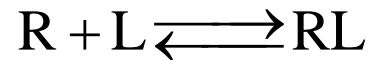


Equilíbrios proteína-ligando

- Para que as reacções enzimáticas possam ocorrer, é necessário o encontro molecular entre o enzima e o substrato e a sua associação num complexo *enzima-substrato*
- O processo de associação de enzima-substrato pode ser tratado como um caso particular de *equilíbrio proteína-ligando*
- Os processos de associação proteína-ligando são iniciadores de uma grande parte dos processos bioquímicos
- É habitual definir a macromolécula como *receptor* (R) e a molécula pequena que se liga a esta como *ligando* (L)

A constante de equilíbrio de dissociação (K_d)

No caso mais simples cada molécula de receptor pode ligar uma única molécula de ligando:



originando as seguintes equações de conservação de massa:

$$[R]_T = [RL] + [R]$$

$$[L]_T = [RL] + [L]$$

em que $[R]_T$ e $[L]_T$ são as concentração *totais* de receptor e ligando. Este processo é geralmente quantificado pela *constante de dissociação* do complexo RL, dada por

$$K_d = \frac{[L][R]}{[RL]}$$

Constante de dissociação e energia livre de associação

A constante de dissociação K_d está relacionada com a energia livre de associação ($\Delta G_{\text{binding}}$) :

$$\Delta G_{\text{binding}} = -RT \ln K_a = -RT \ln \left(\frac{[\text{LR}]}{[\text{L}][\text{R}]} \right) = RT \ln \left(\frac{[\text{L}][\text{R}]}{[\text{LR}]} \right)$$

$$\Delta G_{\text{binding}} = RT \ln(K_d)$$

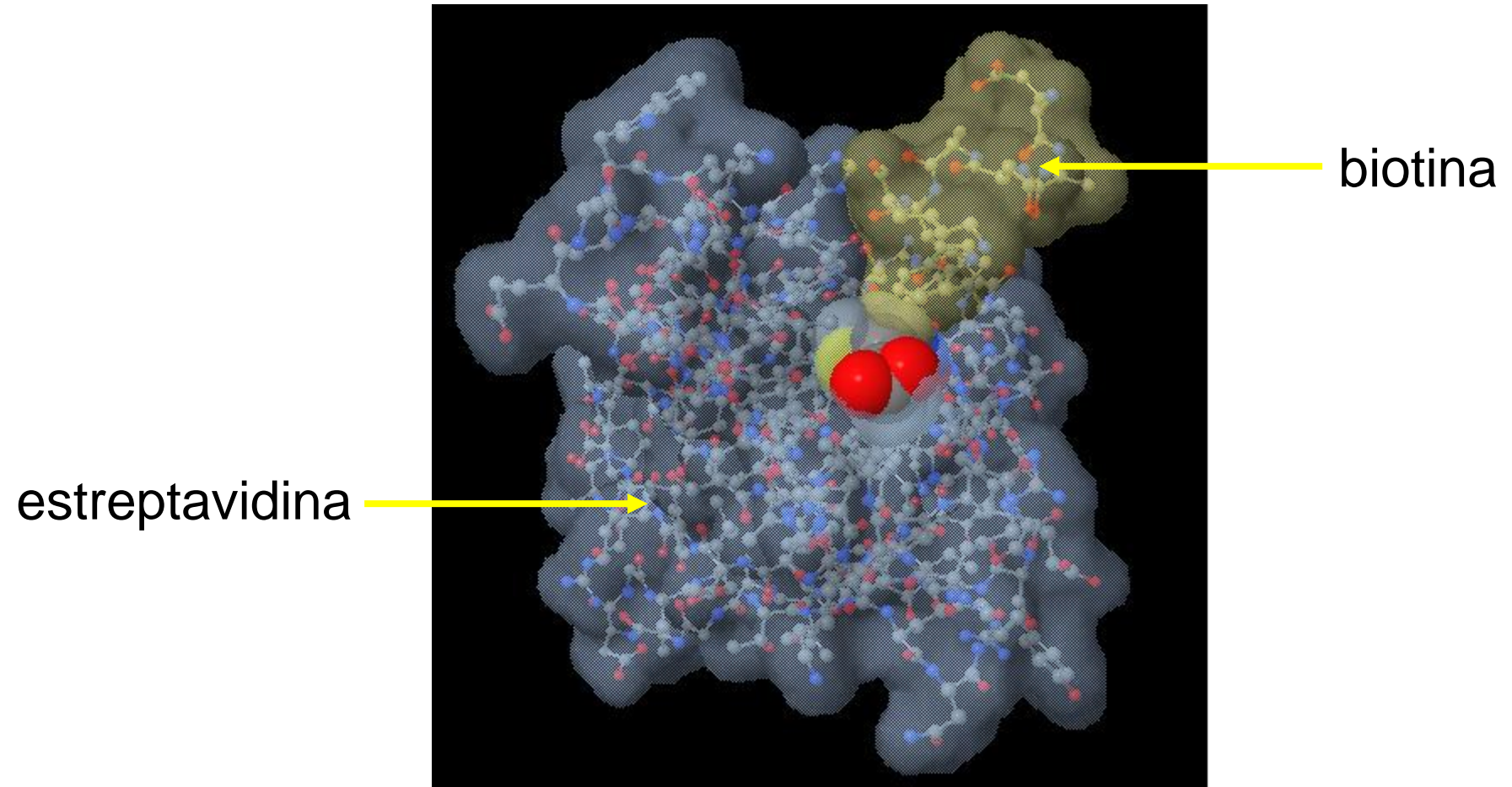
A constante de dissociação K_d é mais usada que K_a porque tem dimensões de concentração e pode ser vista como a concentração de ligando que produz 50% de saturação do receptor

Relação entre K_d e $\Delta G_{\text{binding}}$ a 25 °C

K_d (M)	$\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol) ^a
10^{-3} (mM)	−4.08
10^{-4}	−5.44
10^{-5}	−6.80
10^{-6} (μM)	−8.16
10^{-7}	−9.52
10^{-8}	−10.87
10^{-9} (nM)	−12.23
10^{-10}	−13.59
10^{-11}	−14.95
10^{-12} (pM)	−16.31

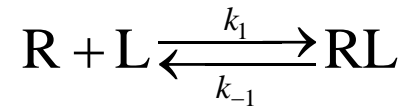
strong binding

Complexo biotina-estreptavidina: uma das mais fortes associações não-covalentes da Natureza



$$K_d \sim 10^{-15} \text{ M} !!!$$

Tratamento cinético do equilíbrio de associação



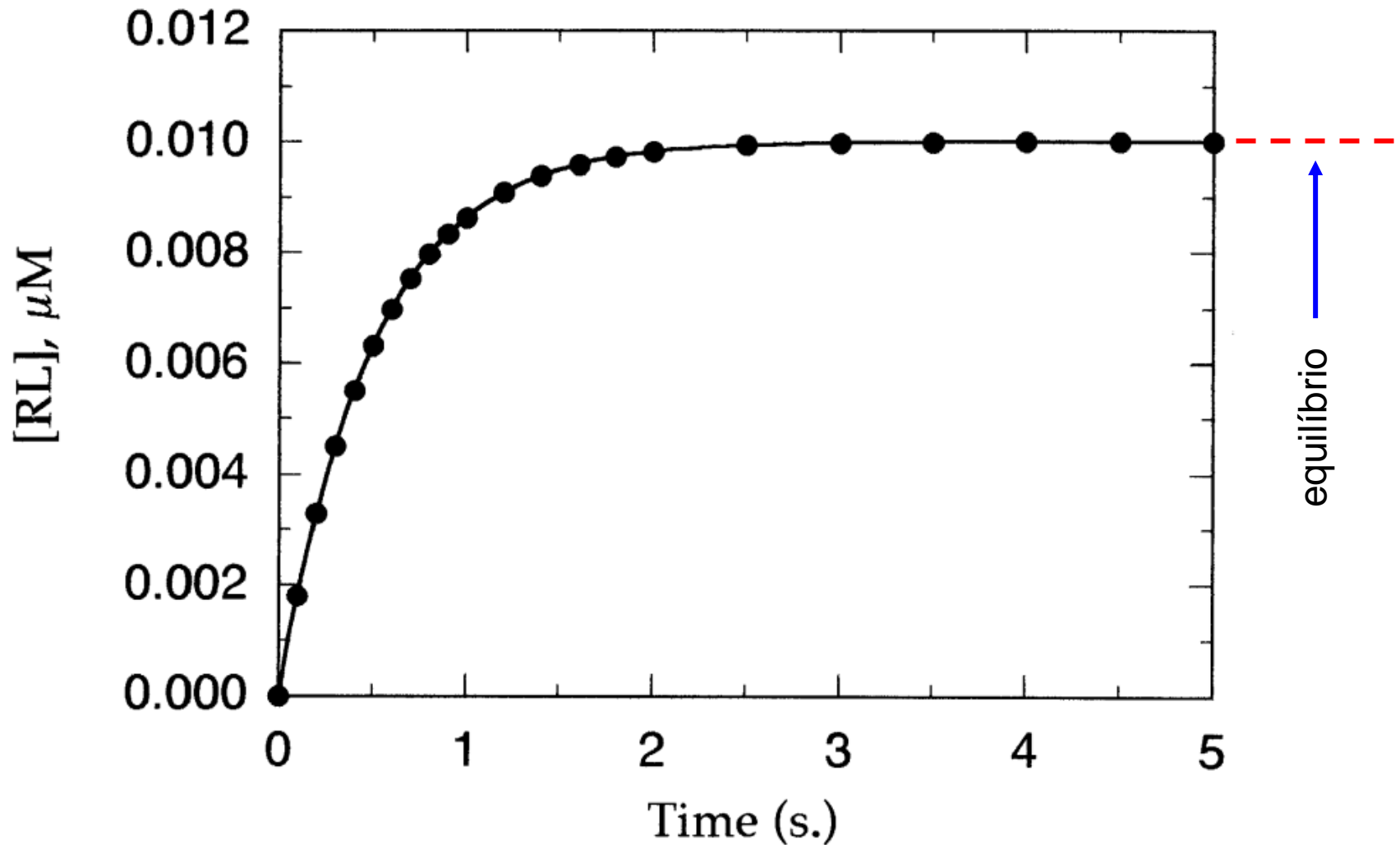
$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

Considerando o ligando em excesso a reacção procede com uma cinética aparente de primeira ordem:

$$[RL]_t = [RL]_{eq} \{1 - \exp(-k_{obs} t)\}$$

Em que $[RL]_t$ é a concentração do complexo binário no instante t e k_{obs} é a constante aparente de primeira ordem da reacção.

Concentração do complexo proteína-ligando vs. tempo



Tratamento cinético do equilíbrio de associação

$$[\text{RL}]_t = [\text{RL}]_{eq} [1 - \exp(-k_{\text{obs}} t)]$$

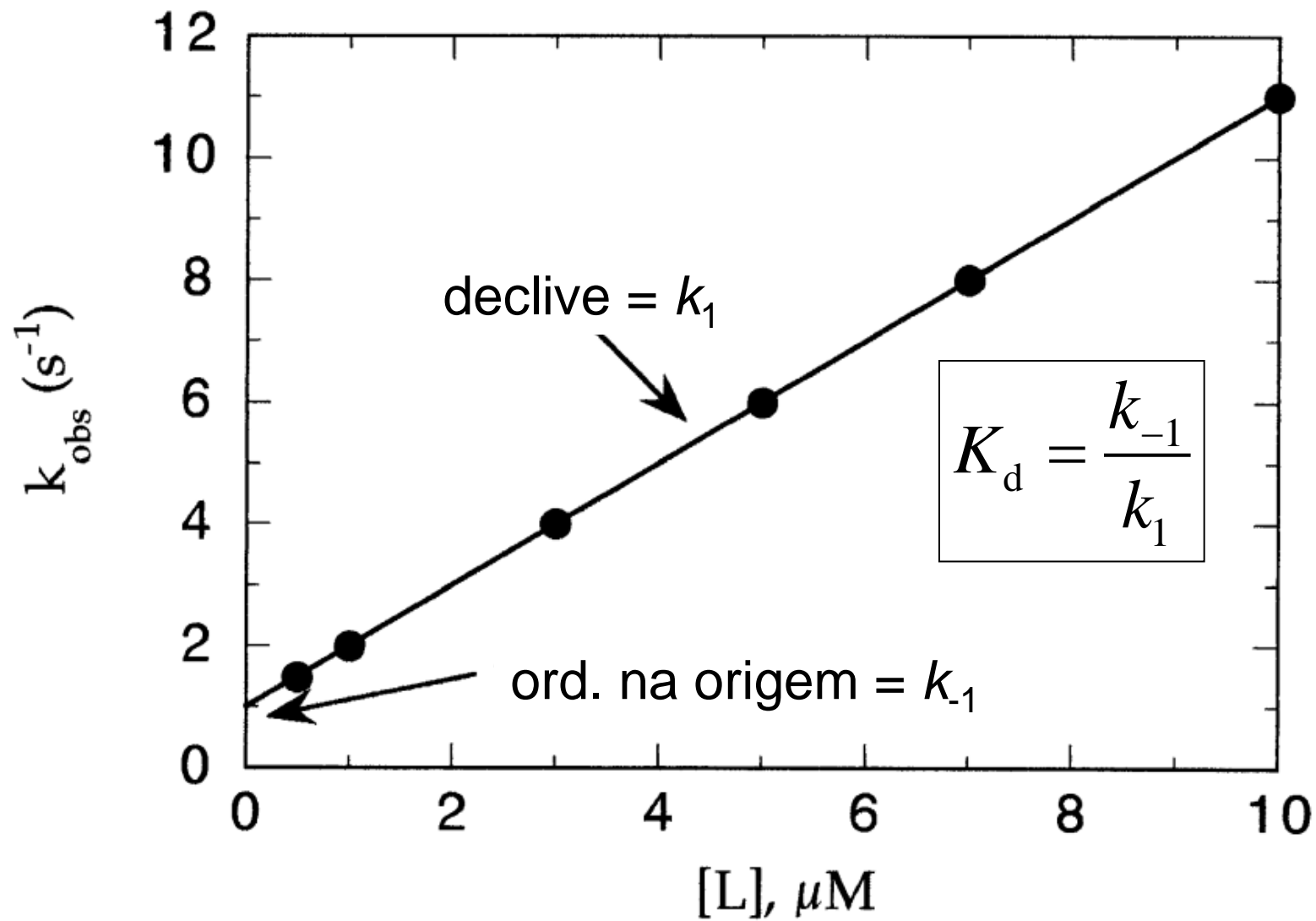
Para o caso da associação reversível, k_{obs} é dado por:

$$k_{\text{obs}} = k_{-1} + k_1 [\text{L}]$$

Determinando k_{obs} para uma série de diferentes concentrações de ligando, podemos obter k_1 e k_{-1} a partir de um gráfico de k_{obs} em função de $[\text{L}]$. A constante de dissociação K_d pode então ser calculada a partir de:

$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

Determinação cinética de K_d



Determinação de K_d no equilíbrio

Apesar de ser em princípio ser possível determinar K_d pelo método cinético exposto, na prática não é fácil pois o equilíbrio estabelece-se frequentemente num espaço de tempo muito curto, tornando difícil este tipo de ensaios. É muito mais frequente estudar os processos de associação proteína-ligando após o equilíbrio ter sido estabelecido.

$$K_d = \frac{[L]_{eq} [R]_{eq}}{[RL]_{eq}}$$

Assume-se que todas as concentrações que não estejam indexadas de outra forma são de equilíbrio, logo abandonamos uso de eq.

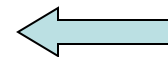
$$[R]_T = [RL] + [R]$$

$$[L]_T = [RL] + [L]$$

$$[RL] = \frac{[L]([R]_T - [RL])}{K_d}$$

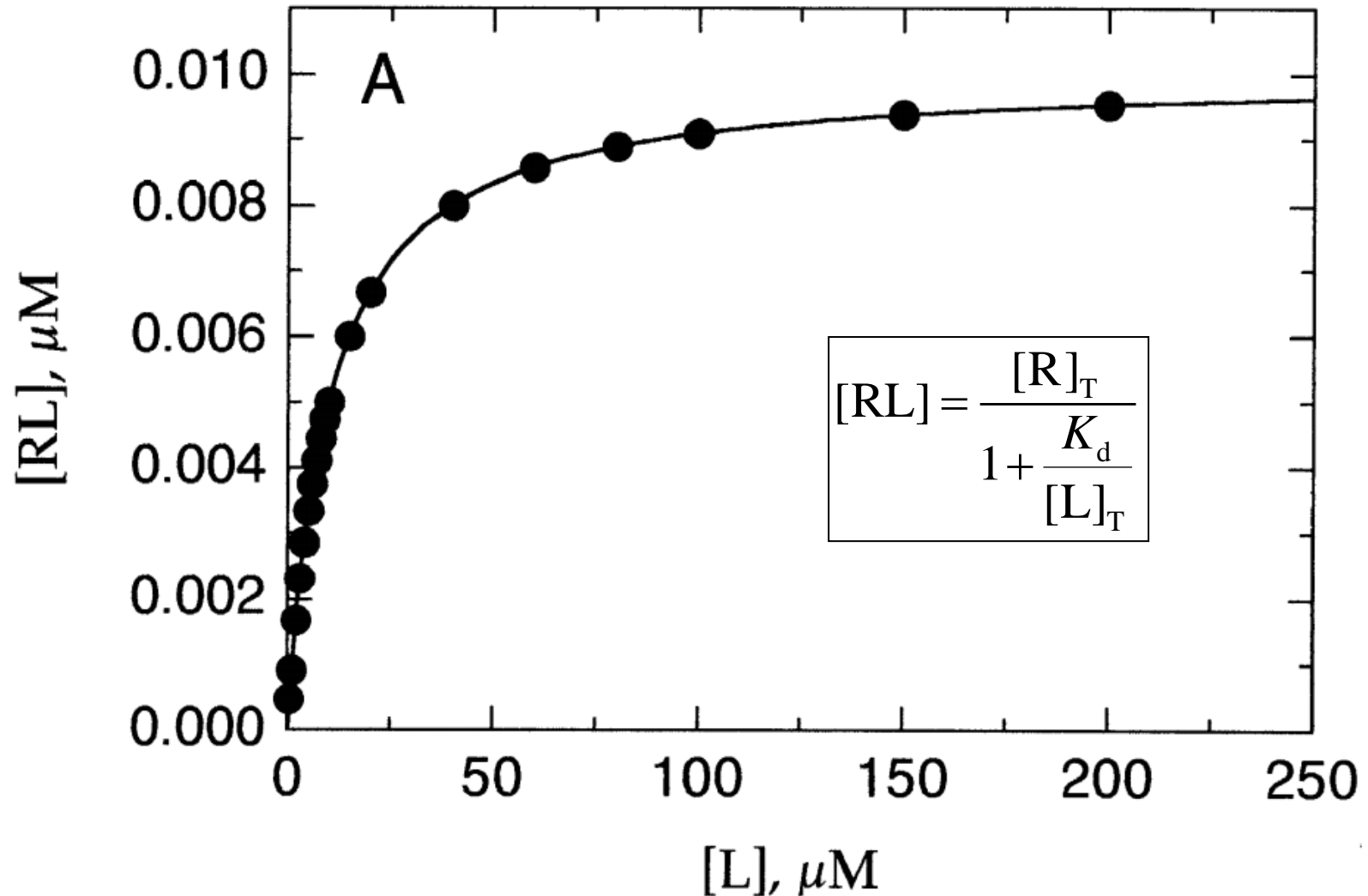
$$[L] \approx [L]_t$$

$$[RL] = \frac{[R]_T}{1 + \frac{K_d}{[L]_t}}$$



**Isoterma
de
Langmuir
(Langmuir, 1916)**

Concentração do complexo RL vs. concentração total de ligando



Isoterma de Langmuir em termos de ocupação fraccional

Não é necessário, e por vezes nem sequer possível, conhecer a quantidade total de receptor numa experiência de associação.

Geralmente existe uma propriedade experimental Y , proporcional à quantidade de complexo RL presente, tal que:

$$Y \propto [\text{RL}] \qquad Y = \frac{Y_{\max}}{1 + \frac{K_d}{[\text{L}]_T}}$$

Os valores de Y_{\max} e K_d são determinados por ajuste a um gráfico de Y em função de $[\text{L}]$

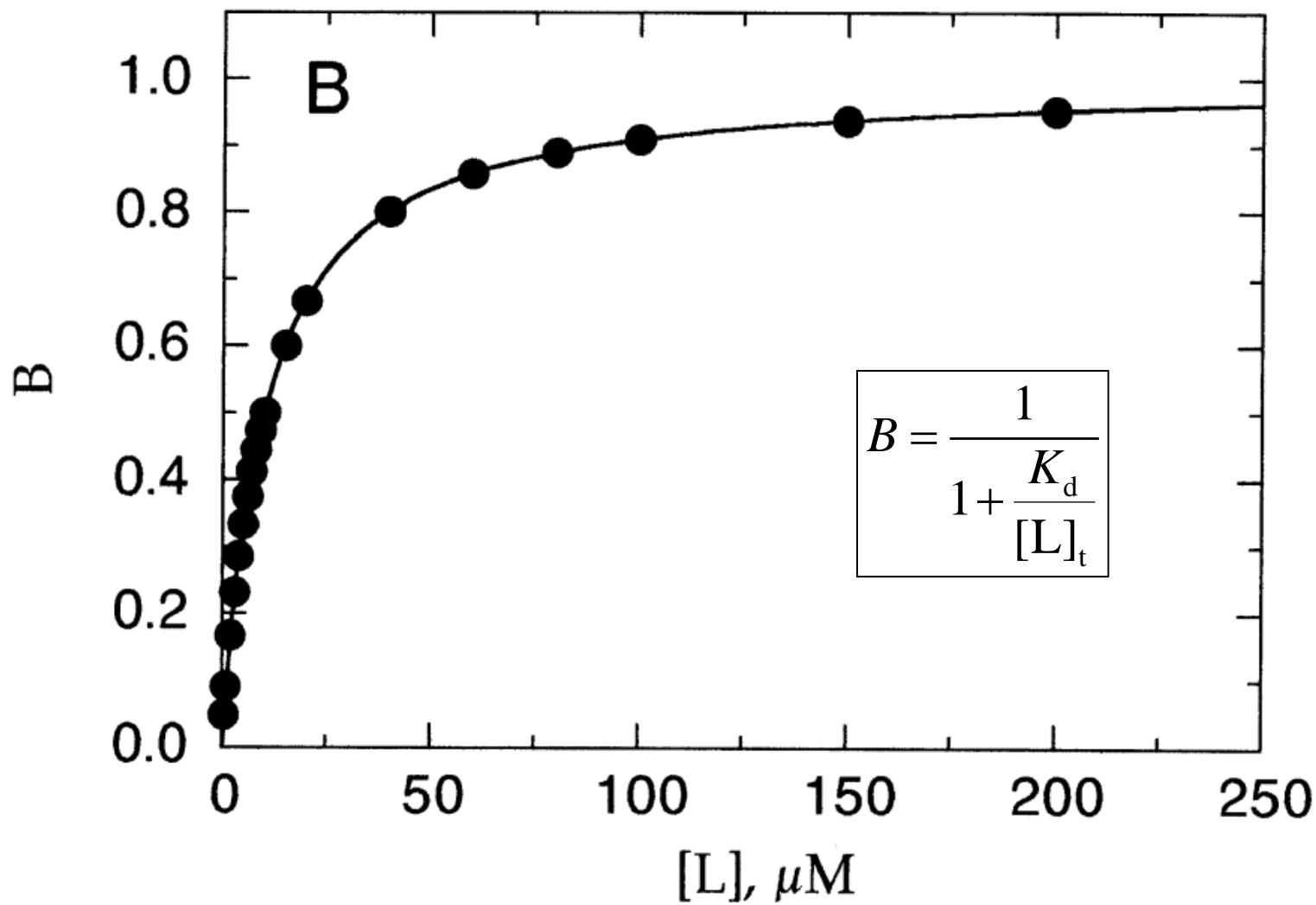
$$\frac{Y}{Y_{\max}} = \frac{[\text{RL}]}{[\text{R}]_T} = B$$

Ocupação
fraccional

$$B = \frac{1}{1 + \frac{K_d}{[\text{L}]_T}}$$

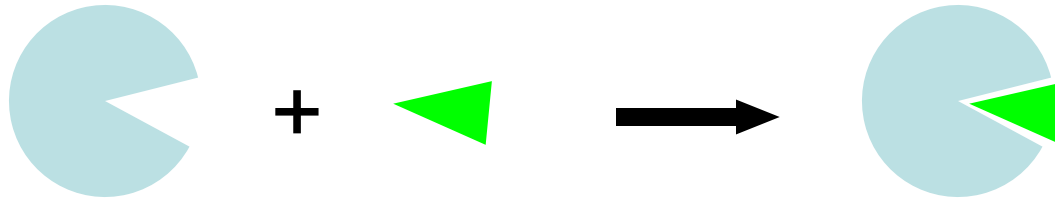
$$[\text{L}]_T = K_d \quad \Rightarrow \quad B = 0.5$$

Ocupação fraccional (B) *versus* $[L]_t$

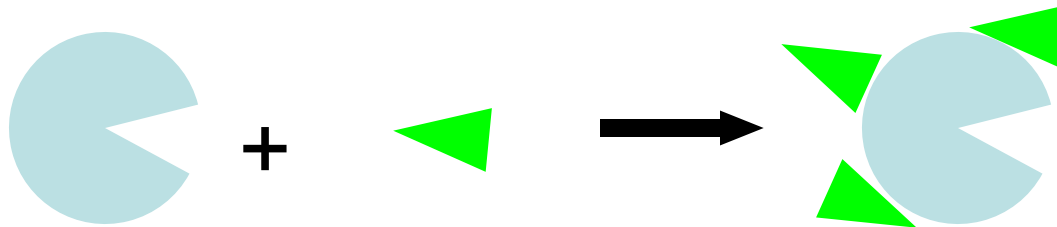


Determinação de K_d na presença de ligação não-específica

Ligação
específica

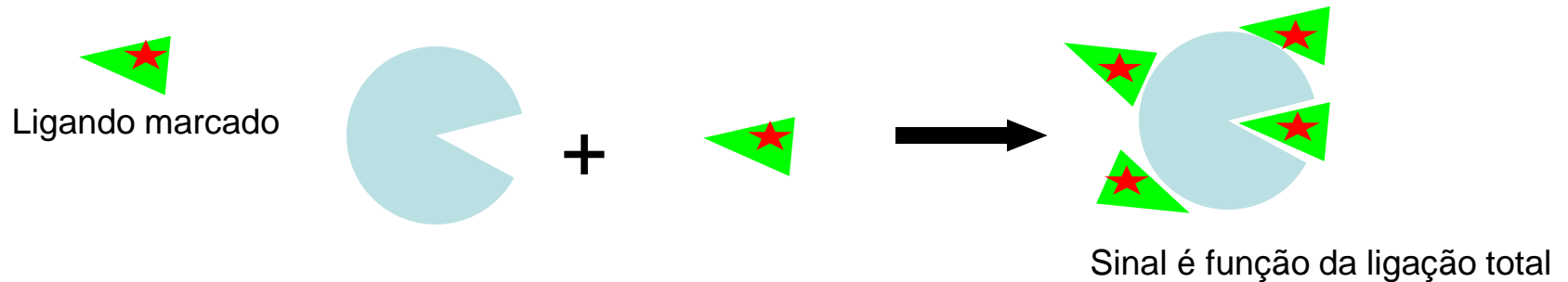


Ligação não
específica

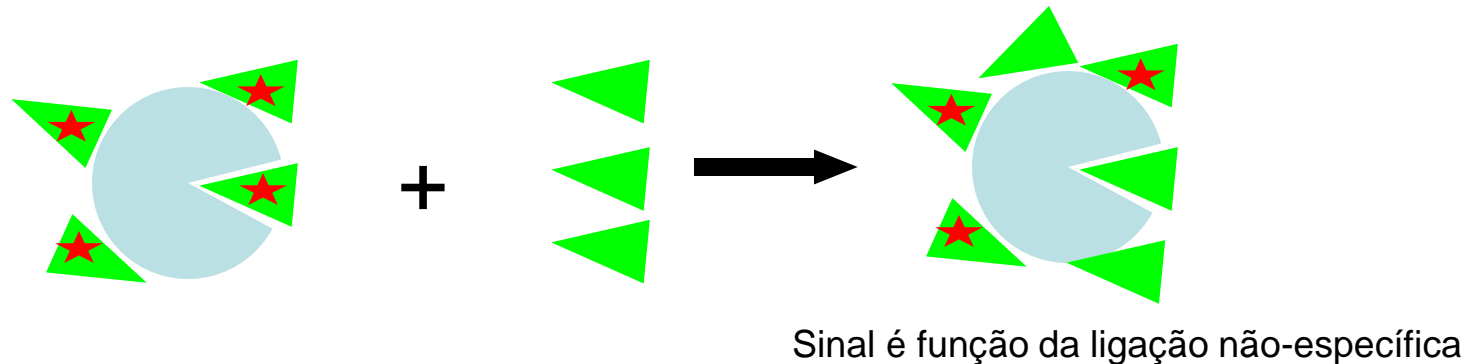


Determinação de K_d na presença de ligação não-específica

Adicionar ligando marcado:



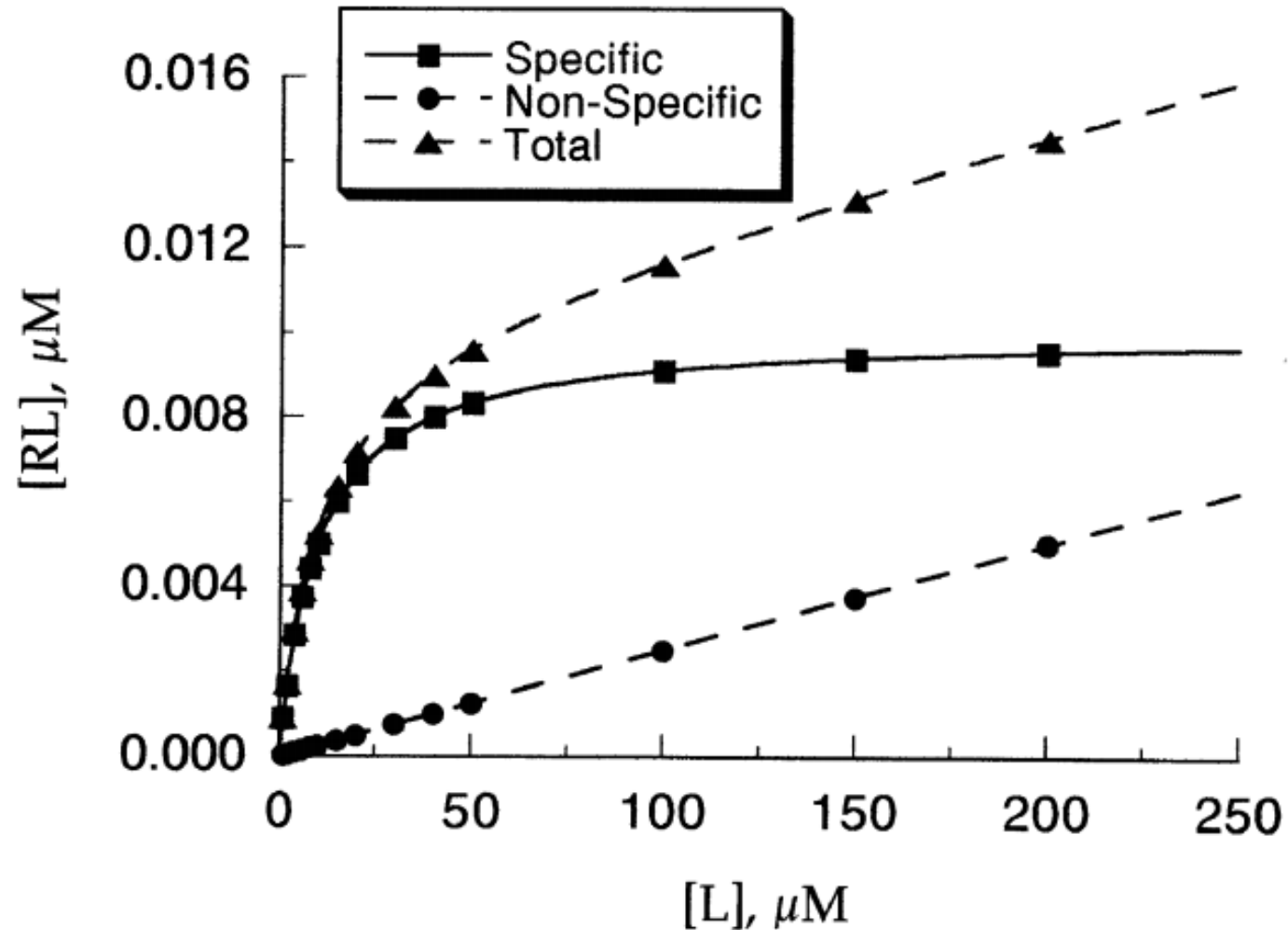
Adicionar ligando “frio” em excesso:



O ligando frio desloca o marcado do sítio de ligação específico, mas não do não-específico. O sinal restante indica o binding não-específico.

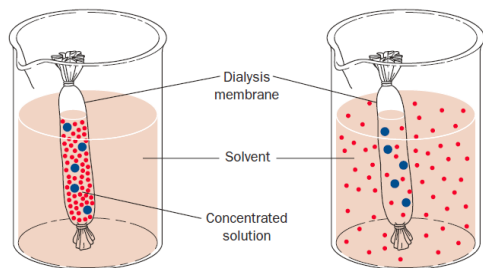
$$[RL]_{\text{específica}} = [RL]_{\text{total}} - [RL]_{\text{não-específica}}$$

Determinação de K_d na presença de ligação não-específica

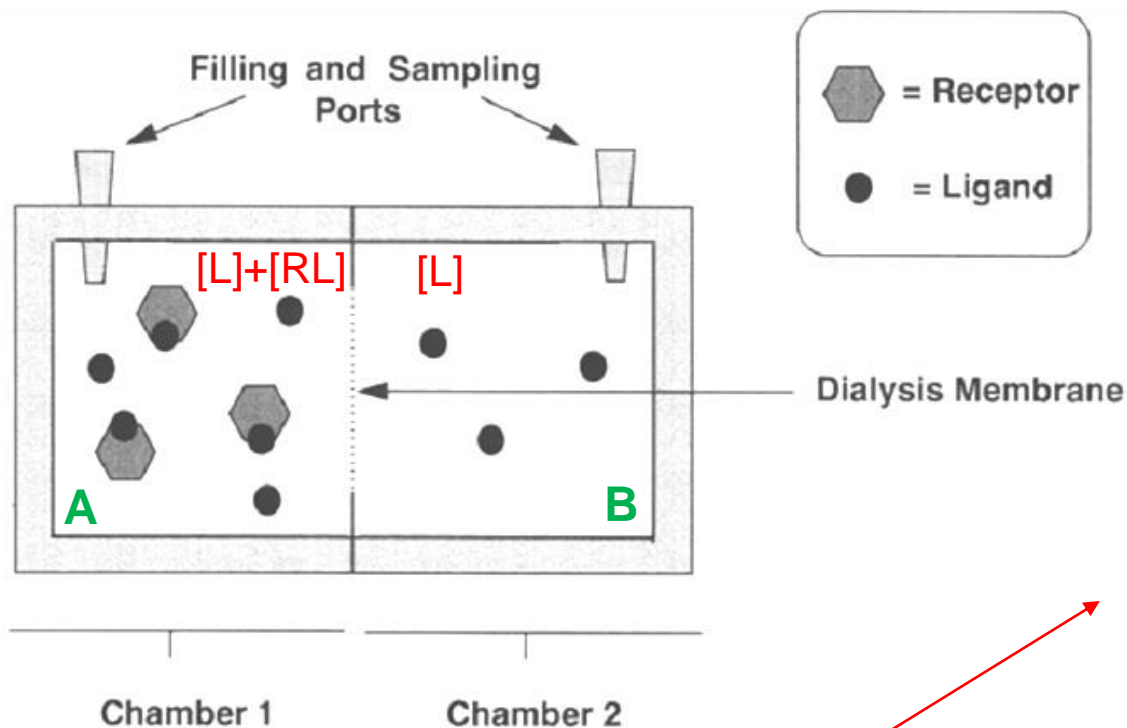


Métodos experimentais para a determinação de K_d

- Diálise de equilíbrio
- Filtração
- Cromatografia de exclusão
- Métodos espectroscópicos
- SPR (Biacore)
- ITC (isothermal titration calorimetry)



Diálise de equilíbrio



Muito importante ter a certeza que o equilíbrio de diálise foi atingido antes de fazer a determinação de $[L]$ nos dois compartimentos.

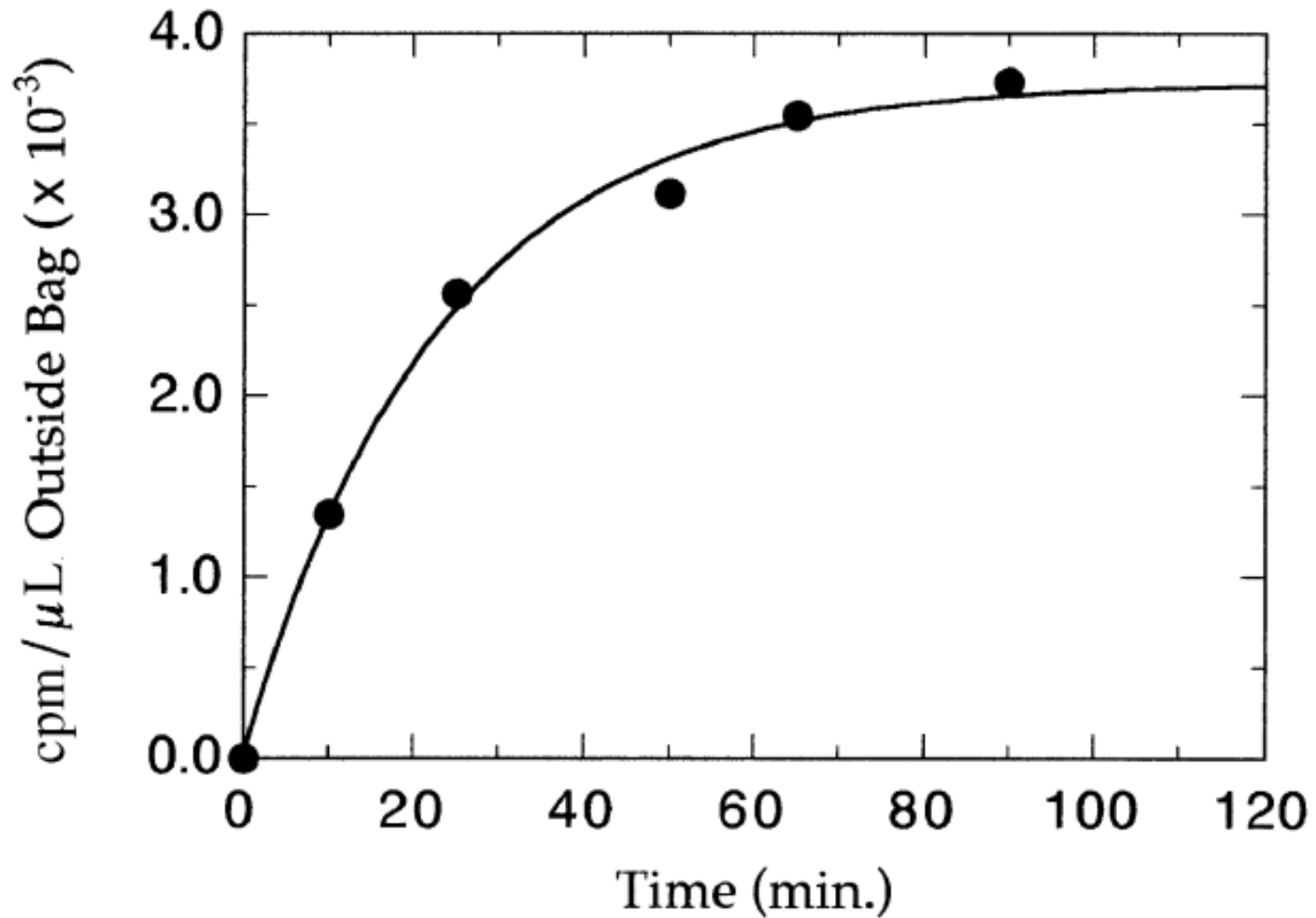
Concentração total de L no compartimento A

No equilíbrio tem-se:

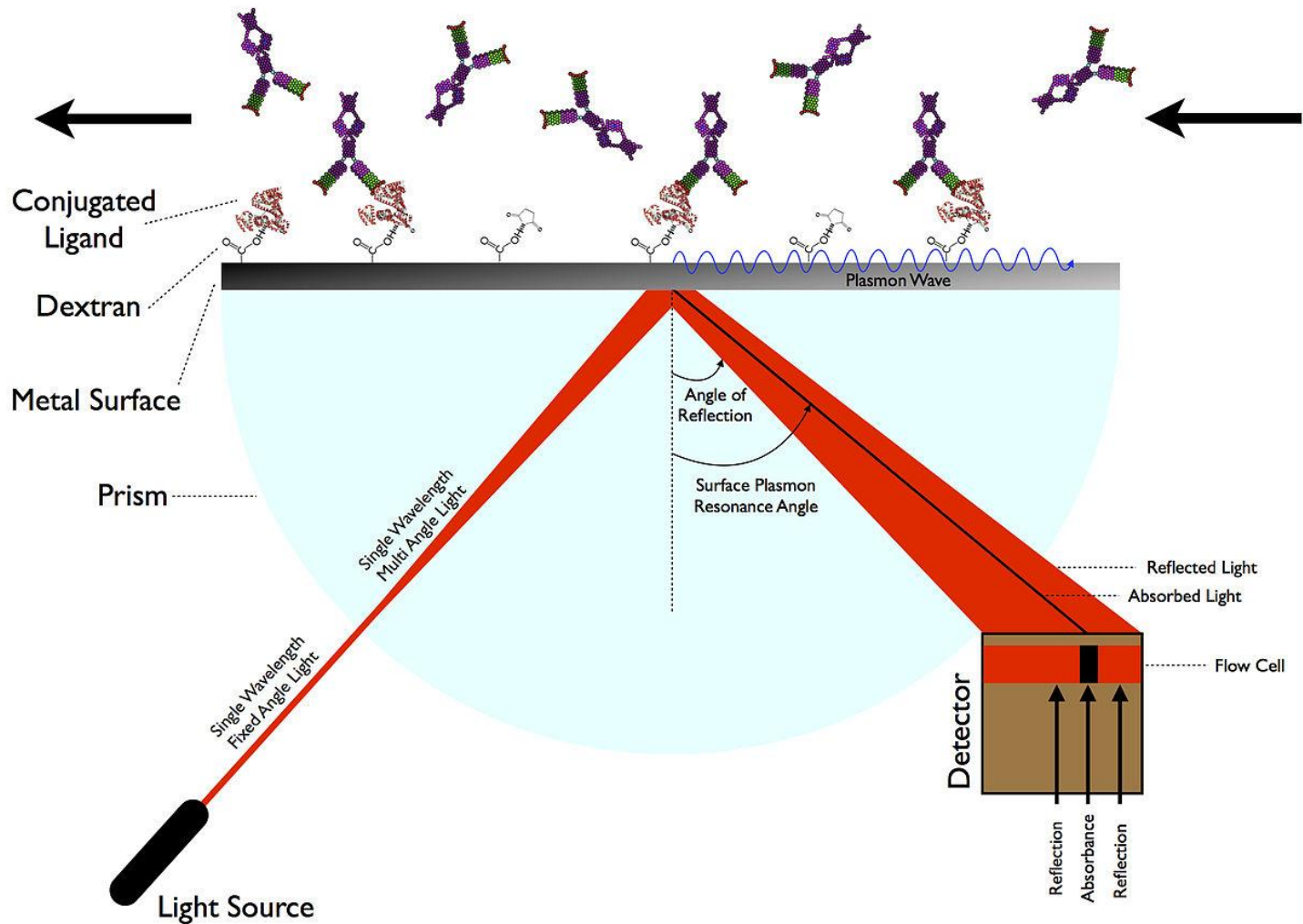
$$\begin{cases} [L]_A = [L]_B = [L]_{eq} \\ [RL]_{eq} = ([L]_A + [RL]) - [L]_B \\ [R]_{eq} = [R]_{Total} - [RL]_{eq} \end{cases}$$

$$K_d = \frac{[L]_{eq} [R]_{eq}}{[RL]_{eq}}$$

Marcha para o equilíbrio numa experiência de diálise

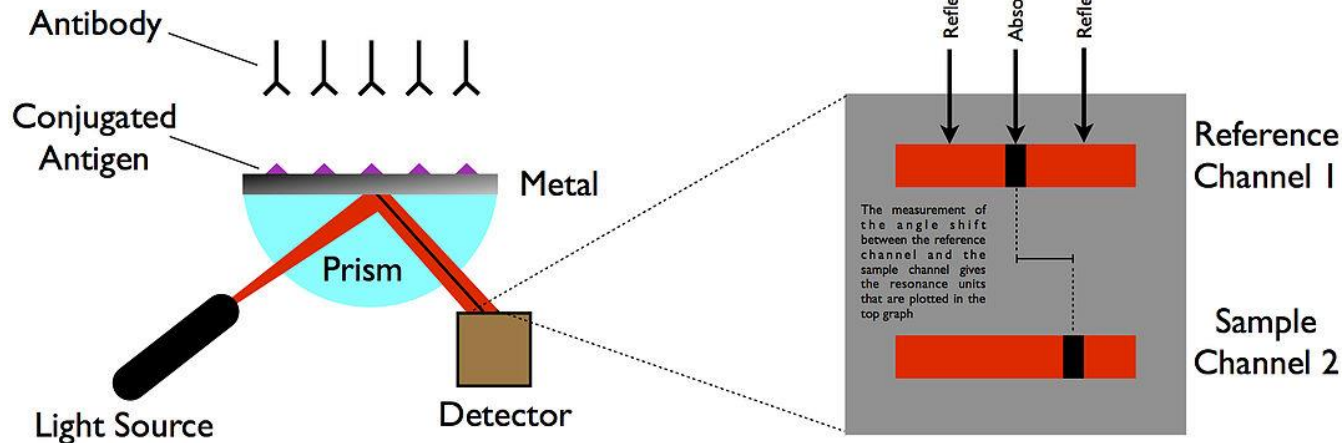
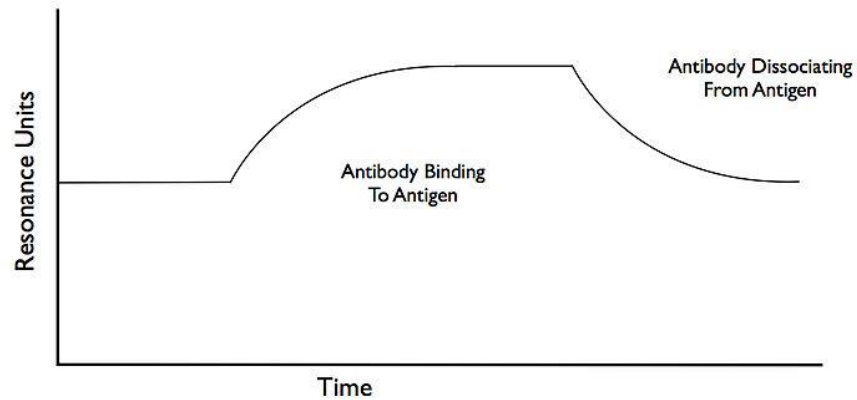


Surface plasmon resonance (SPR)



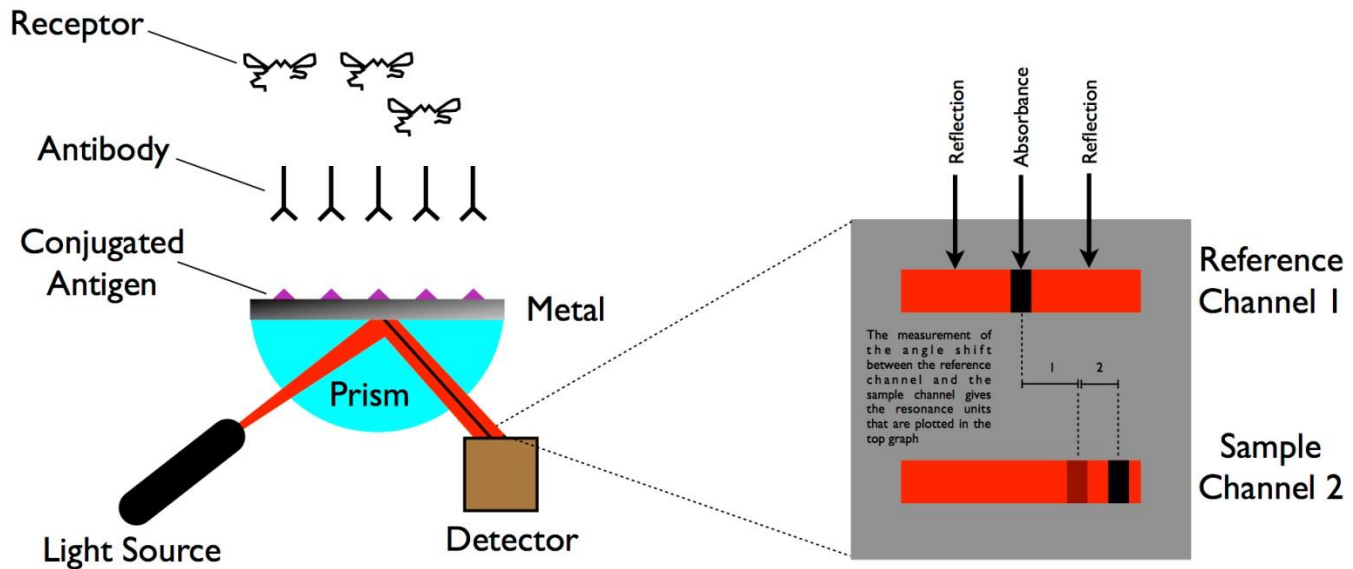
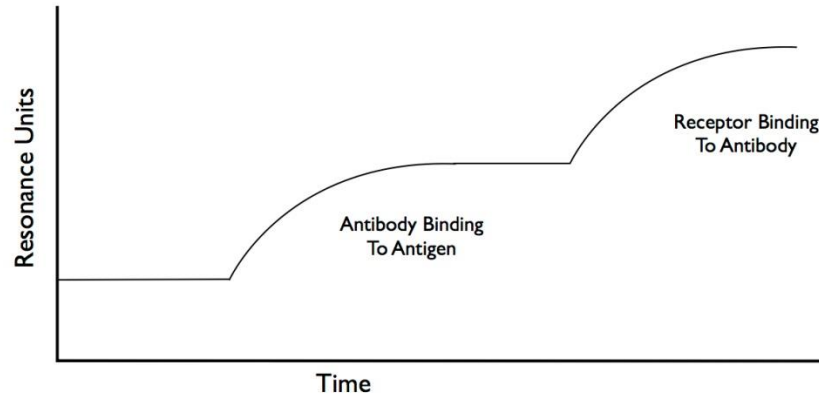
Surface plasmon resonance (SPR)

Graph of Reference
Channel 2-I

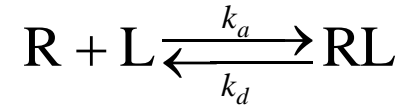


Surface plasmon resonance (SPR)

Graph of Reference
Channel 2-I



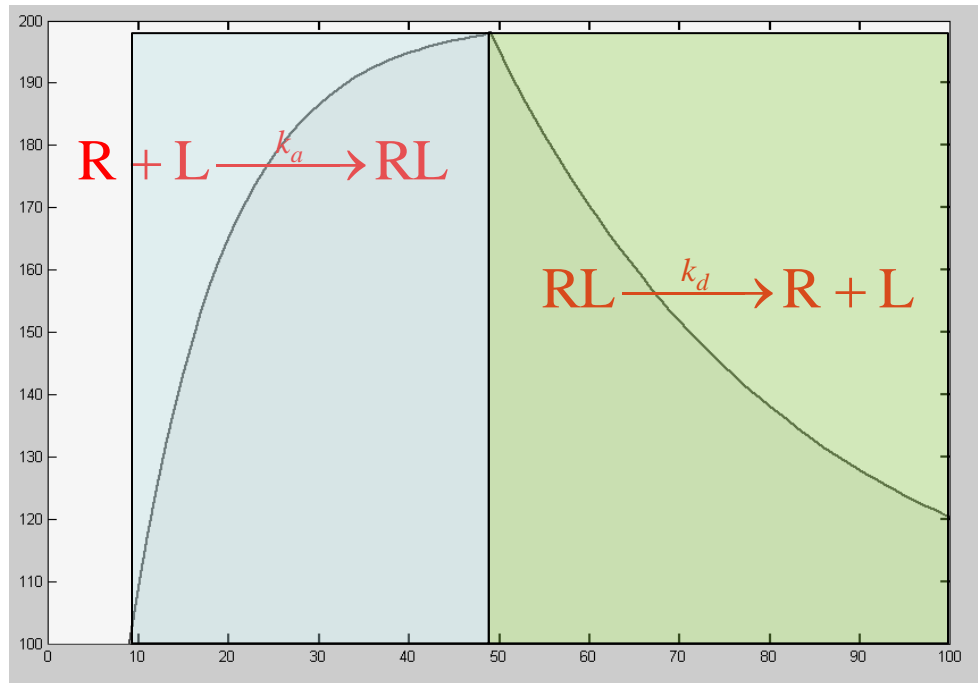
Determinação de K_d por SPR



$k_a(k_1)$ - on rate

$k_d(k_{-1})$ - off rate

$$K_d = \frac{k_d}{k_a}$$



BIACORE

Biacore

label-free interaction analysis –
from research through drug discovery
and development to QC

