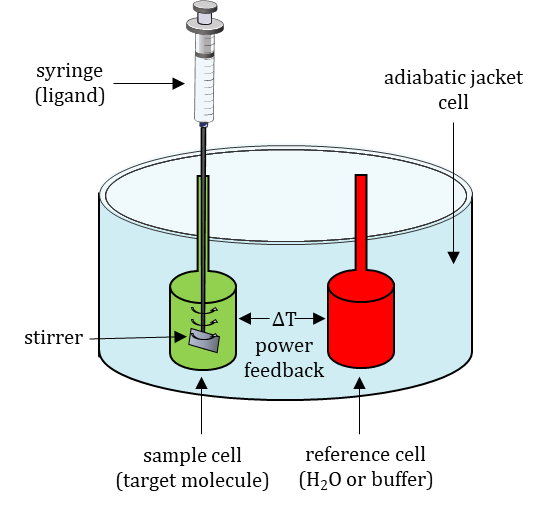
**Versuch:** Bestimmung von thermodynamischen Parametern und Affinität mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) am Beispiel der Bindung von Trypsin mit verschiedenen Liganden

Einleitung

Bei der isothermen Titrationskalorimetrie (*isothermal titration calorimetry,* ITC) handelt es sich um eine biophysikalische Methode, mit welcher die Wärmeänderung, die bei der Wechselwirkung zweier Moleküle auftritt gemessen werden kann. In diesem Versuch werden Sie diese Technik nutzen, um die Wechselwirkung der Serinprotease Trypsin mit verschiedenen Inhibitoren zu untersuchen. [1-3]

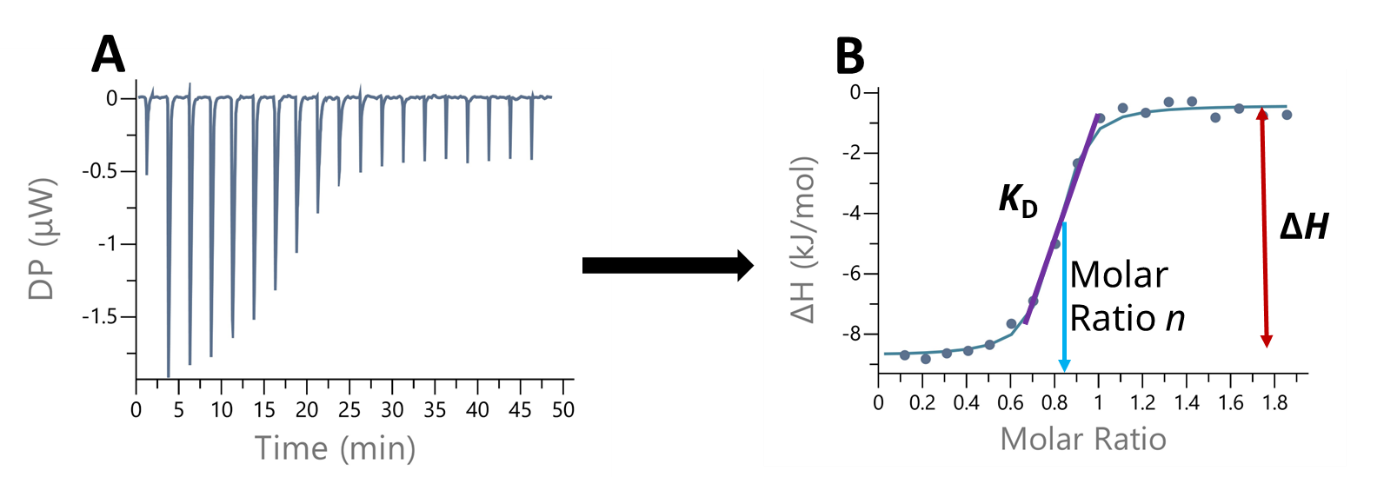
Aufbau des Geräts und Funktionsprinzip

Das Gerät ist aus zwei adiabatisch ummantelten Zellen aufgebaut, eine Referenzzelle und eine Probenzelle. In der Referenzelle befindet sich Wasser (oder Puffer), während die Probenzelle mit einem der Bindungspartner, in diesem Versuch Trypsin, befüllt wird. In beiden Zellen ist die Temperatur regulierbar und über einen Rückkopplungsmechanismus kann die Leistung, welche zum Beheizen der Probenzelle notwendig ist, so eingestellt werden, dass die Temperatur der Probenzelle an die Referenzzellentemperatur angepasst wird (**Abbildung *1***).



**Abbildung 1.** Schematischer Aufbau eines ITC-Geräts.

Während eines ITC-Experiments wird der Bindungspartner in der Probenzelle mit dem zweiten Bindungspartner (Liganden), in diesem Versuch die Inhibitoren Benzamidin oder Leupeptin, unter Rühren titriert. Nach jeder Injektion ändert sich die Temperatur innerhalb der Probenzelle, da durch die Bindung von Probe und Ligand Wärme freigesetzt oder aufgenommen wird. Das ITC-Instrument misst die zeitabhängige Zufuhr oder Reduktion von Leistung (µW), welche benötigt wird, um die Temperatur der Probenzelle an die Referenzzelle anzupassen. Durch Auftragung der gemessenen Leistung gegen die Zeit wird ein Thermogramm, bestehend aus mehreren Zacken (engl. *Spikes*), erhalten (**Abbildung 2A**). Jeder *Spike* repräsentiert dabei eine Injektion des Liganden und die Fläche unter den *Spikes* entspricht der durch die Injektion aufgenommenen oder abgegebenen Wärmemenge. Trägt man die durch Integration erhaltenen Wärmemenge (kJ/mol) jeder Injektion gegen das molare Verhältnis der Bindungspartner auf, wird im Idealfall eine sigmoidale Kurve, die Bindungsisotherme, erhalten. (**Abbildung 2B**).



**Abbildung 2**. Datenauswertung eines ITC-Versuchs. **A** Schematische Darstellung eines durch ITC erhaltenen Thermogramms. **B** Schematische Darstellung einer durch ITC bestimmten Bindungsisotherme.

Aus dieser Bindungsisotherme lässt sich anhand des Wendepunkts die Stöchiometrie der Bindungspartner *n*, anhand der Höhe die Bindungsenthalpie Δ*H* und, anhand der Steigung am Wendepunkt die Dissoziationskonstate *K*D bestimmen. Mit diesem Wert können wiederum, durch Formeln 1 und 2, die Gibbs-Energie Δ*G* sowie die Bindungsentropie Δ*S* berechnet werden.

(1)

(2)

Die Darstellung des thermodynamischen Bindungsprofils erfolgt üblicherweise in Form eines Balkendiagramms (*signature plot*, **Abbildung *3***).

Ein Bild, das Farbigkeit, Screenshot, Quadrat, Grafiken enthält.

Automatisch generierte Beschreibung

**Abbildung 3**. Beispiel eines Signature plots. ΔG blau, ΔH grün, –TΔS rot.

**Probenvorbereitung und Kontrollexperimente**

Nicht nur die Interaktion der Bindungspartner sorgt für die Freisetzung von Wärme. Unterschiedliche Effekte wie die Verdünnung der Bindungspartner oder Konzentrationsunterschiede anderer Pufferkomponenten können ebenso die Freisetzung/Aufnahme von Wärme während der Titration beeinflussen. Besonders das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid, das zum Lösen vieler Liganden, welche in Wasser unlöslich sind, verwendet wird, zeichnet sich durch eine stark exotherme Verdünnung aus. Es sollte daher sichergestellt werden, dass sich die Bindungspartner in identisch zusammengesetzten Lösemitteln befinden (engl. *buffer matching*). Zusätzlich können Kontrollexperimente, wie eine „Ligand gegen Puffer“-Titration, durchgeführt werden, um den Einfluss der Verdünnungswärme zu berücksichtigen.

Während der Assoziation der Bindungspartner können Änderungen der Protonierungszustände stattfinden. Der dabei auftretende Protonentransfer führt zur Ionisierung des verwendeten Puffers. Die somit freigesetzte oder aufgenommene Ionisierungsenthalpie Δ*H*Ion, welche sich für unterschiedliche Puffer unterscheidet, beeinflusst die für den gesamten Bindungsvorgang beobachtete (engl. *observed*) Enthalpie Δ*Hobs*. Durch Wiederholung der Messung unter identischem pH-Wert in unterschiedlichen Puffern mit verschiedenen Δ*H*Ion-Werten können die Anzahl der aufgenommenen oder abgegebenen Protonen *n*Proton und die intrinsische Bindungsenthalpie Δ*H*Bind ermittelt werden (Formel 3).

(3)

**C-Wert** Eine wichtige Größe zur Planung und Optimierung von ITC-Experimenten ist der C-Wert, welcher die Form der Bindungsisotherme wiederspiegelt. Der C-Wert wird anhand der Proteinkonzentration [P] in der Reaktionszelle mit Hilfe von *n* und *K*D bestimmt. (Formel 4)[4].

(4)

Als Faustregel wird bei Bindungsaffinitäten im nano- bis niedrig micromolarem Bereich als Liganden-Konzentration die 10-fache Menge der Enzymkonzentration gewählt. Die Enzymkonzentration liegt meist zwischen 10 µM und 50 µM. Bei größeren *K*D-Werten wird die Ligandenkonzentration oft erhöht. Je nach Gerät sollte C zwischen 1-1000 liegen, um Bindungsaffinitäten zu ermitteln, wobei C optimal zwischen 10 und 100 liegt (**Abbildung *4***).

**Ein Bild, das Screenshot, Grafiken, Reihe, Diagramm enthält.

Automatisch generierte Beschreibung**Für Liganden, mit geringer Affinität, ist es oft sehr schwer einen geeignet hohen C-Wert zu erhalten. Bei bekannten stöchiometischen Verhältnissen kann jedoch auch eine Titration mit einem C-Wert unter 10 durchgeführt werden (dies wird als *low C*- Titration bezeichnet). Die Bindungsisotherme verliert in diesem Fall ihre sigmoidale Form, durch Anpassung der Stöchiometrie lassen sich dennoch *K*D und Δ*H* ermitteln. Bei sehr affinen Liganden liegen C-Werte oft über 500, wodurch die Bindungsisothermen zu steil werden und der Wendepunkt nicht verlässlich bestimmbar ist. Der C-Wert kann zwar durch Verringerung der Proteinkonzentration gesenkt werden, ist [P] jedoch zu klein, sind die Signale der Bindung durch das ITC-System nicht mehr detektierbar.

**Abbildung 4**. Form von Bindungsisothermen für verschiedene C-Werte.

Eine Möglichkeit die Affinitäten besonders starker oder schwacher Liganden trotzdem verlässlich durch ITC zu bestimmen sind sogenannte Verdrängungstitrationen. Hier wird ein schwächerer Ligand in der Zelle mit dem Protein vorgelegt und durch Titration mit einem stärkeren Binder verdrängt. Somit ist die beobachtete Affinität (*K*Dapp) des hochaffinen Liganden gegenüber der *K*D des direkten Titrationsexperiments erhöht. Sind die thermodynamischen Parameter eines der Liganden bekannt können aus den beobachteten Werten für die Verdrängungstitration der *K*D-Wert und die thermodynamischen Parameter für den unbekannten starken oder schwachen Binder bestimmt werden (Formeln 5 und 6)[5].

(5)

(6)

Nach der Nomenklatur von Zhang&Zhangbezeichnet in Formel 5 und 6 der Index 1 die Werte des Liganden mit höherer Affinität und der Index 2 die Werte des Liganden mit geringerer Affinität. [5] L2tot ist die Konzentration des weniger affinen Liganden, welcher in der Zelle mit dem Protein vorinkubiert wird.

Durchführung

**Teil 1: Direkte Titrationen**

Bestimmen Sie den C-Wert der Titrationen (verwenden Sie für den *K*D-Wert die Literaturangaben), unter der Annahme das eine 1:1 Stöchiometrie vorliegt. Bewerten Sie, ob dieser für die jeweiligen Titrationen geeignet ist und welche Änderungen am experimentellen Setup/ der Auswertung eventuell notwendig sind. Besprechen Sie dies mit ihrem/ihrer Assistent\*in.

**Benzamidin**

Es wird der literaturbekannte **schwache** Inhibitor Benzamidin (21.7 µM)6 gegen Trypsin titriert. Die Titration wird in zwei unterschiedlichen Puffern, jeweils als Duplikat durchgeführt. Zusätzlich wird eine Kontrollmessungen des Liganden gegen den jeweiligen Puffer durchgeführt. Die Puffer werden Ihnen von dem/der Assistent\*in zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 1. Zusammensetzung der Puffer.**

|  |  |
| --- | --- |
| **Puffer** | **Zusammensetzung** |
| **HEPES** | 50 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl |
| **TRIS** | 50 mM TRIS pH 7.4, 100 mM NaCl |

**Schritt 1: Vorbereitung der benötigten Lösungen**

**Wichtig:** Berechnen Sie erst alle Volumina und besprechen diese mit dem/der Assistent\*in bevor Sie die Lösungen ansetzten!

Ihnen werden Stammlösungen von Trypsin (**150 µM**) und Benzamidin (**50 mM**) zur Verfügung gestellt. Der Inhibitor ist in MQ-Wasser und das Enzym in Puffer gelöst. Sie benötigen folgende Lösungen:

* Enzym-Lösung: **740 µL** mit einer Konzentration von **100 µM** Trypsin. (jeweils für TRIS und HEPES Puffer)
* Liganden-Lösung: **540 µL** mit einer Konzentration von **2.5 mM** Benzamidin. (jeweils in TRIS und in HEPES Puffer)

Berechnen Sie das benötigte Volumen an Stammlösung und ergänzen Sie den Rest mit dem jeweiligen Puffer. Achten Sie bei den Enzym-Lösungen darauf den richtigen Puffer mit der richtigen Stammlösung zu verwenden (bsp. Die Verdünnung der TRIS-Stammlösung in TRIS-Puffer).

Beachten Sie weiterhin, dass die Liganden-Lösung im Vergleich zur Enzym-Lösung einen prozentualen Überschuss an milli-Q®(MQ)-Wasser enthält, da die Stammlösung aus reinem MQ-Wasser besteht. Berechnen Sie wie groß dieser Überschuss ist und bestimmen Sie das Volumen an MQ-Wasser, welches der Enzym-Lösung zugesetzt werden muss, um diesen auszugleichen. Das von Ihnen berechnete Volumen an MQ-Wasser muss von der Zugabe an Puffer abgezogen werden.

Für Kontrollexperimente und das Vorspülen der Probenzelle benötigen Sie weiterhin 3  mL des jeweiligen Puffers mit dem gleichen MQ-Wasserüberschuss, welcher in den Enzym- und Inhibitor-Lösungen enthalten ist.

**Schritt 2: Befüllen der Mikrotiterplatten**

* Die zuvor hergestellten Lösungen werden nun in Mikrotiterplatten pipettiert. Von der Inhibitor-Lösung werden pro Messung 180 µL und von der Enzym-Lösung 370 µL benötigt.
* Für die Kontrollmessung wird weiterhin ein Well mit 1 mL Puffer befüllt, zusätzlich wird ein weiteres Well mit 1 mL Puffer zum Vorspülen der Probenzelle befüllt.
* Jedes Well ist dabei eindeutig und gut leserlich zu beschriften!
* Die Programmierung der Software wird anschließend von dem/der Assistent\*in durchgeführt.

Die Titration erfolgt vollautomatisch durch das ITC-Gerät instrument (MicroCal PEAQ-ITC Automated, Malvern Panalytical, United Kingdom). Die Messtemperatur beträgt 25 °C und die Liganden werden jeweils 19-mal in einem Abstand von 150 s in die Probenzelle injiziert. Pro Injektion werden je 2 µL innerhalb von 4 s in die Probenzelle gegeben. Die Ergebnisse aller Studierenden für das Protokoll werden Ihnen am Ende der Versuchswoche zur Verfügung gestellt.

**Leupeptin**

Es wird der literaturbekannte **starke** Inhibitor Leupeptin (40.4 nM)7 gegen Trypsin titriert. Die Titration wird in HEPES-Puffer (Siehe Tabelle 1) als Duplikat durchgeführt. Zusätzlich wird eine Kontrollmessungen des Liganden gegen den Puffer durchgeführt.

**Schritt 1: Vorbereitung der benötigten Lösungen**

**Wichtig:** Berechnen Sie erst alle Volumina und besprechen diese mit dem/der Assistent\*in bevor Sie die Lösungen ansetzten!

Ihnen werden Stammlösungen von Trypsin (**150 µM**) und Leupetin (**20 mM**) zur Verfügung gestellt. Der Inhibitor ist in MQ-Wasser und das Enzym in HEPES Puffer gelöst. Sie benötigen folgende Lösungen:

* Enzym-Lösung: **740 µL** mit einer Konzentration von **10 µM** Trypsin.
* Inhibitor-Lösung: **540 µL** mit einer Konzentration von **100 µM** Leupeptin.

Berechnen Sie das benötigte Volumen an Stammlösung und ergänzen Sie den Rest mit Puffer.

Beachten Sie, dass die Inhibitor-Lösung im Vergleich zur Enzym-Lösung einen prozentualen Überschuss an MQ-Wasser enthält, da die Stammlösung aus reinem MQ-Wasser besteht. Berechnen Sie wie groß dieser Überschuss ist und bestimmen Sie das Volumen an MQ-Wasser, welches der Enzym-Lösung zugesetzt werden muss, um diesen auszugleichen. Das von Ihnen berechnete Volumen an MQ-Wasser muss von der Zugabe an Puffer abgezogen werden.

Für Kontrollexperimente und das Vorspülen der Probenzelle benötigen Sie weiterhin 3 mL des Puffers mit dem gleichen MQ-Wasserüberschuss welcher in den Enzym- und Inhibitor-Lösung enthalten sind.

**Schritt 2: Befüllen der Mikrotiterplatten**

* Die zuvor hergestellten Lösungen werden nun in Mikrotiterplatten pipettiert. Von der Inhibitor-Lösung werden pro Messung 180 µL und von der Enzym-Lösung 370 µL benötigt.
* Für die Kontrollmessung wird weiterhin ein Well mit 1 mL Puffer befüllt, zusätzlich wird ein weiteres Well mit 1 mL Puffer zum Vorspülen der Probenzelle befüllt.
* Jedes Well ist dabei eindeutig und gut leserlich zu beschriften!
* Die Programmierung der Software wird anschließend von dem/der Assistent\*in durchgeführt.

Die Titration erfolgt im Anschluss vollautomatisch durch das ITC-Gerät. Die Messtemperatur beträgt 25 °C und die Liganden werden jeweils 19-mal in einem Abstand von 300 s in die Probenzelle injiziert. Pro Injektion werden je 2 µL innerhalb von 4 s in die Probenzelle gegeben. Die Ergebnisse aller Studierenden für das Protokoll werden Ihnen am Ende der Versuchswoche zur Verfügung gestellt.

**Teil 2: Verdrängungstitration von Benzamidin mit Leupeptin**

In diesem Versuchsteil wird eine Verdrängungstitration des wenig affinen Trypsinligandens Benzamidin durch den hochaffinen Liganden Leupeptin durchgeführt.

**Schritt 1: Vorbereitung der benötigten Lösungen**

**Wichtig:** Berechnen Sie erst alle Volumina und besprechen diese mit dem/der Assistent\*in bevor Sie die Lösungen ansetzten!

Ihnen werden Stammlösungen des Enzyms (**150 µM**), von Benzamidin (**50 mM**) und Leupeptin (**20 mM**) zur Verfügung gestellt. Die Inhibitoren sind in MQ-Wasser und das Enzym in HEPES Puffer gelöst. Sie benötigen folgende Lösungen:

* Enzym-Lösung: **740 µL** mit einer Konzentration von **10 µM** Trypsin und **250 µM** Benzamidin.
* Inhibitor-Lösung: **540 µL** mit einer Konzentration von **100 µM** Leupeptin.
* Kontroll-Lösung: **370 µL** mit einer Konzentration von **250 µM** Benzamidin.

Berechnen Sie das benötigte Volumen an Stammlösung und ergänzen Sie den Rest mit Puffer.

Für das Vorspülen der Probenzelle benötigen Sie weiterhin 2 mL des Puffers mit dem gleichen MQ-Wasserüberschuss welcher in den Enzym- und Inhibitor-Lösung enthalten sind.

**Schritt 2: Befüllen der Mikrotiterplatten**

* Die zuvor hergestellten Lösungen werden nun in Mikrotiterplatten pipettiert. Von der Inhibitor-Lösung werden pro Messung 180 µL und von der Enzym-Lösung 370 µL benötigt.
* Für die Kontrollmessung wird weiterhin ein Well mit 370 µL Kontroll-Lösung befüllt, zusätzlich wird ein weiteres Well mit 1 mL Puffer zum Vorspülen der Probenzelle befüllt.
* Jedes Well ist dabei eindeutig und gut leserlich zu beschriften!
* Die Programmierung der Software wird anschließend von dem/der Assistent\*in durchgeführt.

Die Titration erfolgt im Anschluss vollautomatisch durch das ITC-Gerät. Die Messtemperatur beträgt 25 °C und die Liganden werden jeweils 19-mal in einem Abstand von 300 s in die Probenzelle injiziert. Pro Injektion werden je 2 µL innerhalb von 4 s in die Probenzelle gegeben. Die Ergebnisse aller Studierenden für das Protokoll werden Ihnen am Ende der Versuchswoche zur Verfügung gestellt.

Protokolle

Schreiben Sie eine kurze theoretische Einführung. Für die Durchführung kann auf das Praktikumsskript verwiesen werden. Abweichungen von der Durchführung sind im Protokoll zu erwähnen!

Die am Versuchstag ermittelten Werte werden Ihnen vom dem/der Assistent\*in. zur Verfügung gestellt. Bestimmen Sie jeweils den Mittelwert der Zweifachbestimmungen und tragen Sie die Werte in **Tabelle 2** ein. Berechnen Sie zusätzlich jeweils die Fehlerwerte. Thermogramme, Isotherme und *signature plots* sind dem Protokoll im Anhang beizufügen.

**Tabelle 2. Template Ergebnisstabelle der Versuche.**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Titration | ITC-Puffer | *K*D | *n* | ∆*G* (kJ/mol) | ∆*Hobs* (kJ/mol) | –T∆*S* (kJ/mol) |
| Benzamidin  vs Trypsin | TRIS |  |  |  |  |  |
| HEPES |  |  |  |  |  |
| Leupeptin  vs Trypsin | HEPES |  |  |  |  |  |
| Leupeptin vs Trypsin  (Verdrängungstitration) | HEPES |  |  |  |  |  |

Für *K*D, *n* und ∆*Hobs* können die Fehler mittels Fehlerfortpflanzung berechnet werden (Formel 7).

(7)

Für ∆*G* und –T∆*S* geben Sie als Fehler die Standardabweichung des Mittelwerts an.

Die beschriebene Kombination aus Experimenten erlaubt darüber hinaus die Beschreibung von Protonentransfers bei der Bindung von Benzamidin an Trypsin, sowie die Bestimmung von Affinität und des thermodynamischen Bindungsprofils aus den Verdrängungstitrationen.

Ermitteln Sie für die Benzamidin vs Trypsin Titration die Anzahl der aufgenommenen oder abgegebenen Protonen *n*Proton, die intrinsische Bindungsenthalpie Δ*H*Bind und den daraus resultierenden Entropieterm -TΔ*S*Bind anhand der Messungen in unterschiedlichen Puffern (Darstellung ebenfalls in Tabellenform). Nutzen Sie zu diesem Zweck das „*Buffer ionization*“ tool des ITC-Calculators (verfügbar unter: [ITC Calculator (uni-mainz.de)](https://itccalc.uni-mainz.de/), **Wichtig**: Verwenden Sie „.“ als Dezimaltrennzeichen). Für ∆*G* verwenden Sie den Mittelwert aus den Messungen in unterschiedlichen Puffern. Zur Auswertung der Verdrängungstitration können Sie ebenfalls den ITC Calculator nutzen (Bei Unsicherheit wie die Werte einzutragen sind kann die „Tour Funktion“ für Erklärungen genutzt werden). Vergleichen Sie Ihre Ergebnisse mit den direkten Titrationen.

In der Diskussion sollen anschließend von jeder Gruppe die Messwerte **aller** Titrationen verglichen und diskutiert werden. Dabei sollen folgende Punkte im Protokoll bearbeitet werden:

* Diskutieren Sie die bestimmten Bindungsisothermen. Welche Größen lassen sich direkt ablesen, welche werden durch die Software berechnet?
* Erstellen Sie ein Balken-Diagramm (*Signature Plot*) in welchem Δ*H*, Δ*G* und –*T*Δ*S* dargestellt sind für die Benzamidin vs Trypsin Titrationen in TRIS-Puffer, HEPES-Puffer und nach der Pufferkorrektur
* Wie wirken sich folgende Faktoren auf die **Entropie** und/oder **Enthalpie** der Komplexbildung aus? Desolvatation der Liganden und des Trypsins, Neuausbildung von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Liganden und Enzym, Verlust an Freiheitsgraden der Bindungspartner.
* Wie unterscheiden sich die Ergebnisse der unterschiedlichen Puffer? Begründen Sie diesen Unterschied.
* Betrachten Sie die im Versuch bestimmte Stöchiometrie. Erscheint diese Ihnen sinnvoll? Was sind potenzielle Fehlerquellen des Versuchs welche diese beeinflussen können?
* Begründen Sie die Notwendigkeit des von Ihnen durchgeführten Kontrollexperiments. Welche weiteren Kontrollexperimente wären sinnvoll durchzuführen?
* Welche thermodynamische Größe muss sich während der Assoziation der Bindungspartner ändern, um während der Messung ein Signal zu erhalten?
* Welche Vorteile bietet die ITC gegenüber vieler anderer Methoden zur Affinitätsbestimmung? Was sind mögliche Nachteile?
* Diskutieren Sie die von Ihnen bestimmten C-Werte. Welche Lösungsansätze bei zu hohen/zu niedrigen C-Werten haben Sie verwendet? Diskutieren Sie, ob diese erfolgreich waren für die Titrationen von Benzamidin und Leupeptin in HEPES-Puffer sowie die Verdrängungstitration.
* Berechnen Sie anhand Ihrer Messwerte LE und LLE für Benzamidin und Leupeptin. Was drücken diese Parameter aus?

QuelleN und weitere Links

[1] Pierce, M. M.; Raman, C. S.; Nall, B. T. Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods (San Diego, Calif.)* **1999**, *19*, 213–221.

[2] Perozzo, R.; Folkers, G.; Scapozza, L. Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. *Journal of receptor and signal transduction research* **2004**, *24*, 1–52.

[3] Williams, M. A.; Daviter, T. *Protein-Ligand Interactions* 1008; Humana Press: Totowa, NJ, 2013.

[4] Wiseman, T.; Williston, S.; Brandts, J. F.; Lin, L. N. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Analytical biochemistry* **1989**, *179*, 131–137.

[5] Zhang, Y. L.; Zhang, Z. Y. Low-affinity binding determined by titration calorimetry using a high-affinity coupling ligand: a thermodynamic study of ligand binding to protein tyrosine phosphatase 1B. *Analytical biochemistry* **1998**, *261*, 139–148.

[6] Talhout, R.; Engberts, J. B. F. N. Thermodynamic analysis of binding of p -substituted benzamidines to trypsin. *European Journal of Biochemistry* **2001**, *268*, 1554–1560.

[7] Kuramochi, H.; Nakata, H.; Ishii, S. Mechanism of association of a specific aldehyde inhibitor, leupeptin, with bovine trypsin. *Journal of biochemistry* **1979**, *86*, 1403–1410.

[Principles of isothermal titration calorimetry (ITC) - YouTube](https://www.youtube.com/watch?v=o_IpWcWKNXI)