

ΕΥΡΕΣΗ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΜΕΣΩ ΙΣΟΘΕΡΜΙΚΗΣ ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑΣ ΣΥΝΕΧΟΥΣ ΕΓΧΥΣΗΣ

Σ.ΜΗΝΑΔΑΚΗ^{1,*}, Α. ΑΡΜΑΟΥ^{1,2}

¹Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, Ελλάδα

²Department of Chemical Engineering, The Pennsylvania State University, University Park, US

(*up1060067@upnet.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ισοθερμική θερμιδομετρία (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) αποτελεί μια σημαντική τεχνική ανάλυσης για τον προσδιορισμό θερμοδυναμικών παραμέτρων που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση δυο μορίων, ενός που δρα ως δεσμός και ενός ως δέκτης. Η παραδοσιακή προσέγγιση είναι η μέθοδος της σταδιακής έγχυσης (Incremental Injection Approach, IIA-ITC) κατά την οποία η ουσία που δρα ως δεσμός εισέρχεται σταδιακά μέσω κρουστικών παλμών στο κελί του θερμιδόμετρου που περιέχει το δέκτη. Κατά την διάρκεια της αντίδρασης καταγράφεται η ποσότητα της εκλυόμενης ή προσλαμβανόμενης θερμότητας και δημιουργείται το θερμογράφημα. Ο υπολογισμός των θερμοδυναμικών παραμέτρων, (ενθαλπία, εντροπία, στοιχειομετρία) και της σταθεράς ισορροπίας, K , γίνεται με την ολοκλήρωση της καμπύλης του θερμογραφήματος σε κάθε παλμό.^[1] Ωστόσο, ο περιορισμένος αριθμός πειραματικών σημείων που εξάγονται με την μέθοδο IIA-ITC δυσκολεύει τον υπολογισμό των παραμέτρων για συστήματα όπου η τιμή του K είναι υψηλή. Για τέτοια συστήματα έχει προταθεί η μέθοδος συνεχούς έγχυσης^[2] (Continuous Injection Approach, CIA-ITC), η οποία παρέχει αυξημένο αριθμό πειραματικών δεδομένων και μικρότερους χρόνους διεξαγωγής του πειράματος. Η ισοθερμική θερμιδομετρία μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης για τον υπολογισμό κινητικών παραμέτρων (kinITC) μέσω μοντέλων κινητικής^[3]. Σε πειράματα IIA-ITC ο υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων επιτυγχάνεται προσαρμόζοντας τις προβλέψεις του μοντέλου στο σχήμα κάθε κορυφής του θερμογραφήματος, η οποία προκύπτει από την παλμική έγχυση του δεσμού στο κελί της θερμιδομετρίας. Στην περίπτωση του CIA-ITC δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί η kinITC καθώς η συνεχής έγχυση του δεσμού δεν οδηγεί στο σχηματισμό κορυφών στο θερμογράφημα. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, προτείνουμε μία νέα μέθοδο για τον υπολογισμό κινητικών δεδομένων για την CIA-ITC. Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των παραμέτρων σε τρία διαφορετικά συστήματα πρόσδεσης: το απλό σύστημα πρόσδεσης ενός δεσμού με ένα δέκτη, το ανταγωνιστικό σύστημα πρόσδεσης δυο διαφορετικών δεσμών σε έναν δέκτη και στο σύστημα πρόσδεσης ενός δεσμού σε δύο διαφορετικούς δέκτες. Ο υπολογισμός των επιθυμητών θερμοδυναμικών και κινητικών παραμέτρων γίνεται με την επιλογή τιμών των παραμέτρων των αντίστοιχων μοντέλων κινητικής που ελαχιστοποιούν την απόκλιση μεταξύ των πειραματικών δεδομένων και των αρχικά αλγεβρικών και μετά δυναμικών περιγραφών του συστήματος που μελετάμε. Η αξιοπιστία της μεθόδου βεβαιώνεται από την μικρή διαφορά των υπολογισμένων παραμέτρων και των βιβλιογραφικών τιμών.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: ΙΣΟΘΕΡΜΙΚΗ ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΣΥΝΕΧΗΣ ΕΓΧΥΣΗΣ, ΚΙΝΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ, ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εύρεση των θερμοδυναμικών παραμέτρων είναι ιδιαίτερα σημαντική για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων της πρόσδεσης του δέκτη και του συνδέτη στην βιολογία^[4] και στην αλληλεπίδραση μορίων σε πεδία όπως η επιστήμη υλικών^[5] και η νανοτεχνολογία^[1,5]. Η Ισοθερμική

Θερμιδομετρία τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry- ITC) είναι ένα σημαντικό εργαλείο για την εύρεση των επιθυμητών θερμοδυναμικών παραμέτρων. Το πείραμα του ITC πραγματοποιείται σε δοχείο με σταθερό όγκο που περιέχει τον δέκτη και εγχέεται σταδιακά ο συνδέτης. Κατά την διάρκεια της αντίδρασης η θερμότητα που παράγεται ή απορροφάται αντισταθμίζεται ώστε το σύστημα να παραμείνει σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες. Η παραδοσιακή προσέγγιση είναι η μέθοδος της σταδιακής έγχυσης^[1] (Isothermal Injection Approach – IIA-ITC). Η ισχύς που απαιτείται για την αντιστάθμιση των φαινομένων λόγω της παραγωγής ή της απορρόφησης θερμότητας ολοκληρώνεται και κατασκευάζεται το θερμογράφημα. Με την χρήση του θερμογραφήματος υπολογίζεται η τιμή της ενθαλπίας (ΔH) ενώ στο σημείο καμψής της σιγμοειδούς καμπύλης υπολογίζεται η σταθερά ισορροπίας (K) και η στοιχειομετρική αναλογία (n) των σημείων πρόσδεσης ανά δέκτη. Η τεχνική της ισοθερμικής θερμιδομετρίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί όμως και για τον υπολογισμό κινητικών παραμέτρων όπως τον ρυθμό αντίδρασης σχηματισμού (k_{on}). Η μέθοδος που έχει αναπτυχθεί είναι kinITC^[3] και χρησιμοποιείται σε πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί με την προσέγγιση της σταδιακής έγχυσης (IIA-ITC). Ο υπολογισμός του k_{on} γίνεται προσαρμόζοντας προβλέψεις του μοντέλου στο σχήμα κάθε κορυφής του θερμογραφήματος. Ωστόσο ο περιορισμένος αριθμός πειραματικών σημείων δεν επιτρέπει την εύρεση των επιθυμητών δεδομένων για συστήματα με υψηλή συγγένεια μεταξύ του δέκτη και του συνδέτη όπου η σταθερά ισορροπίας είναι εκτός του πεδίου $10^4 \leq K \leq 10^9$.

Η αδυναμία του IIA-ITC αντιμετωπίστηκε με την ανάπτυξη μία νέας μεθόδου, αυτή της συνεχούς έγχυσης^[3] (Continuous Injection Approach- CIA-ITC) με την οποία λαμβάνουμε αυξημένο αριθμό σημείων και μείωση του χρόνου διεξαγωγής του πειράματος. Ωστόσο η έλλειψη κορυφών στο θερμογράφημα απαγορεύει την χρήση του kinITC για την εύρεση κινητικών παραμέτρων. Για τον σκοπό αυτό αναπτύξαμε μια νέα μέθοδο για τρία διαφορετικά μοντέλα: το απλό, το ανταγωνιστικό και των δύο ανεξάρτητων δεκτών. Ο υπολογισμός των επιθυμητών κινητικών και θερμοδυναμικών παραμέτρων γίνεται με την χρήση ενός κώδικα βελτιστοποίησης με τον οποίο μεταβάλλοντας συνεχώς τις παραμέτρους έως ότου ελαχιστοποιηθεί η αντικειμενική συνάρτηση η οποία είναι η διαφορά μεταξύ των πειραματικών και των υπολογισμένων δεδομένων. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα θερμογραφήματα τριών πειραματικά γνωστών βιοχημικών αντιδράσεων. Συγκεκριμένα, για το μοντέλο ανεξάρτητου σημείου πρόσδεσης η ανάλυση έγινε με την έγχυση του άλφα λιπίδικου οξέος (alpha lipoic acid - α LA) που δρα ως συνδέτης στην αβιδίνη (Avidin) που δρα ως δέκτης. Το ανταγωνιστικό μοντέλο πρόσδεσης μελετάται με την έγχυση του d-desthiobiotin (DTB) σε κελί θερμιδόμετρου που περιέχει την αβιδίνη και το α LA ενώ το μοντέλο των δύο ανεξάρτητων δεκτών μελετάται με την έγχυση ασβεστίου (Ca^{+2}) στο κελί του θερμιδόμετρου περιέχονται δύο δεσμούς το EDTA και το DPTA.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Η παρούσα μέθοδος ακολουθεί τα ίδια στάδια και για τα τρία μοντέλα με μόνη διαφορά τις αλγεβρικές εξισώσεις και Συνήθεις Διαφορικές Εξισώσεις που περιγράφουν την διεργασία. Οι εξισώσεις έχουν αναπτυχθεί από τον Wiseman^[6] και από τους Chang et al^[3]. μετασχηματίζονται ώστε να εκφραστούν συνάρτηση του χρόνου και να εισαχθεί ο όρος της επίδρασης της διάλυσης. Στην περίπτωση του απλού μοντέλου και των δύο ανεξάρτητων δεκτών για την εύρεση των παραμέτρων είναι αναγκαίο να έχουμε μόνο το θερμογράφημα του πειράματος και οι αρχικές υποθέσεις για τις τιμές που επιθυμούμε να υπολογίσουμε ενώ για το ανταγωνιστικό μοντέλο είναι αναγκαία και τα θερμοδυναμικά και κινητικά δεδομένα για την δευτερεύουσα αντίδραση.

Βήμα 1: Γίνεται έλεγχος για την εύρεση του πεδίου τιμών ρυθμού της αντίδρασης σχηματισμού (k_{on}) για την οποία δεν έχουμε πληροφορίες. Η ανάλυση γίνεται μέχρι να παρατηρηθεί στρέβλωση των χαρακτηριστικών της σιγμοειδούς καμπύλης. Η αρχική υπόθεση που θα χρησιμοποιηθεί για την εύρεση του ρυθμού αντίδρασης είναι το μέσο σημείο στο πεδίο.

Βήμα 2: Στην συνέχεια, γίνεται ο υπολογισμός της ενθαλπίας (ΔH), της σταθεράς διάσπασης (K_d) και της στοιχειομετρικής σταθεράς (n) με την χρήση του αλγεβρικού μοντέλου. Η εύρεση των δεδομένων γίνεται με την χρήση ενός κώδικα βελτιστοποίησης όπου μεταβάλλονται οι τιμές μέχρι να ελαχιστοποιηθεί η τιμή της αντικειμενικής συνάρτησης που είναι η διαφορά μεταξύ της ποσότητας της θερμότητας που βρέθηκε πειραματικά και εκείνης που υπολογίστηκε από το αλγεβρικό μοντέλο.

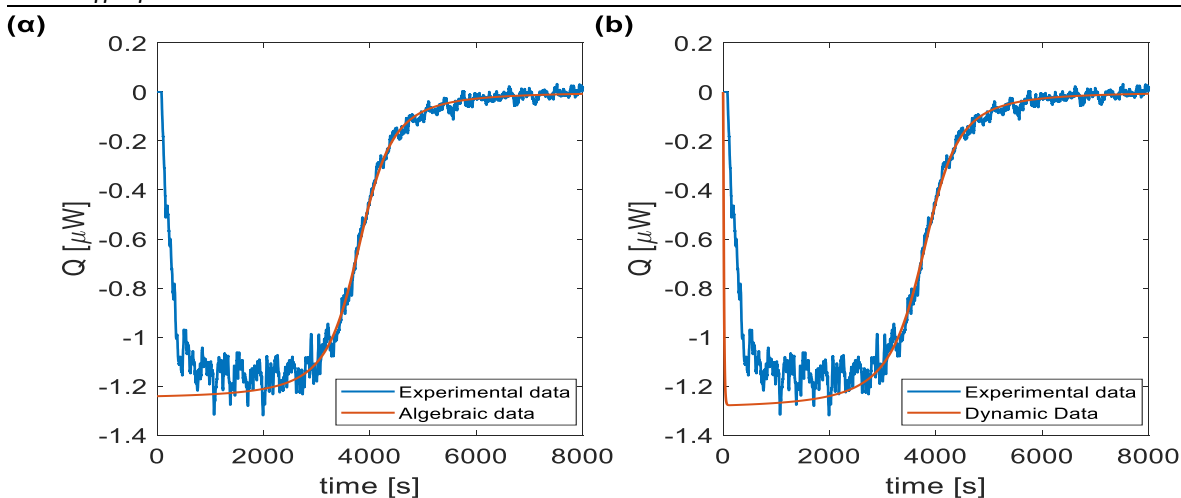
Βήμα 3: Τέλος, τα δεδομένα που βρέθηκαν με την χρήση του αλγεβρικού μοντέλου χρησιμοποιούνται ως αρχικές τιμές για την εύρεση των τιμών του ρυθμού αντίδρασης σχηματισμού (k_{on}) και για τον πιο ακριβή υπολογισμό της ενθαλπίας (ΔH), της σταθεράς διάσπασης (K_d) και της στοιχειομετρικής σταθεράς (n) με την χρήση του δυναμικού μοντέλου. Οι τιμές υπολογίζονται με τον ίδιο τρόπο που υπολογίστηκαν με τη χρήση της αλγεβρικής εξίσωσης δηλαδή με την ελαχιστοποίηση της αντικειμενικής συνάρτησης μεταβαλλόντας συνεχώς τις επιθυμητές τιμές

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα αποτελέσματα παρουσιάζονται οι τιμές που υπολογίστηκαν για την ενθαλπία (ΔH), την σταθερά διάσπασης (K_d), τον ρυθμό αντίδρασης σχηματισμού (k_{on}) και την στοιχειομετρική αναλογία (n), και τα διαγράμματα που παρουσιάζουν την προσαρμογή της πειραματικής καμπύλης στις καμπύλες που προκύπτουν από τα δύο μοντέλα. Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε και για τα τρία μοντέλα. Αρχικά, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το μοντέλο ανεξάρτητου σημείου πρόσδεσης. Το σύστημα που μελετήθηκε είναι αυτό της πρόσδεσης του άλφα λιπιδικού οξέος (α LA) στην αβιδίνη (Avidin). Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται τα δεδομένα που προέκυψαν από το αλγεβρικό μοντέλο, από το δυναμικό μοντέλο καθώς και τα δεδομένα που προκύπτουν από την βιβλιογραφία^[7].

Πίνακας 1. Θερμοδυναμικά και κινητικά μοντέλα της πρόσδεσης του α LA-Avidin

Δεδομένα	ΔH (kJ/mol)	K_d (μM)	k_{on} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	n
Αλγεβρικά	-45.001	0.6053	-	0.3166
Δυναμικά	-45.314	0.6219	$5.12 \cdot 10^4$	0.3177
Βιβλιογραφικά ^[7]	-42.676	0.46	$1.4 \cdot 10^5$	0.31



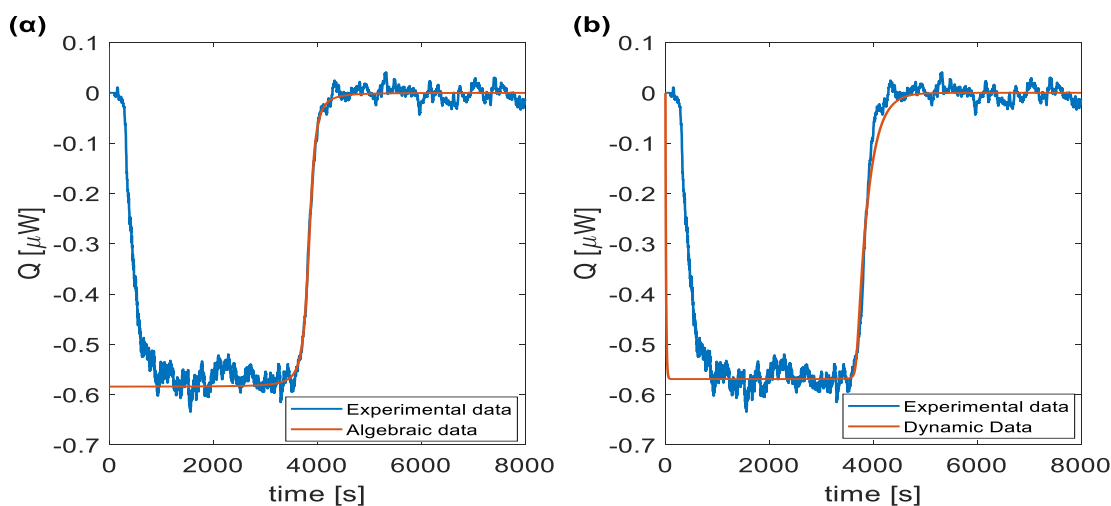
Σχήμα 1: Προσαρμογή πειραματικής καμπύλης (α) σε αλγεβρικά δεδομένα (b) σε δυναμικά για α LA-Avidin

Με βάση τον πίνακα 1 συγκρίνουμε τα δεδομένα που υπολογίστηκαν με εκείνα από την βιβλιογραφία. Αρχικά, συγκρίνουμε τις τιμές που υπολογίστηκαν αλγεβρικά με τις τιμές της βιβλιογραφίας όπου παρατηρούμε ότι η υπολογισμένη τιμή της σταθερά διάσπασης είναι 1.5 φορά μεγαλύτερη από την βιβλιογραφική. Στην συνέχεια συγκρίνουμε τις τιμές που προέκυψαν από το δυναμικό μοντέλο με τις βιβλιογραφικές. Παρατηρούμε ότι όπως και στην περίπτωση του αλγεβρικού μοντέλου η υπολογισμένη σταθερά διάσπασης είναι 1.5 φορά μεγαλύτερη από την βιβλιογραφική. Επιπλέον, παρατηρούμε ότι η βιβλιογραφική τιμή του ρυθμού αντίδρασης είναι 2.5 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με εκείνη που υπολογίστηκε από το δυναμικό μοντέλο. Ωστόσο αναλογιζόμενοι την τάξη μεγέθους της σταθεράς διάσπασης και του ρυθμού αντίδρασης σχηματισμού μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η προτεινόμενη μέθοδος είναι ακριβής στους υπολογισμούς της. Τέλος, παρατηρώντας την μικρή απόκλιση μεταξύ της πειραματικής καμπύλης και των καμπύλων που προκύπτουν από τα μοντέλα ενισχύεται η εμπιστοσύνη μας στην μέθοδο για το μοντέλο ανεξάρτητου σημείου πρόσδεσης.

Στην συνέχεια, παρουσιάζεται το ανταγωνιστικό μοντέλο πρόσδεσης. Το μοντέλο μελετήθηκε για την ταυτόχρονη πρόσδεση δύο συνδετών του αLa και του DTB με τον δέκτη Avidin. Στον παρών μοντέλο η πρόσδεση του αLa με το avidin έχει φτάσει σε ισορροπία την στιγμή που ξεκινάει η έγχυση του DTB στο κελί του θερμιδόμετρου και το θερμογράφημα που προκύπτει είναι μόνο για την πρόσδεση του DTB στο Avidin. Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται τα δεδομένα που υπολογίστηκαν από την μέθοδο καθώς και τα βιβλιογραφικά^[7] για την πρόσδεση του DTB στο Avidin.

Πίνακας 2. Θερμοδυναμικά και κινητικά δεδομένα για ανταγωνιστική πρόσδεση DTB-Avidin

Δεδομένα	ΔH_1 (kJ/mol)	K_{d1} (pM)	k_{on1} (M ⁻¹ s ⁻¹)	n
Αλγεβρικά	-84.962	0.1	-	0.31
Δυναμικά	-84.962	6.414	8.515 10 ⁹	0.3157
Βιβλιογραφικά ^[7]	-83.261	6.5	1.5 10 ⁹	0.31



Σχήμα 2. Προσαρμογή πειραματικής καμπύλης (α) σε αλγεβρικά δεδομένα και (β) σε δυναμικά δεδομένα για DTB-Avidin

Με βάση τον πίνακα 2 παρατηρούμε ότι για τις τιμές της ενθαλπίας και της στοιχειομετρικής αναλογίας οι υπολογισμένες τιμές έχουν μικρή διαφορά. Για την τιμή για την σταθερά διάσπασης που προκύπτει από το αλγεβρικό μοντέλο παρατηρούμε ότι η τιμή είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με την βιβλιογραφική. Ωστόσο η τιμή αυτή χρησιμοποιείται μόνο ως αρχική τιμή για τον

υπολογισμό των παραμέτρων με το δυναμικό μοντέλο και άρα δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα. Αντίθετα, η τιμή της σταθερά διάσπασης που προκύπτει από το δυναμικό μοντέλο είναι ίση με την βιβλιογραφική τιμή. Επιπλέον παρατηρούμε ότι η τιμή του ρυθμού αντιστάσεις που υπολογίστηκε από το δυναμικό μοντέλο είναι 5.5 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την βιβλιογραφική τιμή. Λαμβάνοντας υπόψη την τάξη μεγέθους του k_{on} και το γεγονός ότι χρησιμοποιούμε τα δεδομένα που υπολογίστηκαν για την πρόσδεση του αLA-Avidin τα οποία έχουν σφάλμα, θεωρούμε ότι η διαφορά μεταξύ της βιβλιογραφικής τιμής και της υπολογισμένης τιμής είναι αναμενόμενη και μικρή και άρα το μοντέλο μπορεί να προβλέψει με καλή ακρίβεια τις παραμέτρους. Τέλος, στο διάγραμμα 2 παρουσιάζεται η προσαρμογή της πειραματικής καμπύλης και των καμπύλων που προκύπτουν από τα δύο μοντέλα. Η μικρή απόκλιση μεταξύ των δεδομένων ενισχύει την εμπιστοσύνη μας στην μέθοδο.

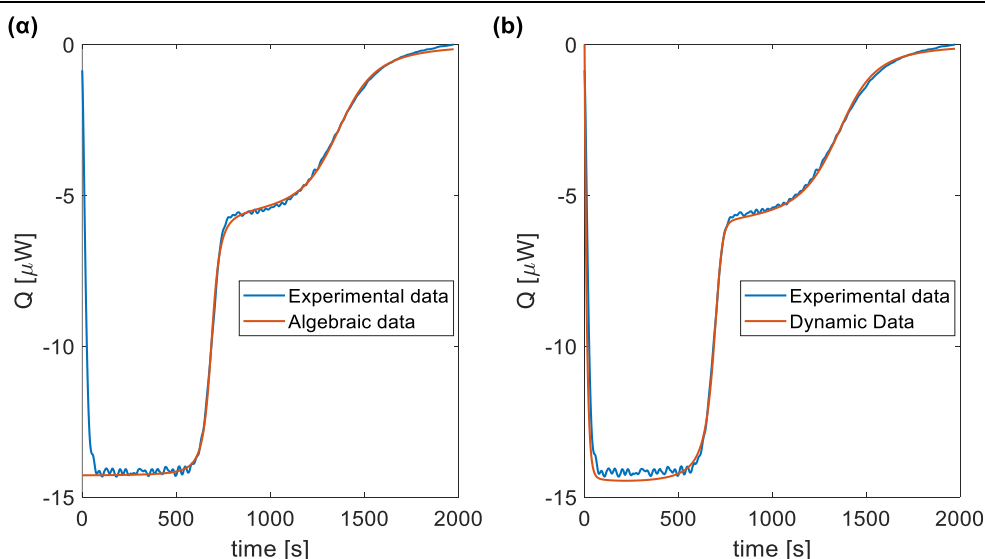
Τελευταίο θα παρουσιαστεί το μοντέλο των δύο ανεξάρτητων σημείων πρόσδεσης. Η ανάλυση του μοντέλου γίνεται με την μελέτη της πρόσδεσης του Ca^{2+} με το EDTA και το DPTA. Στο παρών μοντέλο οι δύο αντίδρασης γίνονται ταυτόχρονα. Στον πίνακα 3 και 4 παρουσιάζονται τα δεδομένα για την πρόσδεσης του Ca^{2+} στο EDTA και Ca^{2+} στο DPTA αντίστοιχα.

Πίνακας 3. Θερμοδυναμικά και κινητικά δεδομένα Ca^{2+} EDTA

Δεδομένα	ΔH_1 (kJ/mol)	K_{d1} (nM)	k_{on1} ($M^{-1}s^{-1}$)	n
Αλγεβρικά	-23.815	0.11	-	1.049
Δυναμικά	-24.328	0.106	$3.7 \cdot 10^4$	1.098
Βιβλιογραφικά ^[3]	-23.81	0.14	-	1.022

Πίνακας 4. Θερμοδυναμικά και κινητικά δεδομένα Ca^{2+} DPTA

Δεδομένα	ΔH_2 (kJ/mol)	K_{d2} (μM)	k_{on2} ($M^{-1}s^{-1}$)	m
Αλγεβρικά	-9.4685	9.546	-	0.9581
Δυναμικά	-10.1	9.088	$9.99 \cdot 10^2$	0.9581
Βιβλιογραφικά ^[3]	-9.58	12.8	-	0.958



Σχήμα 3. Προσαρμογή πειραματικής καμπύλης (α) σε αλγεβρικά δεδομένα και (β) σε δυναμικά δεδομένα για Ca^{2+} σε EDTA και DPTA

Με βάση τον πίνακα 3 και 4 συγκρίνονται τα δεδομένα που προκύπτουν από την βιβλιογραφία^[3] και εκείνα που υπολογίστηκαν από τα δύο μοντέλα. Παρατηρούμε ότι και για την τιμή της ενθαλπίας και της στοιχειομετρικής αναλογίας και για τις δύο αντιδράσεις η διαφορά μεταξύ βιβλιογραφικών τιμών και των τιμών που υπολογίστηκαν τόσο από το δυναμικό όσο από το

αλγεβρικό μοντέλο είναι μικρή. Επιπλέον, παρατηρούμε ότι τιμή της σταθεράς διάσπασης (K_{d1}) που προκύπτει από το δυναμικό μοντέλο για την πρόσδεση του Ca^{2+} στο EDTA απέχει ελάχιστα από την βιβλιογραφική. Ως προς την τιμή της σταθεράς διάσπασης (K_{d2}) της πρόσδεσης του Ca^{2+} στο DPTA παρατηρούμε ότι η βιβλιογραφική τιμή είναι 1.4 φορές μεγαλύτερη από την υπολογισμένη. Η διαφορά αυτή είναι αποδεκτή συνυπολογίζοντας την τάξη μεγέθους της σταθεράς διάσπασης. Για τους ρυθμούς αντιδράσεις σχηματισμού των δύο ανεξάρτητων προσδέσεων δεν βρέθηκαν βιβλιογραφικά δεδομένα και άρα είναι αδύνατον να ελεγχθούν οι τιμές που υπολογίστηκε από το δυναμικό μοντέλο. Ωστόσο, αν βασιστούμε στην ακρίβεια των υπολογισμών των άλλων τιμών και στην καλή προσαρμογή της πειραματικής καμπύλης στις καμπύλες που προκύπτουν από την μέθοδο μπορούμε να θεωρήσουμε ότι το μοντέλο είναι ακριβές.

Σκοπό της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη μια νέας μέθοδος με την οποία υπολογίζονται οι κινητικοί και θερμοδυναμικοί παράμετροι μέσω κώδικα βελτιστοποίηση μεταβάλλοντας τες έως ότου ελαχιστοποιηθεί η απόκλιση μεταξύ των πειραματικών δεδομένων και εκείνων που υπολογίστηκαν από το μοντέλο. Η ανάλυση έγινε για τρία μοντέλα με πειραματικές καμπύλες γνωστών βιοχημικών αντιδράσεων. Βασιζόμενοι στην συμφωνία μεταξύ των βιβλιογραφικών και των υπολογισμένων τιμών ενισχύεται η εμπιστοσύνη μας στην νέα αυτή μέθοδο που αναπτύχθηκε. Στην συνέχεια, στόχος μας είναι ο υπολογισμός κινητικών παραμέτρων για διαφορετικές θερμοκρασίες, ώστε να κατασκευαστεί η εξίσωση Arrhenius.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία υλοποιήθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού έργου του προγράμματος Μέδικος Πανεπιστήμιου Πατρών, βραβείο 81816.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Prozeller, D., Morsbach, S., & Landfester, K. (2019). Isothermal titration calorimetry as a complementary method for investigating nanoparticle–protein interactions. *Nanoscale*, *11*(41), 19265–19273
- [2] Chang, J. W., Armaou, A., & Rioux, R. M. (2021). Continuous Injection Isothermal Titration Calorimetry for in Situ Evaluation of Thermodynamic Binding Properties of Ligand-Receptor Binding Models. *Journal of Physical Chemistry B*, *125*(29), 8075–8087.
- [3] Burnouf, D., Ennifar, E., Guedich, S., Puffer, B., Hoffmann, G., Bec, G., Disdier, F., Baltzinger, M., & Dumas, P. (2012). KINI TC: A new method for obtaining joint thermodynamic and kinetic data by isothermal titration calorimetry. *Journal of the American Chemical Society*, *134*(1), 559–565.
- [4] Atri, M. S., Saboury, A. A., & Ahmad, F. (2015). Biological applications of isothermal titration calorimetry. In *Physical Chemistry Research* (Vol. 3, Issue 4, pp. 319–330).
- [5] Su, H., & Xu, Y. (2018). Application of ITC-based characterization of thermodynamic and kinetic association of ligands with proteins in drug design. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 9, Issue OCT).
- [6] Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F., & Lin, L.-N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Analytical Biochemistry*, *179*(1), 131–137
- [7] Chang, J. W., Mu, Y., Armaou, A., & Rioux, R. M. (2023). Direct Determination of High-Affinity Binding Constants by Continuous Injection Isothermal Titration Calorimetry. *Journal of Physical Chemistry B*, *127*(50), 10833–1084