \right\}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

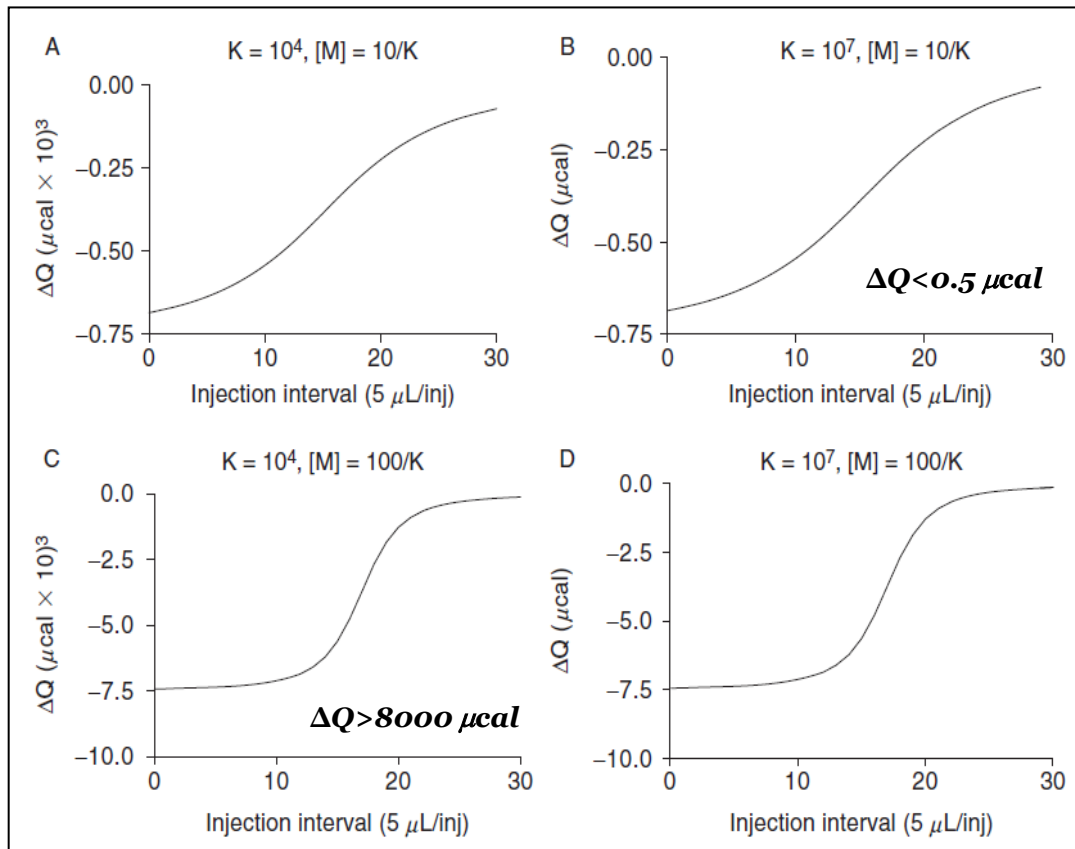
Il grande vantaggio della tecnica ITC è che è possibile in un singolo esperimento, se fatto *in condizioni ottimali*, ottenere valori accurati per **K** (o **ΔG**), **ΔH**, **TΔS** e **n** (moli ligando/moli complesso).

L'esperimento ITC deve essere fatto in condizioni in cui la variazione di calore sia misurabile per ogni iniezione e dove la variazione di calore varia per iniezioni successive producendo un termogramma curvo (un grafico della variazione di calore rispetto al numero di iniezioni, o al rapporto moli di ligando/macromolecola).

La prima condizione è ovvia, lo strumento è un calorimetro e se non ci sono abbastanza calorie prodotte dalla reazione, l'esperimento sarà impossibile.

La seconda è più problematica poiché la curvatura del termogramma è una funzione della concentrazione della macromolecola,  $[M]$ , e della costante di equilibrio  $K$ .

La figura illustra questo punto in quanto le due serie di pannelli con identici parametri "**c**" di Brandt (**c=10** in Fig.A e B, e **c=100** in Fig.C e D) mostrano la stessa curvatura.



Il parametro "**c**" di Brandt è definito come prodotto della concentrazione totale delle macromolecole per la costante di equilibrio ( $\mathbf{c} = [M_{\text{tot}}]K$ ).

Il problema è quello di ottenere concentrazioni di macromolecole dove la curvatura sia appropriata, ma dove i calori non siano troppo grandi per essere misurati accuratamente.

Esperimenti con reazioni che hanno una costante di equilibrio molto grande ( $K > 10^8 M^{-1}$ ) devono essere fatti a basse concentrazioni di macromolecole per produrre la necessaria curvatura nel termogramma ma a concentrazioni abbastanza alte da produrre un calore misurabile.

L'inverso è vero per i complessi deboli ( $K < 10^4 M^{-1}$ ) in quanto qui il problema è raggiungere concentrazioni di macromolecole dove la curvatura sia appropriata e dove i calori non siano troppo grandi per essere misurati accuratamente.

Per una buona determinazione, la concentrazioni di macromolecola e di ligando sono un punto critico:

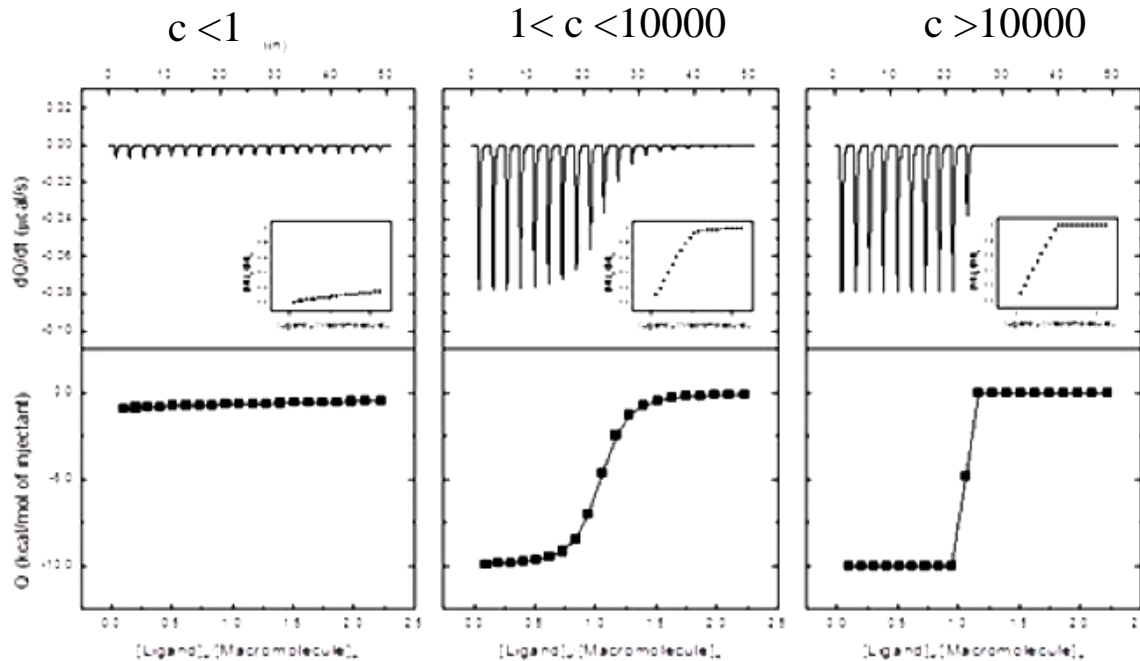
- ✓ le concentrazioni iniziali di macromolecola e ligando vanno misurata accuratamente
- ✓ è comodo valutare il parametro  $\mathbf{c} = K_a [M_t] n = [M_t] n / K_d$

Per una determinazione accurata della costante di equilibrio è consigliato lavorare con  $\mathbf{c} = 1 \div 10,000$ .

Valori grandi di  $c$  ( $>10000$ ) portano a pochi punti sperimentali nella zona di equivalenza (si riesce a valutare solo  $n$  e  $\Delta H$ )

Valori piccoli di  $c$  ( $<1$ ) portano ad una curva «sigmoideale» molto allargata (quasi lineare) dove è difficile valutare il punto di equivalenza (solo  $K_a$ ).

**I valori di  $c$  e  $\Delta H$  determinano la forma dell'isoterma di binding**



**Figure 3.** Calorimetric titrations at different  $c$  values: (left)  $c = 0.1$ ,  $K_a = 10^4 M^{-1}$ ; (middle)  $c = 100$ ,  $K_a = 10^7 M^{-1}$ ; (right)  $c = 100000$ ,  $K_a = 10^{10} M^{-1}$ . In all three cases:  $\Delta H = -10$  kcal/mol,  $[M]_0 = 10$  pM,  $[L]_0 = 100$  pM,  $V_0 = 0.2$  mL, and  $v = 2$  pL. Insets show the molar fraction of the macromolecule-ligand complex (macromolecule saturation) as the titration progresses.

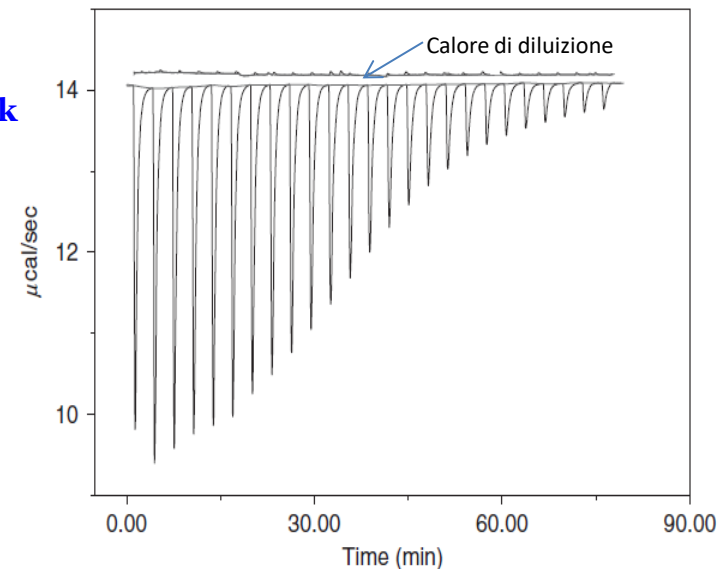
Devono essere misurati i **calori di diluizione** per correggere il dato sperimentale.

- il calore di diluizione per il ligando
- il calore di diluizione della macromolecola

Di solito il calore di diluizione della macromolecola misurato in questo modo è trascurabile. Per essere completamente rigorosi, si dovrebbe fare anche un terzo esperimento per determinare il «bianco» titolando il tampone con se stesso (correzione strumentale)

Pertanto l'equazione per correggere i dati di calore per gli effetti di diluizione è:

$$Q_{\text{corr}} = Q_{\text{meas}} - Q_{\text{dil,ligand}} - Q_{\text{dil,macrom}} - Q_{\text{blank}}$$



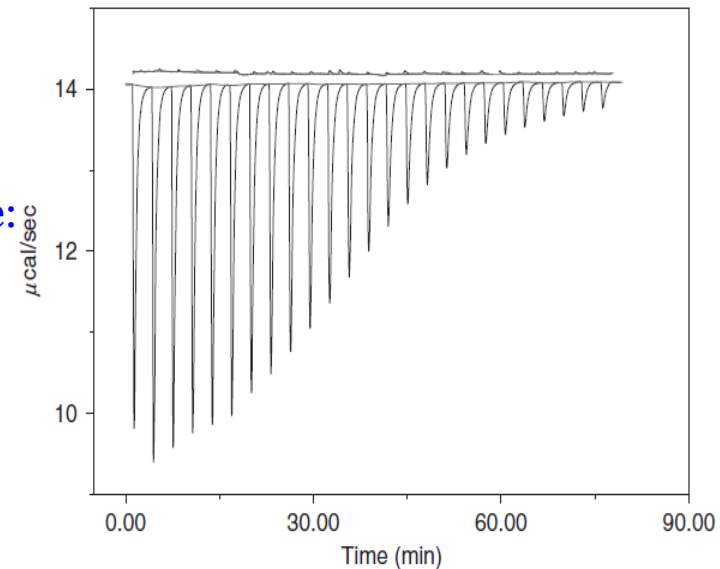
Il termogramma generato nell'esperimento ITC è una semplice somma di tutte le reazioni che producono calore che si verificano quando viene aggiunta un'aliquota di titolante.

Il calore **iniziale** è maggiore di quello delle aggiunte successive poiché all'inizio della titolazione c'è un grande eccesso di siti di legame vuoti o non popolati.

I calori iniziali sono il risultato della reazione completa del ligando aggiunto.

Mentre la titolazione procede, sempre meno del ligando aggiunto è legato e ci sono tre specie esistenti in soluzione: ligando libero, siti di legame non occupati e il complesso ligando/proteina.

Il calore prodotto nell'esperimento ITC è linearmente dipendente dalla  $\Delta H$  della reazione e **non** linearmente dipendente dal  $K_a$ .



$$Q = nV_o [M_t] \Delta H K_a [L_f] \left( \frac{1}{1 + K_a [L_f]} \right)$$



Per ottenere  $n$ ,  $K_a$  e  $\Delta H_b$ , l'equazione generale:


$$Q = nV_o[M_t] \Delta H K_a [L_f] \left( \frac{1}{1 + K_a [L_f]} \right)$$

viene espressa in termini di concentrazione totale di ligando  $[L_t]$ :

$$Q = (n [M_t] \Delta H V_o) / 2 \left\{ 1 + [L_t] / (n [M_t]) + 1 / (n K_a [M_t]) \right. \\ \left. - \left[ \left( 1 + [L_t] / (n [M_t]) + 1 / (n K_a [M_t]) \right)^2 - 4 [L_t] / (n [M_t]) \right]^{1/2} \right\}$$

Per passare dalla prima alla seconda espressione:

$$[L_f] = [L_t] - [L_b] = [L_t] - n [M_b]$$


$$[M_b] = \frac{K_a [M_t] [L_f]}{1 + K_a [L_f]}$$

$$[M_b] = \frac{K_a [M_t] ([L_t] - n [M_b])}{1 + K_a ([L_t] - n [M_b])}$$

Da questa ultima espressione si ottiene una quadratica che risolta dà i valori di  $[M_b]$  (uno solo dei due ha senso fisico) che introdotti nella prima espressione danno il valore di  $[L_f]$  che può essere introdotto nell'espressione generale.

Le radici dell'espressione quadratica per  $[M_b]$ :

$$[M_b] = \frac{-(1 + K_a[L_t] + nK_a[M_t]) \pm \sqrt{(1 + K_a[L_t] + nK_a[M_t])^2 - 4nK_a^2[M_t][L_t]}}{-2nK_a}$$

Solo una delle due soluzioni avrà un valore positivo per  $[M_b]$

$$[L_f] = [L_t] - [L_b] = [L_t] - n[M_b]$$

I parametri sono ottenuti con un metodo di best-fit non-lineare come il Marquardt

## ANALISI DEI DATI

Al fine dell'analisi dei dati ITC deve prima essere assunto un modello di legame (ad esempio, un sito (o  $n$  siti identici), due siti indipendenti, o legame sequenziale).

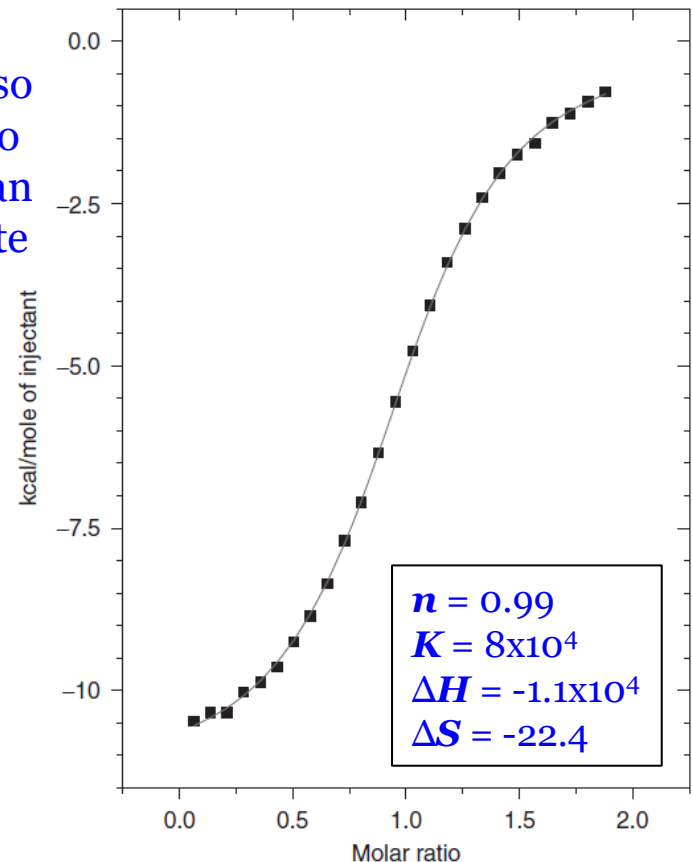
L'analisi del termogramma è un processo di fitting della curva in cui viene utilizzata una procedura di **regressione non lineare**.

Il modello è una descrizione matematica di un processo fisico, chimico o biologico che ha luogo nel calorimetro e in cui la variabile dipendente (ad es. il calore o la scan rate) è definito in funzione della variabile indipendente (moli di titolante aggiunto).

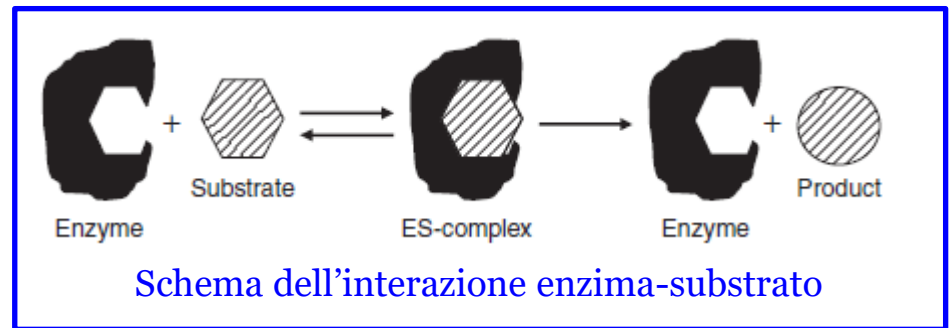
I dati in Figura rappresentano l'integrazione dei dati grezzi mostrati nella Figura precedente.

Questi dati sono stati corretti per il bianco e poi fittati con la regressione non lineare.

I parametri del "best-fit" sono dati nell'insero.



## Esperimenti ITC di cinetica



In termini biologici, i ligandi di interesse diversi dal normale substrato potrebbero essere **inibitori, cofattori, coenzimi, gruppi prostetici, ioni metallici o altre piccole molecole.**

Tuttavia, poiché lo scopo di questi esperimenti è quello di sondare la cinetica e i mezzi con cui il substrato viene convertito in prodotto, il tipico esperimento coinvolge l'enzima, il substrato e possibilmente altri reagenti coinvolti nella reazione

Gli esperimenti cinetici ITC sfruttano il fatto che un calorimetro è un rivelatore universale (quasi tutte le reazioni chimiche sono accompagnate da un flusso di calore).

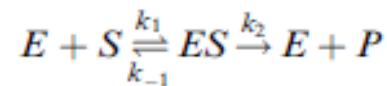
La letteratura recente ha mostrato l'uso dell'ITC nella caratterizzazione di un gran numero di enzimi determinandone le costanti cinetiche (oltre che termodinamiche).

Gli esperimenti ITC possono essere fatti su soluzioni omogenee o eterogenee (per esempio, sospensioni cellulari), o sono torbide o opache.

Le seguenti equazioni per ripasso delle relazioni cinetiche enzimatiche (modello Michaelis-Menten), dove

- $k_1$ ,  $k_{-1}$  e  $k_2$  sono le costanti di velocità
- $K_m$  è la costante di Michaelis
- $K$  è la costante di legame
- $k_{cat}$  è il numero di turnover,
- $v_o$  è la velocità iniziale,
- $v_{max}$  è la velocità massima (per  $[ES] = [E]_t$ )
- $[X]$  è la concentrazione molare della specie **X**.

La tecnica ITC genera in un singolo esperimento una curva di velocità di reazione completa e i valori di  $[E]_t$ ,  $\Delta H$ ,  $K_m$  e  $k_{cat}$  hanno dimostrato di essere in buon accordo con i risultati determinati con altre tecniche.

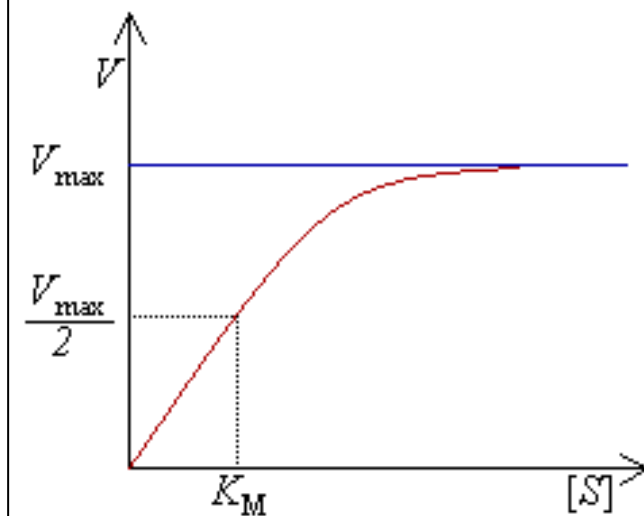


$$K_m = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}$$

$$K_{eq} = \frac{[ES]}{[E][S]} \approx \frac{1}{K_m}$$

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{[E]_t}$$

$$v_o = v_{max} \frac{[S]}{(K_m + [S])} = \frac{k_{cat}[E]_t[S]}{(K_m + [S])}$$



La velocità di reazione (ad esempio,  $v_o$  o  $v_{max}$ ) è tipicamente espressa in moli di prodotto formato per unità di tempo (o moli di substrato consumato per unità di tempo).

Il segnale calorimetrico grezzo è espresso come potenza (ad es.,  $\mu\text{cal}/\text{sec}$  o  $\text{m}/\text{sec}$ ). Questa velocità di riscaldamento è semplicemente uguale alla velocità di reazione moltiplicata per la variazione di entalpia:

$$\frac{\delta Q}{\delta t} = \frac{\delta n}{\delta t} \times \Delta H$$

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

