

a.a. 2023-2024

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 [ΔH], di entropia [ΔS], e di capacità termica [ΔC_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 $\mu\text{cal/deg}$).

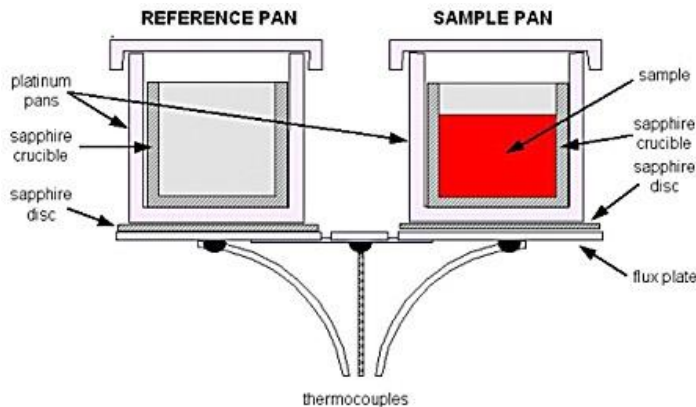
In generale, una singola scansione sarebbe sufficiente per determinare la differenza di capacità termica tra il campione e la soluzione di riferimento.

DSC - Compensazione di potenza

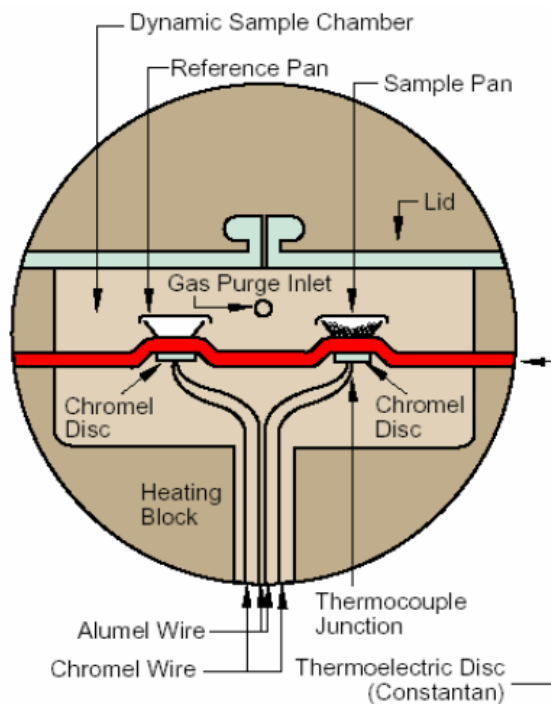
Due forni separati

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”

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

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

$$dH = dQ_p = C_p dT$$

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

Capacità termica «eccesso»

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

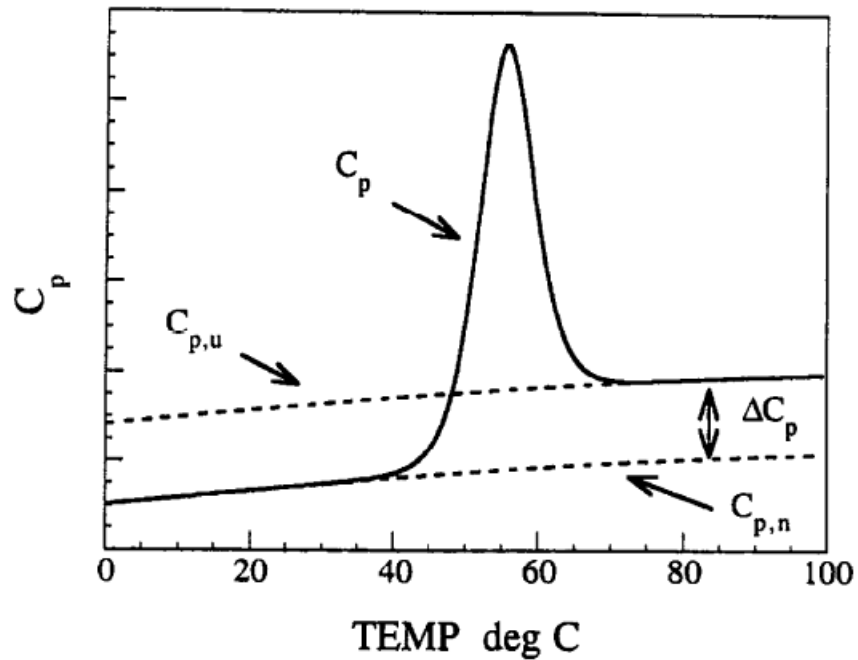
In queste condizioni, la C_p non può più essere attribuita a un singolo stato strutturale poiché contiene i contributi di tutti gli stati che si popolano durante la transizione (contributi **in eccesso**) derivanti dall'esistenza di fluttuazioni entalpiche entro l'intervallo di transizione.

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

$$\Delta C_p = C_{p,U} - C_{p,N}$$

La sensibilità del DSC è proporzionale alla **velocità di riscaldamento**, quindi questi esperimenti dovrebbero essere eseguiti a concentrazioni di proteine abbastanza alte da ottenere la temperatura di transizione con un'accuratezza relativamente elevata.

Le condizioni di equilibrio dell'*unfolding* reversibile devono essere impostate trovando la velocità di scansione ottimale che permetta di ottenere l'equilibrio tra gli stati nativo e denaturato a tutte le temperature, **ossia la *scan rate* deve essere compatibile con la velocità di ripiegamento/denaturazione.**

L'entalpia calorimetrica $\Delta H_{exp}(T_m)$ è definita come l'area della curva della capacità termica eccesso :

$$\Delta H_{exp}(T_m) = Q_{tot} = \int_0^{\infty} \langle C_p(T) \rangle^{exc} dT$$

Entalpia di Van't Hoff

$\Delta H_{vH}(T_m)$ per un processo di unfolding a due stati è determinata dalla dipendenza dalla temperatura della costante di equilibrio, K_{eq} :

$$\Delta H_{vH}(T_m) = -R \cdot \frac{d \ln K_{eq}}{d(1/T)} = R \cdot T^2 \cdot \frac{d \ln K_{eq}}{dT}$$

$$K_{eq}(T) = \frac{\alpha(T)}{1 - \alpha(T)}$$

Sia ΔH_{vHoff} che ΔH_{exp} ($= \Delta H_{cal}$) possono essere ottenute da misure calorimetriche.

L'espressione per ΔH_{vHoff} in funzione di n e α :

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

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

può essere riescritta come:

$$\Delta H_{vHoff} = RT^2(2 + 2n) \left[\frac{\partial \alpha}{\partial T} \right]_{T=T_M}$$

In questo caso α può essere visto come il grado di avanzamento del processo (la frazione di reagente convertiti in prodotto) che può essere valutato dalla curva calorimetrica della capacità termica:

$$\alpha(T) = \frac{1}{\Delta H_{cal}} \int_{T_1}^T C_p dT$$

da cui:

$$\left[\frac{\partial \alpha}{\partial T} \right]_{T=T_M} = \frac{C_{p,ex}(T_M)}{\Delta H_{cal}}$$

$$\left[\frac{\partial \alpha}{\partial T} \right]_{T=T_m} = \frac{C_{p,ex}(T_m)}{\Delta H_{cal}}$$

$C_{p,ex}(T_M)$ è la capacità termica eccesso a metà transizione, che approssimativamente corrisponde al massimo della curva calorimetrica:

$$\Delta H_{vHoff} = RT^2(2 + 2n) \left[\frac{\partial \alpha}{\partial T} \right]_{T=T_M}$$

$$\Delta H_{vHoff} = (2 + 2n)RT^2 \frac{C_{p,ex}(T_M)}{\Delta H_{cal}}$$

Dalla curva calorimetrica $\Delta H_{vHoff}(T_m)$ (per un processo a due stadi, monomolecolare, in cui $n=1$) viene determinato come:

$$\Delta H_{vHoff}(T_m) = 4RT_m^2 \frac{C_{p,ex}(T_m)}{\Delta H_{ex}(T_m)}$$

dove $C_{p,ex}(T_m)$ è il valore massimo della funzione eccesso della capacità termica

La stima diretta delle due entalpie, l'entalpia calorimetrica sperimentale e l'entalpia di van't Hoff, - da un singolo esperimento DSC fornisce un modo unico per determinare il meccanismo di denaturazione, per mezzo del rapporto delle due grandezze:

$$\frac{\Delta H_{cal}}{\Delta H_{vHoff}} = n$$

Le deviazioni dall'unità indicano che la transizione è più complicata.

Ci sono due possibili spiegazioni quando n è diverso da 1.

I due metodi descritti per determinare l'entalpia di una transizione, ΔH_{vHoff} dalla dipendenza della costante di equilibrio dalla temperatura e ΔH_{cal} dalle misure calorimetriche, generalmente **non danno lo stesso valore (n≠1)**.

La differenza tra i due valori dipende dalla **cooperatività** della transizione:

Se $\Delta H_{vHoff} = \Delta H_{cal}$ allora la transizione coinvolge solo due stati

Se $\Delta H_{vHoff} < \Delta H_{cal}$ sono coinvolti degli stati intermedi

Se $\Delta H_{vHoff} > \Delta H_{cal}$ allora possono essere coinvolte interazioni intermolecolari che devono essere superate per passare da uno stato all'altro.

Calorimetria di Titolazione Isotherma (ITC)

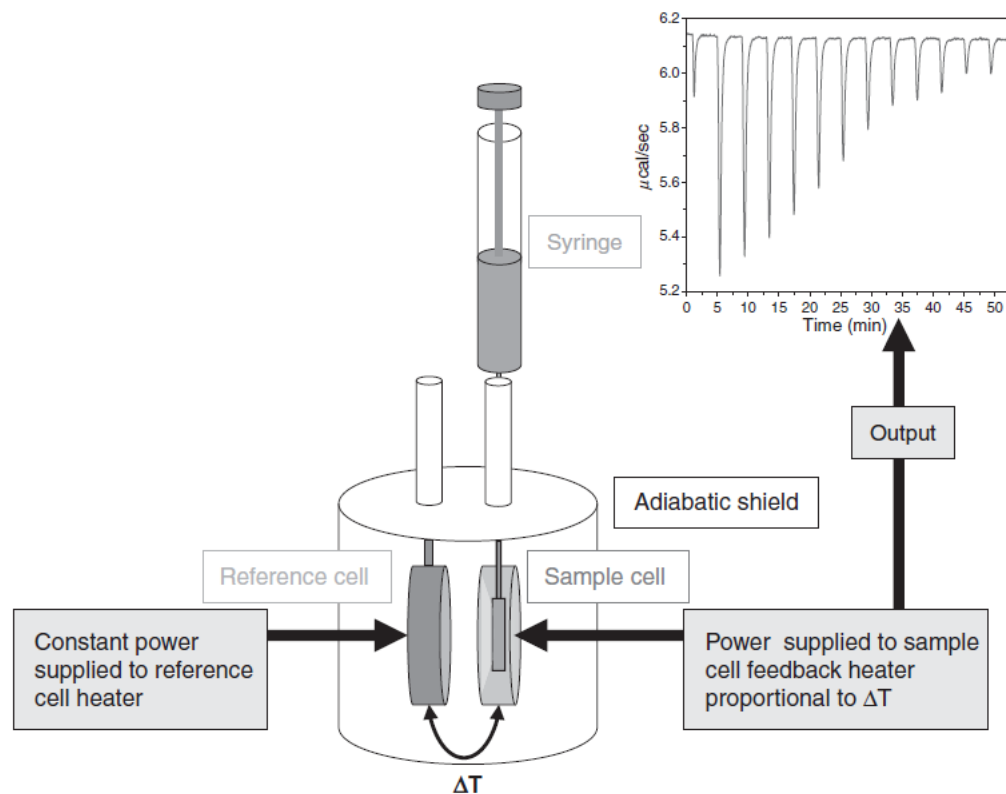
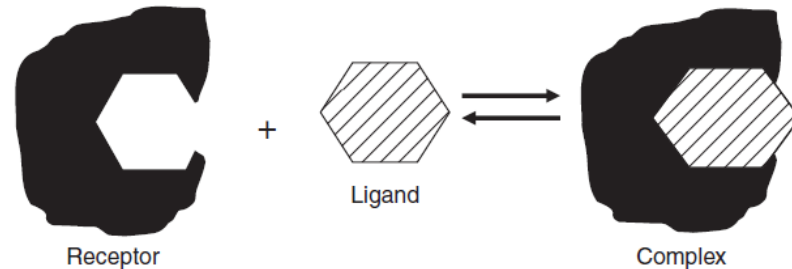


Fig. 2 Representative diagram of a typical power compensation ITC. Major features of this type of instrument such as the reference and sample cells, syringe for adding titrant, and the adiabatic shield are noted in the figure. This diagram shows an oversimplification of how the power applied by the instrument 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).



Tra le principali applicazioni si evidenziano:

- Quantificare l'affinità e la stechiometria di legame
- Caratterizzazione del meccanismo d'azione dell'interazione
- Conferma dell'affinità in studi di pre-formulazione
- Misura delle cinetiche enzimatiche
- Qualsiasi tipologia di interazione come ad esempio tra biomolecole e nanomateriali, tra enzima e substrato,....ecc..
-

Il grande vantaggio della tecnica ITC è che è possibile **in un singolo esperimento**, se fatto *in condizioni ottimali*, ottenere tutti i valori accurati dei parametri di binding molecolare (K_D o ΔG , ΔH , $T\Delta S$ e n moli ligando/moli complesso).

Senza la necessità di modificare le molecole mediante marcatura o immobilizzazione, l'ITC misura l'interazione tra le componenti nel loro stato nativo.

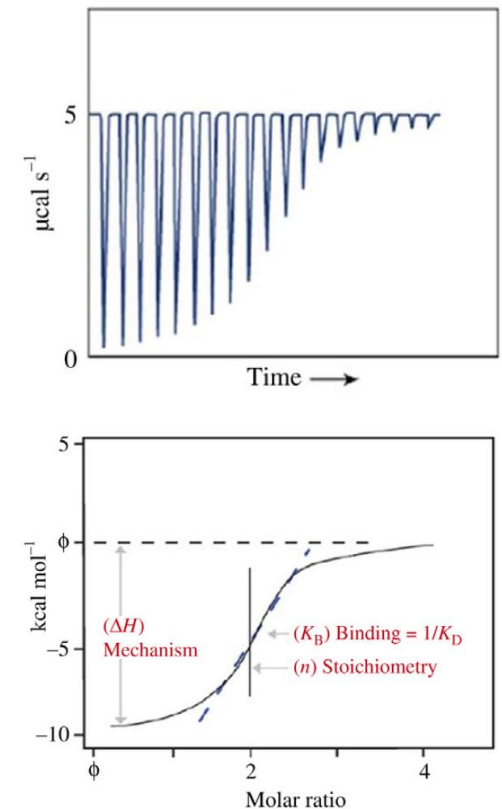
Quando due sostanze interagiscono si può generare o assorbire calore. La misura di questo calore permette l'accurata determinazione di costanti di legame (K_D), stechiometria di reazione (n), entalpia (ΔH) ed entropia (ΔS), fornendo così un profilo termodinamico completo dell'interazione molecolare in un singolo esperimento.

Queste informazioni consentono di andare oltre alla sola affinità di legame: disponendo di una rappresentazione completa e dettagliata del **profilo termodinamico dell'interazione** è infatti possibile approfondire i meccanismi chimico-fisici che governano il fenomeno a livello molecolare.

Quando si verifica un'interazione, il calore è generato o assorbito e questa variazione viene misurata dal microcalorimetro ITC durante la graduale titolazione del ligando nella soluzione contenente la biomolecola di interesse.

L'esperimento consiste **nell'iniezione di piccole aliquote di ligando nella soluzione (titolazione) contenente il campione**, incrementando progressivamente il rapporto molare tra le due componenti. Se si verifica un'interazione, viene rilasciato o assorbito calore in modo direttamente proporzionale all'entità del legame.

Con il progredire delle iniezioni, e quindi con l'aumentare del rapporto molare, si verifica la **progressiva saturazione della proteina nella cella** con una conseguente riduzione del calore scambiato fino a quando la cella conterrà un eccesso di ligando raggiungendo così la saturazione della reazione e non verrà più rilevato nessuno scambio termico (eccetto il calore di diluizione).

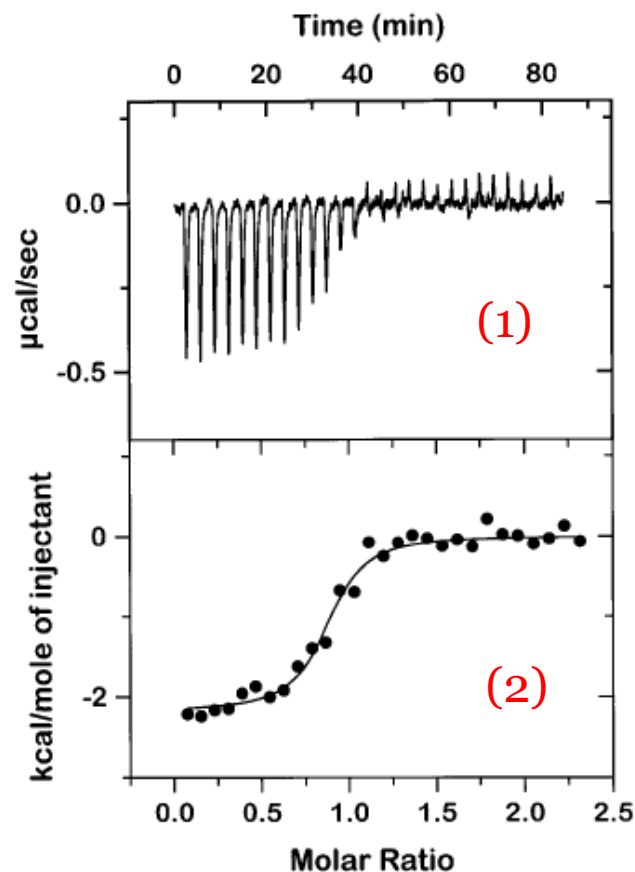
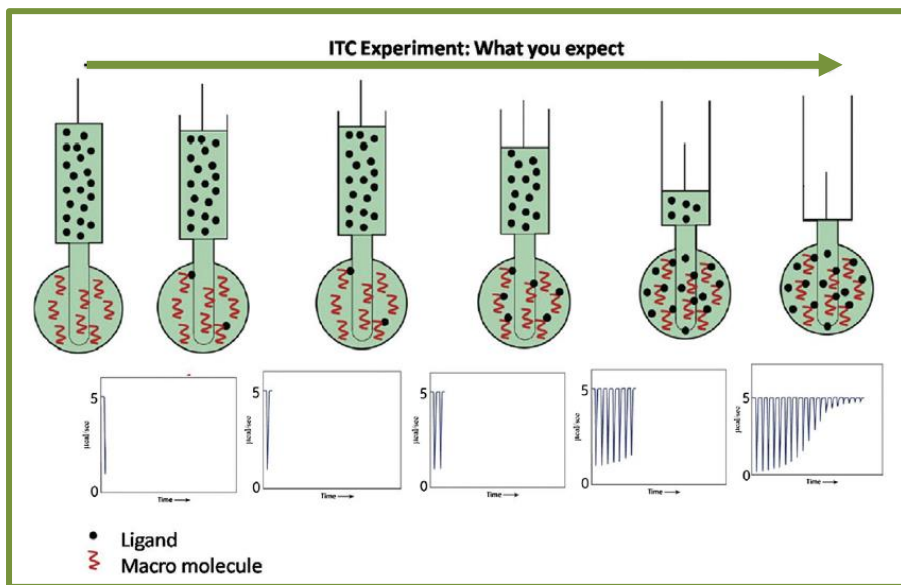


L'area relativa al segnale di ogni aggiunta è proporzionale al calore totale rilasciato per ogni aggiunta **(1)**.

L'area di ciascun picco viene integrata e riportata in funzione del **rapporto molare tra ligando e macromolecola**, ottenendo l'**isoterma di legame (2)**.

La curva interpolata permette di ottenere i migliori parametri termodinamici (stechiometria, costante di legame e entalpia del processo).

L'isoterma così ottenuta può essere descritta mediante diversi modelli di interazione ottenendo così i parametri descrittivi.



L'esperimento ITC deve essere fatto in condizioni in cui:

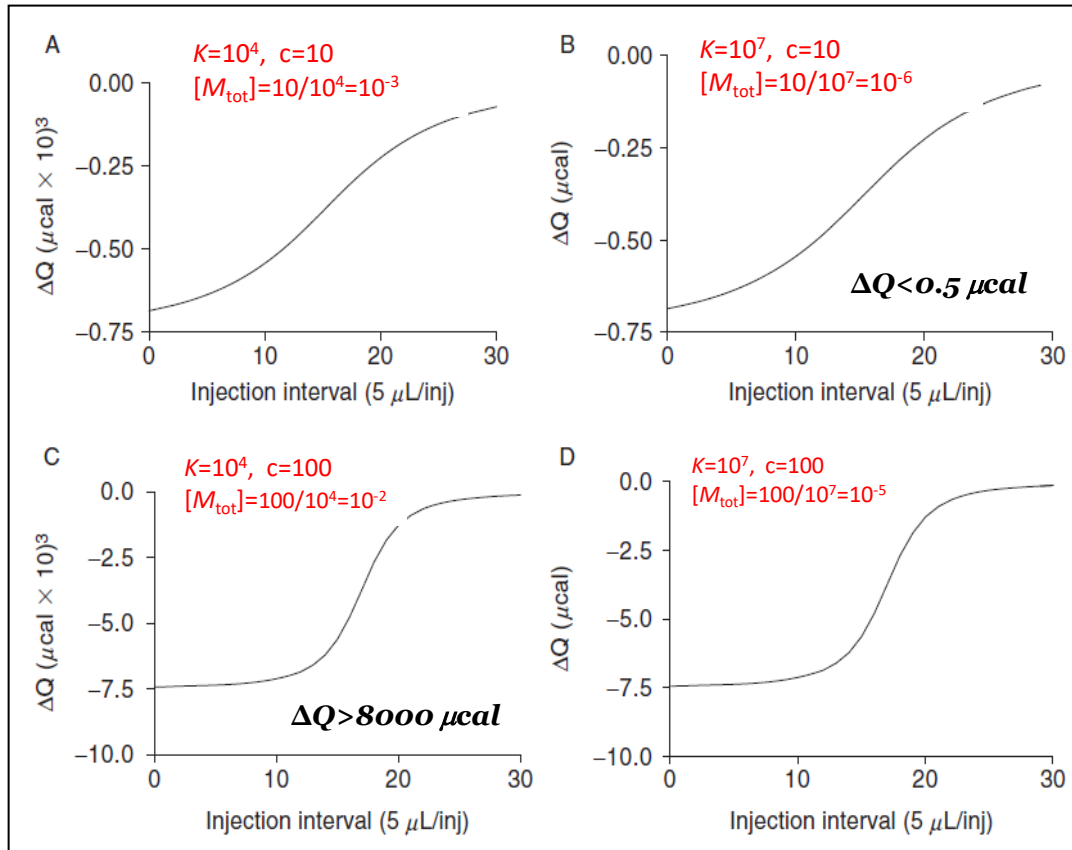
- la variazione di calore sia misurabile per ogni iniezione
- accurata misura delle concentrazioni iniziali di macromolecola e ligando. La concentrazioni di macromolecola e di ligando sono un punto critico ed è fondamentale
- la valutazione del parametro **c di Brandt**

$$c = K_a [M_t] n = [M_t] n / K_d$$

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 ($c=[M_{\text{tot}}]K$).

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

Esperimenti con reazioni che hanno una costante di equilibrio molto grande ($K \geq 10^7 M^{-1}$) 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.

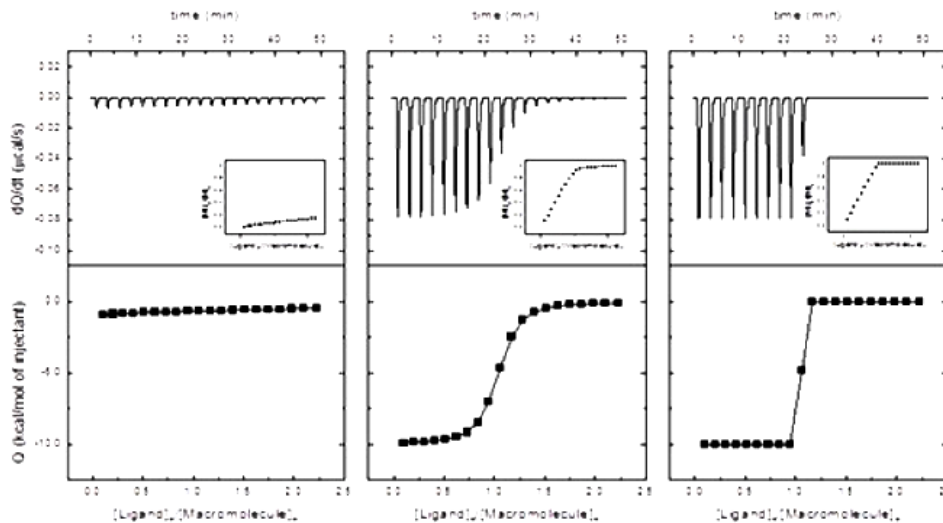
L'inverso è vero per i complessi deboli ($K \leq 10^4 M^{-1}$) in quanto qui il problema è raggiungere concentrazioni di macromolecole dove la curvatura sia appropriata e dove i calori non siano troppo grandi per essere misurati accuratamente.

Per una buona determinazione dei parametri di binding, la concentrazioni di macromolecola e di ligando devono essere tali per cui il parametro **c di Brandt** sia

$$c = K_a [M_t] n = [M_t] n / K_d = \mathbf{1 \div 10,000}$$

Valori grandi di **c (>10,000)** portano a pochi punti sperimentali nella zona di equivalenza: si possono determinare solo **n** e **ΔH**.

Valori piccoli di **c (<1)** portano ad una zona di sigmoidale molto allargata (quasi lineare) dove è difficile valutare il punto di equivalenza (solo **K_a**).



Il parametro **c** è importante nell'analisi degli esperimenti di ITC perché:

- ❖ determina la forma delle curve di titolazione;
- ❖ determina gli equivalenti in mole di titolante necessari per saturare i siti di legame
- ❖ determina l'accuratezza del fitting dei parametri **n, K_a, ΔH**).

$$\Delta H = -10 \text{ kcal/mole}, [M]_0 = 10 \text{ pM}, [L]_0 = 100 \text{ pM}, V_0 = 0.2 \text{ mL}$$

$$c = 0.1$$

$$K_a = 10^4 \text{ M}^{-1}$$

$$c = 100$$

$$K_a = 10^7 \text{ M}^{-1}$$

$$c = 100,000$$

$$K_a = 10^{10} \text{ M}^{-1}$$

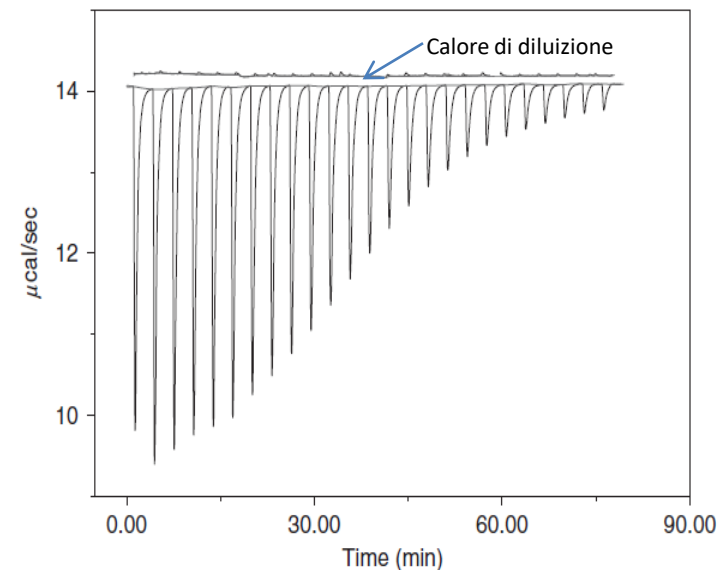
Devono essere misurati inoltre i **calori di diluizione** per correggere il dato sperimentale.

- 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:

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



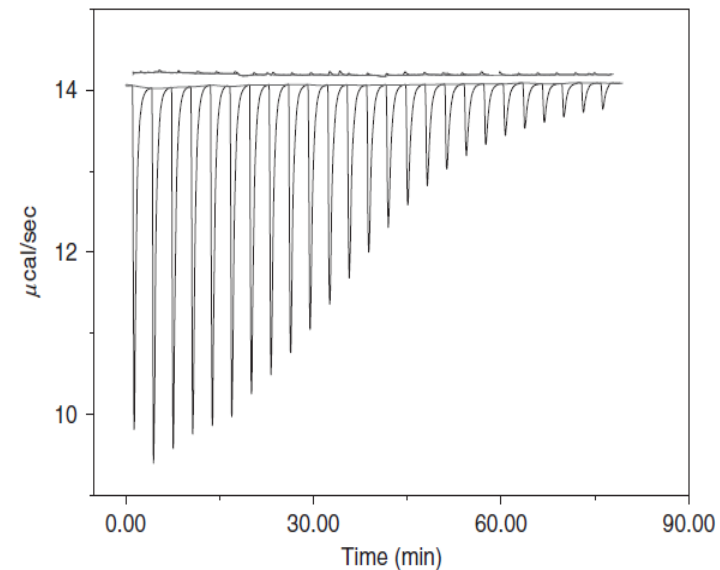
Il termogramma generato nell'esperimento ITC è una semplice **somma di tutte le reazioni che producono calore** che si verificano quando viene aggiunta un'aliquota di titolante.

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 ΔH della reazione e **non** linearmente dipendente dal K_a .



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

L'equazione precedente è ricavata in questo modo:

$$K_a = \frac{[M_b]}{[M_f][L_f]}$$

$$Q = (\text{moli } M_b) \Delta H$$

$$\text{moli } M_b = [M_b] V_o$$

$$[M_b] = K_a [M_f][L_f]$$

$$Q = [M_b] V_o \Delta H$$

$$Q = V_o \Delta H K_a [L_f][M_f]$$

$$[M_f] = [M_t] - [M_b]$$

$$Q = V_o \Delta H K_a [L_f] ([M_t] - [M_b])$$

$$K_a = \frac{[M_b]}{([M_t] - [M_b])[L_f]}$$



$$K_a [M_t][L_f] - K_a [M_b][L_f] = [M_b]$$

$$K_a[M_t][L_f] - K_a[M_b][L_f] = [M_b] \quad \longrightarrow \quad K_a[M_t][L_f] = [M_b](1 + K_a[L_f])$$

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

$$Q = V_0 \Delta H K_a[L_f] ([M_t] - [M_b])$$

$$Q = V_0 \Delta H K_a[L_f] \left([M_t] - \frac{K_a[M_t][L_f]}{1 + K_a[L_f]} \right)$$

$$Q = V_0 \Delta H K_a[L_f] [M_t] \left(\frac{1 + \cancel{K_a[L_f]} - \cancel{K_a[L_f]}}{1 + K_a[L_f]} \right)$$

$$Q = V_0 \Delta H K_a[L_f] [M_t] \left(\frac{1}{1 + K_a[L_f]} \right)$$

Importante:

Le equazioni sono ricavate in accordo con un modello di interazione.

Nel caso precedente: **un unico sito di interazione per macromolecola.**

Se più ligandi si legano alla macromolecola bisogna modificare l'equazione del Q inserendo la stechiometria con un modello di siti uguali ed indipendenti.

Se i siti sono n per ogni macromolecola:

$$Q = n (\text{moli } M_b) \Delta H$$

$$Q = V_o [M_t] n \Delta H K_a [L_f]$$

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

Per ottenere n , K_a e ΔH_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 $[L_t]$ sostituendo $[L_f] = [L_t] - [L_b]$ con $[L_b] = n[M_b]$:

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

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 in conseguenza 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 $[M_b]$

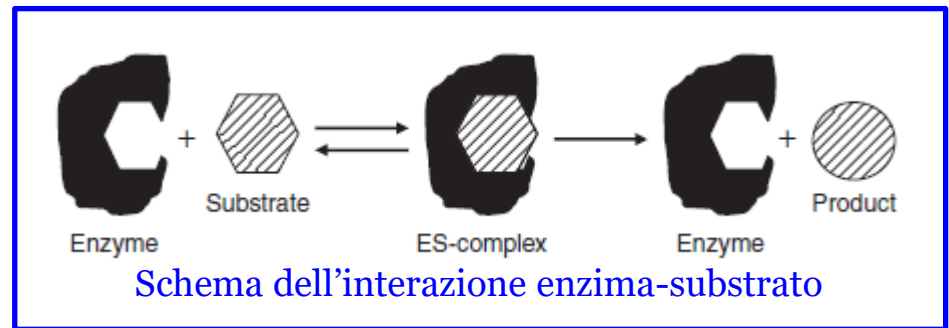
$$[L_f] = [L_t] - [L_b] = [L_t] - n[M_b]$$

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

$$Q = \left(\frac{1}{2} n [M_t] \Delta H V_0 \right) \left\{ 1 + \frac{[L_t]}{n [M_t]} + \frac{1}{n K_a [M_t]} - \left[\left(1 + \frac{[L_t]}{n [M_t]} + \frac{1}{(n K_a [M_t])} \right)^2 - 4 \frac{[L_t]}{n [M_t]} \right]^{1/2} \right\}$$

I parametri n , K_a ed ΔH sono poi ottenuti con un metodo di best-fit multiparametrico come l'algoritmo **Marquardt**

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).

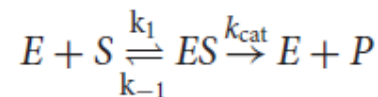
Gli esperimenti ITC possono essere fatti su soluzioni omogenee o eterogenee (per esempio, sospensioni cellulari), o sono torbide o opache.

Le seguenti equazioni sono le relazioni cinetiche enzimatiche del **modello di Michaelis-Menten**), dove:

- k_1 , k_{-1} e k_2 sono le costanti di velocità
- K_m è la costante di Michaelis
- k_{cat} è il numero di turnover,
- v_0 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 $[E]_t$, ΔH , K_m e k_{cat} hanno dimostrato di essere in buon accordo con i risultati determinati con altre tecniche sperimentali.

V_{max} è la velocità massima di catalisi in presenza di una quantità infinita di substrato e K_m equivale alla concentrazione di substrato necessaria per raggiungere la metà della velocità massima.

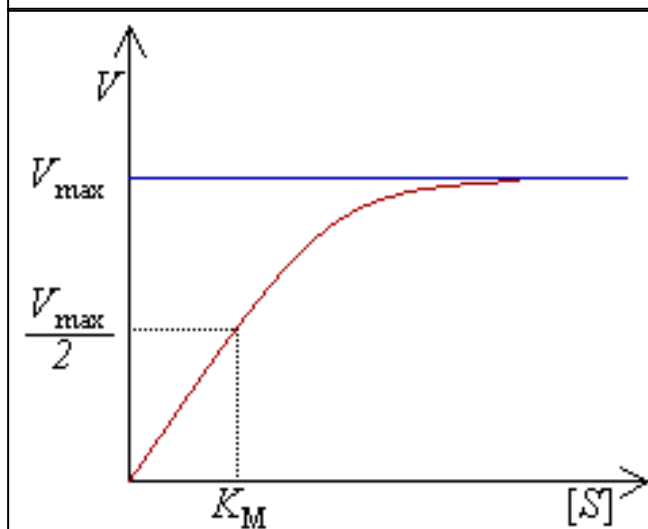


$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$$

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

$$V_{max} = k_{cat} [E]$$

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$



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).

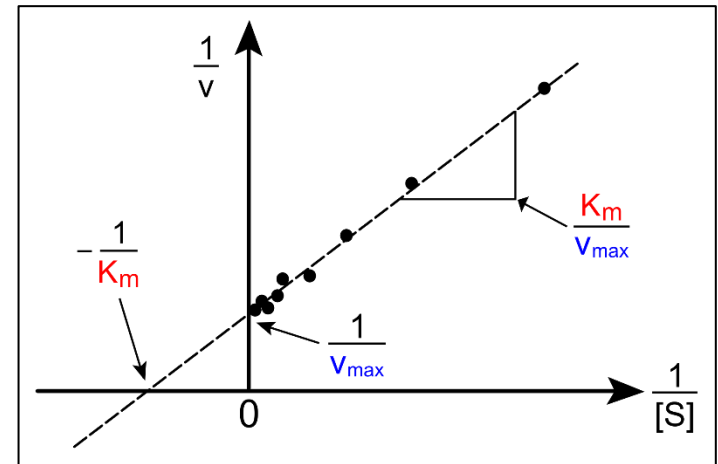
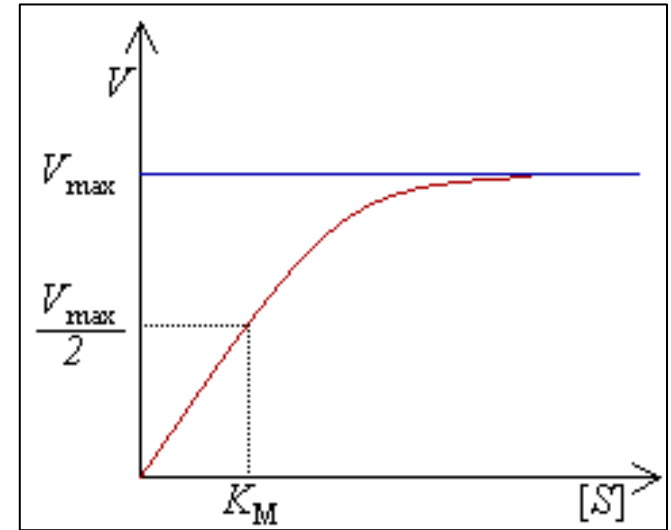
La relazione tra la velocità dell'enzima e la concentrazione del substrato può essere linearizzata secondo Lineweaver-Burk, in cui $1/V$ viene espresso in funzione di $1/[S]$:

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

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

Le costanti K_m e k_{cat} forniscono una semplice misura del comportamento di un enzima e quantificano il modo in cui l'attività cambia in risposta al cambiamento delle condizioni della soluzione, all'aggiunta di inibitori o attivatori, a cambiamenti nella sequenza aminoacidica dell'enzima, alla modifica chimica del substrato o allo scambio di un cofattore con un altro.

Pertanto, i metodi di misurazione di K_m e k_{cat} sono tecniche fondamentali delle bioscienze molecolari.



La calorimetria ITC è ben nota come un potente strumento per lo studio delle interazioni di binding e recentemente ha guadagnato popolarità come saggio cinetico generale e versatile

L'ITC ha il vantaggio di misurare direttamente il flusso di calore prodotto dalla catalisi in tempo reale. Poiché la maggior parte delle reazioni chimiche sono esotermiche o endotermiche, l'ITC può essere applicata per qualsiasi reazione enzimatica, senza bisogno di molecole o di enzimi aggiuntivi.

Gli studi ITC possono andare oltre la misurazione dei parametri solitamente associati alla cinetica enzimatica, come K_m , k_{cat} , ecc. e si estendono all'osservazione di ulteriori fenomeni dinamici quali l'associazione e il rilascio di inibitori, l'ingresso lento di substrati nel periplasma batterico, l'associazione e il rilascio di periplasma batterico, ecc.

La velocità di produzione di calore nella cella ITC, dQ/dt , è direttamente proporzionale alla velocità di reazione:

$$v_o = d[P]/dt$$

e alla variazione di entalpia molare (totale) della reazione di catalisi: $(\Delta_r H = H_{\text{product}} - H_{\text{substrate}})$:

$$\frac{dQ}{dt} = V_{\text{cell}} \Delta_r H \frac{d[P]}{dt}$$

Dove V_{cell} è il volume del campione nella cella.

Pertanto, con i valori di dQ/dt derivati dall'ITC ottenuti in funzione del tempo, è semplice calcolare con precisione la velocità dell'enzima a qualsiasi tempo dell'esperimento a condizione che siano noti $\Delta_r H$ e V_{cell} .

Questo si ottengono dall'area integrata del picco ITC ottenuto iniettando una quantità nota di substrato in una cella di campionamento contenente una quantità di enzima sufficiente a convertirlo completamente in prodotto.

$$\Delta_r H = \frac{\int_{t=0}^{\infty} \frac{dQ}{dt} dt}{n_S}$$

n_S è il numero di moli di substrato iniettati.

Dall'equazione precedente si dimostra come le misure di variazione del calore in ITC, misurano direttamente la velocità di reazione ($d[P]/dt$):

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{V_{cell} \Delta_r H} \cdot \frac{dQ}{dt}$$

Il segnale calorimetrico grezzo è espresso come potenza (ad es., $\mu\text{cal}/\text{sec}$).

