

# Vpogled v reakcije in vezave molekul ter metode za merjenje interakcij

# Na porazdelitev stanj poleg energije vpliva tudi entropija

- Verjetnost za zasedenost stanja je odvisna od energije stanja (Boltzmannov faktor):

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

- Kadar se molekularna stanja močno razlikujejo, je pri oceni njihove verjetnosti ( $p_i$ ) potrebno upoštevati tudi razliko v entropiji:  
(tj. različno število možnih izvedb istega stanja -  $P_i$ )

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

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

# Dinamika kemijskih reakcij

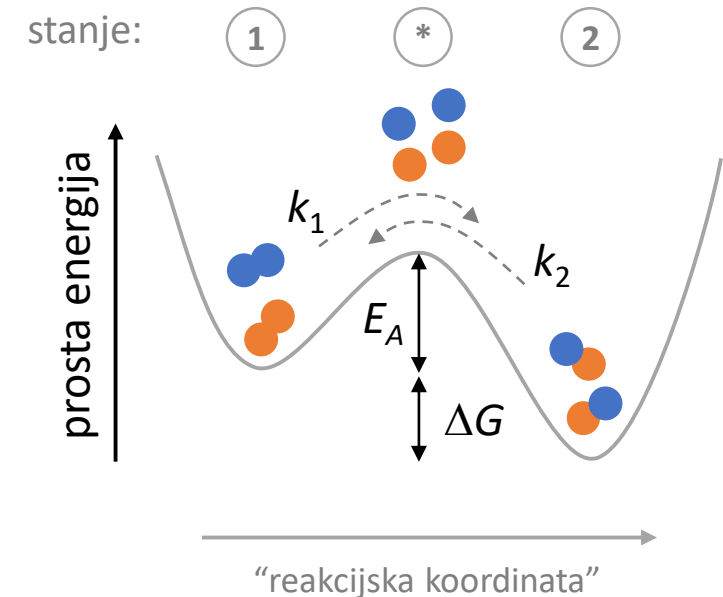
- Hitrost reakcije (spreminjanje koncentracij) je odvisna od verjetnosti vmesnega stanja:
  - koncentracije snovi v izhodiščnem stanju ( $c_i$ ) ter
  - neugodnosti vmesnega stanja \* (aktivacijska energija,  $E_A$ ):

$$\frac{dc_2}{dt} = k_1 c_1 - k_2 c_2 \quad \begin{aligned} k_1 &= A e^{-(E_A)/kT} \\ k_2 &= A e^{-(E_A - \Delta G)/kT} \end{aligned}$$

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

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

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



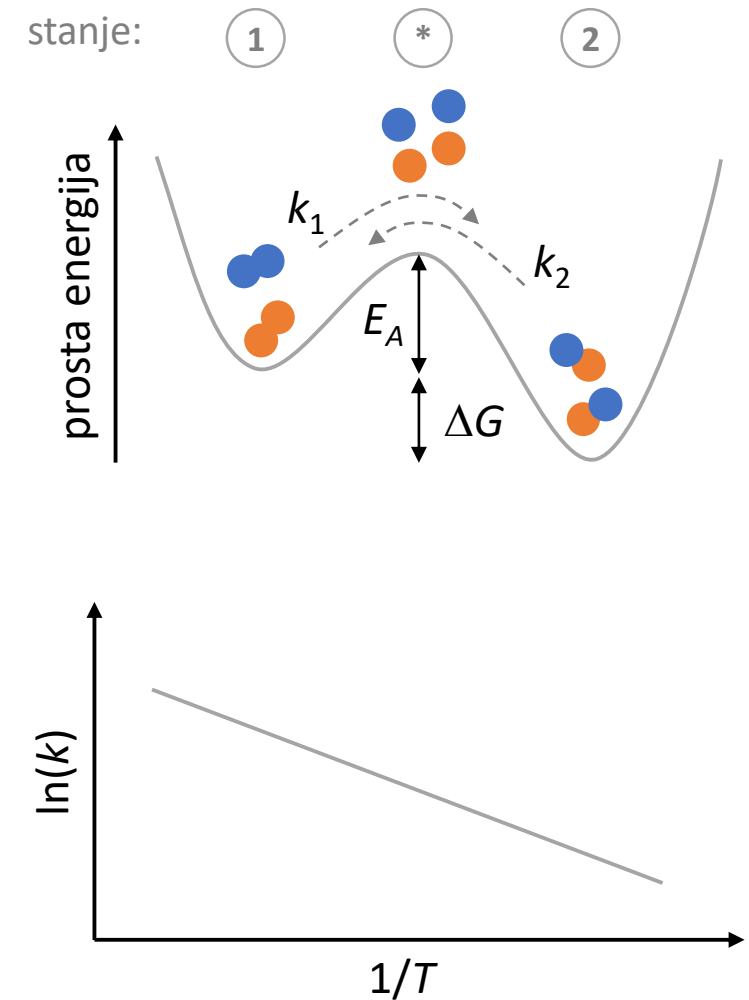
# Dinamika kemijskih reakcij

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

$$k_1 = A e^{-E_A/kT}$$

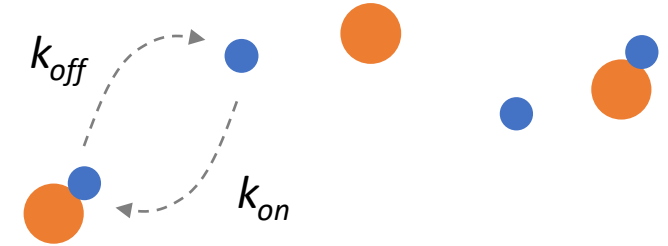
$$\ln(k_1) = \ln(A) - \frac{E_A}{k} \frac{1}{T}$$

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



# Dinamika vezave med molekulami

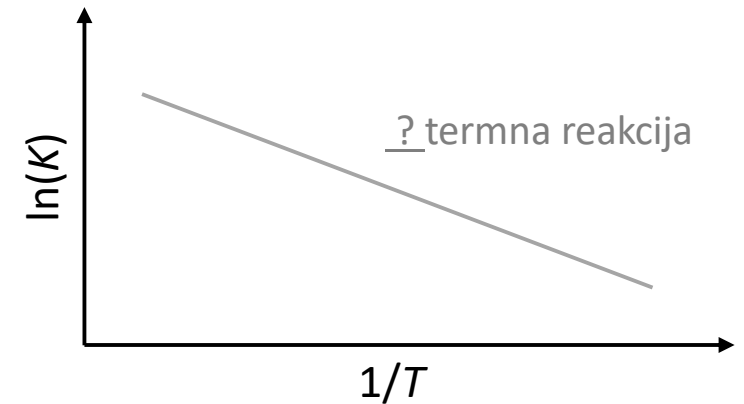
- Tudi pri vezavi liganda na receptor  $A + B \leftrightarrow AB$  gre za dinamično ravnovesje med reakcijama vezave ( $k_{on}$ ) in odcepljanja ( $k_{off}$ ). Nekaj liganda vedno ostane prostega.
- Ravnovesne koncentracije ponovno določa razlika v prosti energiji med vezanim in nevezanim ligandom:
-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



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

# Ali spremembe vodi energija ali entropija?

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



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



# Kalorimetrija

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

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

**H<sub>2</sub>O**:  $c_p = 4180 \text{ J/kgK} = 4.18 \text{ kJ/kg K} = 1 \text{ kcal/kg K}$

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

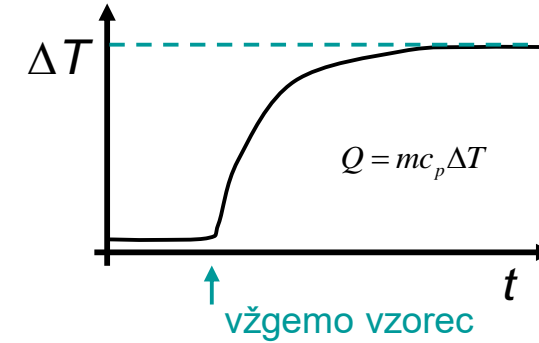
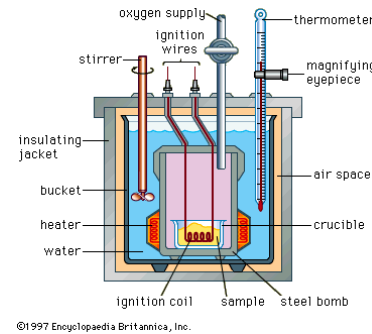
$$Q = mc_p \Delta T$$

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

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

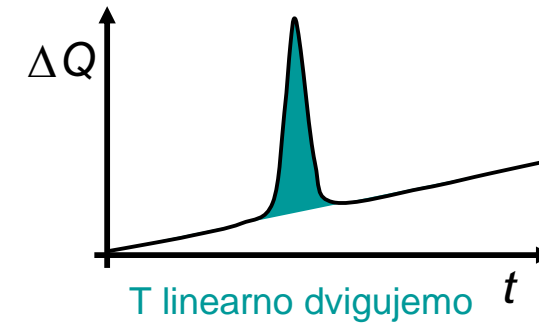
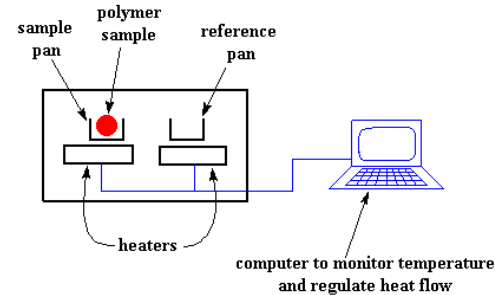
# Kalorimetrija – tri izvedbe

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

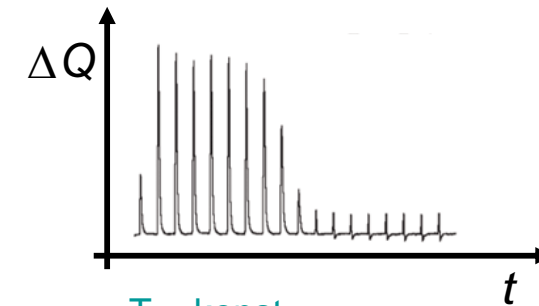
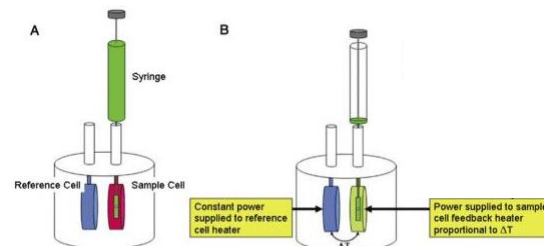


V bioloških sistemih:

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



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



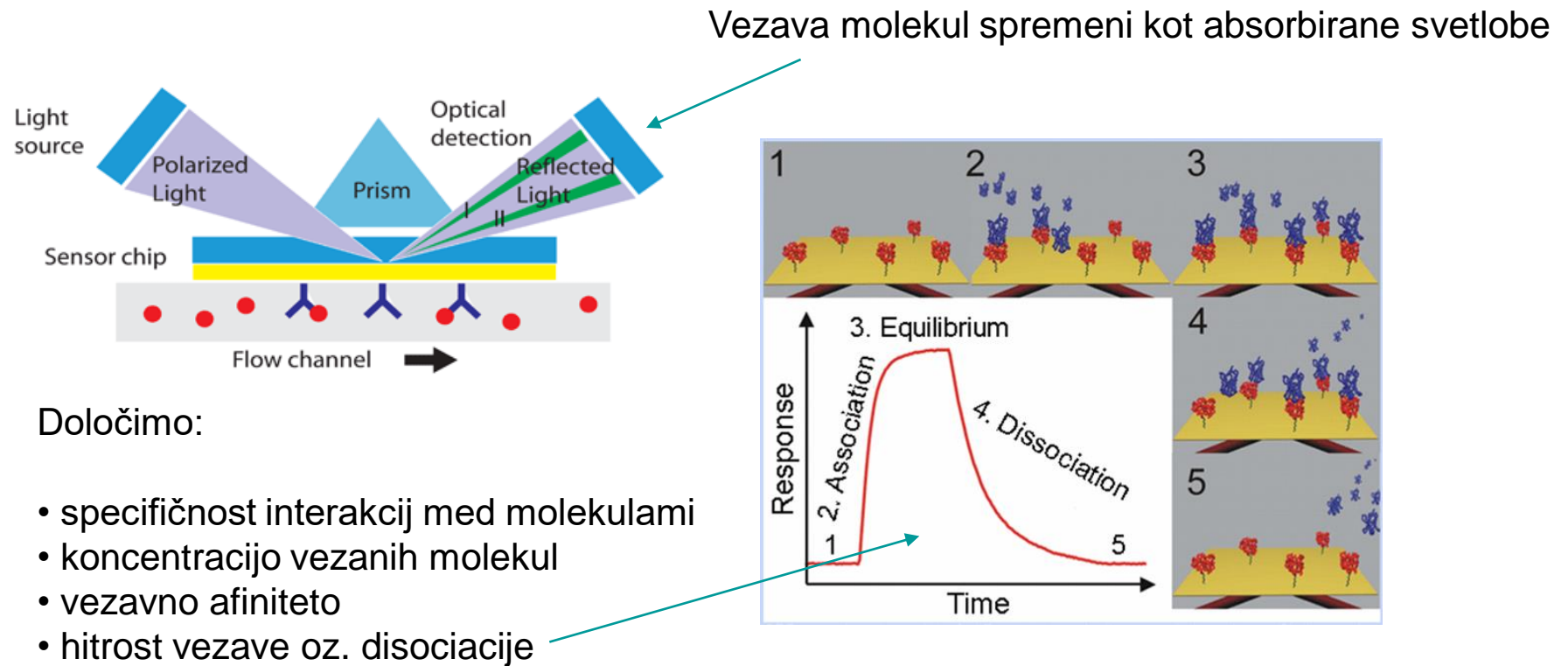
T = konst.,  
intervalno dodajamo "ligand"



# Površinska plazmonska resonanca (SPR)

ko zastavice zatemnijo nebo

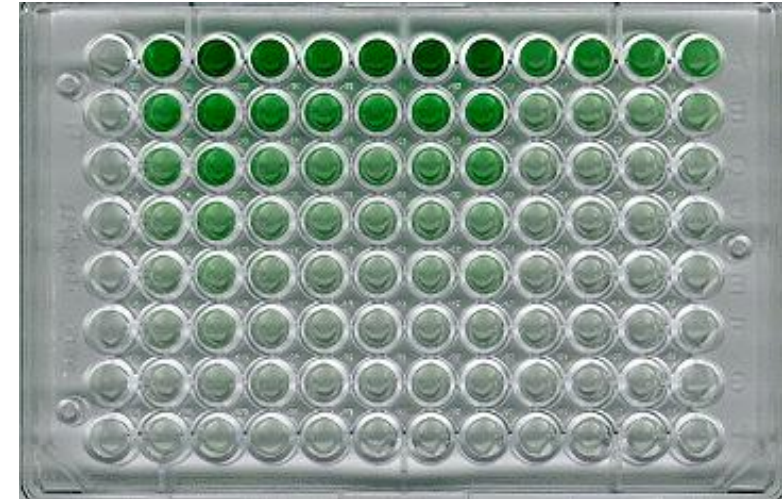
- Ko spremenimo opazovano tekočino, spremenimo lastnosti odbite svetlobe !



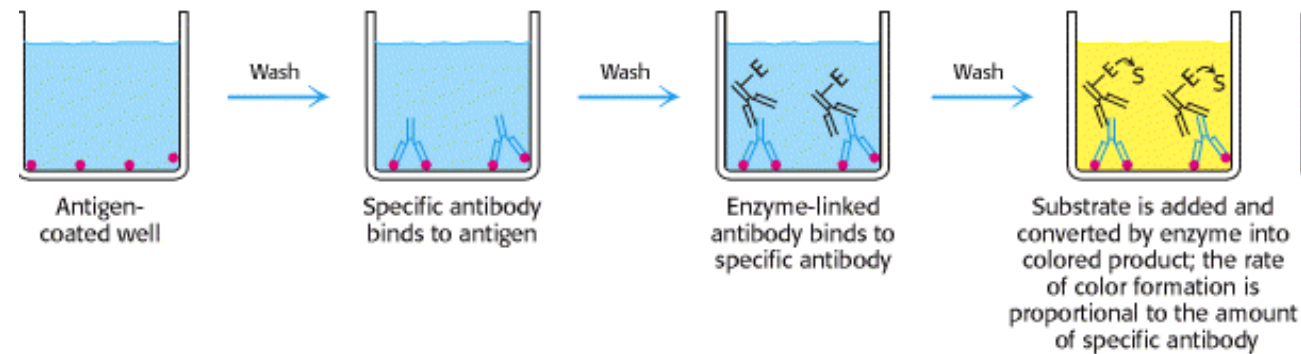
# Encimskoimunski test

z molekularnim ojačevalcem vidimo bolje

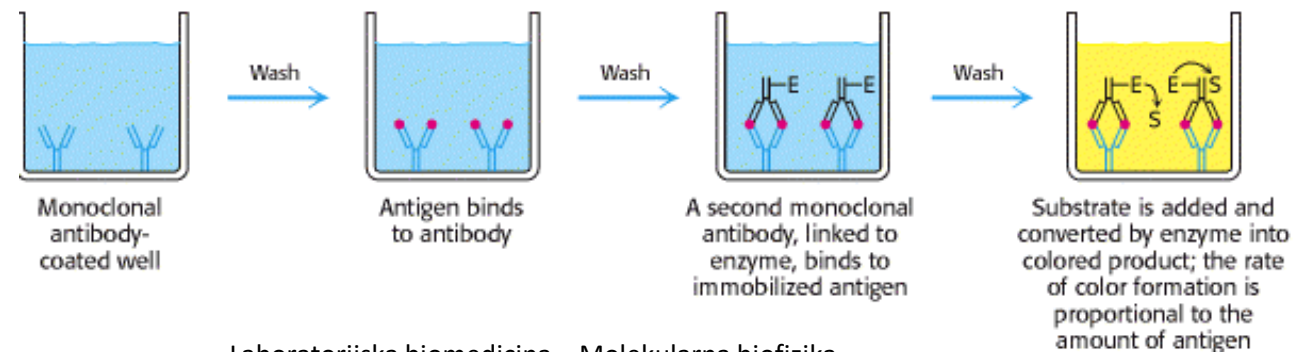
- Že vezava enega samega encima preko antigena ali protitelesa pretvori mnogo molekul substrata v molekule drugačne barve!



(A) Indirect ELISA



(B) Sandwich ELISA







# Osmoza

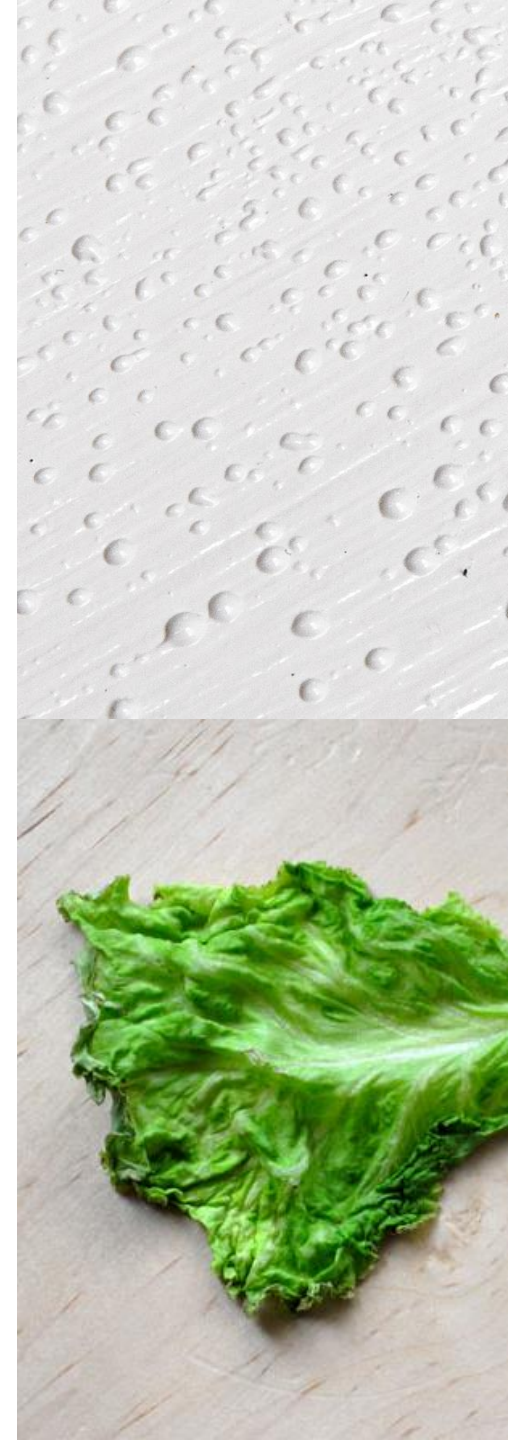


# Neravnovesje koncentracij

- Porazdelitev topljenca po topilu vpliva na prosto energijo sistema:

$$G = E - k_B T \ln(P) = E + kT \ln(c)$$

- Najnižja  $G$  ob enakomerni porazdelitvi topljenca (čim nižja koncentracija  $c$ , največ možnih načinov razporeditve:  $P \propto 1/c$ )
- Koncentracijo topljenca poskušata izenačiti tako topljenec kot topilo – oba v povprečju potujeta v smeri (svoje) nižje koncentracije.
- Gre za pasivni transport





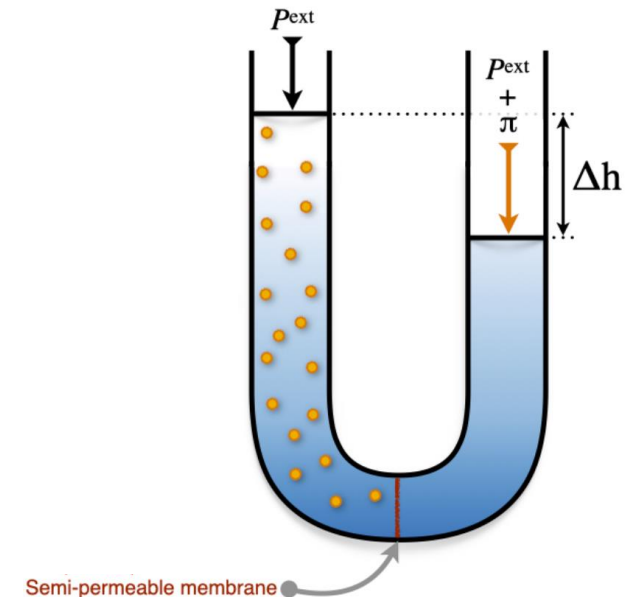
# Osmozni tlak

- Če dele prostora z različno koncentracijo topljenca ločuje membrana, skozi katero lahko prehaja le topilo, izgleda, kot da to gibanje (**osmozo**) poganja dodatni tlak.
- Ker se spreminja število delcev ( $N$ ), stanje namesto z  $G$  raje opišemo s kemijskim potencialom ( $\mu$  - za vsako snov  $i$  z molskim deležem  $x_i$ ):

$$\mu_i = \frac{\partial G_i}{\partial N_i} = E_i + pV_i + k_B T \ln(x_i)$$

- **Osmozni tlak** ( $\pi$ ) je sorazmeren razliki koncentracij topljenca ( $\Delta c$ ):

$$\pi = N_A k_B T \Delta c$$

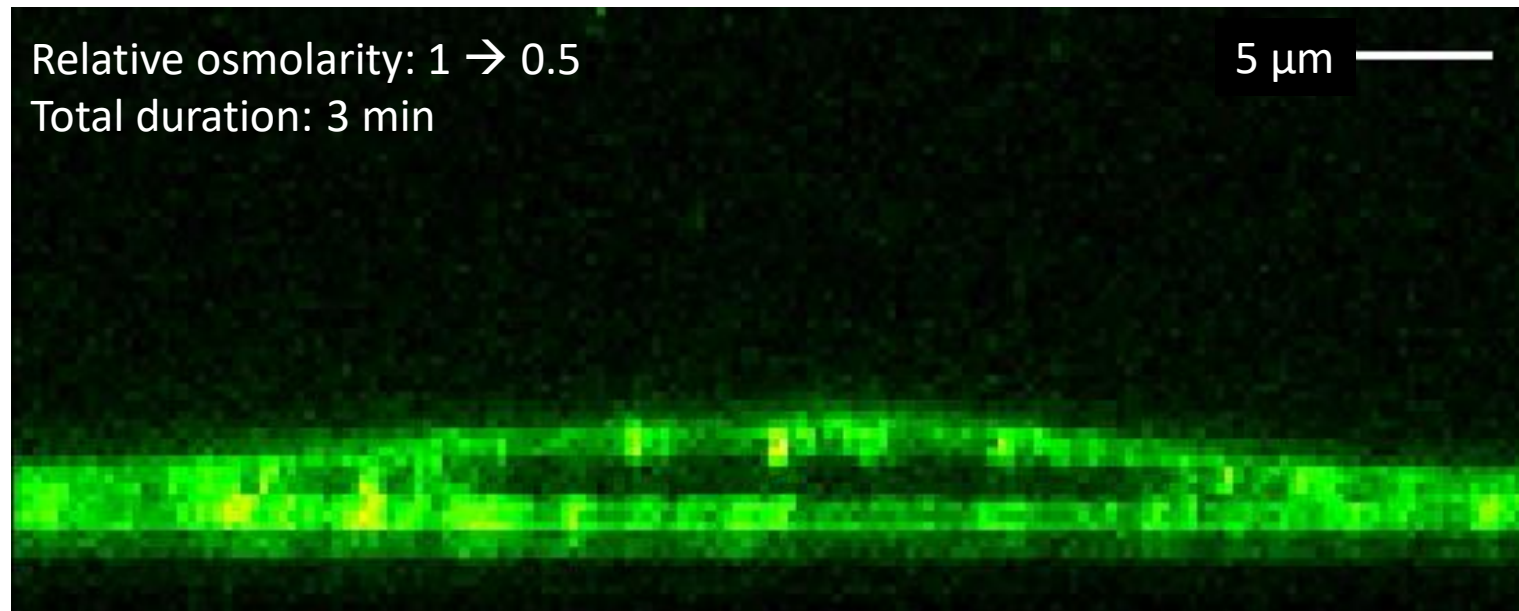


# Primer: raztapljanje tablete

1. Kapilarni vlek in osmozni tlak vlečeta vodo v tableto
2. Tableta zato nabrekne
3. Poveča se površina izmenjalne plasti
4. Osmozni tlak povleče snovi s površine tablete v vodo
5. V nekaterih tabletah se sproščajo mehurčki plina, ki pospešujejo mešanje tekočine z izločenimi snovmi



# Primer: celica v hipotoničnem okolju





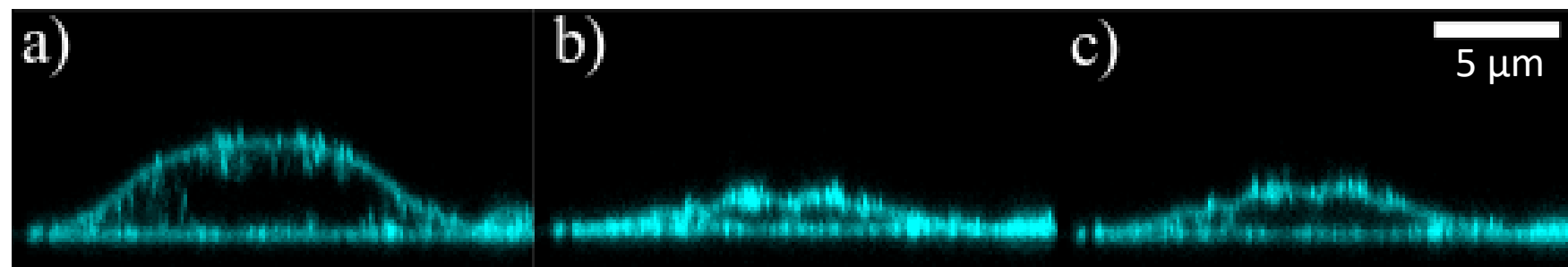
# Primer: celica v hipo-/hipertoničnem okolju

Relative  
osmolarity:

$1 \rightarrow 0.5$



$1 \rightarrow 2$



V: Kolikšen je osmozni tlak krvne plazme (proti vodi)?

# Osmometer na parni tlak

- Kako izmerimo osmolarnost raztopine?
- Kemijski potencial molekul topila v **čistem topilu** ali v **raztopini** je različen!  
→ različna parna tlaka topila
- Parni tlak je odvisen tudi od T  
→ **Razlika v T**, pri kateri izenačimo parni tlak topila in raztopine, je merilo za količino topljenca (**OSMOLARNOST**)

