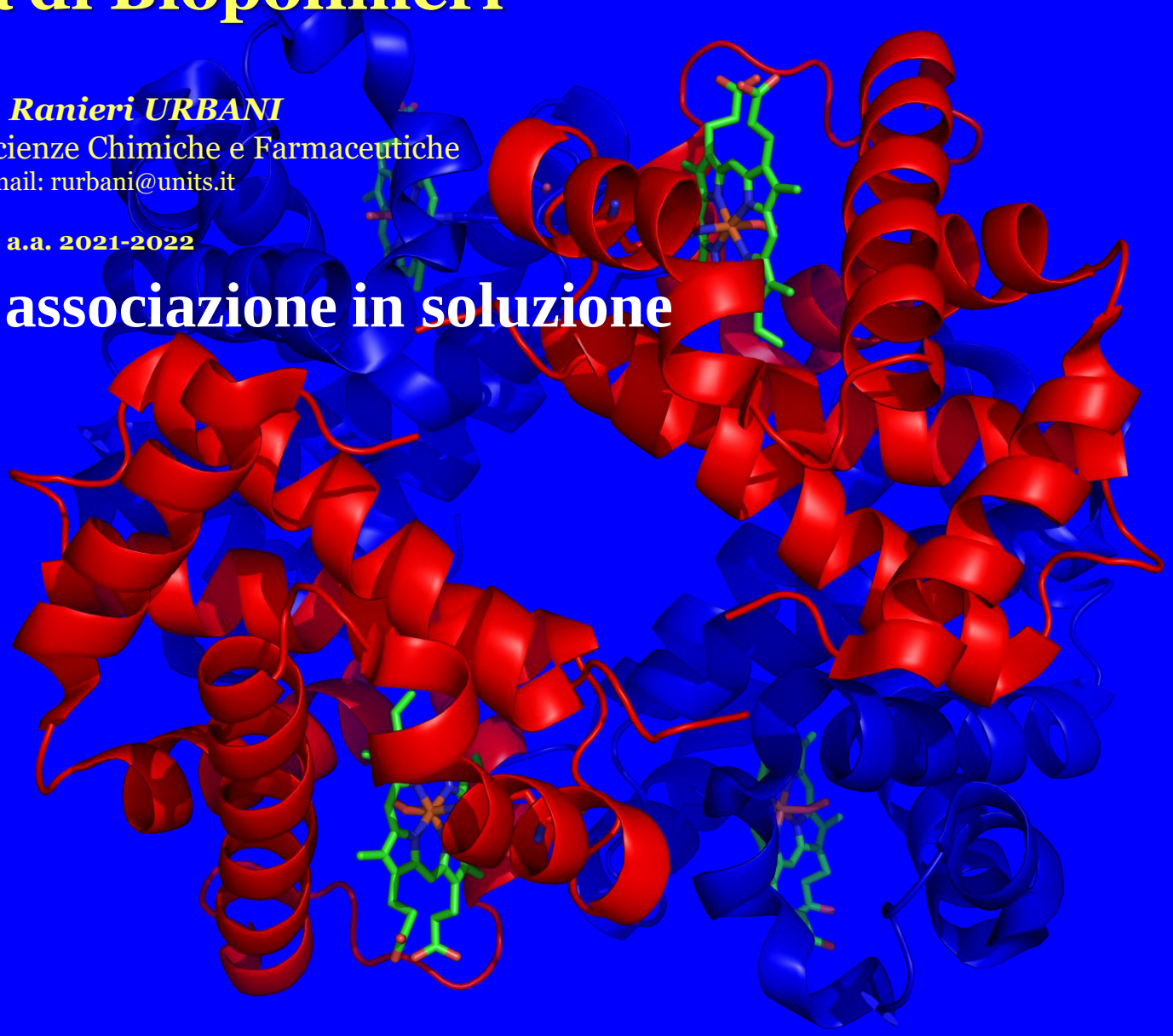
Corso di
Proprietà di Biopolimeri

Prof. Ranieri URBANI
Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche
e-mail: rurbani@units.it

a.a. 2021-2022

Modelli di associazione in soluzione



L’interazione macromolecola-ligando gioca un ruolo fondamentale nelle attività biologiche di enzimi, proteine strutturali ad acidi nucleici.

Una maggior parte delle funzioni biologiche di molti biopolimeri riguarda il binding di piccole molecole e ioni sui biopolimeri.

Esempi

- Enzimi che legano i substrati
- Proteine trasportatori come l’emoglobina che legano l’ossigeno
- Farmaci che legano specifici recettori
- ....

Per questo motivo è di fondamentale importanza comprendere i meccanismi di tali interazioni che sono alla base della biochimica a livello molecolare.

Le domande alle quali rispondere sono le seguenti:

- Qual è il massimo numero di moli di ligando per moli di biopolimero che può legarsi al substrato? In altre parole, qual è il numero ***n*** di siti della macromolecola disponibile?

- Qual è la costante di equilibrio (e altri parametri termodinamici) del binding?

- E' la costante di equilibrio indipendente dall'occupazione degli altri siti della macromolecola?

- E' la costante di equilibrio di un certo ligando influenzata dalla presenza (competizione) di un altro ligando per lo stesso biopolimero?

Quali sono le evidenze sperimentali di un'associazione ligando-biopolimero?

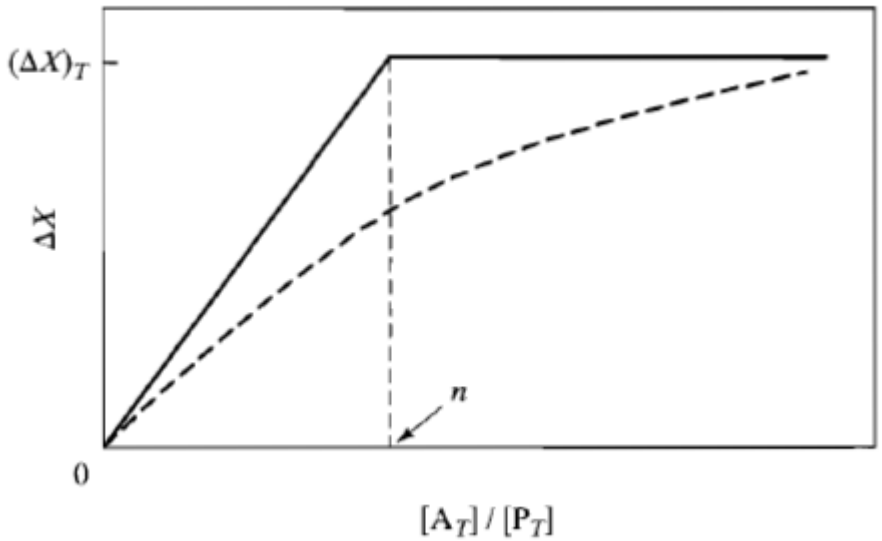
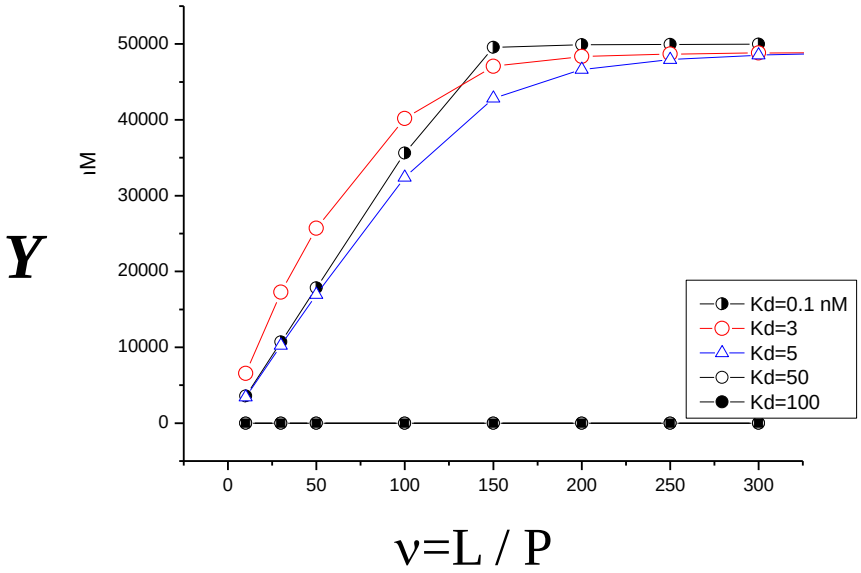


Figure 14.5 The change in some measurable parameter X graphed against *total* ligand concentration for very strong binding (solid line) and weaker binding (dashed curve). In the strong binding case, a clear break point will be observed at saturation.



Vediamo alcuni modelli per il *binding*

Modello di Langmuir

1) ciascun **sito** di legame può legare **una sola molecola di legante**;

2) i siti sono **identici**;

3) **i siti sono indipendenti**, quindi non interagiscono tra loro e hanno tutti la stessa energia di interazione con il legante, indipendentemente da quante molecole di legante si siano già legate sul polimero.

P = macromolecola con ***n*** siti di legame identici e indistinguibili

L = legante (ioni, piccole molecole,..)

A *P*= 1 atm, *T* = costante, vi sono ***n*** equilibri, a cui sono associate ***n*** costanti di equilibrio:

$$P + L \rightleftarrows PL \qquad K_1 = \frac{[PL]}{[P][L]}$$

$$PL + L \rightleftarrows PL_2 \qquad K_2 = \frac{[PL_2]}{[PL][L]}$$

$$PL_2 + L \rightleftarrows PL_3$$

$$\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots$$

$$PL_i + L \rightleftarrows PL_{i+1} \qquad K_i = \frac{[PL_i]}{[PL_{i-1}][L]}$$

$$PL_{n-1} + L \rightleftarrows PL_n \qquad K_n = \frac{[PL_n]}{[PL_{n-1}][L]}$$

L'equilibrio sarà in definitiva:

$$\boldsymbol{P + nL \rightleftarrows PL_n}$$

con una costante totale:

$$K^n{}_{tot} = \frac{[PL_n]}{[P][L]^n} = \frac{[PL]}{[P][L]} \cdot \frac{[PL_2]}{[PL][L]} \cdots \frac{[PL_n]}{[PL_{n-1}][L]} = \prod_{i=1}^{n} K_i$$

Generalmente le concentrazioni delle singole specie ***PL, PL$_2$, PL$_3$***,… non sono sperimentalmente determinabili, mentre è possibile determinare la concentrazione totale delle specie del polimero legato ***PL$_n$*** , del polimero non associato **[*P*]** e molecole di legante libero **[*L*]**.

Definiamo:

ν = moli di ligando legato per mole di macromolecola

= numero medio di siti occupati

$$\nu = \frac{[\,siti\ occupati\,]}{[\,conc.\,totale\ polimero\,]}$$

Partiamo dal caso più semplice di una macromolecola *P* con **1 solo** sito di legame

L = legante (ioni, piccole molecole,..)

$$\boldsymbol{P + L \rightleftarrows PL}$$

$$K_{eq} = K_a = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{1}{K_d}$$

$[\boldsymbol{L}]$=concentrazione del ligando libero=$[\boldsymbol{L}]_t$-$[\boldsymbol{L}]_b$

con $[\boldsymbol{L}]_t$ =$[\boldsymbol{L}]$+$[\boldsymbol{PL}]$

La determinazione della costante di binding, $\boldsymbol{K_a}$, richiede la valutazione della concentrazione $[\boldsymbol{PL}]$ in funzione della concentrazione $[\boldsymbol{L}]$.

A tal scopo si definisce **la saturazione frazionaria (ν)** di ***P*** da parte del ligando ***L*** come la frazione siti occupati dal legante:

$$\boldsymbol{\nu = \frac{[PL]}{[P]+[PL]}}$$

Sostituendo [PL] dall'equazione dell'equilibrio:

$$\nu = \frac{[PL]}{[P]+[PL]} = \frac{[P][L]K_a}{([P]+[P][L]K_a)} = \frac{[L]K_a}{(1+[L]K_a)}$$

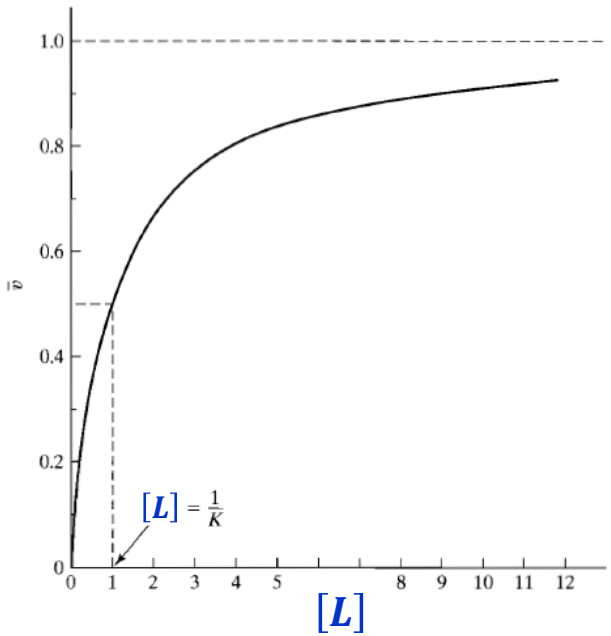


Figure 14.6 The curve describing binding of a ligand to a single site on a macromolecule. At the point where $\bar{\nu} = 0.5$, $[A] = 1/K$.

con ν=0.5

$$\frac{[L]K_a}{(1+[L]K_a)} = 1/2$$

$$[L] = \frac{1}{K_a}$$

Se gli ***n*** siti sono tutti identici e indistinguibili e consideriamo gli eventi di *binding* indipendenti tra di loro, possiamo prendere in considerazione l'equilibrio generico:

sito libero + L ⇄ sito occupato

$$K = \frac{[\,siti\ occupati\,]}{[\,siti\ liberi\,][\ \mathbf{L}\ ]}$$

$$[\,siti\ occupati\,] = \sum_{i=1}^{n} i[\,PX_i\,] = C_b$$

$$[\,siti\ liberi\,] = n[\,P\,]_{tot} - \sum_{i=1}^{n} i[\,PX_i\,] = n[\,P\,]_{tot} - C_b$$

$$[\,legante\,libero\,] = C_f$$

$$K = \frac{C_b}{\left(n[P]_{tot} - C_b\right)C_f}$$ **Equazione di Langmuir**

$$\boldsymbol{\nu} = \frac{C_b}{[P]_{tot}}$$

$$\lim_{C_f \to 0} K = \frac{C_b}{n[P]_{tot} \cdot C_f} = \frac{\boldsymbol{\nu}}{nC_f}$$

$$\lim_{C_f \to \infty} \boldsymbol{\nu} \cong \frac{n[P]_{tot}}{[P]_{tot}} = n$$

Equazione di Langmuir

$$K = \frac{C_b}{\left(n[P]_{tot} - C_b\right)C_f}$$

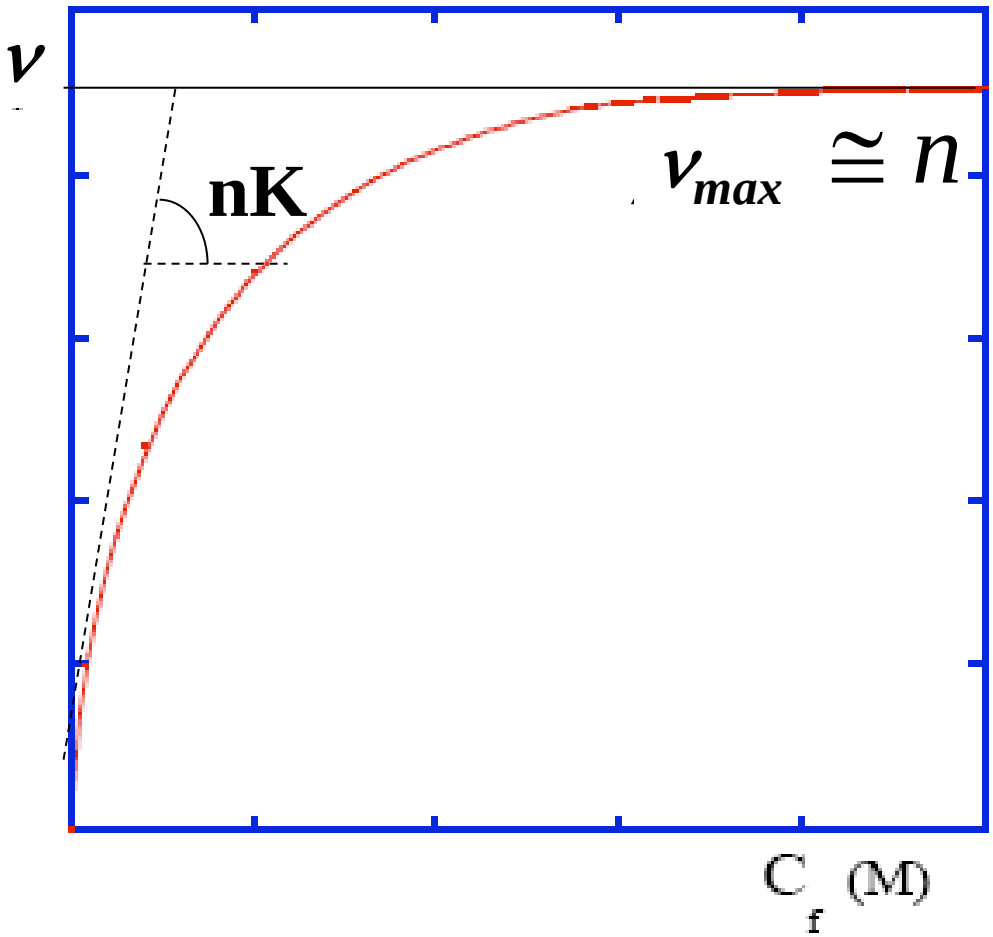
Moltiplicando e dividendo per $[P]_{tot}$ a destra:

$$K = \frac{C_b / [P]_{tot}}{\dfrac{\left(n[P]_{tot} - C_b\right)}{[P]_{tot}} C_f} = \frac{\nu}{\left(n - \nu\right)C_f}$$

Da cui si ottiene:

$$\nu = \frac{nKC_f}{1 + KC_f}$$

Equazione di Langmuir



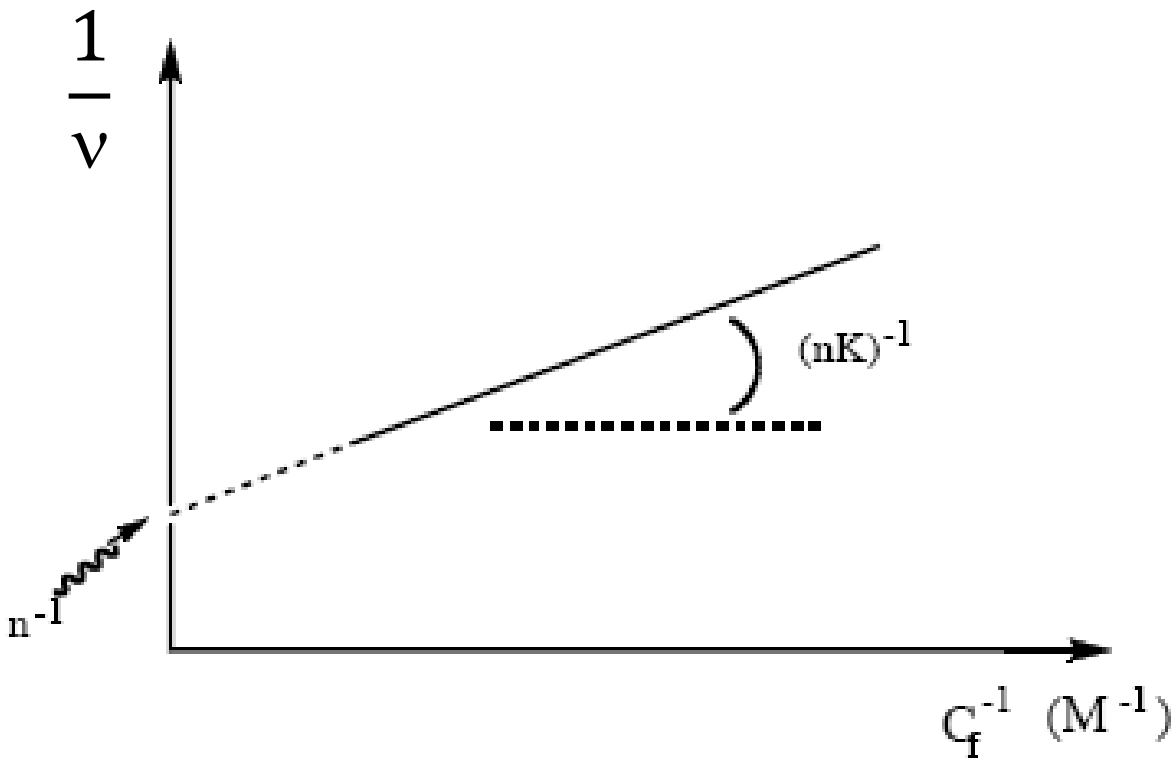
$$\lim_{C_f \to \infty} \nu = \nu_{max} = n$$

$$\lim_{C_f \to 0} \nu = nKC_f$$

Plot di Scatchard

$$\nu = \frac{nKC_f}{1+KC_f}$$

$$\frac{1}{\nu} = \frac{1}{n} + \frac{1}{nKC_f}$$

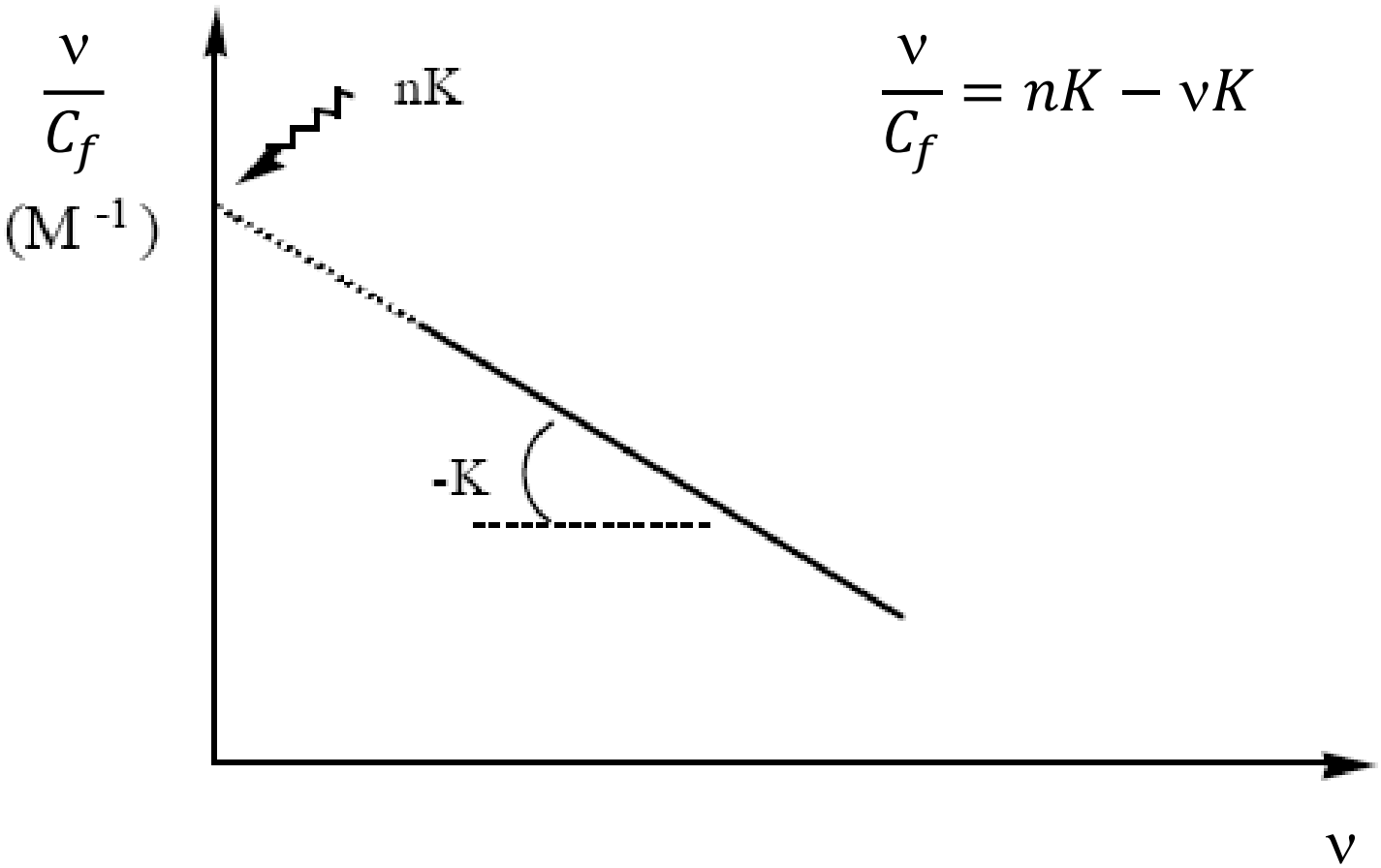


Alternativamente:

$$\boldsymbol{\nu} = \frac{nKC_f}{1 + KC_f}$$

$$\nu + \nu K C_f = n K C_f$$

$$\frac{\nu}{C_f} = nK - \nu K$$



SITI INDIPENDENTI ED IDENTICI

Calcolo del numero delle specie microscopiche

Consideriamo una macromolecola ***M*** che contiene ***n*** siti per il ligando ***L***.

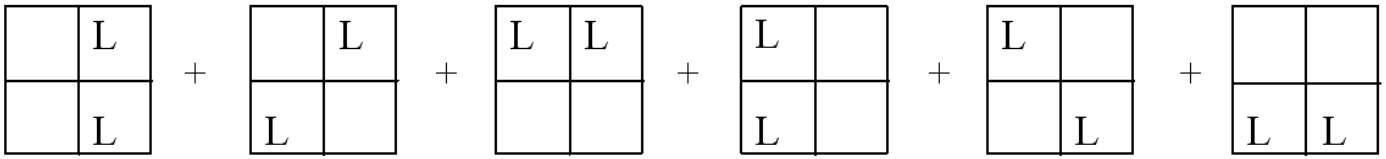
Ciascun sito ha la stessa **costante di dissociazione microscopica**, ***k***.

I siti sono indipendenti.

Gli equilibri coinvolti sono:

$$M_o + L \leftrightarrow M_1$$
$$M_1 + L \leftrightarrow M_2$$
$$\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots$$
$$M_{n-1} + L \leftrightarrow M_n$$

P. es., se **n=4** e se rappresentiamo schematicamente la macromolecola con un quadrato con quattro siti:

$M_2 =$ 

In generale, ci sono $\Omega_{n,i}$ modi diversi di mettere ***i* ligandi su *n* siti**, dove:

$$\Omega_{n,i} = \frac{n!}{(n-i)!\,i!}$$

L'indice di M_i denota il numero totale di molecole ***L*** legate.
Quindi M_i è l'insieme di specie microscopiche che hanno ***i*** molecole ***L*** legate.

ν = moli di **ligando legato** per mole di macromolecola:
= frazione di legante legato

$$\nu = \frac{\sum_{i=0}^{n} i[M_i]}{\sum_{i=0}^{n} [M_i]}$$

$$[M_1] + 2[M_2] + 3[M_3] + \ldots = \sum_{i=0}^{n} i[M_i]$$ siti occupati

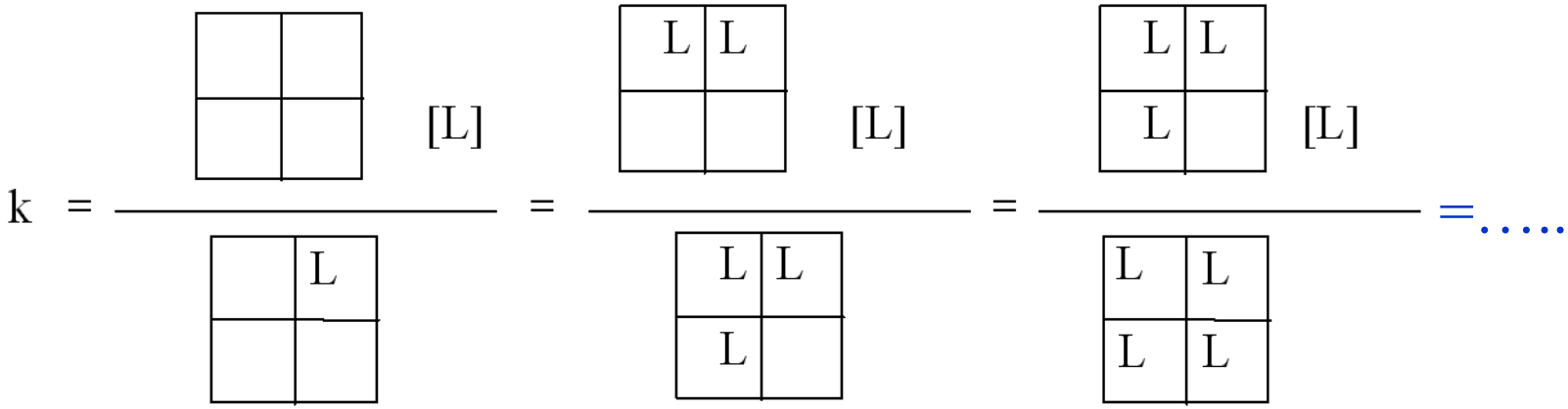
$$K_1 = \frac{[M_o][L]}{[M_1]} \quad \ldots \quad K_i = \frac{[M_{i-1}][L]}{[M_i]} \quad \ldots \quad K_n = \frac{[M_{n-1}][L]}{[M_n]}$$

K_i sono le costanti macroscopiche di dissociazione

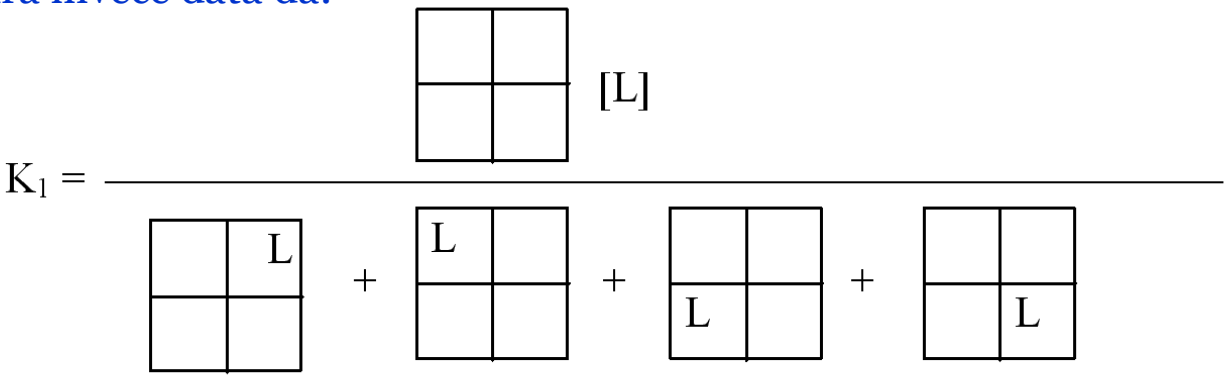
$$[M_i] = \frac{[M_{i-1}][L]}{K_i} = \frac{[M_0][L]^i}{\prod_{j=1}^{i} K_j}$$

N.B. La costante di dissociazione ***k*** si riferisce all'equilibrio di una particolare specie *microscopica* mentre la costante *macroscopica* $\boldsymbol{K_i}$ coinvolge l'intero insieme di specie che sono rappresentate da $\boldsymbol{M_i}$ ed $\boldsymbol{M_{i-1}}$

Esempio: ***n=4***



K_1 sarà invece data da:



La relazione tra K_i e k è governata dal fattore statistico $\Omega_{n,i}$:

Se consideriamo il seguente equilibrio:

$$M_{i-1} + L \rightleftarrows M_i$$

Ci sono $\Omega_{n-1,i}$ *microspecie* che determinano M_{i-1} ed $\Omega_{n,i}$ per M_i. Allora la costante **microscopica** di dissociazione è:

$$k = \frac{([M_{i-1}]/\Omega_{n,i-1})[L]}{([M_i]/\Omega_{n,i})}$$

essendo K_i:

$$K_i = \frac{[M_{i-1}][L]}{[M_i]}$$

allora:

$$\boxed{K_i = (\Omega_{n,i-1}/\Omega_{n,i})\, k}$$

La relazione tra $\boldsymbol{K_i}$ e $\boldsymbol{k}$ è proporzionale ai fattori statistici $\boldsymbol{\Omega_{n,i}}$

$$K_i = \frac{\Omega_{n,i-1}}{\Omega_{n,i}} k$$

quindi

$$[M_i] = \frac{[M_{i-1}][L]}{K_i} = [M_{i-1}] \frac{n-i+1}{i} \frac{[L]}{k}$$

Usando espressioni simili per $[\boldsymbol{M_{i-1}}]$, $[\boldsymbol{M_{i-2}}]$ etc., si ottiene:

$$[M_i] = [M_o] \left(\prod_{j=1}^{i} \frac{n-j+1}{j} \right) \left(\frac{[L]}{k} \right)^i$$

dalla definizione di ν

$$\nu = \frac{\sum_{i=0}^{n} i[M_i]}{\sum_{i=0}^{n} [M_i]} \qquad \nu = \frac{\sum_{i=1}^{n} i\left(\prod_{j=1}^{i} \frac{n-j+1}{j}\right)\left(\frac{[L]}{k}\right)^i}{1+\sum_{i=1}^{n}\left(\prod_{j=1}^{i} \frac{n-j+1}{j}\right)\left(\frac{[L]}{k}\right)^i}$$

Il termine in produttoria è identico a $\Omega_{n,i}$:

$$\prod_{j=1}^{i} \frac{n-j+1}{j} = \frac{n!}{(n-i)!\,i!}$$

nell'espressione precedente

$$\nu = \frac{\sum_{i=1}^{n} i \frac{n!}{(n-i)!\,i!}\left(\frac{[L]}{k}\right)^{i}}{1+\sum_{i=1}^{n} \frac{n!}{(n-i)!\,i!}\left(\frac{[L]}{k}\right)^{i}}$$

Il denominatore è semplicemente l'espansione della potenza di un binomio:

$$\left(1+\frac{[L]}{k}\right)^{n} = 1+\sum_{i=1}^{n} \frac{n!}{(n-i)!\,i!}\left(\frac{[L]}{k}\right)^{i}$$

differenziando l'espressione precedente rispetto ad $[L]/k$ e poi moltiplicando ancora per $[L]/k$ si ottiene:

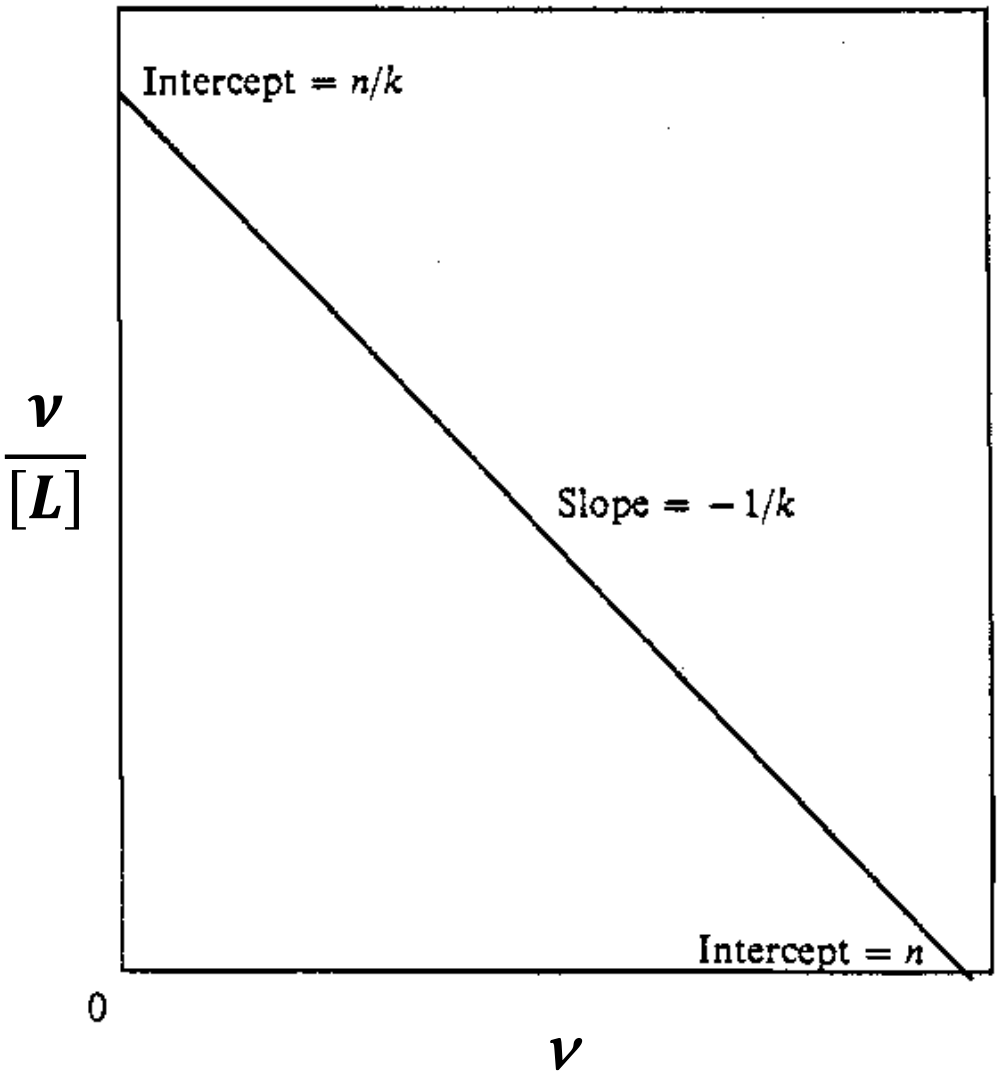
$$\frac{[L]}{k}\frac{d\left(1+\frac{[L]}{k}\right)^n}{d\frac{[L]}{k}} = n\frac{[L]}{k}\left(1+\frac{[L]}{k}\right)^{n-1} = \sum_{i=1}^{n} i\frac{n!}{(n-i)!\,i!}\left(\frac{[L]}{k}\right)^i$$

sostituendo le due precedenti espressioni nella definizione di ν:

$$\nu = \frac{n\frac{[L]}{k}}{1+\frac{[L]}{k}}$$

$$\boxed{\frac{\nu}{[L]} = \frac{n}{k} - \frac{\nu}{k}}$$

Scatchard plot



$$\frac{\nu}{[L]} = \frac{n}{k} - \frac{\nu}{k}$$

GRAFICI DI SCATCHARD CURVI

In molti casi un grafico di Scatchard può essere curvo piuttosto che lineare.

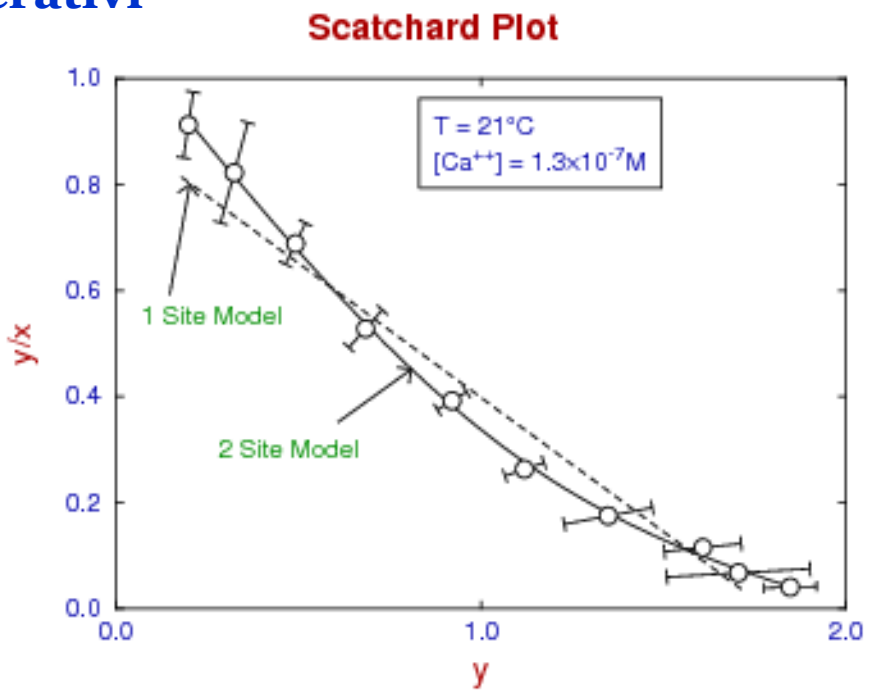
Questo succede in due casi classici:

1 - Classi multiple di siti indipendenti

2 - Interazioni tra siti di legame, in particolare

a - Legami cooperativi

b - Legami anti-cooperativi



Nel caso di **due** diversi siti di legame indipendenti, ***n_1 e n_2***:

n_1 siti con cost microscopica k_1
n_2 siti con cost microscopica k_2
.....

$$\nu = \nu_1 + \nu_2 + \cdots . = \sum \frac{n_i K_i C_f}{1 + K_i C_f}$$

$$\nu_1 = \frac{n_1 K_1 C_f}{1 + K_1 C_f} \qquad \nu_2 = \frac{n_2 K_2 C_f}{1 + K_2 C_f}$$

$$\frac{\nu}{C_f} = \frac{\nu_1}{C_f} + \frac{\nu_2}{C_f} = \frac{n_1 K_1}{1 + K_1 C_f} + \frac{n_2 K_2}{1 + K_2 C_f} =$$

$$= \frac{n_1 K_1 + n_2 K_2 + (n_1 + n_2) K_1 K_2 C_f}{1 + K_1 C_f + K_2 C_f + K_1 K_2 C_f^2}$$

$$\frac{\nu}{C_f} + (K_1 + K_2)\,\nu + K_1 K_2 C_f\,\nu = n_1 K_1 + n_2 K_2 + (n_1 + n_2) K_1 K_2 C_f$$

$$\frac{\nu}{C_f} = n_1K_1 + n_2K_2 + (n_1 + n_2)K_1K_2\,C_f - (K_1 + K_2 + K_1\,K_2\,C_f)\;\nu$$

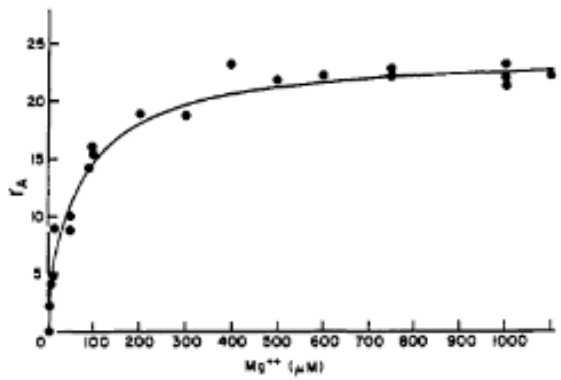
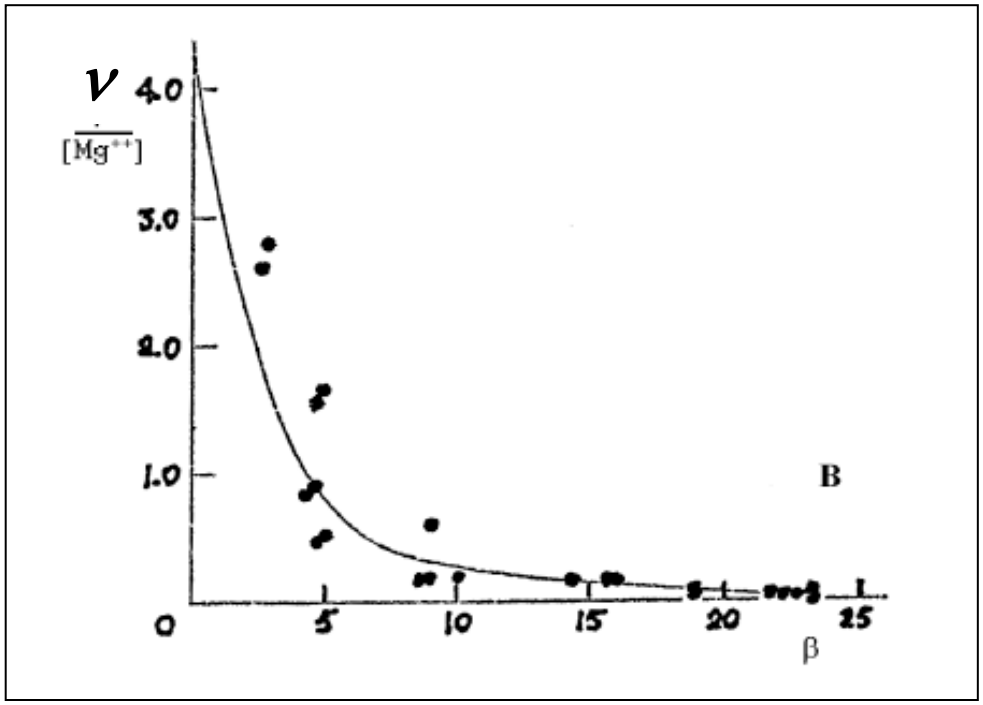


FIGURE 2: Binding of Mg^{2+} to RNA^{Phe} as a function of Mg^{2+} concentration at 25°, pH 7.2, mM Na-phosphate buffer, 5 mM NaCl. Solid line calculated assuming $N_{1A} = 4$, $N_{2A} = 20$, $K_{1A} = 10^6\ M^{-1}$, and $K_{2A} = 1.1 \times 10^6\ M^{-1}$. See text for details.

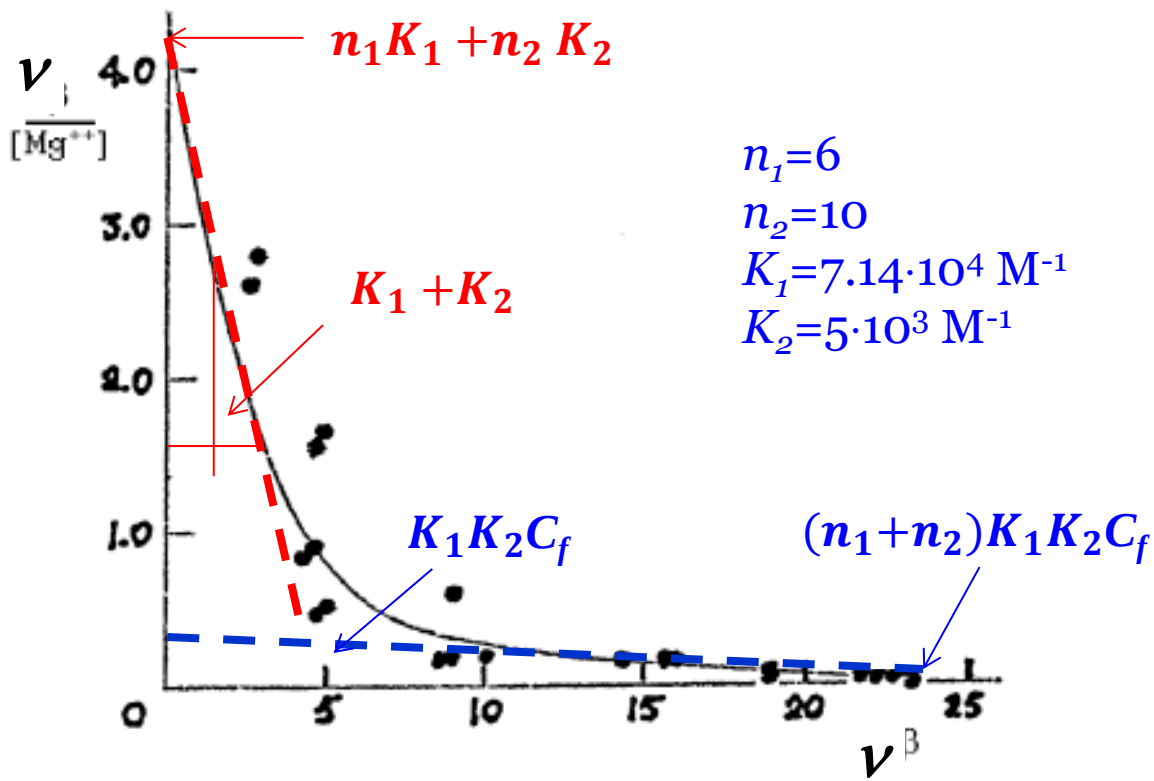
ESEMPIO:

Isoterma di associazione (25°C, pH=7.2) di ioni Mg^{2+} con t-RNA.



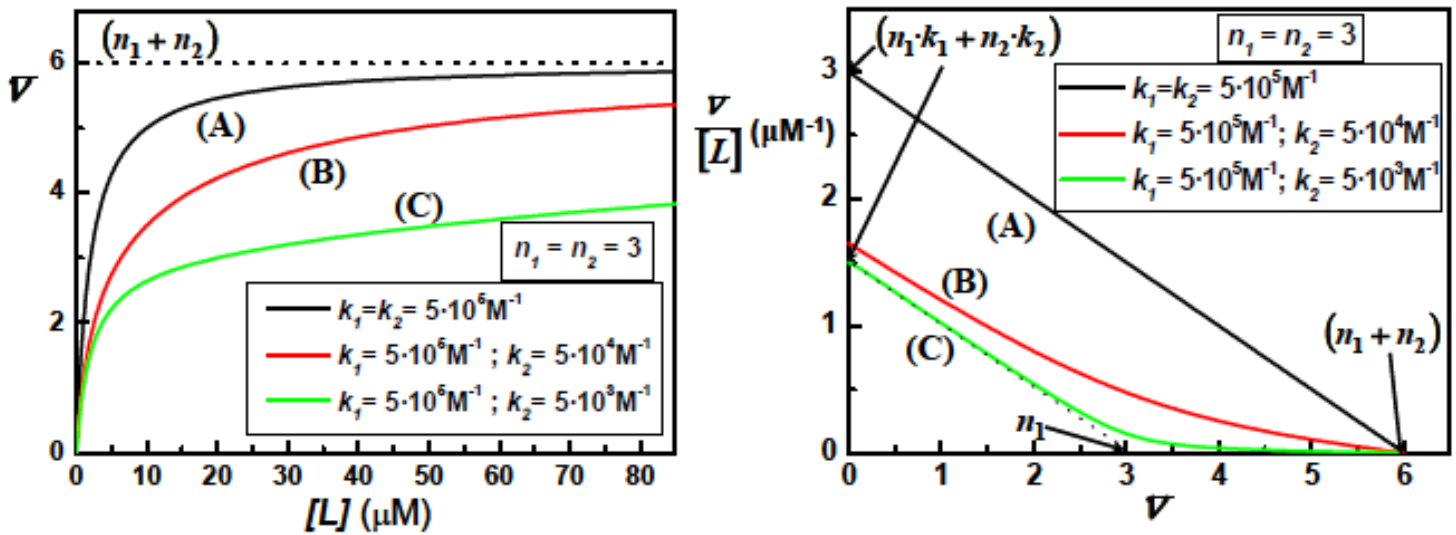
$$\lim_{C_f \to 0} \frac{\nu}{C_f} = n_1 K_1 + n_2 K_2 - (K_1 + K_2)\,\nu$$

$$\lim_{C_f \to \infty} \frac{\nu}{C_f} = 0 = (n_1 + n_2) K_1 K_2 C_f - K_1 K_2 C_f\,\nu$$



ν

Figure 3. Binding to independent sites



Simulation examples for the binding equilibrium of a ligand to a macromolecule with one or two different classes of sites, to show the differences in the binding curves (left panel) and in the Scatchard representation (right panel). Curve A corresponds to the ligand binding to six equivalent and independent sites, with a microscopic constant of $5 \cdot 10^5$ M^{-1}. Curves B and C correspond to the binding to two different kinds of sites, each class with 3 sites: for curve B the ratio between microscopic constants of the two binding site classes is $k_1 = 10k_2$; for curve C the ratio is $k_1 = 100k_2$.

INTERAZIONI TRA SITI

E' possibile che il legame di un ligando alteri l'affinità della macromolecola per il successivo ligando e così via producendo una variazione continua del valore delle costanti di dissociazione microscopiche.

Nel caso più semplice di una sola classe **di siti identici e dipendenti** possiamo definire $\boldsymbol{k_o}$ la costante di dissociazione microscopica per $\boldsymbol{\nu = o}$. Quando $\boldsymbol{\nu}$ aumenta, l'interazione tra i siti fa variare il valore di $\boldsymbol{k}$.

Se $\Delta G°$ è la variazione di energia libera standard per la dissociazione di un ligando legato:

$$\Delta G° = \Delta G_o° + RT\phi(\nu)$$

dove $\Delta G_o° = - RTln k_o$ e $\phi(\nu)$ è una funzione che, per definizione, prende in considerazione gli effetti delle interazioni tra siti che variano col grado di saturazione.

Allora:

$$ln\, k(\nu) = ln\, k_o(\nu = 0) - \phi(\nu)$$

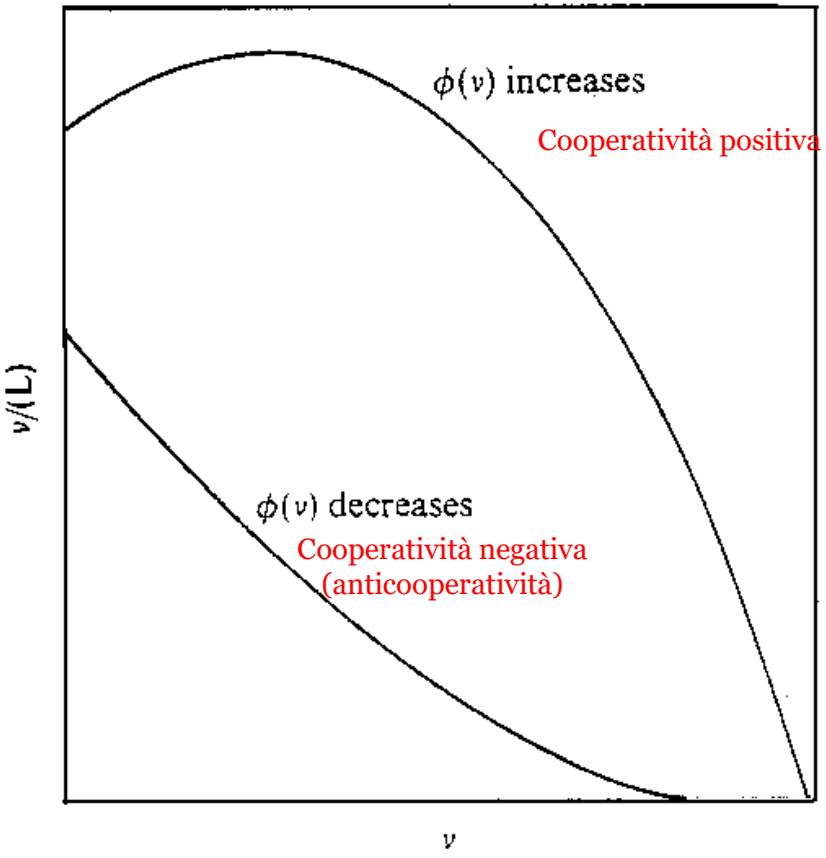
$$k(\nu) = k_o e^{-\phi(\nu)}$$

dove $\phi(\nu) = o$ per $\nu = o$

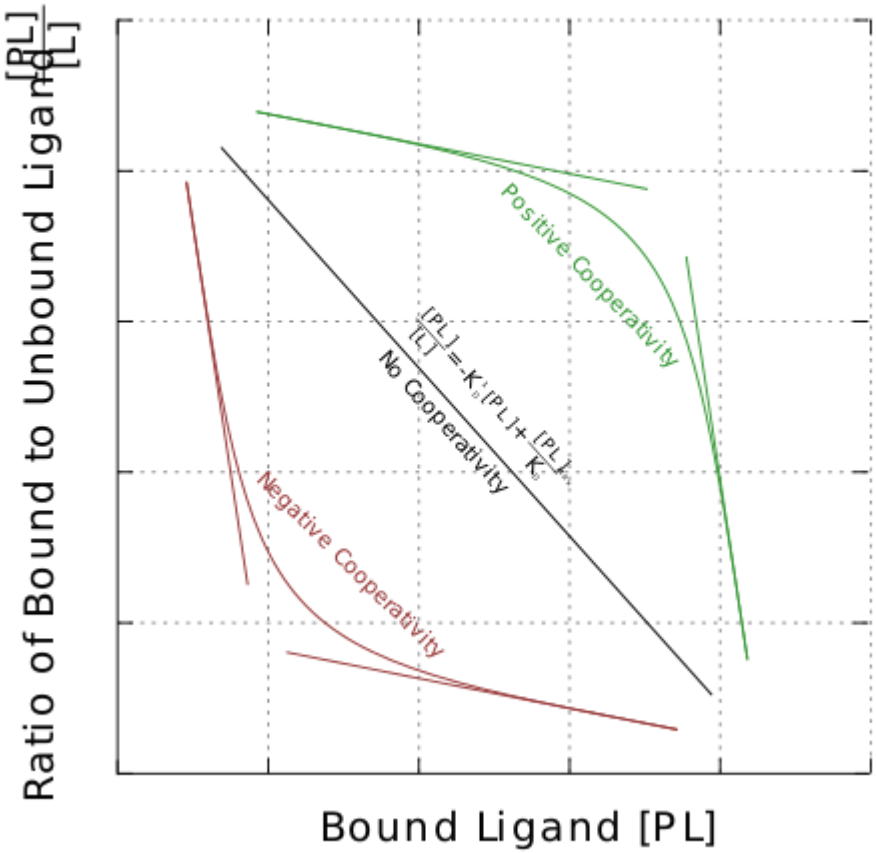
Possiamo allora usare le equazioni di Scatchard con ***k*** sostituito da ***k(ν).***

Se ***ϕ(ν)*** è una funzione decrescente di ***ν*** allora ***k(ν)*** cresce con la saturazione: in questo caso il grafico di Scatchard sarà curvo con la concavità verso l'alto (anticooperatività).

D'altra parte se ***ϕ(ν)*** aumenta all'aumentare di ***ν*** allora il grafico di Scatchard avrà un massimo con la concavità verso il basso.
Man mano che il binding procede, i ligandi successivi sono maggiormente legati (minore la ***k*** di dissociazione) situazione che corrisponde ad una interazione cooperativa (positiva) tra i siti all'aumentare di ***ν***



Scatchard Plot



EFFETTI STATISTICI ED ENERGIA DI INTERAZIONE

Consideriamo una macromolecola che lega 4 ligandi ***L***: se tutti i siti sono identici ed indipendenti e legano ***L*** con una costante *microscopica* ***k***, allora attraverso il trattamento statistico visto precedentemente è possibile conoscere le quattro costanti *macroscopiche*:

$$K_1 = \frac{1}{4}k \qquad K_2 = \frac{2}{3}k \qquad K_3 = \frac{3}{2}k \qquad K_4 = 4k$$

Dove $K_1<K_2<K_3<K_4$ ed il processo, dal punto di vista delle costanti macroscopiche, sembra essere *sempre più debole al crescere della saturazione anche se la costante microscopica è sempre la stessa*: dal punto di vista delle costanti macroscopiche gli effetti statistici descrivono una **anticooperatività** di associazione.

In un sistema veramente **cooperativo**, una volta effettuata la correzione per gli effetti statistici, la costante di dissociazione di uno o più stadi successivi decresce al crescere della saturazione.
Nell'esempio della macromolecola con 4 siti questo vuol dire che, se c'è cooperatività tra il primo ed il secondo stadio, si ha:

$$4K_1 > \frac{3}{2}K_2$$

Se tutti gli stadi coinvolgono un legame via via più forte allora:

$$4K_1 > \frac{3}{2}K_2 > \frac{2}{3}K_3 > \frac{1}{4}K_4$$

Modello (semiempirico) di Hill

$$M_o + L \leftrightarrow M_1$$
$$M_1 + L \leftrightarrow M_2$$
$$\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots$$
$$M_{n-1} + L \leftrightarrow M_n$$

$$K = \frac{[ML_n]}{[M][L]^n}$$

uguale per ogni stadio

$$\nu = \frac{n[ML_n]}{[M] + [ML_n]} = \frac{n(K[L])^n}{1 + (K[L])^n}$$

Tenendo conto che le costanti di equilibrio non saranno, in generale, identiche, Hill propose l'equazione:

$$\nu = \frac{n(K[L])^{n_H}}{1 + (K[L])^{n_H}}$$

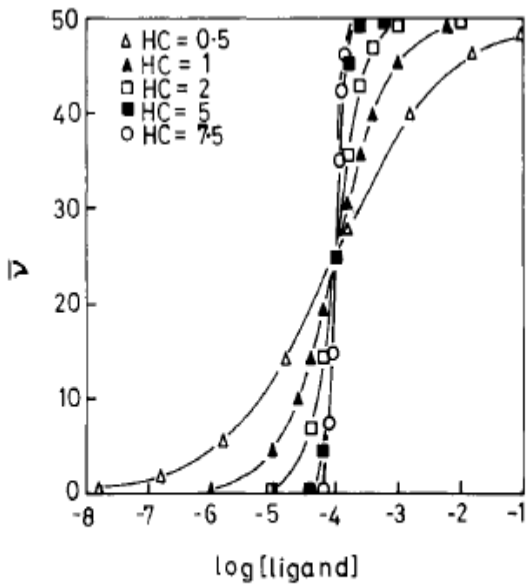
$$\nu = \frac{n(K[L])^{n_H}}{1 + (K[L])^{n_H}}$$

Dove $\boldsymbol{n^H}$ (costante di Hill) è il coefficiente di cooperatività e $\boldsymbol{K}$ è la costante di binding.

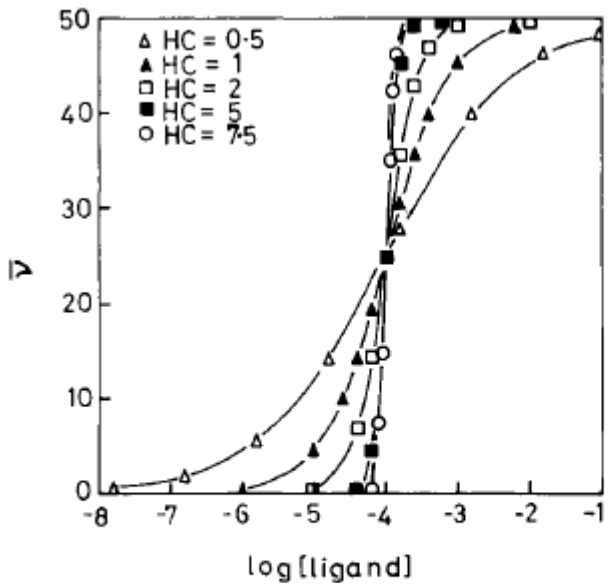
Per $\boldsymbol{n^H<1}$ il binding è **anticooperativo** (cooperatività negativa), ossia il legame di un ligando sfavorisce il binding di quello successivo.

Per $\boldsymbol{n^H>1}$ è **cooperativo**, ossia il legame di un ligando favorisce il binding di quello successivo.

Per $\boldsymbol{n^H=1}$ si rientra nelle condizioni binding di siti identici ed indipendenti come previsto nell'equazione di Scatchard (**non cooperativo**) .



Binding isotherms ($\bar{\nu}$ versus log [ligand]) calculated from the Hill equation for a protein with 50 binding sites (intrinsic binding constant 10^4) for a range of Hill coefficients from 0.5 to 7.5



Gli Scatchard Plot delle curve sigmoidali sono molto diversi al variare di n^H e sono indicativi del grado di cooperatività del sistema.
La curvatura negativa (a) è caratteristica di cooperatività negativa ($n^H<1$) mentre quella positiva (b) di cooperatività positiva ($n^H>1$)

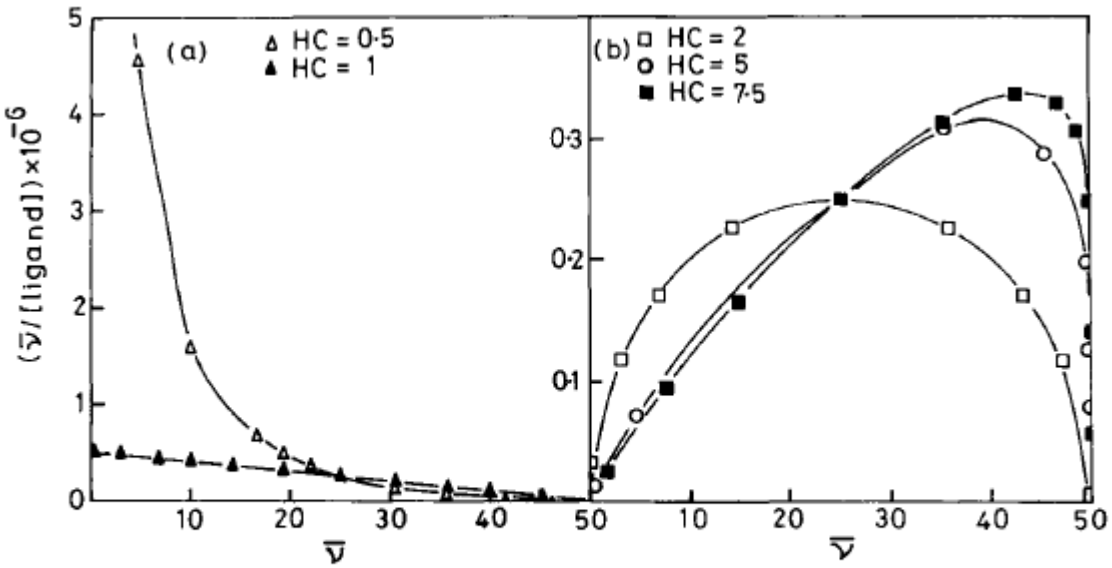


Figure 3 *Scatchard plots ($\bar{\nu}/[ligand]_{free}$ versus $\bar{\nu}$) for the isotherms of Figure 2 for a protein with 50 binding sites (intrinsic binding constant 10^4) for a range of Hill coefficients from 0.5 to 7.5*

Energetica dei processi di associazione

$$\Delta G_B^0 = -RT \ln K$$

1. Perdita dei gradi di libertà traslazionali e rotazionali

$$\Delta G_{tr,rot}^0 = -T\Delta S_{tr,rot}^0 > 0$$

Per un legante di P.M.=200 (T=25°C):

$$\Delta G_{tr,rot}^0 \approx 50 kJ \cdot mol^{-1}$$

2. *Restrizioni alle rotazioni interne*

$$\Delta G^0_{rot.int.} = -T\Delta S^0_{rot.int.} > 0$$

Per ogni grado di libertà interno perduto:

$$\Delta G^0_{rot.int.} \approx 5-6 kJ \cdot mol^{-1}$$

3. *Effetti idrofobici*

Per 1Å² di superficie sottratta al solvente:

$$\Delta G^0_{hydr} \approx 0.2 kJ \cdot mol^{-1}$$

4.Interazioni tra gruppi funzionali
(legame idrogeno, dipolo-dipolo, Van der Waals)

5. Interazioni elettrostatiche

6. Rilascio di molecole di solvente dalla sfera di idratazione

a T_{amb} considerando tutti i contributi, si ottiene :

$$\Delta H_B^0 \approx 0.5 - 3 kcal \cdot mol^{-1}$$

$$\Delta S_B^0 \approx 10 - 40 cal \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$$

I processi di associazione sono generalmente guidati dall'entropia.