INDICE

APPROCCI DI STUDIO DELL'INTERAZIONE PROTEINA – LIGANDO p. 1

INTERPRETAZIONI GRAFICHE p. 5

METODI PER LA QUANTIFICAZIONE DI [PL] p. 7

master COPY

master COPY

master COPY

master COPY

master COPY

master COPY

master COPY

APPROCCI DI STUDIO DELLE INTERAZIONI PROTEINA-LIGANDO

Ci possono essere varie interazioni proteina-ligando

- enzima-substrato
- enzima-inibitore/attivatore
- recettore-ligando
- proteina-proteina

master COPY

Anzitutto, occorre mettere per iscritto la reazione che lega proteina (P), ligando (L) e complesso (PL)

$$P + L \longleftrightarrow PL$$

Essendo, di fondo, una reazione chimica, possiamo tirare fuori delle COSTANTI, che ci danno un'idea di come sia orientata la reazione (se verso i "reagenti" o il "prodotto").

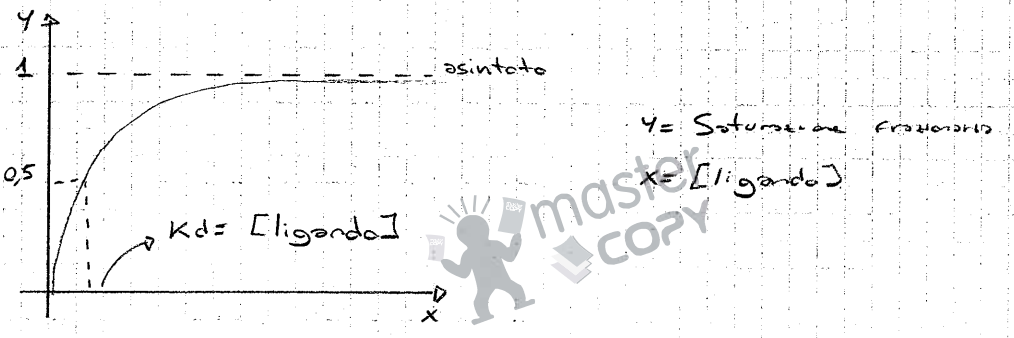
$K_a = [PL]/[P][L]\ (M^{-1})$ dove "K_a" è la costante di associazione del complesso.

$K_d = [P][L]/[PL]\ (M)$ dove "K_d" è la costante di dissociazione del complesso.

Un alto valore di K_a o un basso valore di K_d sono indici di stabilità del complesso PL, e quindi dell'alta affinità di P per il suo ligando.

Saturazione frazionaria = Rapporto tra concentrazione di proteina legata [PL] e la somma delle concentrazioni di proteina legata e libera (cioè la proteina totale, [Pt])

$$S.f. = \frac{[PL]}{[P_{tot}]}$$



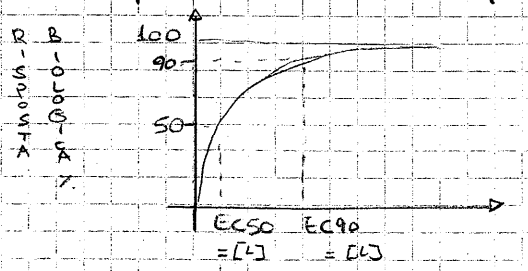
Perché $K_d = [L]$? Sappiamo che $K_d = [P][L]/[PL]$ e che $[PL]/[P_{tot}] = 0,5$ in quel punto. Inoltre, sempre lì metà proteine sono legate, metà libere ($[P] = [PL]$). Mettendo a sistema, si ha:

$$K_d = \frac{[P][L]}{\frac{[P_{tot}]}{2}} \Rightarrow K_d = \frac{[P][L] \cdot 2}{P_{tot}}$$

essendo $[P] \cdot 2 = P_{tot}$, possiamo semplificare cost.

$$K_d = [L]$$

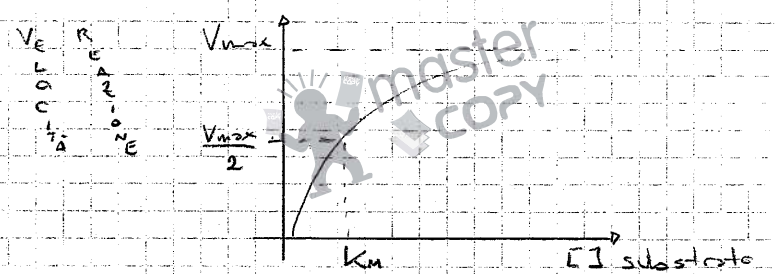
Tale grafico può anche essere espresso in termini di RISPOSTA BIOLOGICA



EC90 → Concentrazione espressa che dà 90% di risposta (in qst caso 90% proteine legate).

EC50 → Idem a sopra, ma al 50%.

Un grafico simile ai precedenti è anche quello usato per definire l'interazione tra enzima e substrato



INIBIZIONE REVERSIBILE

INIBITORE COMPETITIVO
stesso sito del substrato. Lega S.

INIBITORE INCOMPETITIVO
lega enzima in un sito non-catalitico

INIBITORE NON COMPETITIVO o MISTO
lega ES (può avere maggior/minor preferenza per E)

Tornando alle interazioni proteina-ligando

$$P + L \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} PL$$

K_1 → Costante cinetica di associazione $\frac{1}{M \cdot min}$

K_2 → " " dissociazione $\frac{1}{min^{-1}}$

La velocità di formazione del complesso PL può essere scritta come

$$\frac{\Delta[PL]}{\Delta t} = K_1[P][L]$$

mentre la velocità di dissociazione del complesso è espressa da

$$-\frac{\Delta[PL]}{\Delta t} = K_2[PL]$$

Raggiunto l'equilibrio dinamico (ovvero che n. complessi si formano e contemporaneamente altri n. si dissociano), si avrà

$$\frac{\Delta[PL]}{\Delta t} = -\frac{\Delta[PL]}{\Delta t} \longrightarrow K_1[P][L] = K_2[PL]$$

$$\downarrow$$

$$\frac{K_2}{K_1} = \frac{[P][L]}{[PL]} = K_d \qquad \frac{min^{-1}}{min^{-1} \cdot M^{-1}} = M$$

master COPY

Come si valuta Kd? $\frac{K_2}{K_1} = \frac{[P][L]}{[PL]} = Kd$

$[P_t] = [P] + [PL]$

$[P] = [P_t] - [PL]$

$$Kd = \frac{([P_t] - [PL])[L]}{[PL]}$$

$$[PL] \cdot Kd = [P_t][L] - [PL][L]$$

$$Kd[PL] + [PL][L] = [P_t][L]$$

$$[PL](Kd + [L]) = [P_t][L]$$

$$[PL] = \frac{[P_t][L]}{Kd + [L]}$$

Se misuriamo la [PL] con un metodo, conoscendo quanto ligando e proteina totale abbiamo messo, troviamo la Kd

Misurando [PL] possiamo ottenere la Kd, visto che sappiamo $[P_t]$ e $[L]$ ein dall'inizio!

E se la proteina avesse più siti di legame? Si mette "n" (n. siti attivi) davanti a $[P_t]$ e si rigira un po' la formula

$$[PL] = \frac{[P_t][L]}{Kd + [L]} \dots \Rightarrow [PL] = \frac{[P_t]}{1 + \frac{Kd}{[L]}} \dots \Rightarrow \left([PL] = \frac{n[P_t]}{1 + \frac{Kd}{[L]}}\right)$$

Per semplificare, ci mettiamo la SATURAZIONE FRAZIONARIA $\Rightarrow B = \frac{[PL]}{[P_t]} \dots \Rightarrow B = \frac{n}{1 + \frac{Kd}{[L]}}$

La situazione può essere + complicata, ad esempio...

- Se ho 2 siti con uguale affinità per il ligando
- Se ho 2 siti con ≠ affinità per il ligando

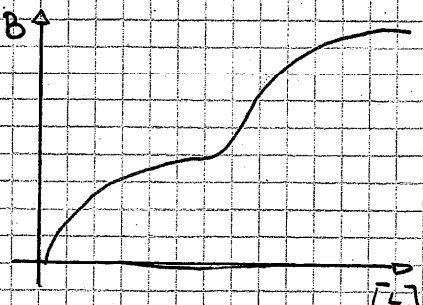
} cmq mi cambia l'iperbole

Nel primo caso, l'iperbole non avrà asintoto in y=1, ma in y=2

Nel secondo, L si lega al sito più affine per primo → aumentando [L] entra in gioco anche il secondo sito.

Se le Kd per i due siti sono molto simili, è poco + difficile vedere come cambia la curva da un'iperbole tipica.

Più le Kd differenziano, più si vede la deviazione.



$$B = \frac{n_1}{1 + \frac{Kd_1}{[L]}} + \frac{n_2}{1 + \frac{Kd_2}{[L]}}$$

Nb → sempre ipotizzando che ogni sito abbia rapporto 1:1

Sito con affinità maggiore (= Kd minore)

Sito con affinità minore (= Kd alta)