

Bestimmung der Protein-Ligand Bindungsaffinität durch isotherme Titrationskalorimetrie

1 Theorie

1.1 Isotherme Titrationskalorimetrie

Um quantitative biophysikalische Untersuchungen in einer Label-freien und das zu charakterisierende System nicht störenden Art und Weise durchzuführen eignet sich besonders die isotherme Titrationskalorimetrie (*isothermal titration calorimetry*, ITC), welche sehr empfindlich auf Enthalpie-Änderungen von chemischen Bindungsreaktionen reagiert. Die Sensitivität der ITC Instrumente hat sich während der letzten Jahre wesentlich verbessert, sodass sehr geringe Temperaturänderungen detektiert werden können und dafür nur sehr geringe Mengen des zu untersuchenden Materials benötigt werden. Nach jeder Injektion in die Probenzelle führt die Wechselwirkung der beiden Bindungspartner zu einer Wärmeaufnahme oder Wärmeabgabe, wobei der Temperaturunterschied im Vergleich zu einer Referenzzelle durch ein Heizelement an der Probenzelle und dessen Heizleistung ausgeglichen wird. Die Änderung der Heizleistung wird detektiert und gegen die Zeit aufgetragen. Die Fläche unter den Peaks ist proportional zur freigesetzten bzw. aufgenommenen Wärmemenge, welche durch Integration erhalten wird und als Funktion der molaren Verhältnisse der beiden Bindungspartner in einem Titrationsthermogramm dargestellt werden kann.

Die experimentellen Daten lassen sich mit einer nichtlinearen Funktion, basierend auf einem Model mit gleichen, unabhängigen Bindungsstellen, anpassen und so ermöglicht ein einziges ITC Experiment unterschiedliche thermodynamische Parameter einer Bindungsreaktion zu bestimmen. Die Affinität, ausgedrückt durch die Assoziationskonstante oder Dissoziationskonstante $K_a = 1/K_d$, die Enthalpie ΔH und die Stöchiometrie können direkt aus der nichtlinearen Anpassungsfunktion bestimmt werden (Abb. 1) und damit die Freie Gibbs'sche Energie ΔG und die Entropie ΔS berechnet werden [1], [2].

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad (1)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2)$$

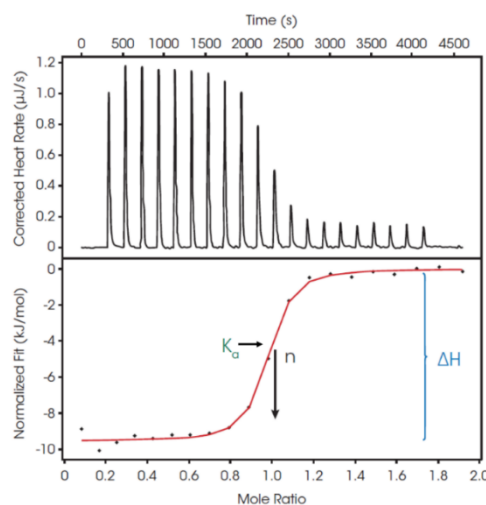


Abb. 1 Charakteristisches Experiment mit einem Titrationsthermogramm, das die Wärme pro Zeit nach jeder Injektion angibt (oben). Entsprechende Wärmemenge als Funktion der molaren Verhältnisse der Bindungspartner, die Punkte stellen die experimentellen Daten dar und die Linie entspricht einer Anpassungsfunktion basierend auf einem Model mit n gleichen, unabhängigen Bindungsstellen (unten). Abbildung übernommen aus [3].

1.2 Kalorimeter: Low Volume NanoITC

Das NanoITC besteht aus einer Messeinheit und einer Büretteneinheit mit einem integrierten Rührsystem (Abb. 2). Die Messeinheit ist in einem isolierten, mit Stickstoff gefülltem Behälter untergebracht und umfasst den Kalorimeterblock und zwei nicht herausnehmbare Reaktionsgefäße, die Probenzelle und die Referenzzelle. Das NanoITC nutzt eine differenzielle Leistungskompensation, wobei halbleitende thermoelektrische Elemente (*semiconducting thermoelectric devices*, TED) zur Detektion der Temperaturunterschiede zwischen der Proben- und Referenzzelle eingesetzt werden. Ein Kontrollheizelement an der Probenzelle hält eine Null-Temperatur-Differenz zwischen diesen beiden Zellen aufrecht, dabei dient die Leistung, um diese Null-Temperatur-Differenz aufrechtzuerhalten als Kalorimetersignal und wird als eine Funktion der Zeit aufgezeichnet. Setzt eine Reaktion in der Probenzelle Wärme frei, wird die erforderliche Wärmemenge für die Nulldifferenz um die bei der Reaktion freigesetzte Wärmemenge verringert und es resultiert ein Peak im Thermogramm.

Die Probenzelle besteht aus Gold und besitzt ein Volumen von 170 μL . Die thermischen Eigenschaften der beiden Reaktionszellen sind gleich, weshalb die Referenzzelle eine Referenznadel enthält, die der Titrationsnadel entspricht.

Das Low Volume NanoITC besitzt eine 50 μL Titrationspritze, welche die genaue Titration einer definierten Menge eines Bindungspartners zu der Probenzelle ermöglicht und ebenfalls als Rührer dient [4].

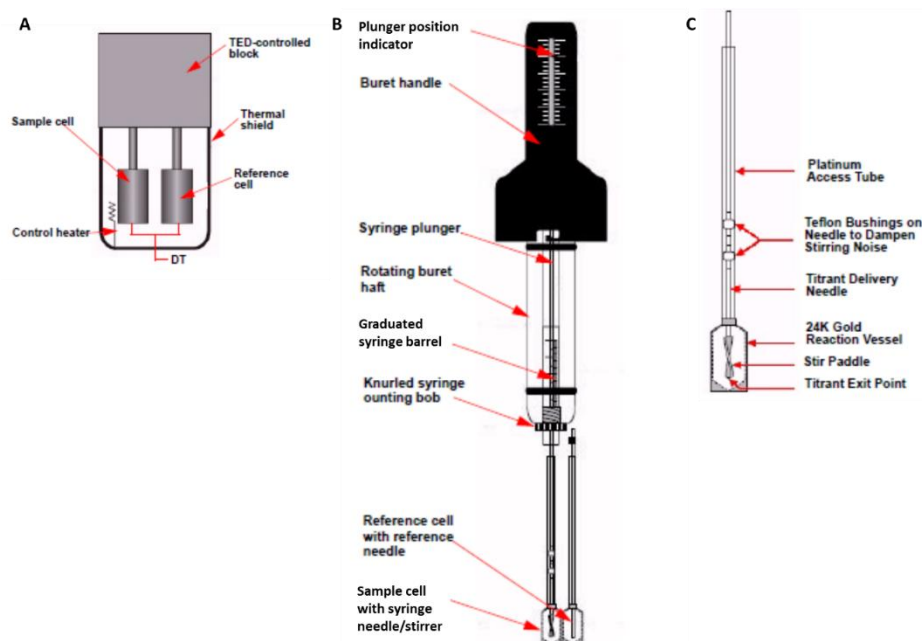


Abb. 2 Schematische Darstellung einer NanoITC Messeinheit (A). Anordnung der Bürette, Spritze und Reaktionsgefäße während eines Experiments (B). Probenzelleneinheit (C). Abbildung übernommen aus [4].

1.3 c-Wert

Ein Titrationsexperiment ist zusammengesetzt aus drei Teilen. Während der initialen Injektionen wird annähernd die gesamte Menge des Liganden von dem in der Probenzelle vorgelegten Makromolekül gebunden, im Bereich um den Äquivalenzpunkt nimmt die Menge des zur Verfügung stehenden Makromoleküls für die Bindung zum Liganden ab und innerhalb der finalen Injektionen ist die Makromolekül-Lösung vollständig mit dem Liganden abgesättigt, sodass die Messsignale nur von der Verdünnung der Liganden-Lösung bzw. Makromolekül-Lösung resultieren.

Die Form der Titrationskurve ist abhängig von der Affinität und der Konzentration des Makromoleküls und wird von dem c-Wert bestimmt, dem Produkt aus der totalen Makromolekülkonzentration, der Assoziations- bzw. Dissoziationskonstante und die Anzahl der Liganden, die an das Makromolekül binden.

$$c = n \cdot K_a \cdot [\text{Makromolekül}] = \frac{n \cdot [\text{Makromolekül}]}{K_d} \quad (3)$$

Ein gut auszuwertendes Experiment kann erhalten werden, wenn der c -Wert im Bereich zwischen 10 und 1000 liegt (Abb. 3), dabei ist darauf zu achten, dass die Konzentration so gewählt wird, sodass ausreichend Wärme während der Bindungsreaktion freigesetzt wird und diese im Kalorimeter gemessen werden kann [1], [3].

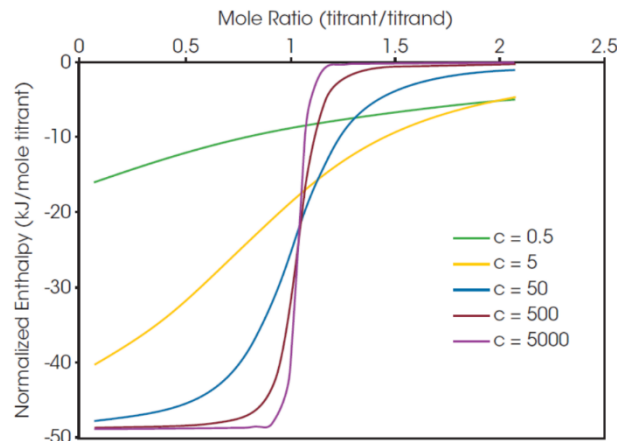


Abb. 3 Einfluss des c -Wertes auf die Form der Titrationsisotherme, wobei K_d , ΔH und n konstant gehalten wurden. Abbildung übernommen aus [3].

1.4 Bovine Serum Albumin

Serum Albumin ist das am häufigsten vorkommende Protein des Blutkreislaufsystems von Säugetieren und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des osmotischen Blutdruckes, des Blut-pH und des Transports von Fettsäuren, Aminosäuren, Hormonen, Ionen, Metallen, sowie Medikamenten. Rinderserum Albumin (*bovine serum albumin*, BSA) ist ein monomeres und hydrophiles Protein von ungefähr 66,43 kDa. Es besteht aus einer einzigen Polypeptidkette und ist zusammengesetzt aus 3 α -helikalen, homologen Domänen (I, II, III), jede aus zwei Subdomänen (IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB), unterteilt durch 9 Schleifen und verbrückt durch 17 Disulfidbrücken (Abb. 4).

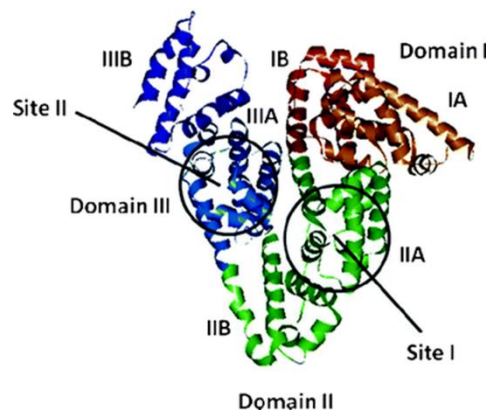


Abb. 4 Bildhafte Darstellung der BSA Struktur mit Domänen und Bindungsstellen. Abbildung übernommen aus [5].

Die Hauptbindungsstellen, *Sudlow site I* und *Sudlow site II*, befinden sich innerhalb der Subdomänen IIA und IIIA und binden eine Reihe von hydrophoben, heterocyclischen und anionischen Komponenten. Die wesentliche Bindungsstelle für Medikamente ist die *Sudlow site II*, eine hydrophobe Bindungstasche, mit hoher Affinität für kleine aromatische neutrale oder negativ geladene Liganden. Die Bindung innerhalb der *Sudlow site I* ist weniger spezifisch und von mittlerer Affinität gegen hydrophobe Komponenten [5].

1.5 Naproxen und Ibuprofen

Naproxen (2-(6-Methoxy-2-naphthyl)propansäure) und Ibuprofen (2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]propansäure) (Abb. 5) gehören zu der Wirkstoffklasse der nichtsteroidalen Antirheumatika (*non steroidal anti inflammatory drug, NSAID*) und werden in analgetischen, antipyretischen und antirheumatischen Medikamenten eingesetzt. Der Wirkmechanismus von NSAID ist nicht vollständig bekannt, sehr wahrscheinlich wird die Prostaglandin-Synthese durch die Inhibierung der Cyclooxygenase limitiert.

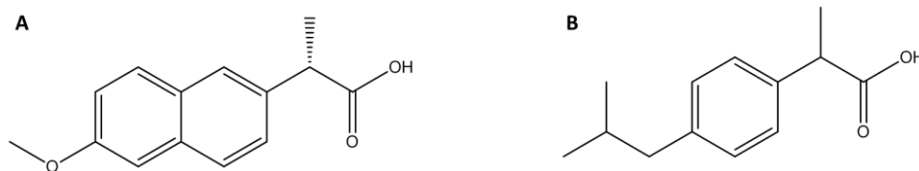


Abb. 5 Naproxen (A) und Ibuprofen (B).

Im Blut befindliche Medikamente binden an plasmatische Proteine wie Albumin, diese Proteine dienen der begünstigten Löslichkeit und als Transportelemente für das Medikament zu dem gewünschten Ziel. Da nur der freie ungebundene Wirkstoff in der Lage ist effizient mit dem Ziel zu interagieren, muss die Wechselwirkung zwischen dem Medikament und dem Plasmaprotein stark genug sein, um den Transport zu begünstigen und schwach genug, um dieses am Zielort wieder zu entlassen. Die Verteilung, der Metabolismus und die freie Konzentration des verabreichten Medikamentes im Blut sind abhängig von der Stärke der Protein-Wirkstoff-Wechselwirkung [6], [7].

2 Aufgabenstellung

Die Bindungsaffinität zwischen BSA und Naproxen soll durch eine Titration von einer Naproxen-Lösung zu einer BSA-Lösung bestimmt werden. Um die Dissoziationskonstante hinreichend bestimmen zu können, muss ein geeigneter Konzentrationsbereich der beiden Bindungspartner gewählt werden. Dafür wird gemeinsam eine Simulation eines ITC Experiments durchgeführt, geeignete Konzentrationen für Naproxen und BSA festgelegt und die entsprechenden Verdünnungen angesetzt. Das Titrationsexperiment wird gestartet und das Kolloquium während der Titration durchgeführt. Im Anschluss soll eine Blank-Messung mit Naproxen und Puffer (statt BSA) durchgeführt werden. Während der Blank-Messung soll die bereits aufgenommene Messung mit einer bereitgestellten Blank-Messung ausgewertet werden (für die Auswertung im Protokoll soll später dann die selbst aufgenommene Blank-Messung verwendet werden!!!). Ebenfalls sollen die Daten einer bereitgestellten Titrationssmessung von Ibuprofen in BSA ausgewertet werden.

3 Versuchsdurchführung

3.1 Stammlösungen

Für den Praktikumsversuch werden folgende Stammlösungen zur Verfügung gestellt:

Substanz	Konzentration	Konzentrationsbestimmung mittels	pH	Volumen (bereitgestellt)
Phosphatpuffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$	50 mM	Einwaage	7,4	2 mL
BSA	-	UV-VIS Spektrometer	7,4	0,3 mL
Naproxen	10 mM	Einwaage	7,4	0,1 mL

Tab. 1 Stammlösungen mit entsprechender Konzentration, pH-Wert und Volumen.

Die BSA Konzentration soll über die Absorption bei 280 nm ermittelt werden.

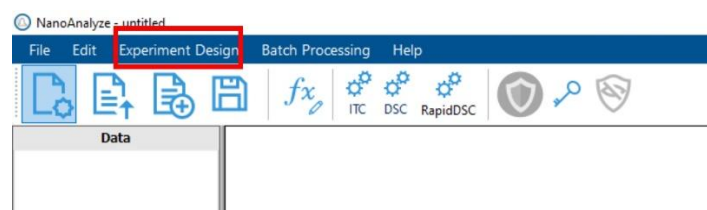
Aus der Aminosäuresequenz, die bei <https://www.uniprot.org/> (Protein: Serum albumin, Organismus *Bos taurus* (Bovine) P02769) erhalten wird, kann der Extinktionskoeffizient berechnet werden <https://web.expasy.org/protparam/> (Extinktionskoeffizient für oxidierte Cystein-Reste verwenden). Extinktionskoeffizient bitte bereits zuhause bestimmen.

Die Absorption (280 nm) der BSA-Stammlösung beträgt 37,2. Ihre Konzentration soll nun mithilfe des Lambert Beerschen Gesetzes berechnet werden. Für die Berechnung soll der bereits bestimmte Extinktionskoeffizient und eine Schichtdicke von 1 cm verwendet werden. Die Konzentration der Stammlösung bitte bereits zuhause berechnen.

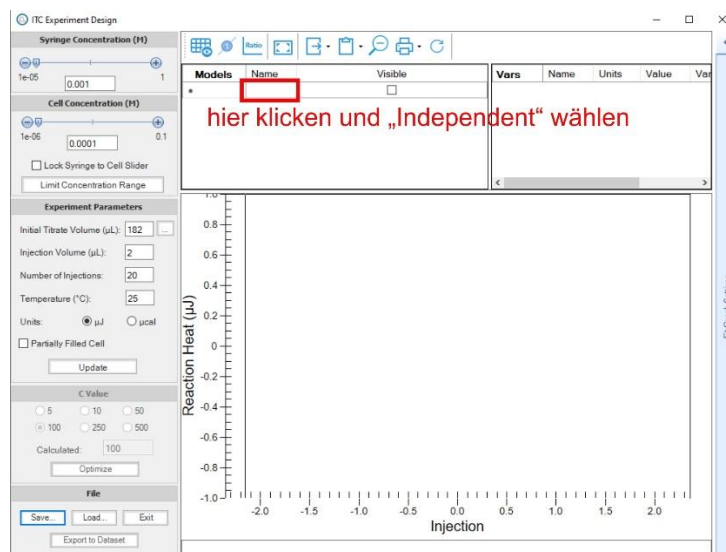
3.2 Experiment Design

Zu Beginn des Versuchs (am Praktikumstag) soll ein ITC Experiment simuliert werden, um geeignete Verdünnungen (Konzentrationen) von BSA und Naproxen zu bestimmen. Dafür wird die Software NanoAnalyze v3.11.0 verwendet.

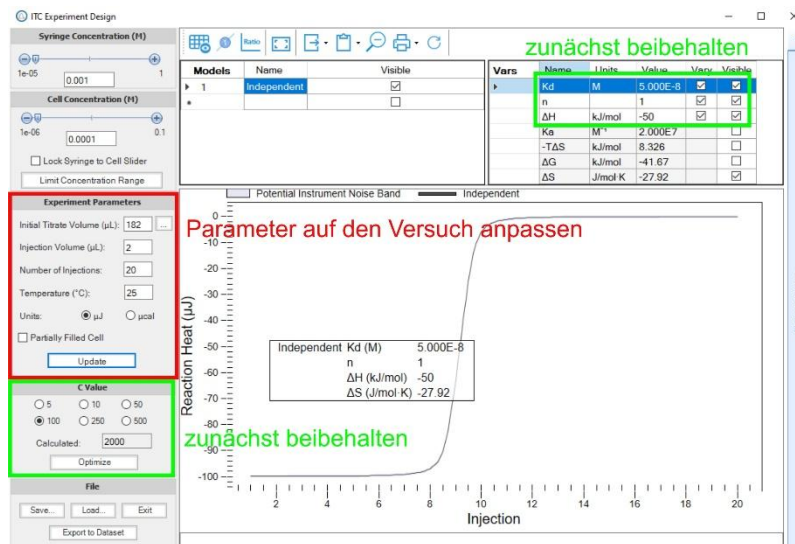
Für die Simulation wird „Experiment Design“ (ITC) verwendet.



Es muss zunächst das Model „Independent“ ausgewählt werden.



Die Dissoziationskonstante ($K_d = 5.000E-8$) und der c-Wert (100) sollen beibehalten werden. Hingegen müssen die „Experiment Parameters“ auf den Versuch (siehe Kapitel 3.4) angepasst werden. Mit „Initial Titrate Volume“ ist das aktive Volumen der BSA-Lösung in der Probezelle gemeint. Die „Number of Injections“ muss aus dem Volumen einer Injektion und dem Gesamtvolumen der Titrationspritze berechnet werden (dabei bitte abrunden!).



Jetzt kann mit der Bestimmung der Verdünnung begonnen werden. Die Konzentration von BSA soll zwischen 0,02-0,5 mM liegen. Die BSA-Lösung befindet sich in der Probenzelle, im Experiment entspricht sie daher der „Cell Concentration“. Die Konzentration von Naproxen soll zwischen 0,1-3 mM liegen. Naproxen befindet sich in der Titrationspritze und entspricht daher der „Syringe Concentration“. Die Werte von „Cell Concentration“ und „Syringe Concentration“ (Achtung jeweils in M) sollen nun so variiert werden (jeweils nur im angegebenen Bereich), dass die Titrationskurve einen sigmoidalen Verlauf zeigt. Der Äquivalenzpunkt sollte möglichst nach der Hälfte der Injektionen erfolgen und sowohl am Beginn als auch am Ende soll ein Plateau vorhanden sein. Dies erleichtert später die Auswertung des Experiments. Die Konzentrationen der im Experiment verwendeten Lösungen sollen so gewählt werden, dass sie gut aus den Stammlösungen hergestellt bzw. verdünnt werden können (nicht 383,7 µM, besser 380 µM).

Die erzeugte Reaktionswärme soll nicht unter 15 µJ liegen, damit sie detektiert werden kann. Der Startpunkt soll im Graph also nicht oberhalb von -15 µJ liegen.

Zum Schluss soll der Einfluss der Dissoziationskonstante getestet werden (erst nach Starten der Titrationsmessung). Dafür soll sie im Bereich von $1 \cdot 10^{-8}$ M bis $9 \cdot 10^{-8}$ M variiert werden (bis lang lag sie bei $5 \cdot 10^{-8}$ M (= 5.000E-8)). Was passiert?

Was passiert, wenn statt einer exothermen eine endotherme Reaktion vorliegt? Dafür soll nun die Enthalpie (ΔH) variiert werden (erst nach Starten der Titrationsmessung).

3.3 Verdünnung der Stammlösungen

Die für das ITC Experiment benötigten Verdünnungen sollen aus dem bereitgestellten Phosphatpuffer (50 mM Phosphatpuffer, pH von 7.4) und den Stammlösungen hergestellt werden. Die Konzentration der BSA-Stammlösung wurde bereits unter 3.1 bestimmt. Geeignete Verdünnungen von BSA und Naproxen wurden durch Simulation des ITC Experiments (siehe 3.2) ebenfalls ermittelt. Die für die Verdünnung benötigten Volumina der Stammlösung und des Phosphatpuffers sollen berechnet werden (Tab. 2). Für den Versuch werden 200 µL Naproxen-Lösung und 600 µL BSA-Lösung benötigt.

	Naproxen	BSA
Konzentration Stammlösung	10 mM	unter 3.1 bestimmt
Konzentration der gewünschten Lösung [µM]	durch Simulation unter 3.2	durch Simulation unter 3.2
Volumen der benötigten Lösung [µL]	200	600
Volumen Stammlösung [µL]		
Volumen Phosphatpuffer [µL]		

Tab. 2 Berechnung der für die Verdünnung benötigten Volumina der Stammlösung und des Phosphatpuffers.

3.4 ITC Messung

Das ITC Experiment wird an einem Low Volume Nano ITC Kalorimeter von TA Instruments durchgeführt. Die Probenzelle besitzt ein aktives Volumen von 170 µL, wird jedoch mit 300 µL BSA-Lösung befüllt, um eine vollständige Befüllung zu garantieren. Die Referenzzelle wird mit 300µL bidestilliertem Wasser gefüllt. Die Titrationsspritze besitzt ein Volumen von 50 µL und eine Rührgeschwindigkeit von 350 rpm. Die Spritze wird mit der Naproxen-Lösung befüllt. Das Volumen der Spritze wird in Aliquoten von 3 µL schrittweise in die Probenzelle, injiziert, mit einem Intervall von 240 s zwischen den Injektionen. Das Titrationsexperiment wird bei 25 °C durchgeführt. Die verwendeten Lösungen werden vor der Messung für 10 min unter vermindertem Druck entgast, um Luftblasen zu vermeiden, die während der Messung stören. Nach der Messung werden sowohl die Titrationsspritze als auch die Probenzelle mit bidestilliertem Wasser gespült.

Für die Blank-Messung wird die Probenzelle mit 300 µL Puffer und die Titrationsspritze mit 50 µL Naproxen-Lösung befüllt. Die restlichen Parameter bleiben unverändert.

4 Ergebnisse

4.1 Auswertung von Titrationsexperimenten

Die selbst gemessenen Daten der Titration von Naproxen in BSA sollen ausgewertet werden (im Praktikum mit bereitgestelltem Blank und fürs Protokoll mit selbst aufgenommenen Blank). Zusätzlich sollen bereitgestellte Daten einer Titration von Ibuprofen in BSA mit dazugehöriger Blank-Messung ausgewertet werden. Für beide Experimente soll die Freie Gibbs'sche Energie ΔG berechnet werden. Die Ergebnisse der Naproxen und Ibuprofen Messungen solle miteinander verglichen werden.

4.2 Analyse der ITC Daten

Für die Auswertung wird die Software NanoAnalyze v3.11.0 verwendet. Sie kann auf der Internetseite des Herstellers TA Instruments heruntergeladen werden. Dafür bitte den folgenden Link verwenden. Die Software ist unter „Nano Series Software“ zu finden.

<https://www.tainstruments.com/support/software-downloads-support/downloads/?lang=de&lang=de>

Daten in NanoAnalyze laden

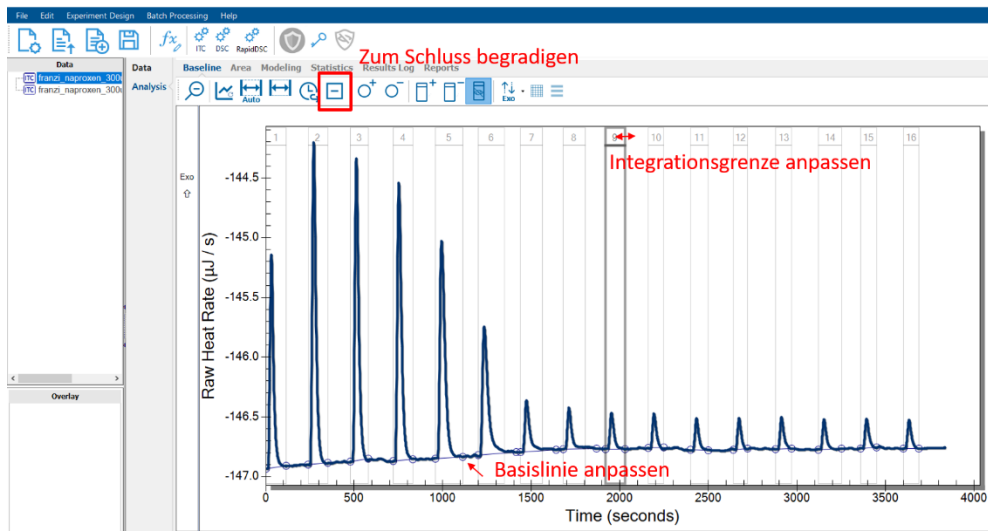
Wähle *File - Add Files...* entsprechende Dateien auswählen. Es können auch mehrere Dateien auf einmal geladen werden. Links unter *Data* erscheinen die Dateien und können durch Anklicken geöffnet werden.

Um auf die Daten Analyse Funktion von NanoAnalyze zugreifen zu können muss der *Analysis* Tab geöffnet werden.

Integrationsregionen

Wähle den *Baseline* Tab. Zunächst soll der Bereich der Basislinie mit Hilfe der blauen Kreise festgelegt werden, wobei die Basislinie durch die Mitte des Rauschens verlaufen soll. Die Integrationsgrenzen können am oberen Rand verändert werden und sollen nur den Peak ohne zusätzliche Baseline einschließen.

Die Basislinie wird dann durch das „Minus“ am oberen Rand begradigt.



Titrationsdaten und Verdünnungswärme

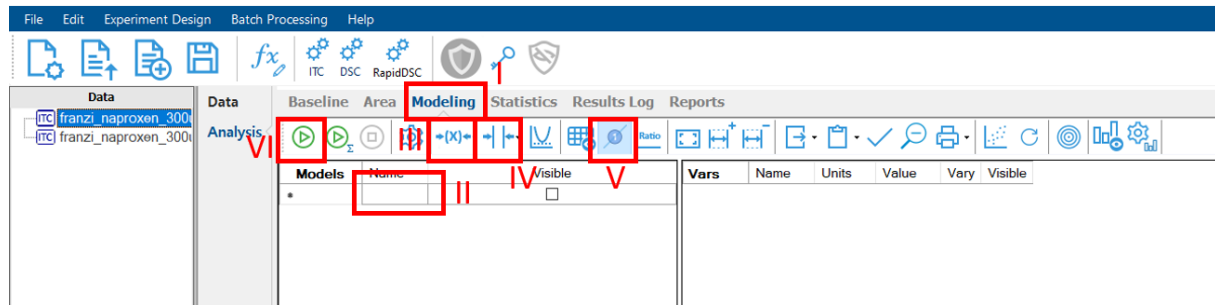
Wähle den **Area** Tab. Hier sollen die Konzentrationen (auf Einheiten achten) der verwendeten Lösungen eingetragen werden.

Die Verdünnungswärme wird aus der Blank-Messung bestimmt und von den experimentellen Daten abgezogen. Das Blank Experiment soll in den vorgesehenen Bereich unter dem **Area Correction** Tab eingefügt werden und die Option **Injection by Injection** ausgewählt werden. Bevor die Blank-Messung als Verdünnungswärme abgezogen werden kann, müssen die Daten des Blank entsprechend ausgewertet worden sein (Integrationsgrenzen setzen – Basislinie begradigen – Konzentrationen eintragen).

Modell an Daten anpassen

Wähle den **Modeling** Tab (I). Für die Verdünnungswärme soll das Modell **Blank (constant)** und die experimentellen Daten das Modell **Independent** gewählt werden (II). Um während des Fits nicht in einem lokalen Minimum zu landen soll die Variable **Constraint** (III) auf **wide** (aktiv wenn Haken vor **wide**) eingestellt werden und **Tolerance** (IV) auf **Precise** (aktiv wenn Haken vor **Precise**), damit der Fit nahe an den experimentellen Daten liegt. Der erste Datenpunkt ist meist kleiner als die anderen, da nur eine geringere Menge injiziert wird, und soll

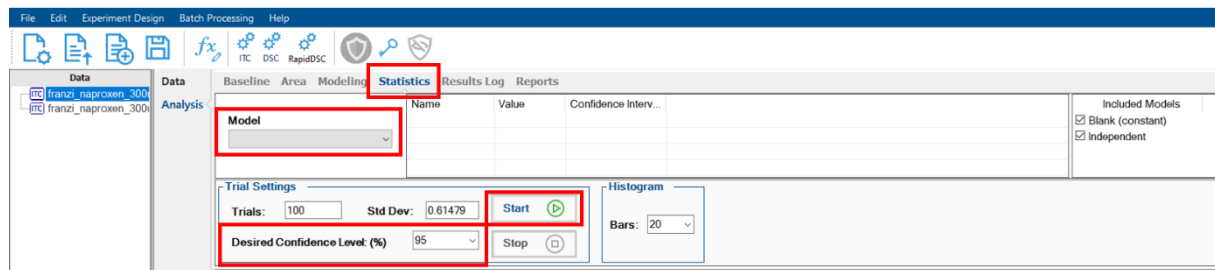
nicht in die Berechnung eingeschlossen werden (V, aktiv, wenn blau hinterlegt). Die Datenanpassung mit Hilfe des entsprechenden Modells erfolgt durch betätigen des grünen „Play“ (VI) am oberen Rand.



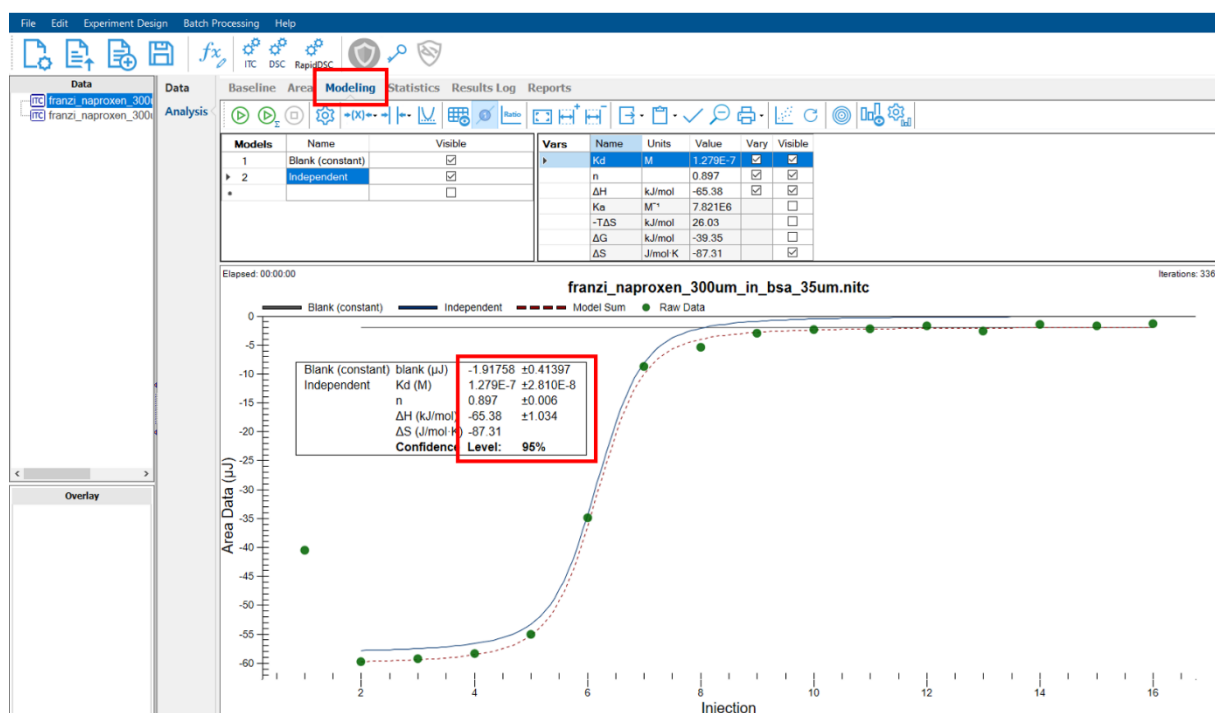
Statistische Analyse des Modells

Wähle den *Statistics* Tab. Sobald ein Modell zufriedenstellend an die experimentellen Daten angepasst wurde, gelten die Parameter als eine optimale Anpassung des gewählten Modells an die Daten. Um die Unsicherheit der berechneten Modellparameter abzuschätzen, wird eine definierte Menge an Variationen in das Modell eingeführt und der Fit erneut durchgeführt, wobei jeder Parameter innerhalb einer Gauß'schen Verteilung variiert.

Für die Verdünnungswärme soll das Modell *Blank (constant)* gewählt werden und die Abschätzung der Unsicherheit des Modells durch betätigen des grünen „Play“ am oberen Rand erfolgen. Anschließend soll für die experimentellen Daten das Modell *Independent* gewählt werden und die Abschätzung der Unsicherheit erneut durch „Play“ erfolgen. Für beide Modelle soll dabei ein *Desired Confidence Level* von 95% gewählt werden.



Daraufhin werden die Unsicherheiten der berechneten Modellparameter innerhalb des *Modeling* Tab als +/- Werte angezeigt.

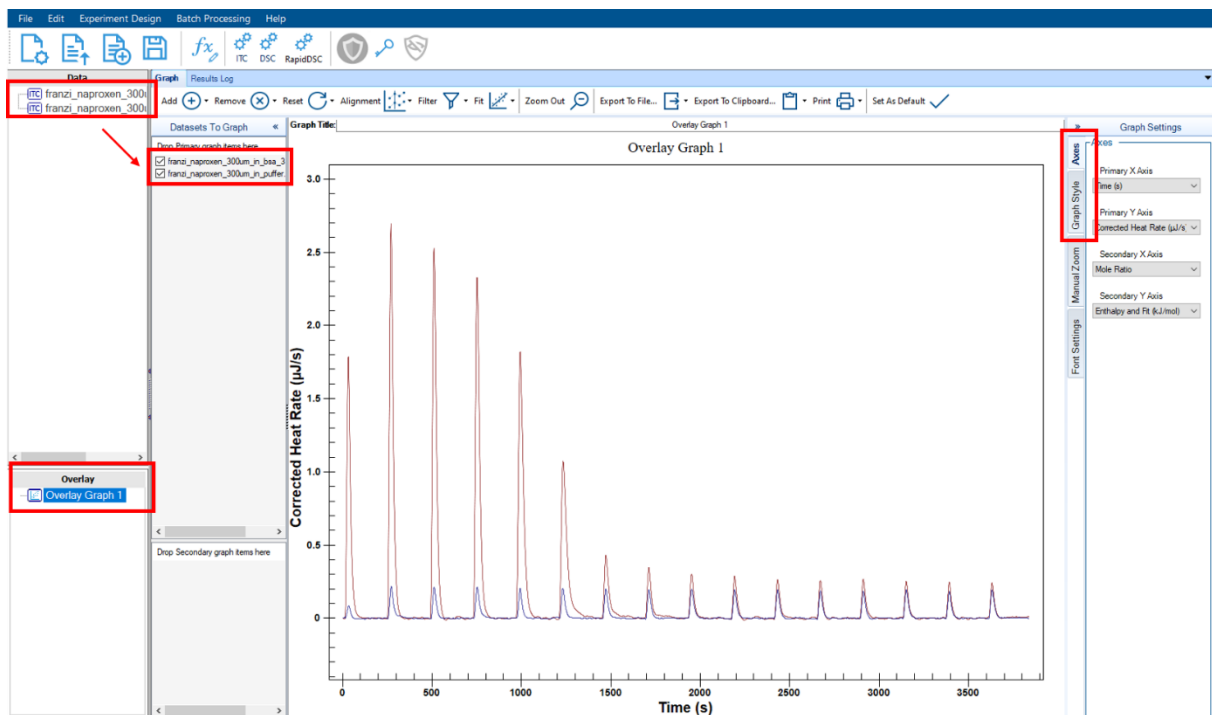


4.3 Darstellung der Abbildungen

Ein neuer *Overlay* Graph muss durch klicken der rechten Maustaste im Bereich unterhalb der Daten auf der linken Seite erstellt werden. Bevor der Overlay Graph erstellt wird, müssen die Daten des Blank und der Titration entsprechend ausgewertet worden sein (Integrationsgrenzen setzen – Basislinie begradigen – Konzentrationen eintragen – Verdünnungswärme abziehen - Modell an Daten anpassen – statistische Analyse des Modells).

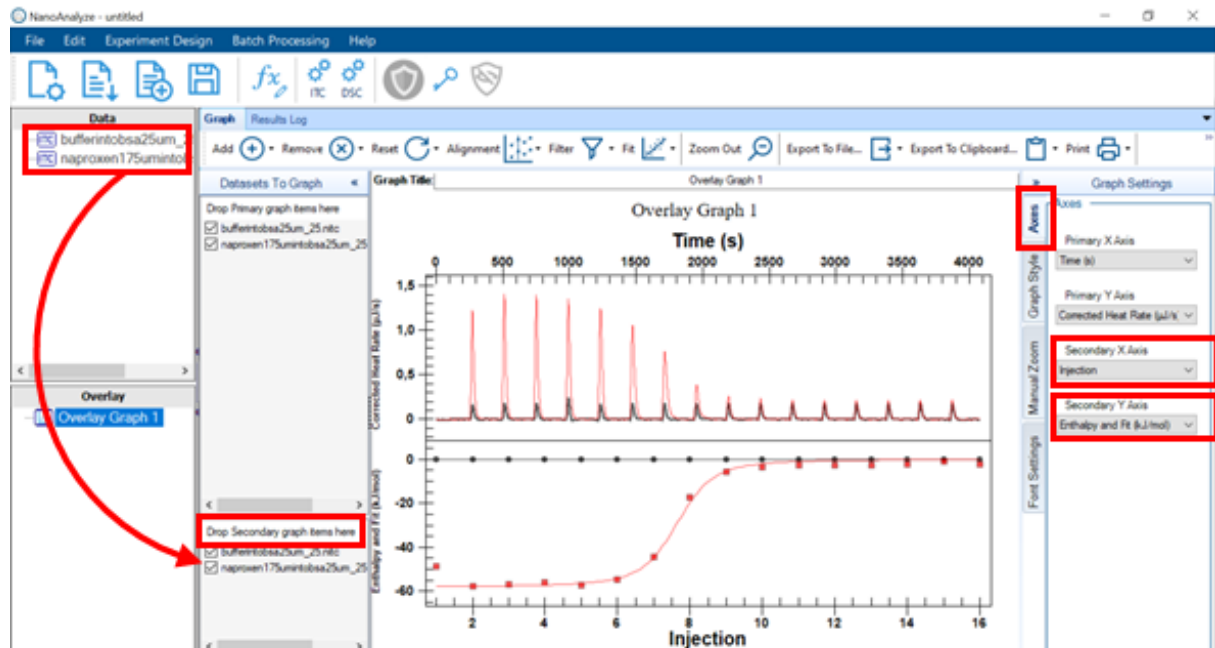
Darstellung der Heizrate

Die entsprechende Titration des Blank und der Medikamentenlösung wird aus dem *Data* Feld in das *Drop Primary graph items here* Feld gezogen. Die Achsenauswahl und Achsenbeschriftung kann auf der rechten Seite unter dem Tab *Axes* angepasst werden. Dargestellt werden soll die Zeit gegen die korrigierte Heizrate. Die Legende soll aufgrund der Übersichtlichkeit auf der rechten Seite unter dem Tab *Graph Style* ausgeblendet werden, die Beschreibung der Abbildung muss in der Abbildungsbeschriftung erfolgen.



Darstellung der angepassten Parameter

Die entsprechende Titration des Blank und der Medikamentenlösung wird aus dem *Data* Feld in das *Drop Secondary graph items here* Feld gezogen. Dargestellt werden soll die Anzahl der Injektionen gegen die Enthalpie.



Die durch die Fitfunktion angepassten Parameter sollen durch Auswahl des Punktes *Model Variables* auf der rechten Seite unter dem Tab *Graph Style* angezeigt werden. Die Größe dieses Feldes soll auf der rechten Seite unter dem Tab *Font Settings* so gewählt werden, dass es nicht den Graphen überdeckt. Die Farben der Graphen können durch Rechtsklick unter dem Punkt *Customization Dialog* verändert werden. Bitte Farben der oberen und unteren Darstellung anpassen.



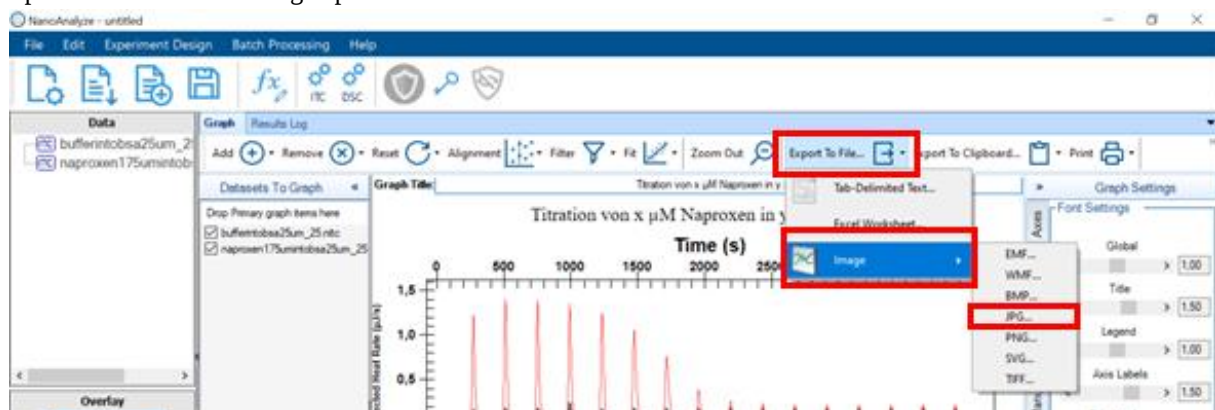
Überschrift

Überschrift der entsprechenden Titrationsen mit Konzentrationen über dem oberen Graphen unter *Graph Titel* eintragen.



Abbildung exportieren

Unter dem Tab *Graph* oben *Export to File – Image – JPG* auswählen. Nach Auswahl des Dateinamens und des Speicherorts die Abbildung exportieren.



5 Kolloquium

Zunächst wird der Versuch theoretisch besprochen und die Ergebnisse der Berechnung der BSA-Stammlösung verglichen. Das Kolloquium wird während der Titrationsmessung durchgeführt. Wird dieses nicht bestanden, darf der Versuch nicht beendet werden und muss nach einem Strafkolloquium bei einem Nachholtermin wiederholt werden.

Das Prinzip der isothermen Titrationskalorimetrie, sowie der Aufbau und Funktionsweise eines Kalorimeters und die thermodynamischen Grundlagen mit Massenwirkungsgesetz müssen bekannt sein.

6 Protokoll

Das Protokoll soll eine Einführung mit einem theoretischen Teil enthalten und die Zielsetzung des Versuchs erläutern. Im Material und Methoden Teil sollen die verwendeten Materialien aufgeführt und die experimentelle Methode beschrieben werden. Die Auswertung der experimentellen Daten (jetzt selbst gemessener Blank verwenden!) mit graphischer Darstellung der Messwerte, deren Fit und daraus berechneten Parameter, wie auch der statistischen Auswertung dieser berechneten Parameter sollen in den Ergebnissen zusammengefasst und diskutiert werden.

Auf die vollständige Beschriftung der Abbildungen ist zu achten. Abschließend muss das Protokoll eine Liste mit der verwendeten Literatur und den Quellen der Abbildungen enthalten.

Beispielaufbau:

Theorie

Zielsetzung

Material und Methode

Simulation

ITC-Experiment

Ergebnisse

eigene Messung

gegebene Titration von Ibuprofen

Diskussion

Literatur

7 Literatur

- [1] E.Freire, Y. Kawasaki, A. Velazquez-Campoy, A. Schön, „Characterisation of Ligand Binding by Caorimetry,“ in *Biophysical Approaches Determining Ligand Binding to Biomolecular Targets: Detection, Measurement and Modelling*, Royal Society of Chemistry, 2011, 275-299.
- [2] L. Lottspeich, J. Engels, *Bioanalytik*, Springer Spektrum, 2012.
- [3] „Bibliothek für Anwendungshinweise: Quick Start ITC,“ <http://www.tainstruments.com/applications-library-search/?lang=de>.
- [4] „Getting Started Guide for Models 601000, 601001, 601002,“ <https://biochem.wisc.edu/sites/default/files/equipment/manuals/tainstrumentsnanoitcusermanual.pdf>.
- [5] P. Satyajit, S. Kotni, P. Ashok, S. Anunay, „Diffusion of organic dyes in bovine serum albumin solution studied by fluorescence correlation spectroscopy,“ *RSC Advances*, 2, 6079-6086, 2012.
- [6] S. Wysocki, „The study of interactions between Ibuprofen and Bovine Serum Albumin,“ *Food Chemistry and Biotechnology*, 73, 15-24, 2009.
- [7] R. Nijhu, Y. Jhanker, K. Sutradhar, „Development of an Assay Method for Simultaneous Determination of Ciprofloxacin and Naproxen by UV Spectrophotometric Method,“ *S. J. Pharm. Sci.*, 4, 84-90, 2011.
- [8] C. Song, S. Zhang, H. Huang, „Choosing suitable method for the Origins in microbial genomes,“ *Front. Microbiol.*, 6, 1-18, 2015.