

## 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 ( $\Delta G_{\text{binding}}$ ):

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

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

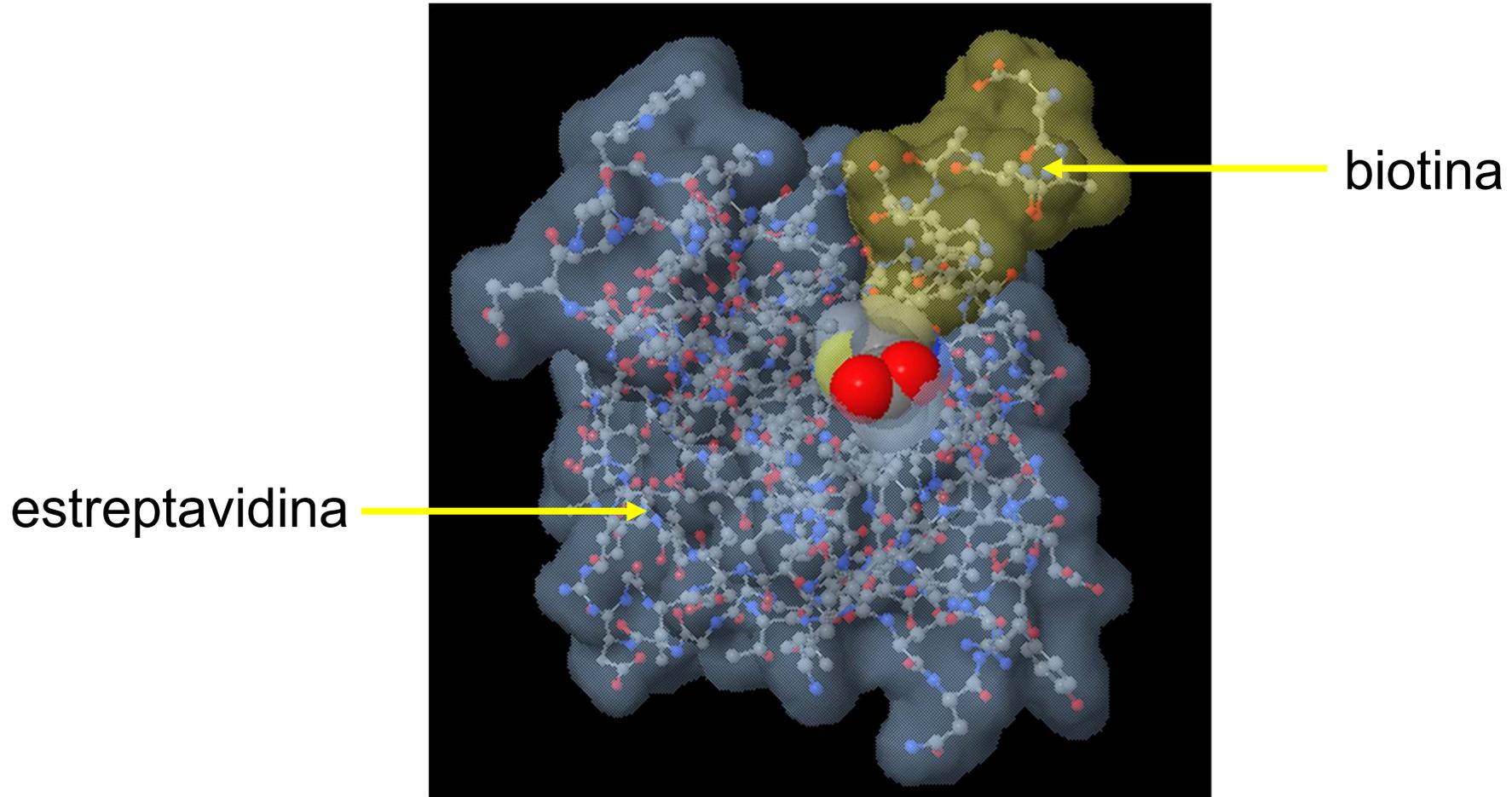
A constante de dissociação  $K_d$  é mais usada que  $K_a$  porque tem dimensões de concentração e pode ser vista como a concentração de ligando que produz 50% de saturação do receptor

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

$K_d$ (M)	$\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol) <sup>a</sup>
$10^{-3}$ (mM)	-4.08
$10^{-4}$	-5.44
$10^{-5}$	-6.80
$10^{-6}$ ( $\mu\text{M}$ )	-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

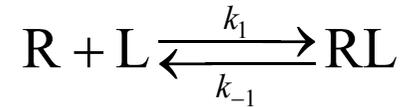
strong binding

# 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



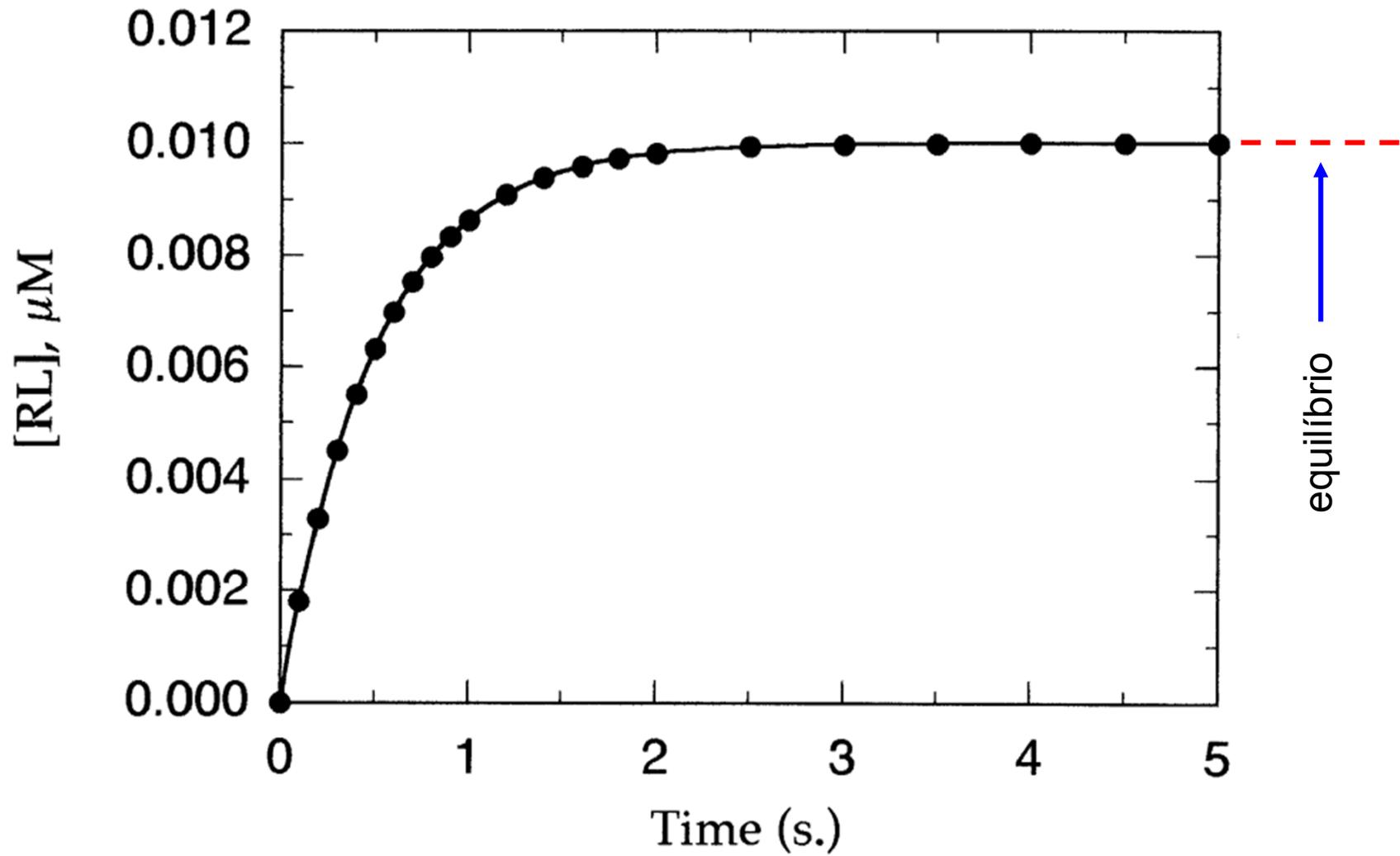
$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

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

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

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

# Concentração do complexo proteína-ligando vs. tempo



## Tratamento cinético do equilíbrio de associação

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

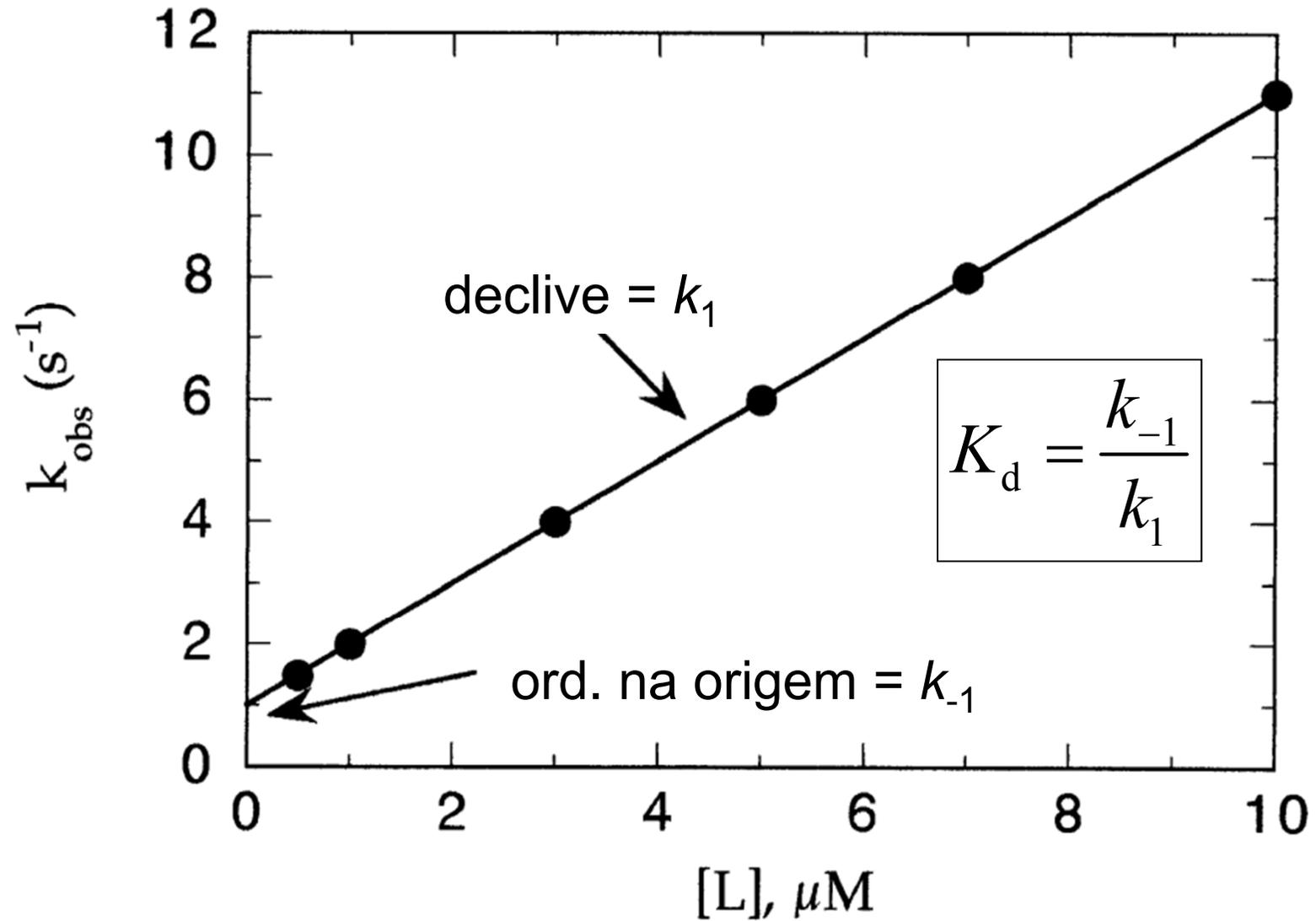
Para o caso da associação reversível,  $k_{\text{obs}}$  é dado por:

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

Determinando  $k_{\text{obs}}$  para uma série de diferentes concentrações de ligando, podemos obter  $k_1$  e  $k_{-1}$  a partir de um gráfico de  $k_{\text{obs}}$  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.*

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

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

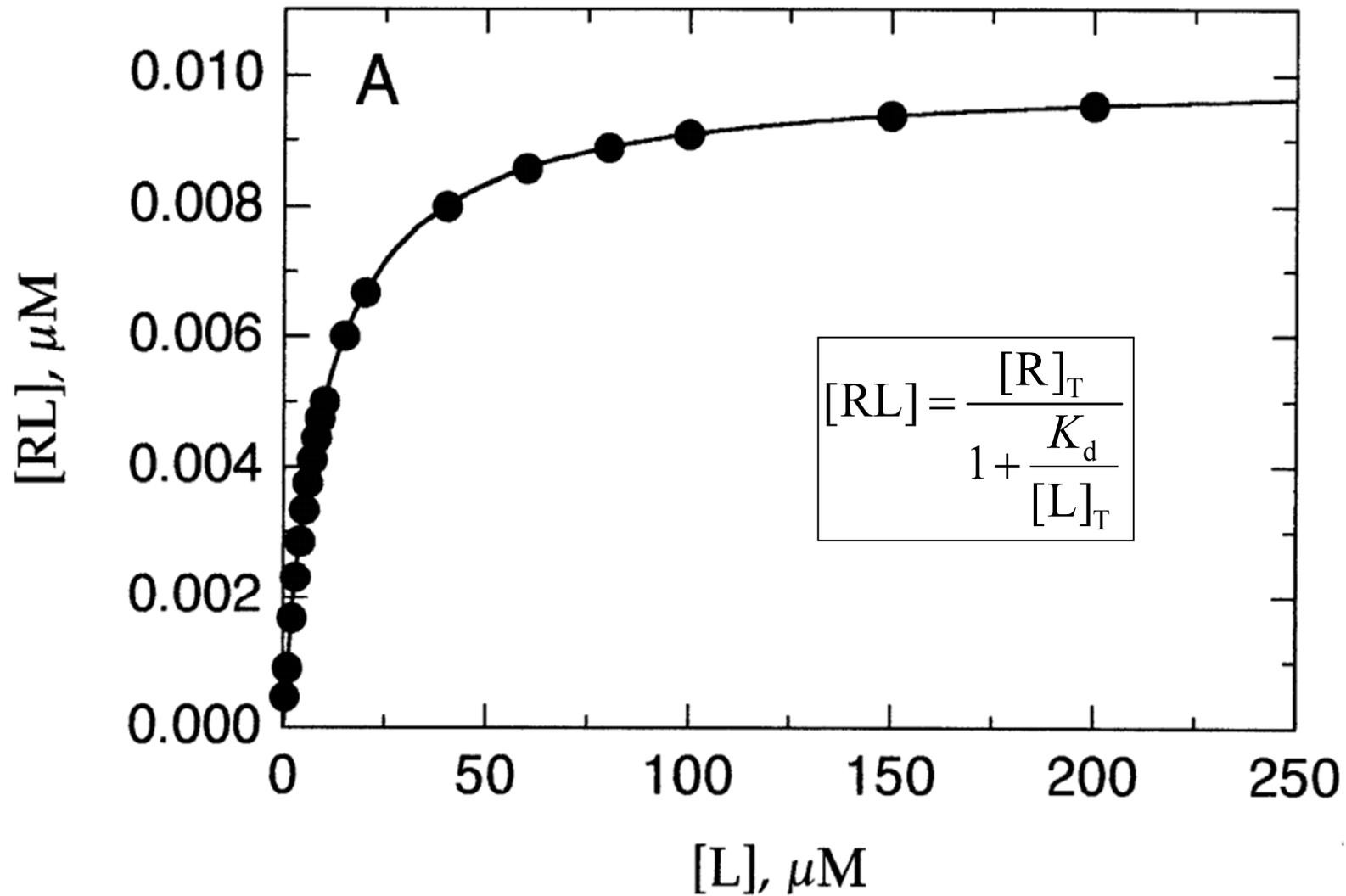
$$[RL] = \frac{[L]([R]_T - [RL])}{K_d}$$

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

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

**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  $[\text{L}]$

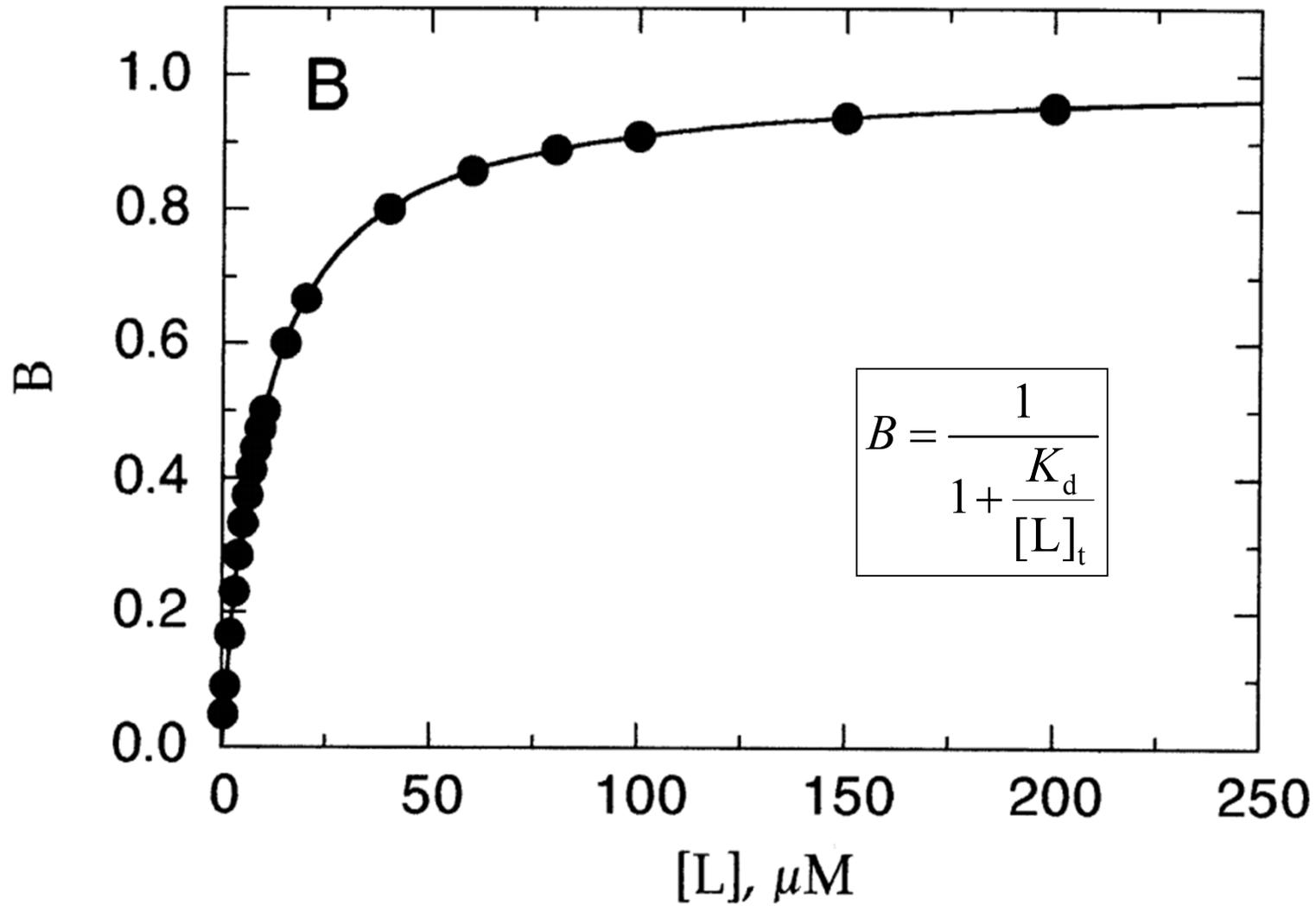
$$\frac{Y}{Y_{\max}} = \frac{[\text{RL}]}{[\text{R}]_T} = B$$

Ocupação fraccional

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

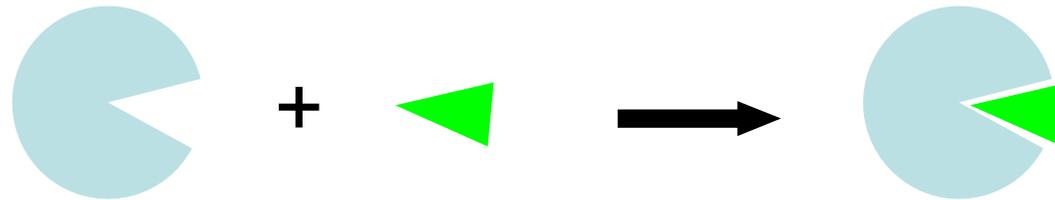
$$[\text{L}]_T = K_d \Rightarrow B = 0.5$$

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

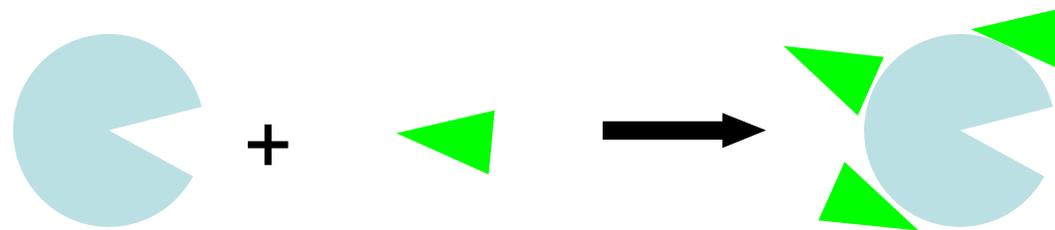


# Determinação de $K_d$ na presença de ligação não-específica

Ligação específica

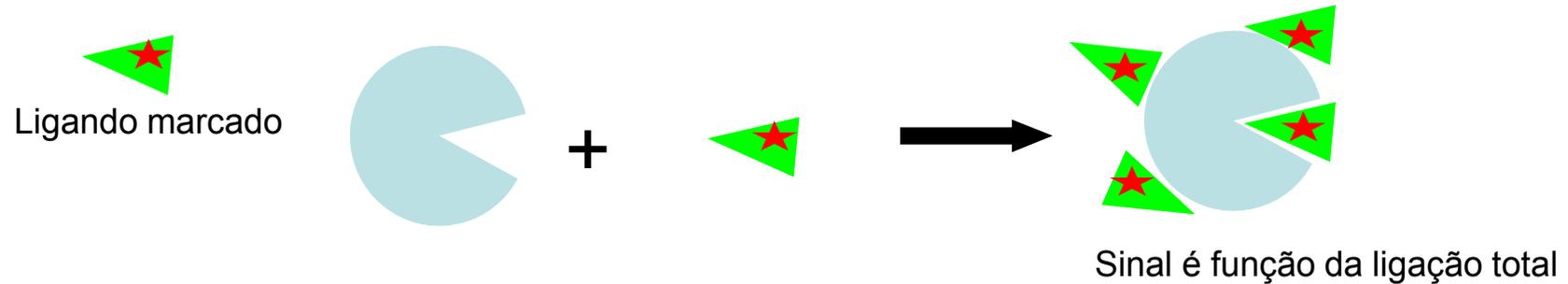


Ligação não específica

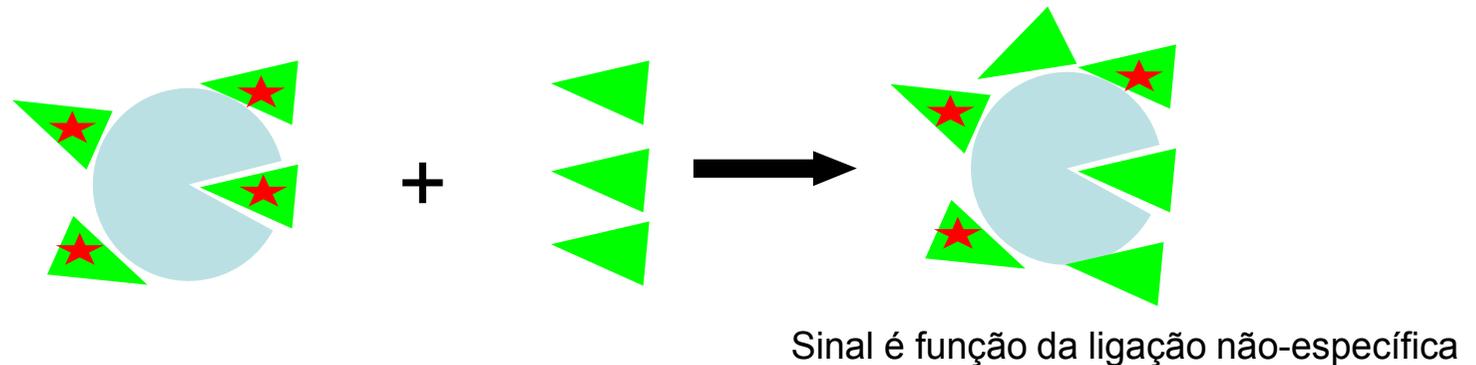


# Determinação de $K_d$ na presença de ligação não-específica

Adicionar ligando marcado:



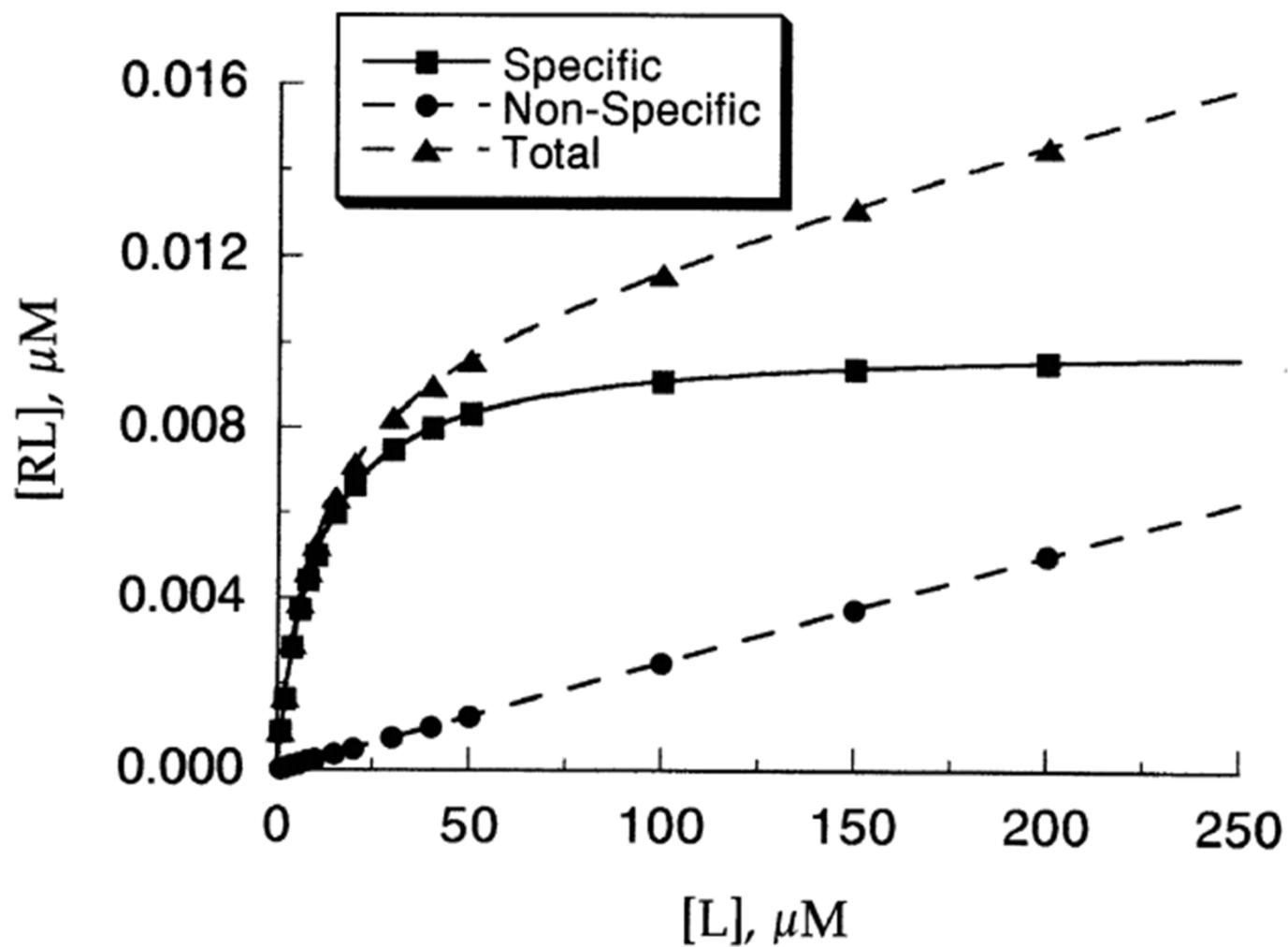
Adicionar ligando “frio” em excesso:



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

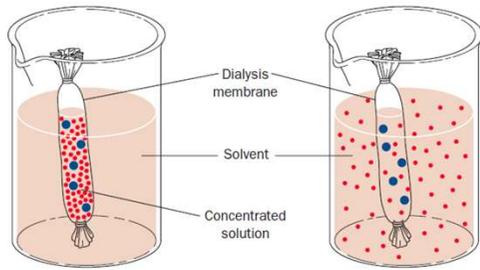
$$[RL]_{\text{específica}} = [RL]_{\text{total}} - [RL]_{\text{não-específica}}$$

# Determinação de $K_d$ na presença de ligação não-específica

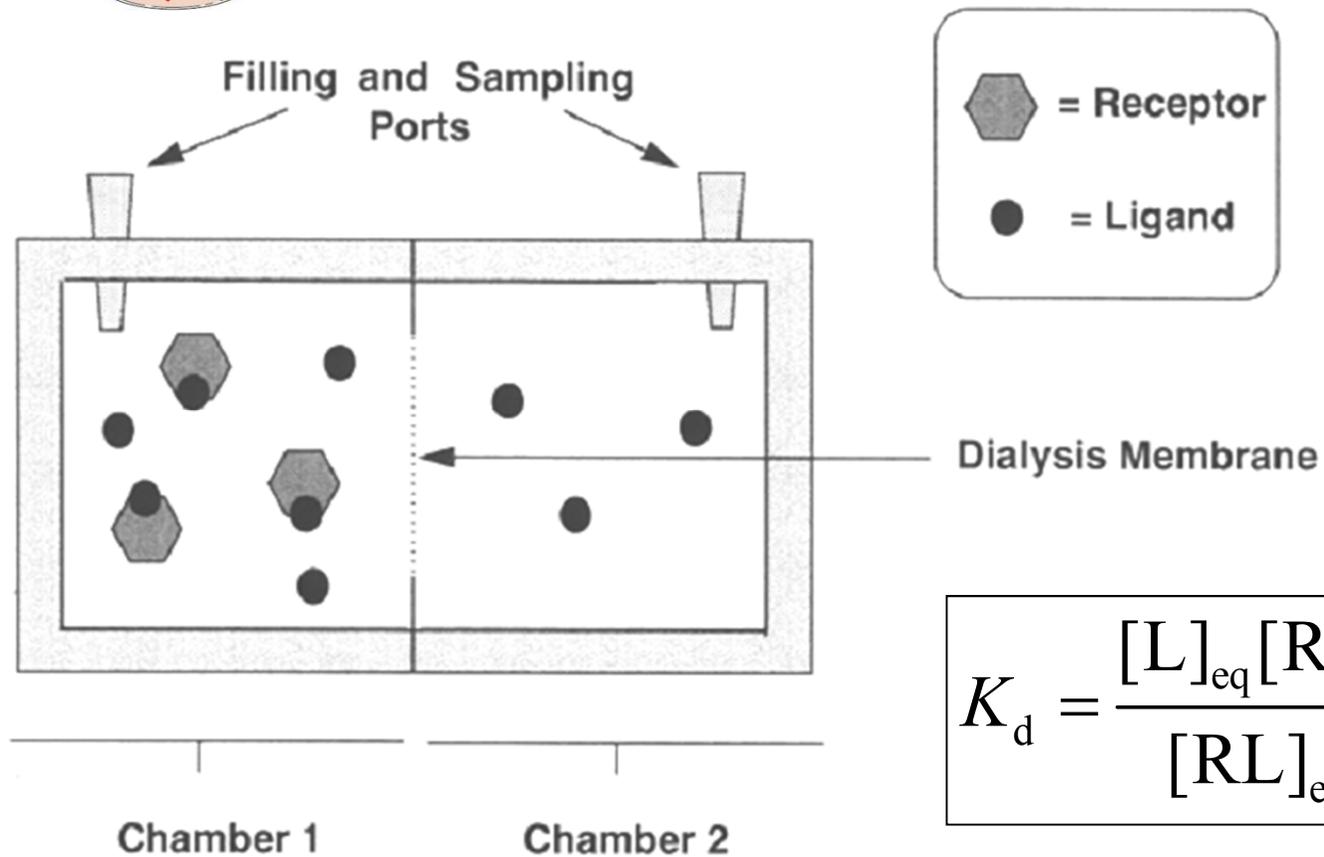


## Métodos experimentais para a determinação de $K_d$

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



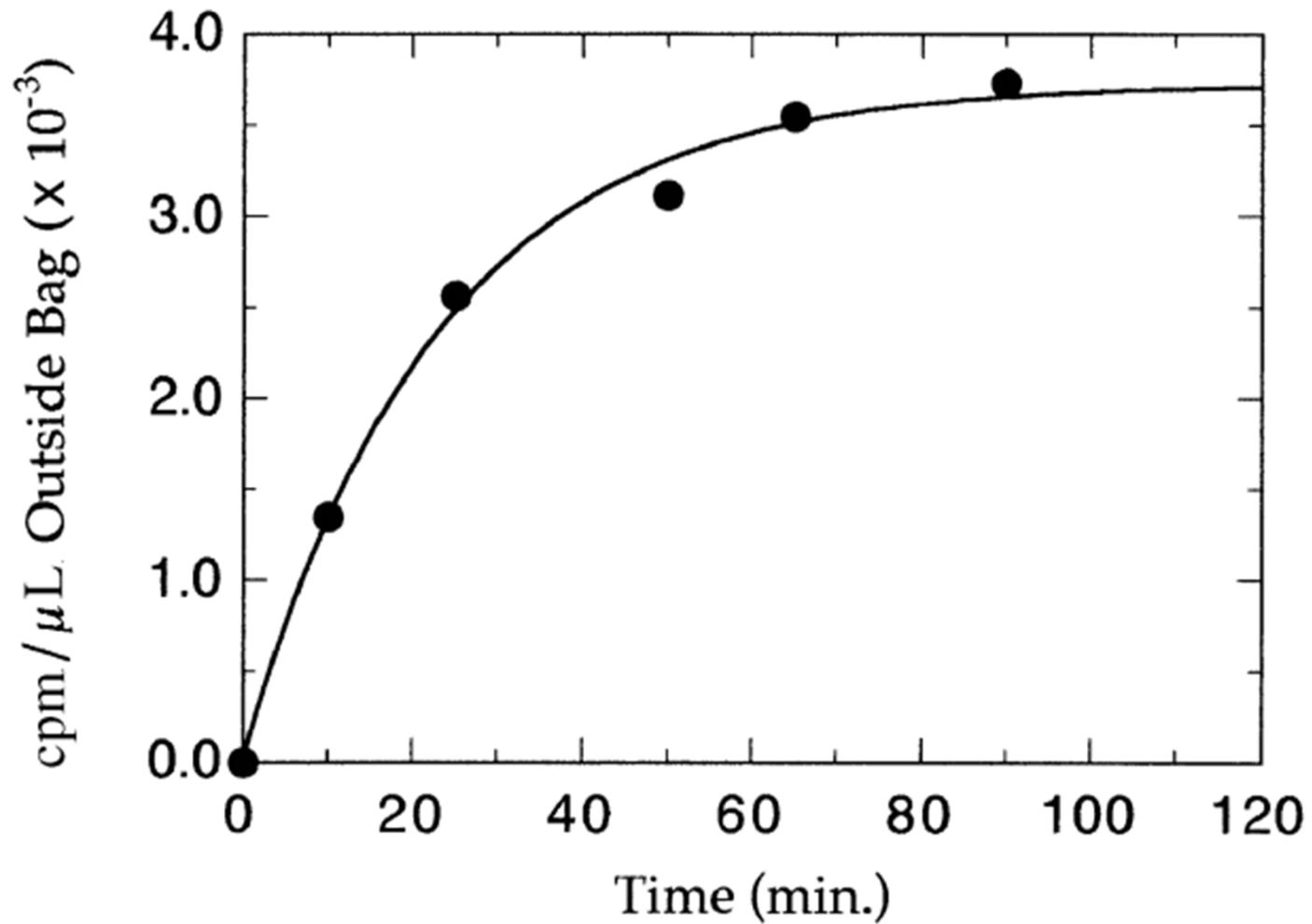
## Diálise de equilíbrio



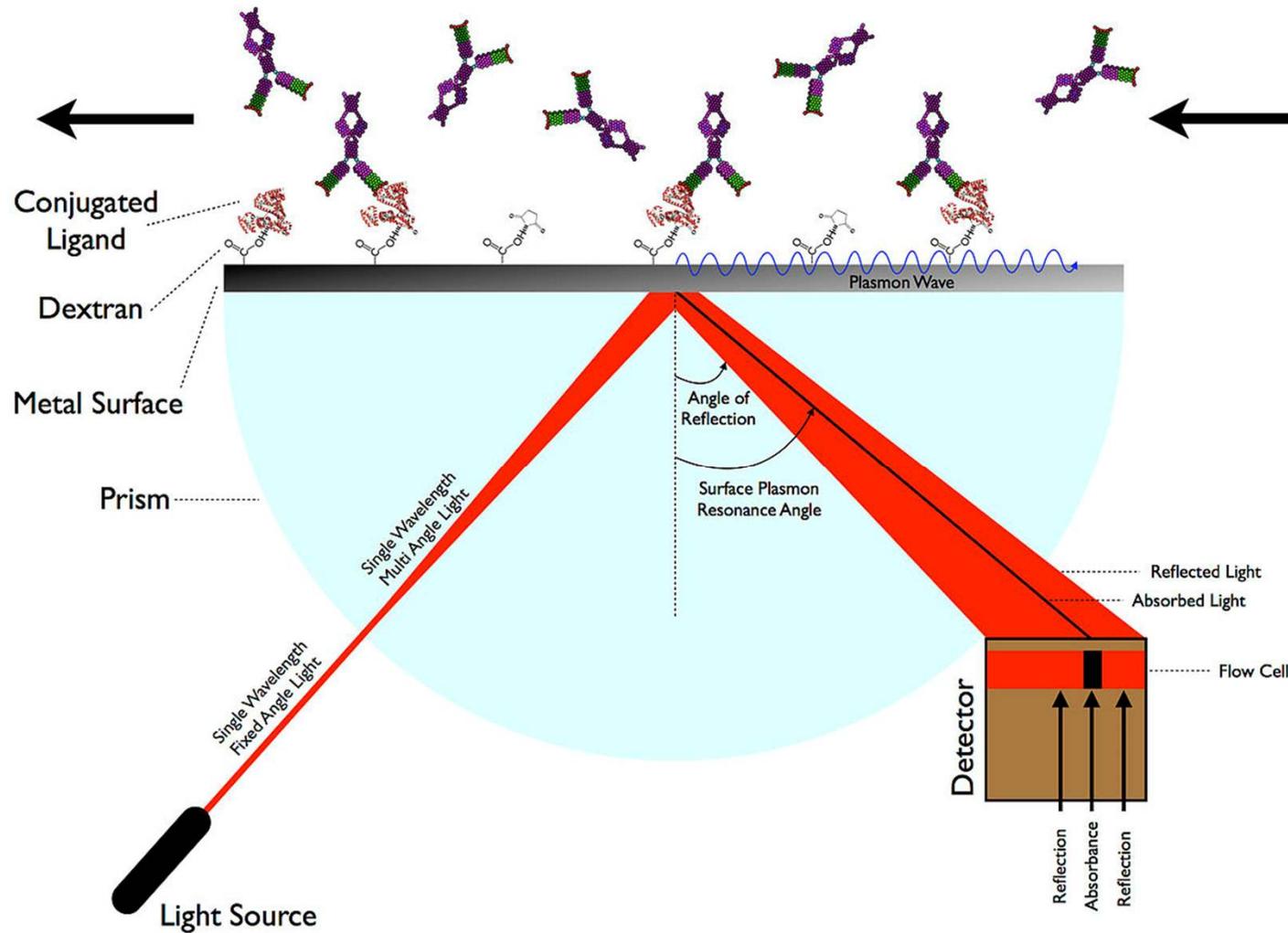
$$K_d = \frac{[L]_{eq} [R]_{eq}}{[RL]_{eq}}$$

Neste método é muito importante ter a certeza que o equilíbrio foi atingido antes de fazer a determinação de [L] nos dois compartimentos.

Marcha para o equilíbrio numa experiência de diálise

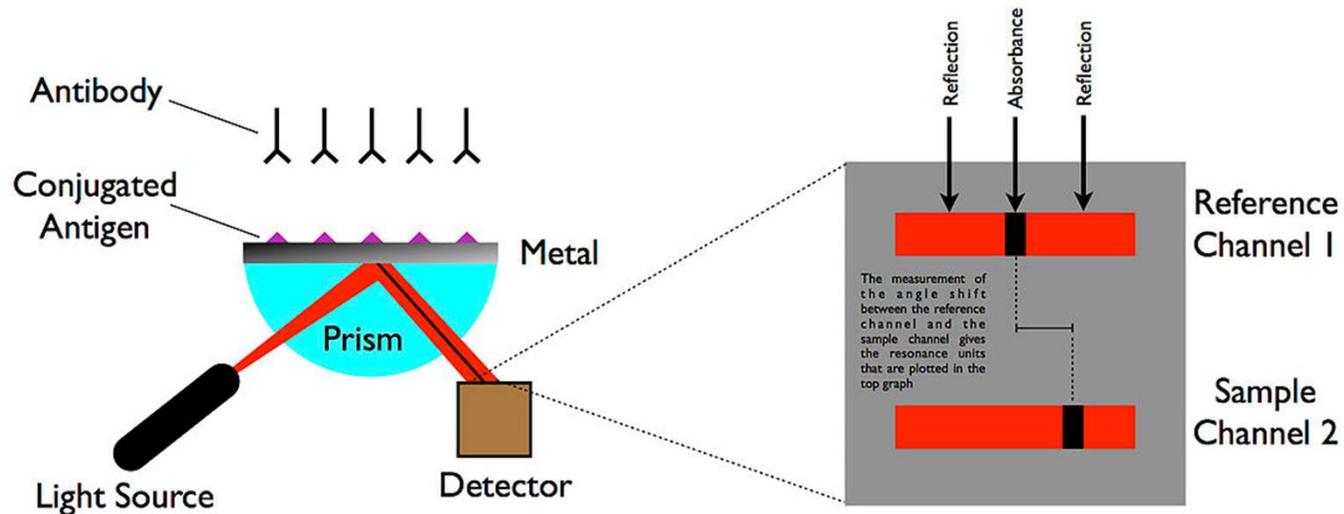
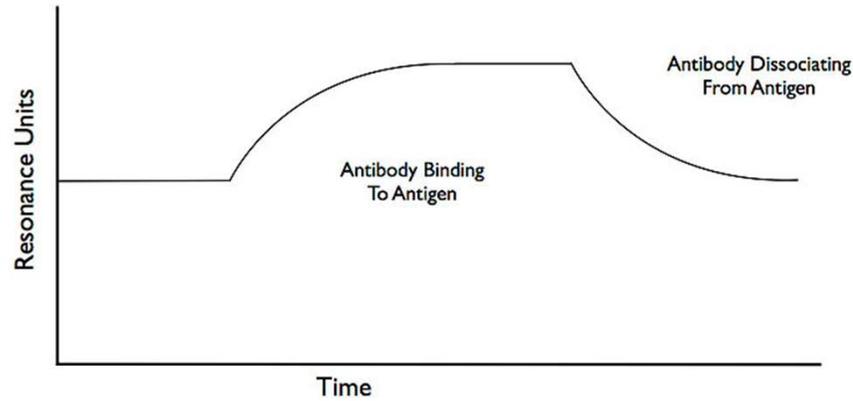


# Surface plasmon resonance (SPR)



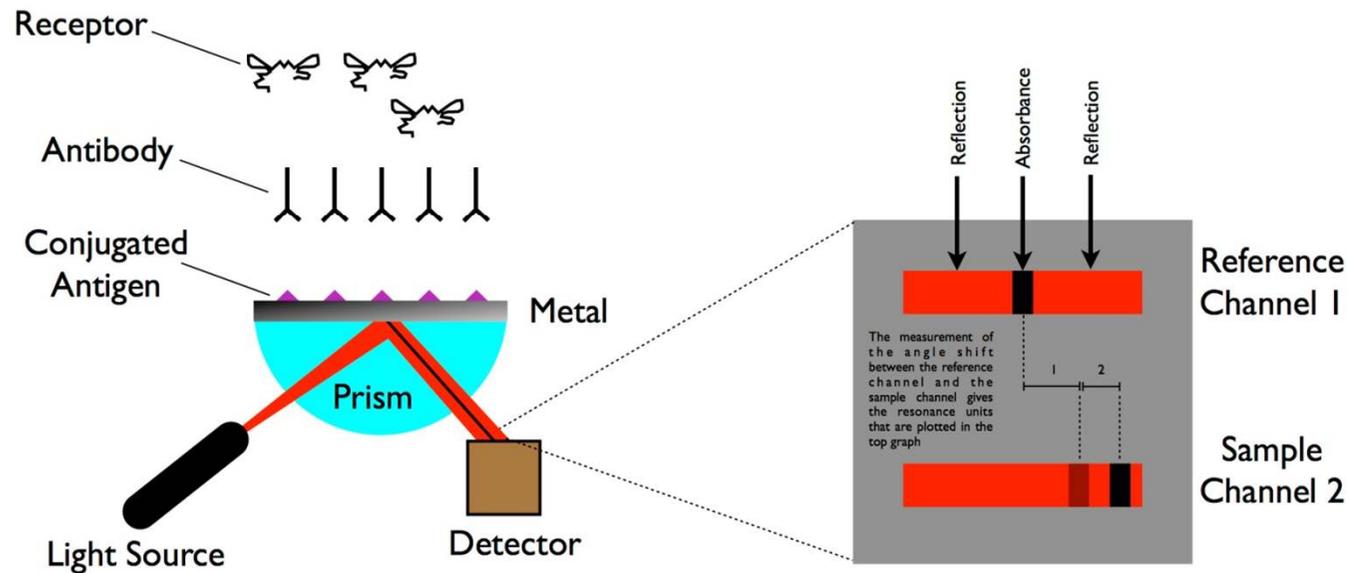
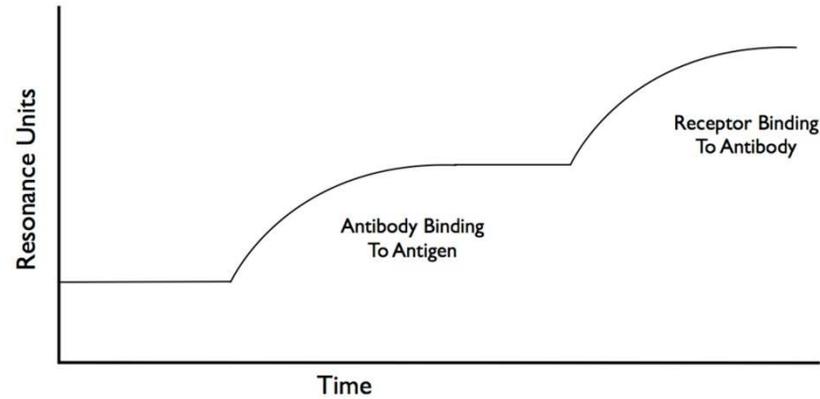
# Surface plasmon resonance (SPR)

Graph of Reference  
Channel 2-1

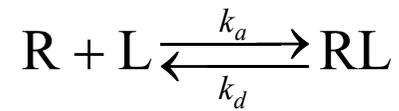


# Surface plasmon resonance (SPR)

Graph of Reference Channel 2-1



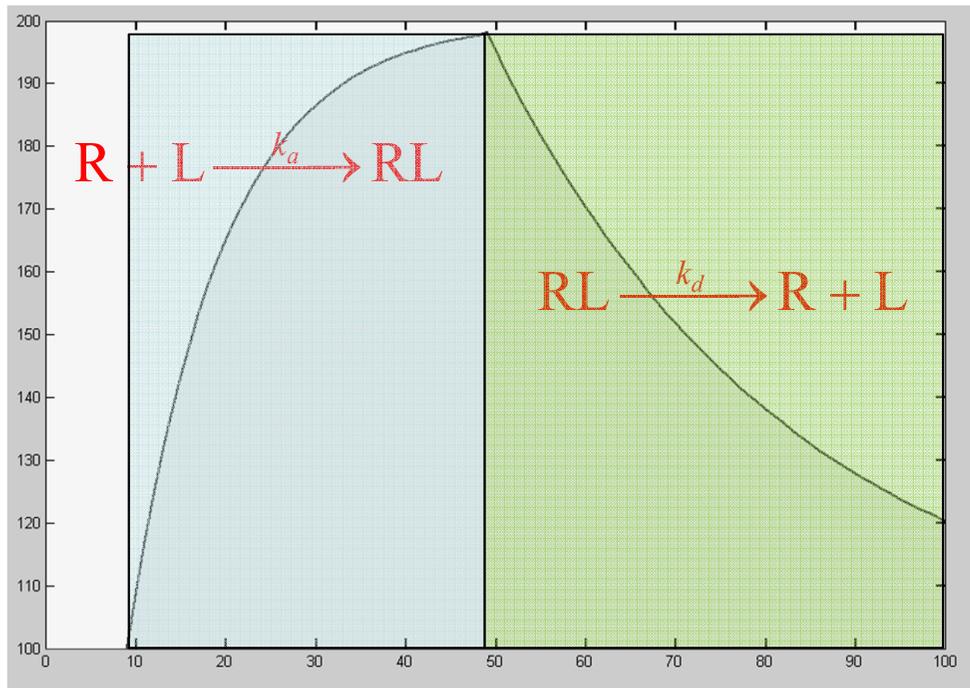
# Determinação de $K_d$ por SPR



$k_a(k_1)$  - 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

