

Mesure de l'interaction
protéine-ligand,
protéine-ADN,
protéine-protéine par
Microcalorimétrie

La microcalorimétrie qu'est-ce que c'est ?

- Méthode de mesure des paramètres thermodynamiques d'une liaison

- Constante d'association K_a
- Enthalpie, Énergie libre de Gibbs, Entropie
- Stoechiométrie de la réaction
(nombre de sites de liaison)
- Capacité thermique



$$\Delta G = - RT \ln K_a = \Delta H - T\Delta S$$

On connaît la qtt de protéine et celle de ligand introduit à l'arrêt de la réaction

$$\Delta H = \Delta H_{ref} - \Delta C_p (T - T_{ref})$$

Intérêt

- La majorité des réactions sont endo ou exothermiques
- Chaleur dégagée et vitesse de réaction sont proportionnelle
- Possibilité de suivre des réactions lentes / peu énergétiques
- Pas d'interaction avec le milieu

Le calorimètre

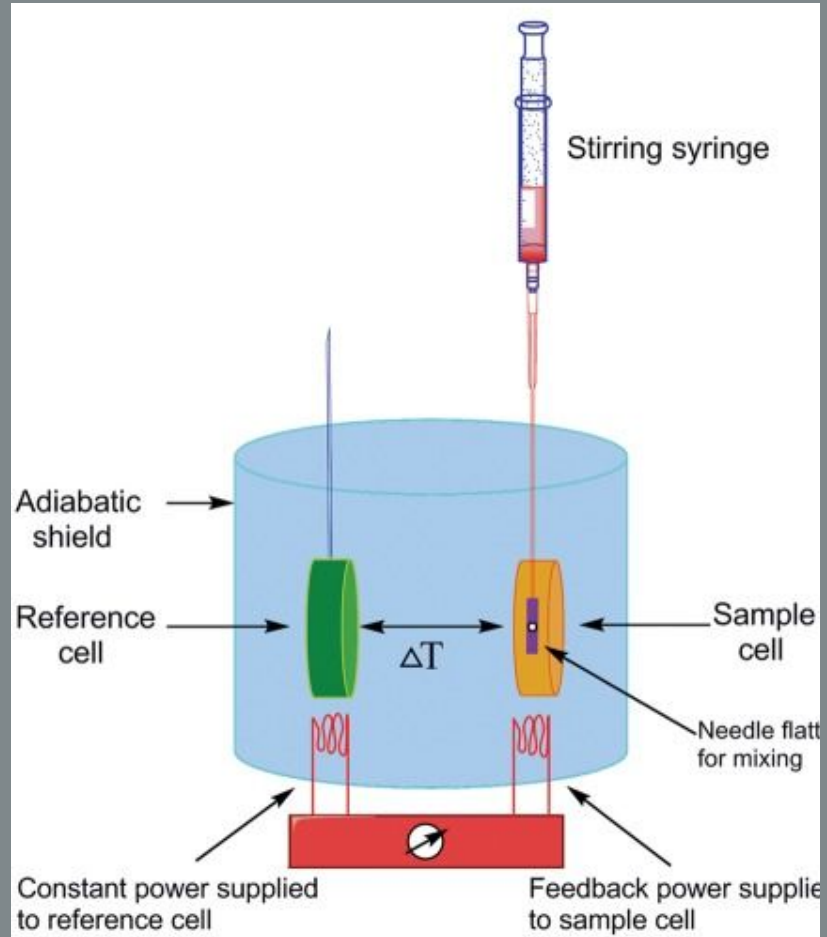
Effet Peltier-Seebeck

$$\Delta V = S \Delta T$$

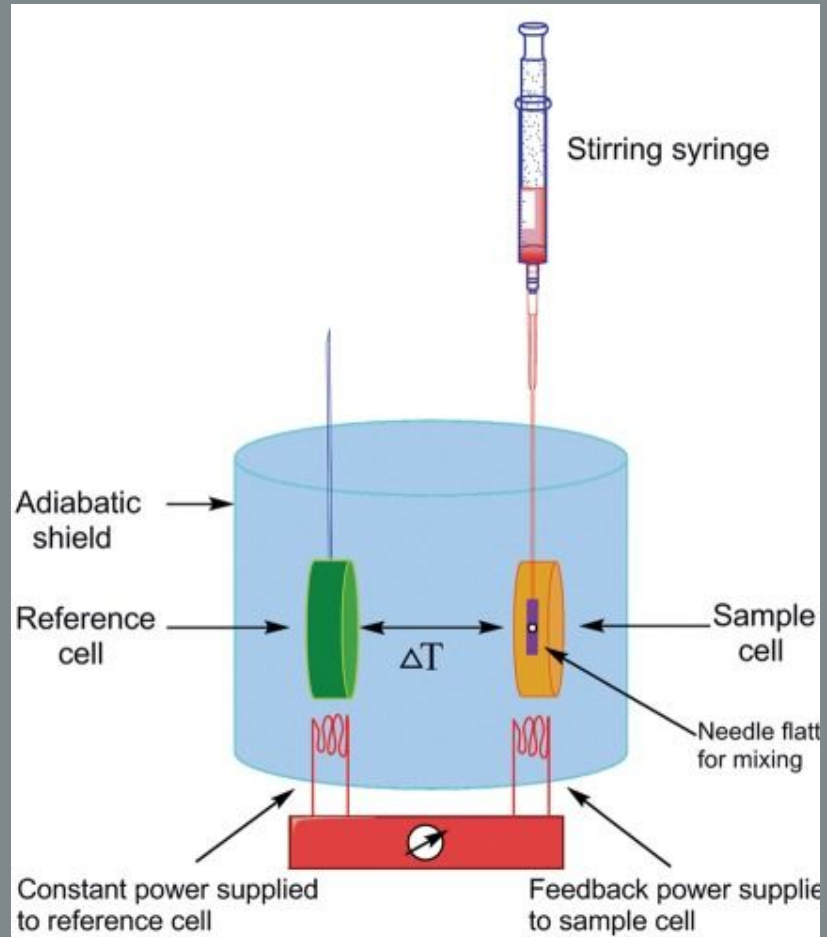
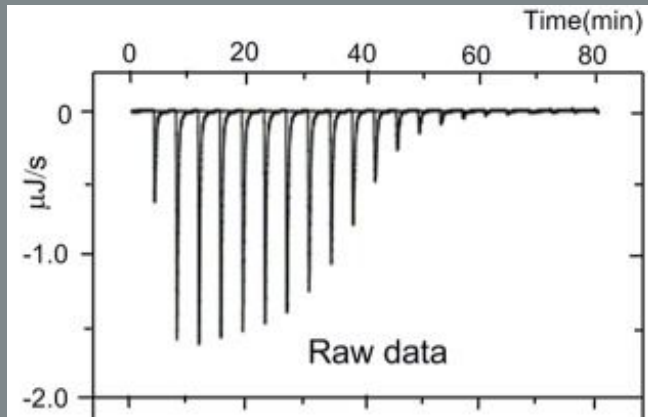
ΔV : tension électrique entre les deux cellules (V)

S le coefficient de Seebeck (V/K)

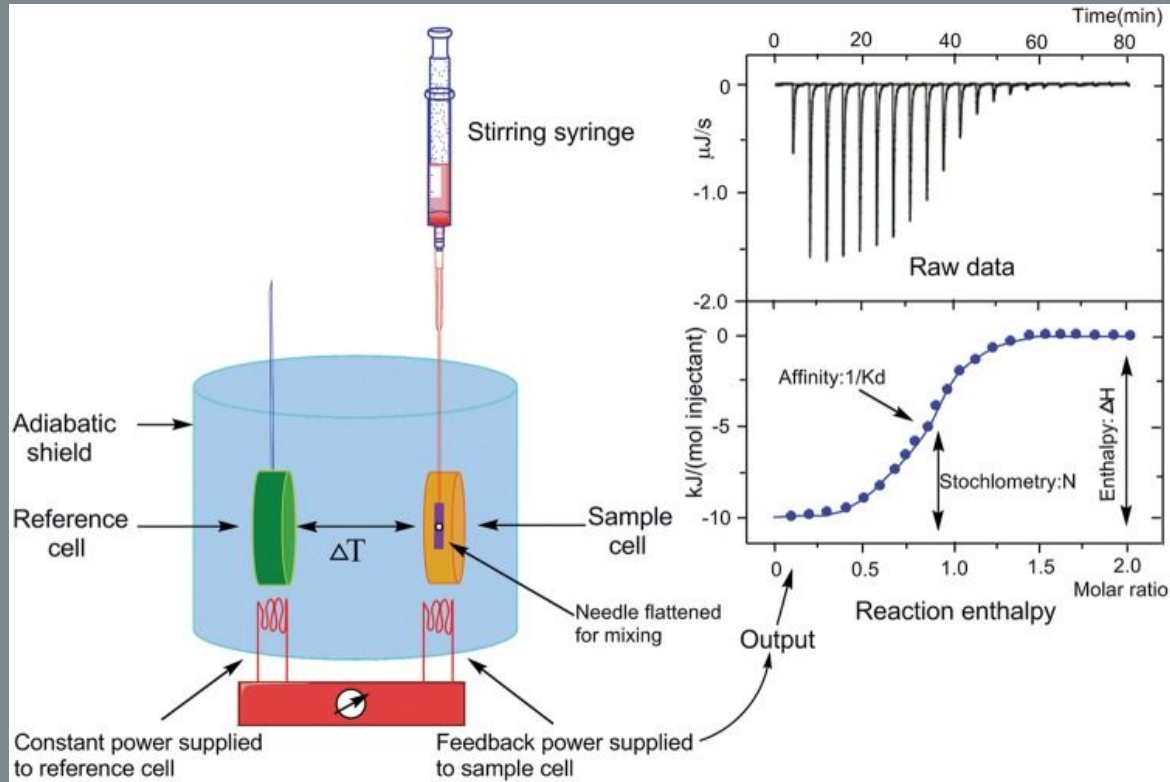
ΔT la différence de température entre les deux cellules (K)



Le calorimètre



Le calorimètre



Précautions

- Température constante de l'enceinte
- Homogénéité des tampons
- Absence de contaminants
- Connaître la concentration exacte de la protéine et du ligand

Les limites

- stabilité de la protéine et du ligand à 25°C , 1h
- pour des résultats fiables : $5 < C < 500$ avec

$$C = n[P] / K_d$$

- K_d nM
- $K_d < 100 \mu\text{M}$

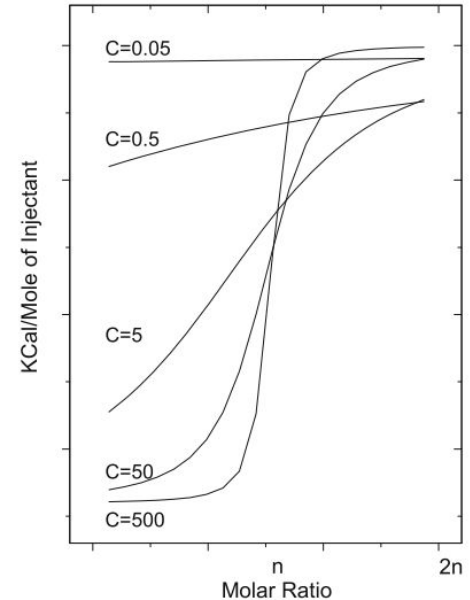


Fig. 2 Simulated binding isotherms for various values of the parameter C

Applications de la microcalorimétrie



HHS Public Access

Author manuscript

Methods. Author manuscript; available in PMC 2016 June 17.

Published in final edited form as:

Methods. 2015 April ; 76: 171–182. doi:10.1016/j.ymeth.2015.01.012.

Isothermal titration calorimetry of ion-coupled membrane transporters

Olga Boudker and Oh SeCheol

Department of Physiology & Biophysics, Weill Cornell Medical College, New York, 10021 USA

Olga Boudker: olb2003@med.cornell.edu; Oh SeCheol: seo2003@med.cornell.edu

Applications de la microcalorimétrie

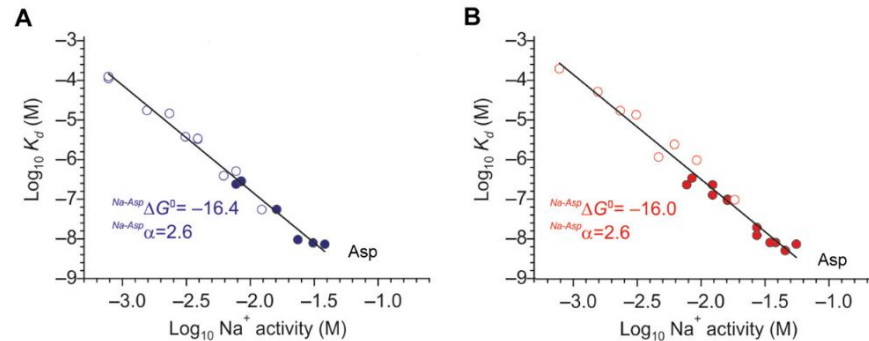
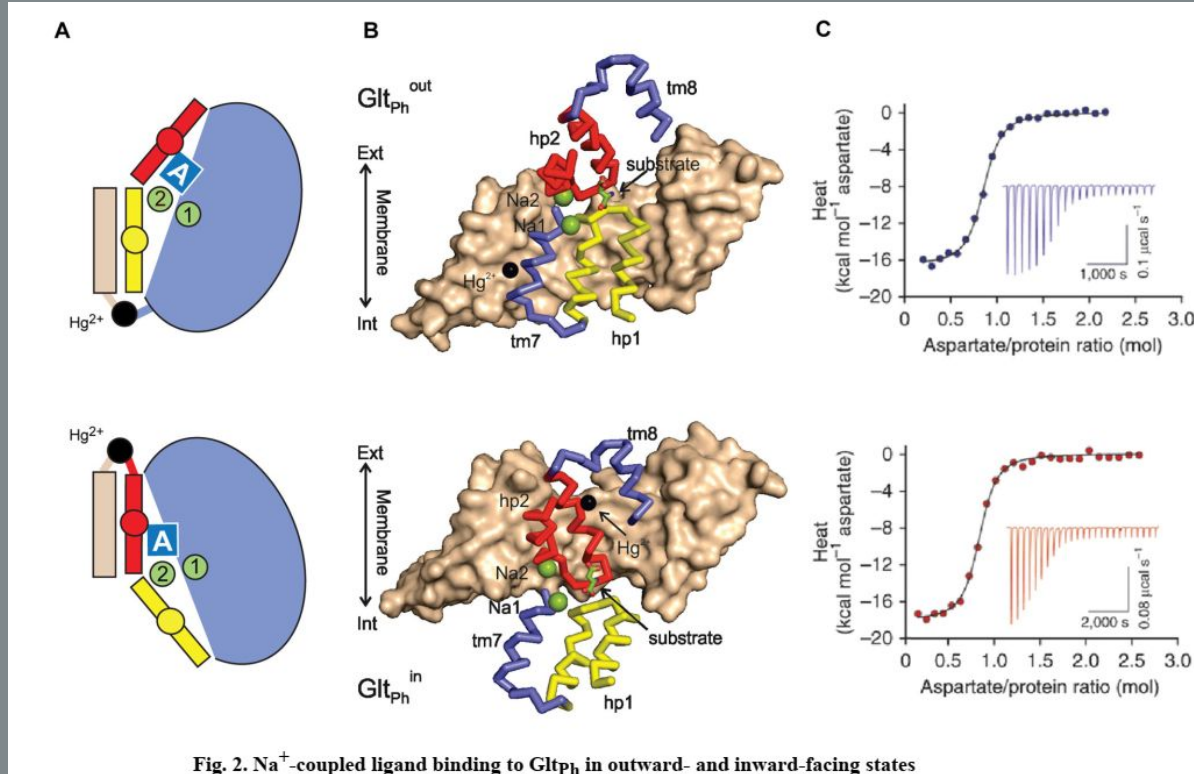


Fig. 3. Coupled Na^+ and aspartate binding

ogarithmic plots of the apparent K_D -s for aspartate as functions of Na^+ activities. Ligand K_D -s for outward- (top) and inward-facing states (bottom) were measured by ITC (filled symbol) and fluorescence-based assay (open symbol). The slopes (a) of the linear fits to the data (solid lines) correspond to the) of to apparent number of Na^+ ions coupled to ligand binding. Standard free energies of coupled Na^+ and aspartate binding obtained by extrapolating data to standard conditions of 1 M Na^+ activity (ΔG° , kcal/mol) are shown in the panels. Panels **A** and **B** were adapted and modified from Reyes, *et al.* (15).

Complémentarité avec d'autres techniques



Merci pour votre attention !!

Références

1. Damian, L. Isothermal Titration Calorimetry for Studying Protein–Ligand Interactions. in *Protein-Ligand Interactions* (eds. Williams, M. A. & Daviter, T.) vol. 1008 103–118 (Humana Press, 2013).
2. Boudker, O. & Oh, S. Isothermal titration calorimetry of ion-coupled membrane transporters. *Methods San Diego Calif* **76**, 171–182 (2015).
3. Song, C., Zhang, S. & Huang, H. Choosing a suitable method for the identification of replication origins in microbial genomes. *Front. Microbiol.* **6**, (2015).