

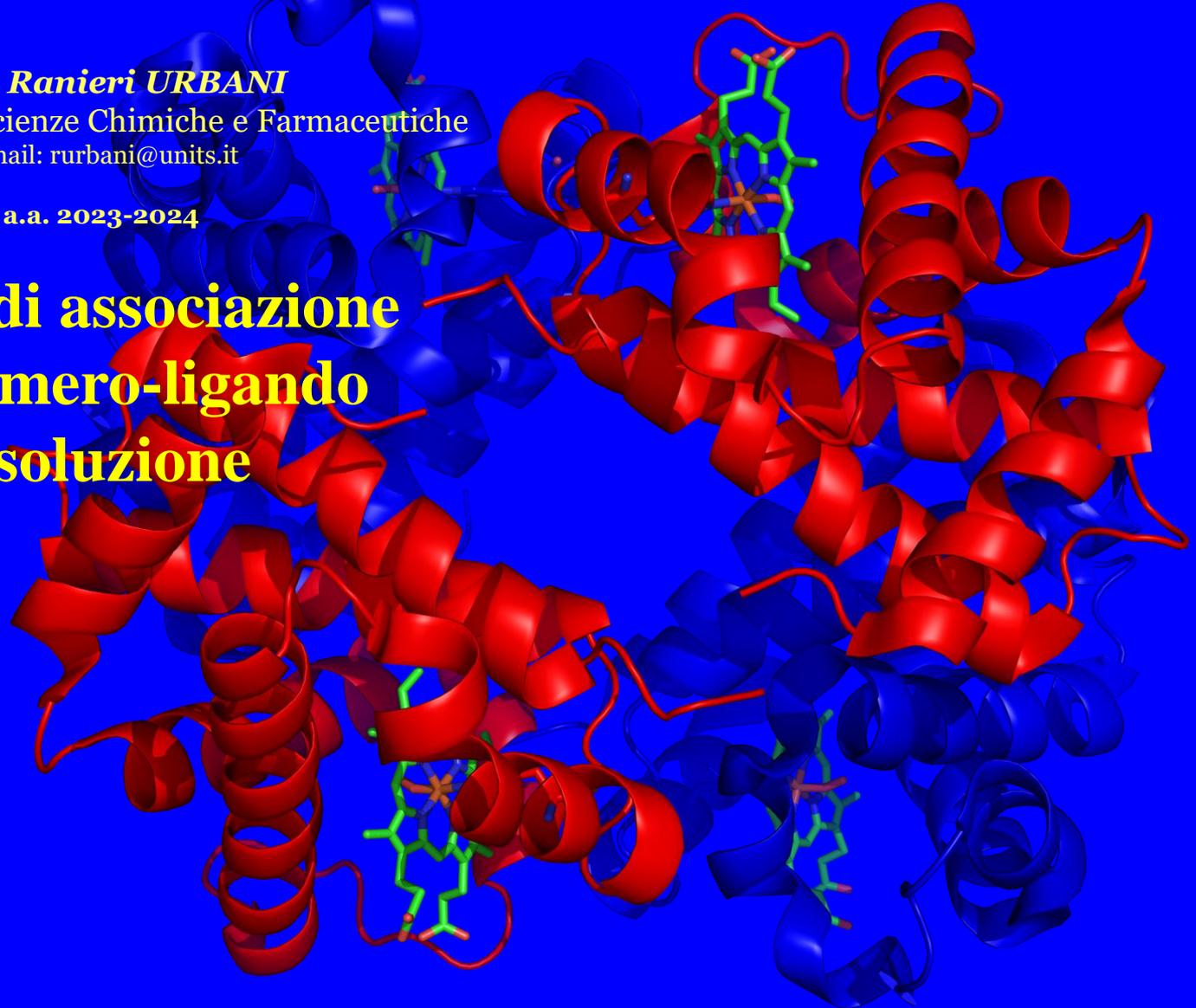
Corso di Proprietà di Biopolimeri

Prof. Ranieri URBANI

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

a.a. 2023-2024

**Modelli di associazione
biopolimero-ligando
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** del binding (e altri parametri termodinamici)?

- 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?

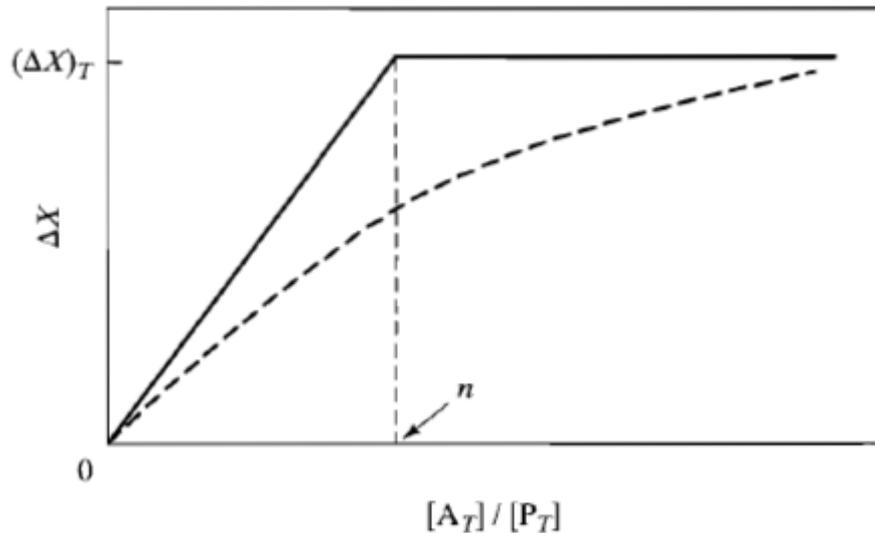
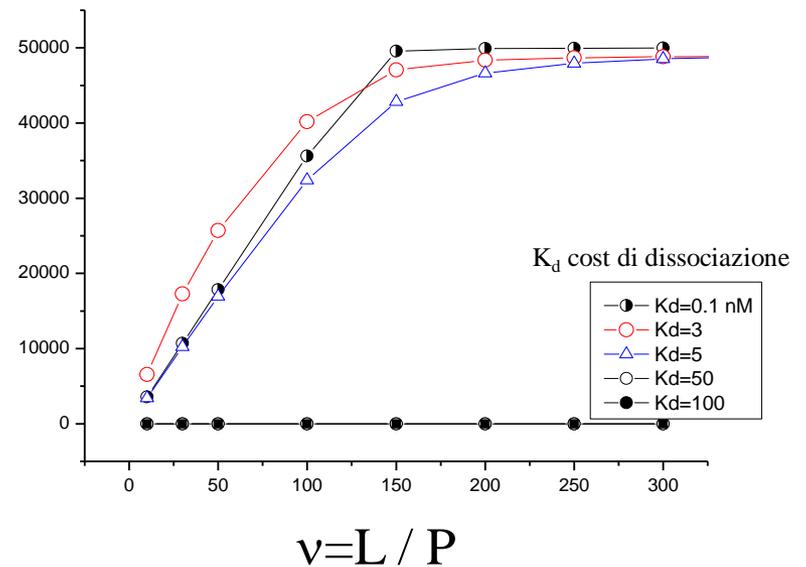


Figure 14.5 The change in some measurable parameter X graphed against *total* ligand concentration for very strong binding (solid line) and weaker binding (dashed curve). In the strong binding case, a clear break point will be observed at saturation.

Y



La cooperatività: un fenomeno sperimentale

La cooperatività può essere definita in modo univoco facendo riferimento a una procedura sperimentale.

La quantità da misurare in un esperimento di binding è la **saturazione frazionaria** del recettore all'equilibrio ($Y = \text{siti occupati} / \text{siti totali}$) per diversi valori di concentrazione di ligando libero $[L]$.

Diciamo che il binding di un ligando a una proteina **non è cooperativo** se, nelle particolari condizioni sperimentali, il grafico Y vs. L è una sezione di un'iperbole rettangolare Fig.1.

Pertanto, il fenomeno della cooperatività è sinonimo di deviazione dal comportamento iperbolico.

Per diagnosticare l'esistenza della cooperatività, sono stati adottati diversi modi per **linearizzare l'iperbole** .

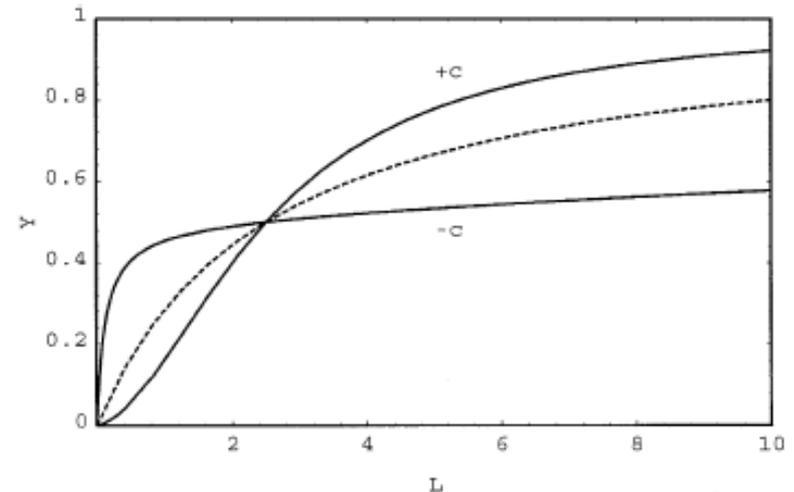


Fig. 1. Plot Y vs. L . Examples of hyperbolic curve (dashed line), positive cooperativity (+c) and negative cooperativity (-c).

Sono stati utilizzati diversi metodi per l'analisi grafica e computerizzata dei dati di legame.

Due dei metodi grafici più comunemente utilizzati sono il **diagramma di Scatchard** e il **diagramma di Hill**.

Il grafico di Hill, (**$\log [siti\ legati]/[siti\ liberi]$** vs. **$\log [ligando\ libero]$**)

È chiaro che un dato insieme di dati di binding contiene le stesse informazioni, indipendentemente dal particolare metodo utilizzato per interpretarli. Tuttavia, alcuni metodi grafici mostrano alcuni aspetti più chiaramente di altri.

È importante riconoscere che **la procedura di Hill richiede una conoscenza indipendente della concentrazione dei siti liberi**. Questa è solitamente ottenuta per differenza, conoscendo il numero totale di siti potenziali e quello dei siti legati dal ligando.

In questo senso è **meno potente** dello Scatchard, che non richiede la conoscenza del numero totale di siti, ma fornisce piuttosto un'estrapolazione del numero totale di siti.

Tuttavia, il coefficiente di Hill fornisce **una misura quantitativa molto utile per misurare l'entità delle interazioni cooperative** tra i siti potenziali.

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:



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



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



.....



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



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

L'equilibrio sarà in definitiva:



con una costante totale:

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

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**

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

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

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



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

$[L]$ = concentrazione del ligando libero = $[L]_t - [PL]_b$

con $[L]_t = [L] + [PL]$

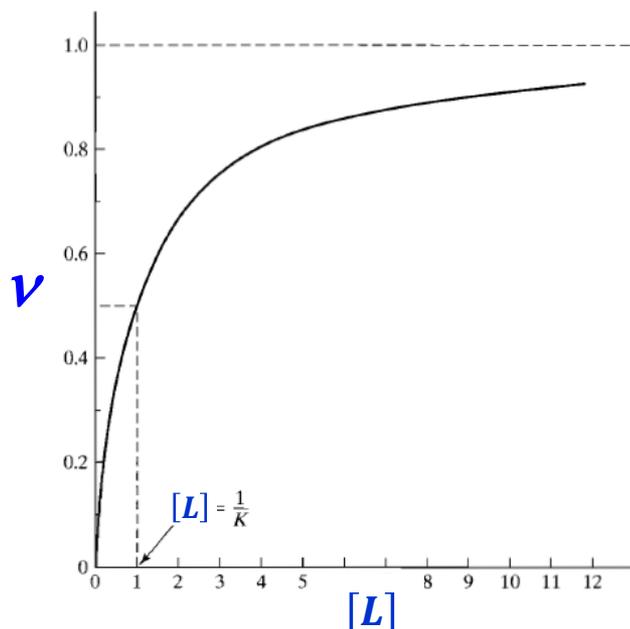
La determinazione della costante di binding, K_a , richiede la valutazione della concentrazione $[PL]$ in funzione della concentrazione $[L]$.

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

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

Sostituendo $[PL]$ dall'equazione dell'equilibrio:

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



con $\nu = 0.5$

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

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

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

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

sito libero + L \rightleftharpoons sito occupato

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

$$[\text{siti occupati}] = \sum_{i=1}^n i [P L_i] = C_b$$

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

$$[\text{legante libero}] = C_f = [L]$$

Equazione di Langmuir

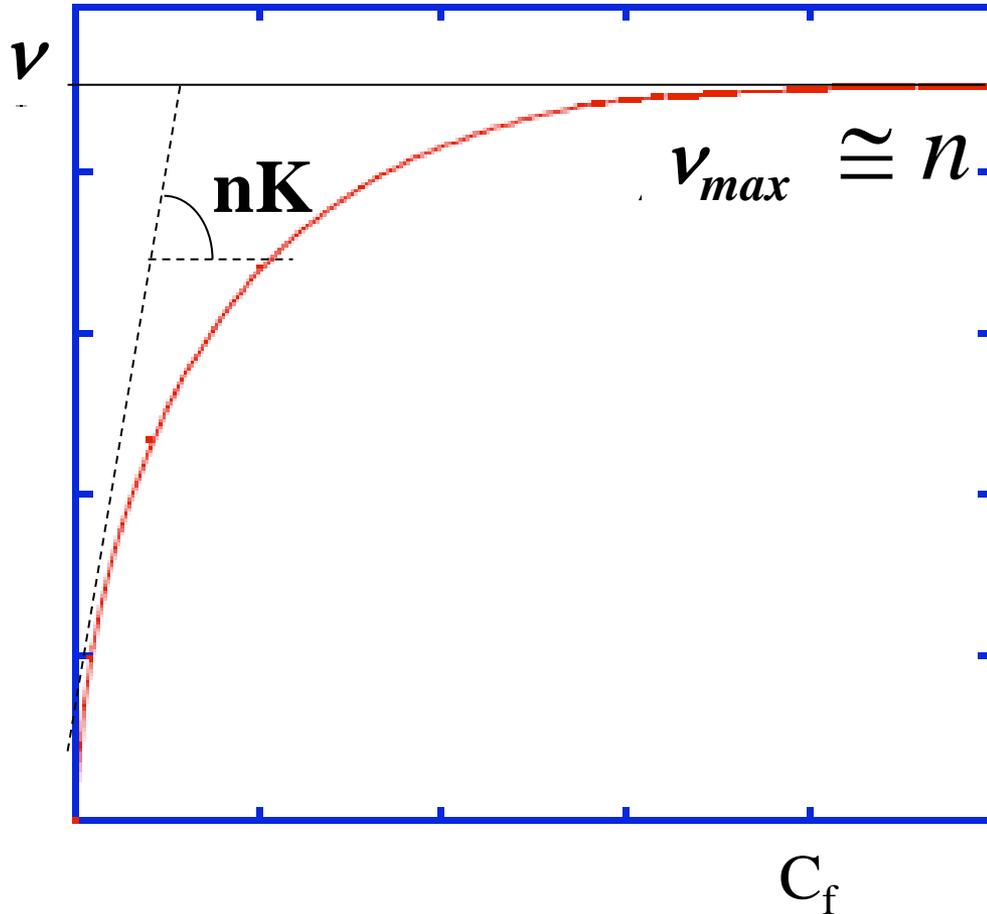
$$K = \frac{C_b}{(n[P]_{tot} - C_b)C_f}$$

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

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

Da cui si ottiene: $v = \frac{nKC_f}{1 + KC_f}$

Equazione di Langmuir



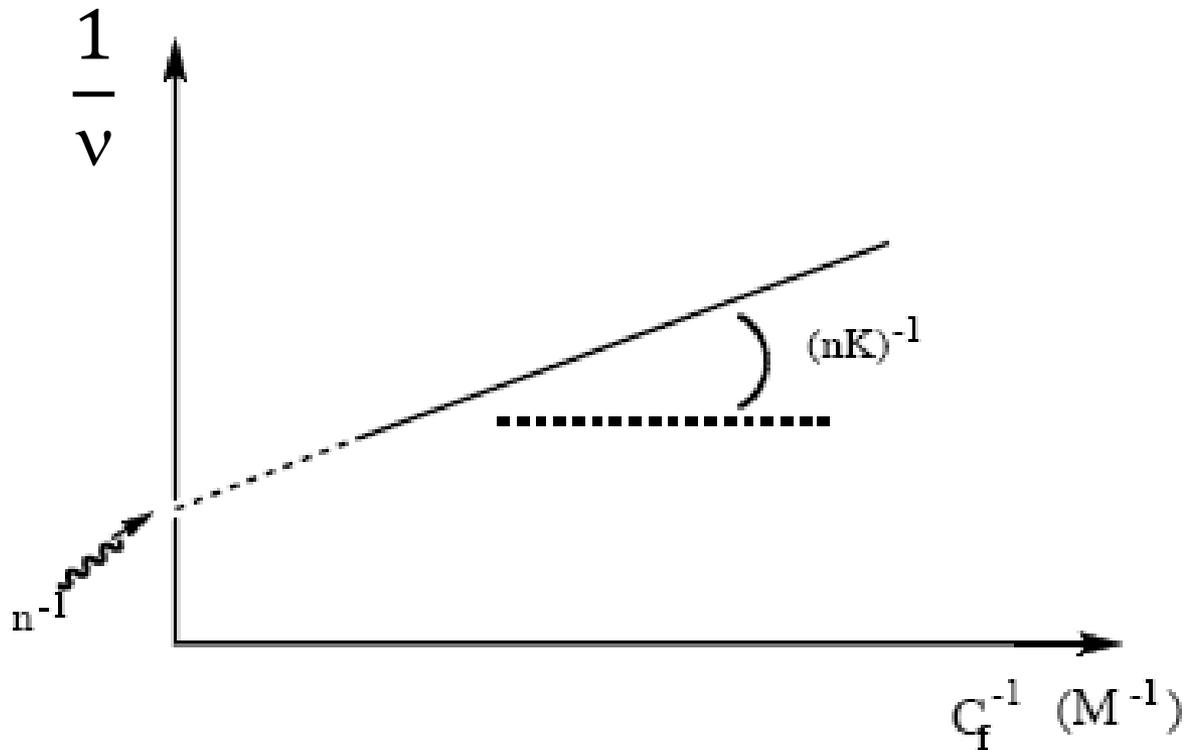
$$\lim_{C_f \rightarrow \infty} v = v_{max} = n$$

$$\lim_{C_f \rightarrow 0} v = nKC_f$$

Plot di Scatchard

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

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

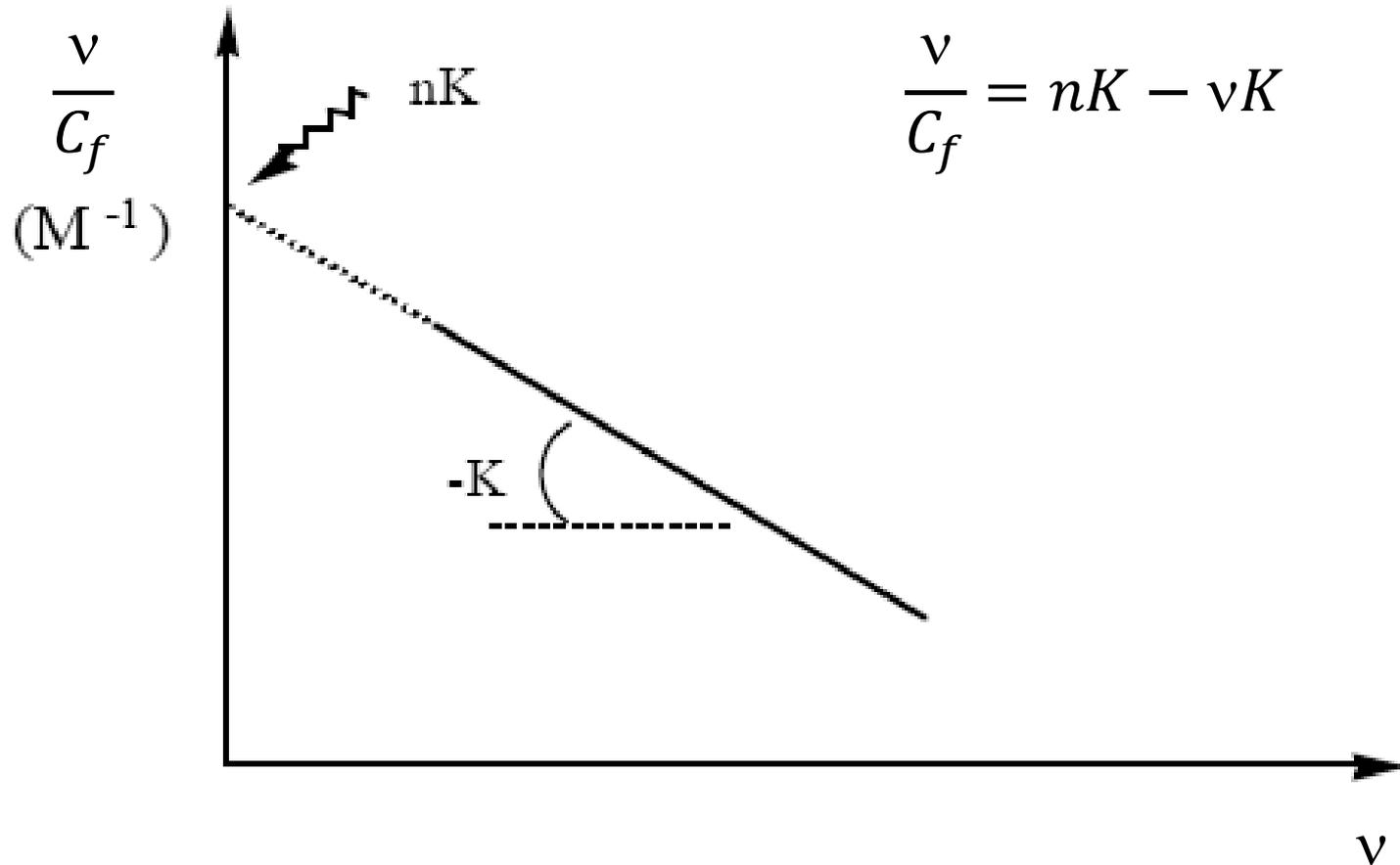


Alternativamente:

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

$$v + vKC_f = nKC_f$$

$$\frac{v}{C_f} = nK - vK$$



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.

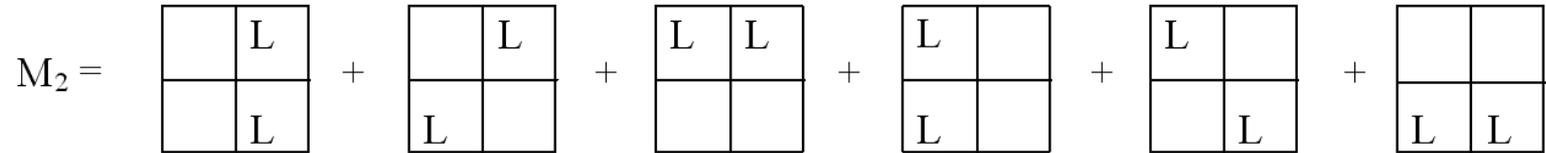
Gli equilibri coinvolti sono:



.....



Per esempio, se $n=4$ e rappresentiamo schematicamente la macromolecola con un quadrato con quattro siti, avremo:



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 moli di macromolecola:
 = frazione di legante legato

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

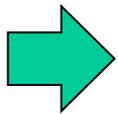


$$[M_1] + 2[M_2] + 3[M_3] + \dots = \sum_{i=0}^n i[M_i] \text{ siti occupati}$$

$$K_1 = \frac{[M_0][L]}{[M_1]} ; \quad K_2 = \frac{[M_1][L]}{[M_2]} \quad \dots \quad K_i = \frac{[M_{i-1}][L]}{[M_i]} \quad \dots \quad K_n = \frac{[M_{n-1}][L]}{[M_n]}$$

K_i sono le **costanti macroscopiche di dissociazione**

$$\begin{aligned}
 [M_2] &= \frac{[M_1][L]}{K_2} = \frac{[M_0][L]^2}{K_1 K_2} \\
 [M_3] &= \frac{[M_2][L]}{K_3} = \frac{[M_0][L]^3}{K_1 K_2 K_3} \\
 &\dots\dots\dots
 \end{aligned}
 \quad \Rightarrow \quad
 [M_i] = \frac{[M_{i-1}][L]}{K_i} = \frac{[M_0][L]^i}{\prod_{j=1}^i K_j}$$



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

Esempio: $n=4$

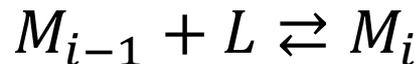
$$k = \frac{\begin{array}{|c|c|} \hline & \\ \hline & \\ \hline \end{array} [L]}{\begin{array}{|c|c|} \hline & L \\ \hline & \\ \hline \end{array}} = \frac{\begin{array}{|c|c|} \hline L & L \\ \hline & \\ \hline \end{array} [L]}{\begin{array}{|c|c|} \hline L & L \\ \hline L & \\ \hline \end{array}} = \frac{\begin{array}{|c|c|} \hline L & L \\ \hline L & \\ \hline \end{array} [L]}{\begin{array}{|c|c|} \hline L & L \\ \hline L & L \\ \hline \end{array}} = \dots$$

K_1 sarà invece data da:

$$K_1 = \frac{\begin{array}{|c|c|} \hline & \\ \hline & \\ \hline \end{array} [L]}{\begin{array}{|c|c|} \hline & L \\ \hline & \\ \hline \end{array} + \begin{array}{|c|c|} \hline L & \\ \hline & \\ \hline \end{array} + \begin{array}{|c|c|} \hline & \\ \hline L & \\ \hline \end{array} + \begin{array}{|c|c|} \hline & \\ \hline & L \\ \hline \end{array}}$$

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

Se consideriamo il seguente equilibrio:



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:

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

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

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

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 $[M_{i-1}]$, $[M_{i-2}]$ 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

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

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

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

Il **denominatore** è semplicemente l'espansione della potenza di un binomio (di Newton):

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

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

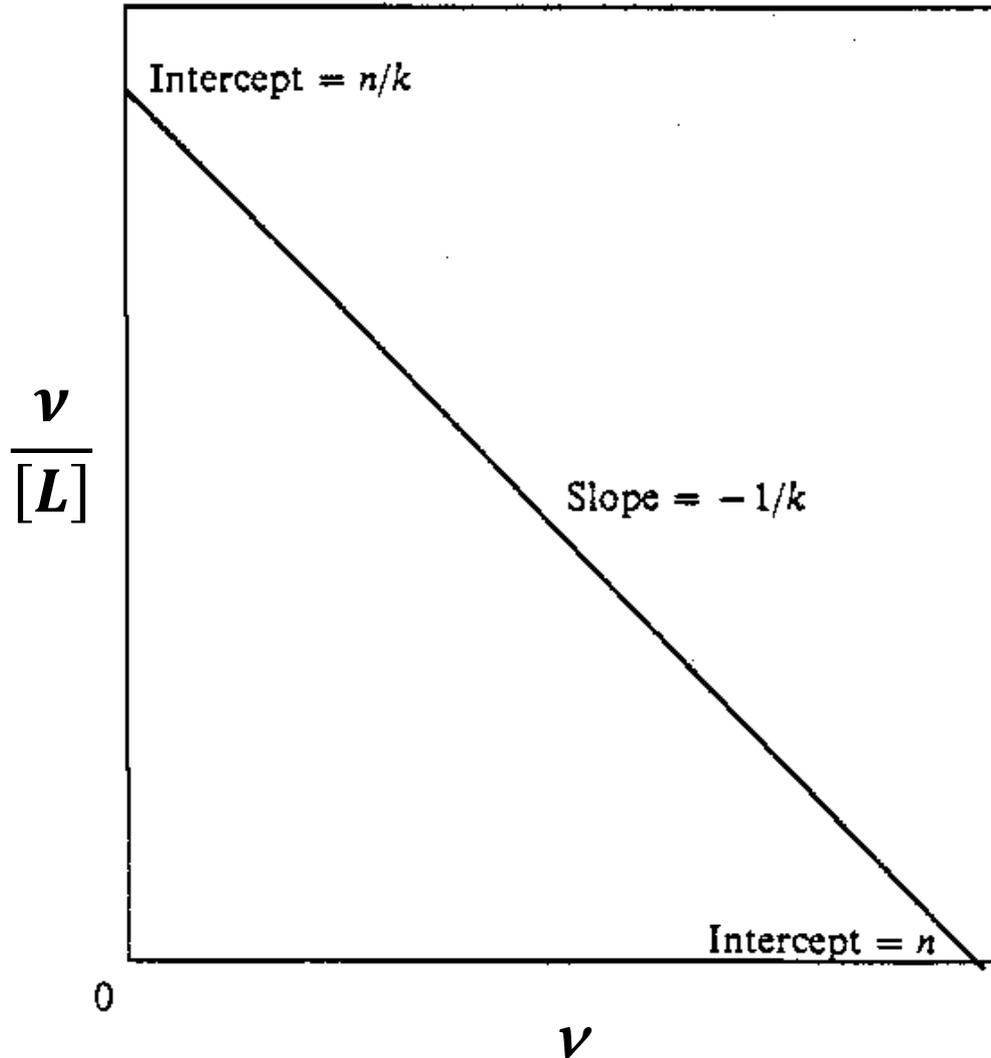
$$\frac{[L]}{k} \frac{d \left(1 + \frac{[L]}{k} \right)^n}{d \frac{[L]}{k}} = n \frac{[L]}{k} \left(1 + \frac{[L]}{k} \right)^{n-1} = \sum_{i=1}^n i \frac{n!}{(n-i)! i!} \left(\frac{[L]}{k} \right)^i$$

sostituendo le due precedenti espressioni nella definizione di v :

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

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

Scatchard plot



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

GRAFICI DI SCATCHARD CURVI

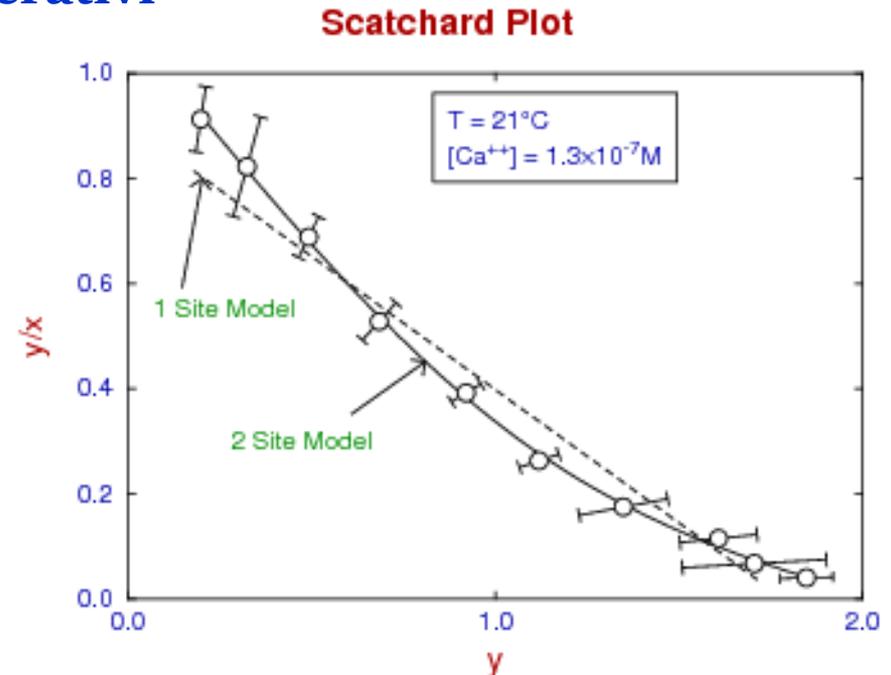
In molti casi un grafico di Scatchard può essere curvo piuttosto che lineare. Questo succede in due casi classici:

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** :

$$\left. \begin{array}{l} n_1 \text{ siti con cost microscopica } k_1 \\ n_2 \text{ siti con cost microscopica } k_2 \\ \dots\dots\dots \end{array} \right\} v = v_1 + v_2 + \dots = \sum \frac{n_i K_i C_f}{1 + K_i C_f}$$

$$v_1 = \frac{n_1 K_1 C_f}{1 + K_1 C_f} \qquad v_2 = \frac{n_2 K_2 C_f}{1 + K_2 C_f}$$

$$\begin{aligned} \frac{v}{C_f} &= \frac{v_1}{C_f} + \frac{v_2}{C_f} = \frac{n_1 K_1}{1 + K_1 C_f} + \frac{n_2 K_2}{1 + K_2 C_f} = \\ &= \frac{n_1 K_1 + n_2 K_2 + (n_1 + n_2) K_1 K_2 C_f}{1 + K_1 C_f + K_2 C_f + K_1 K_2 C_f^2} \end{aligned}$$

$$\frac{v}{C_f} + (K_1 + K_2) \cdot v + K_1 K_2 C_f \cdot v = n_1 K_1 + n_2 K_2 + (n_1 + n_2) K_1 K_2 C_f$$

$$\frac{v}{C_f} = n_1 K_1 + n_2 K_2 + (n_1 + n_2) K_1 K_2 C_f - (K_1 + K_2 + K_1 K_2 C_f) v$$

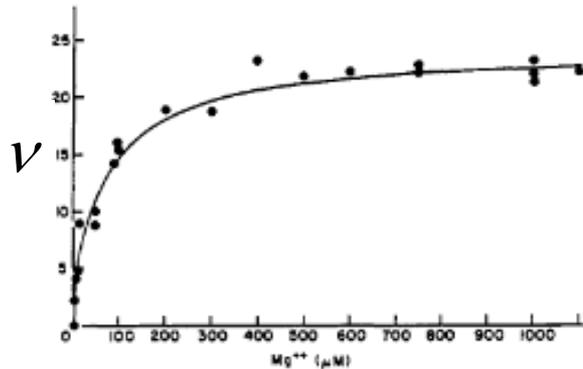
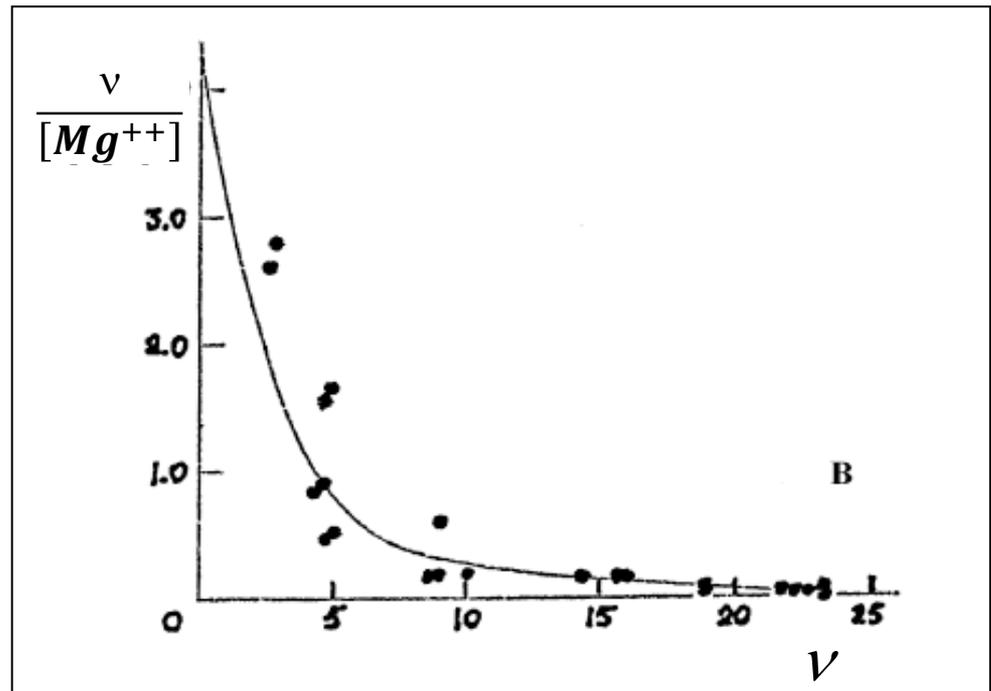


FIGURE 2: Binding of Mg^{2+} to RNA^{Pbc} as a function of Mg^{2+} concentration at 25° , pH 7.2, mM Na-phosphate buffer, 5 mM NaCl. Solid line calculated assuming $N_{1A} = 4$, $N_{2A} = 20$, $K_{1A} = 10^6 M^{-1}$, and $K_{2A} = 1.1 \times 10^4 M^{-1}$. See text for details.

ESEMPIO:

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



$$\lim_{C_f \rightarrow 0} \frac{v'}{C_f} = n_1 K_1 + n_2 K_2 - (K_1 + K_2) v$$

$$\lim_{C_f \rightarrow \infty} \frac{v}{C_f} = 0 = (n_1 + n_2) K_1 K_2 C_f - K_1 K_2 C_f v$$

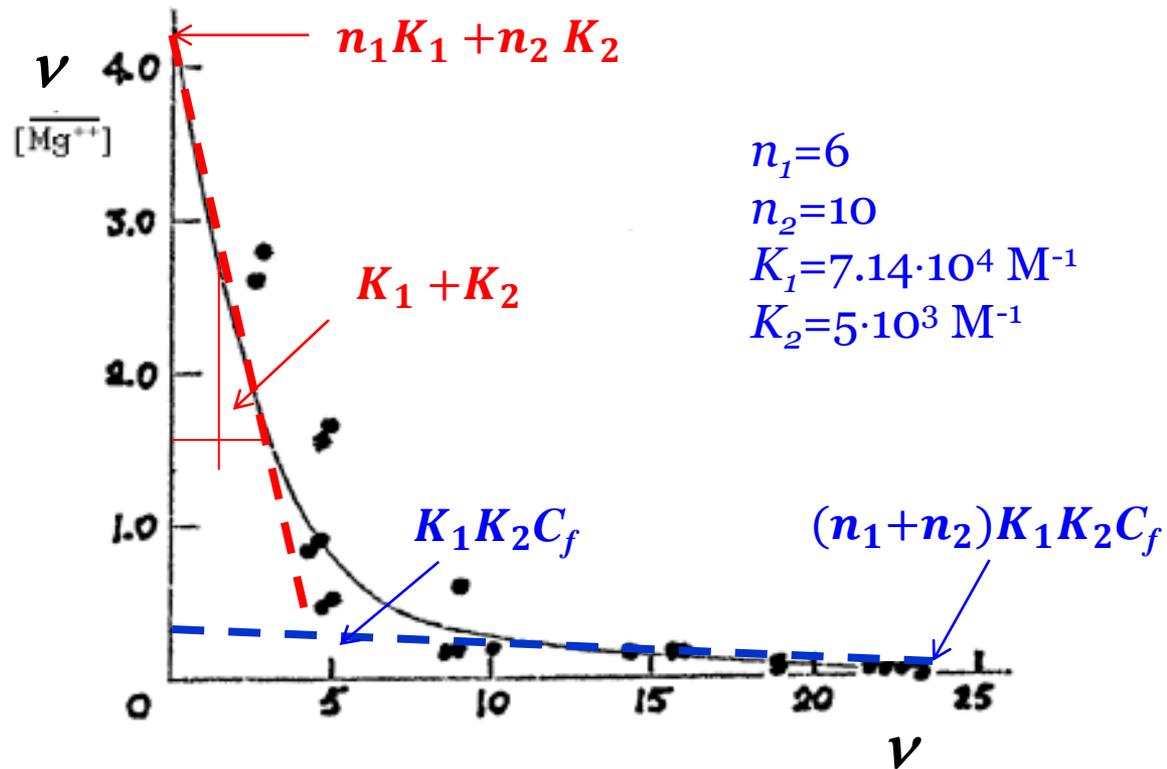
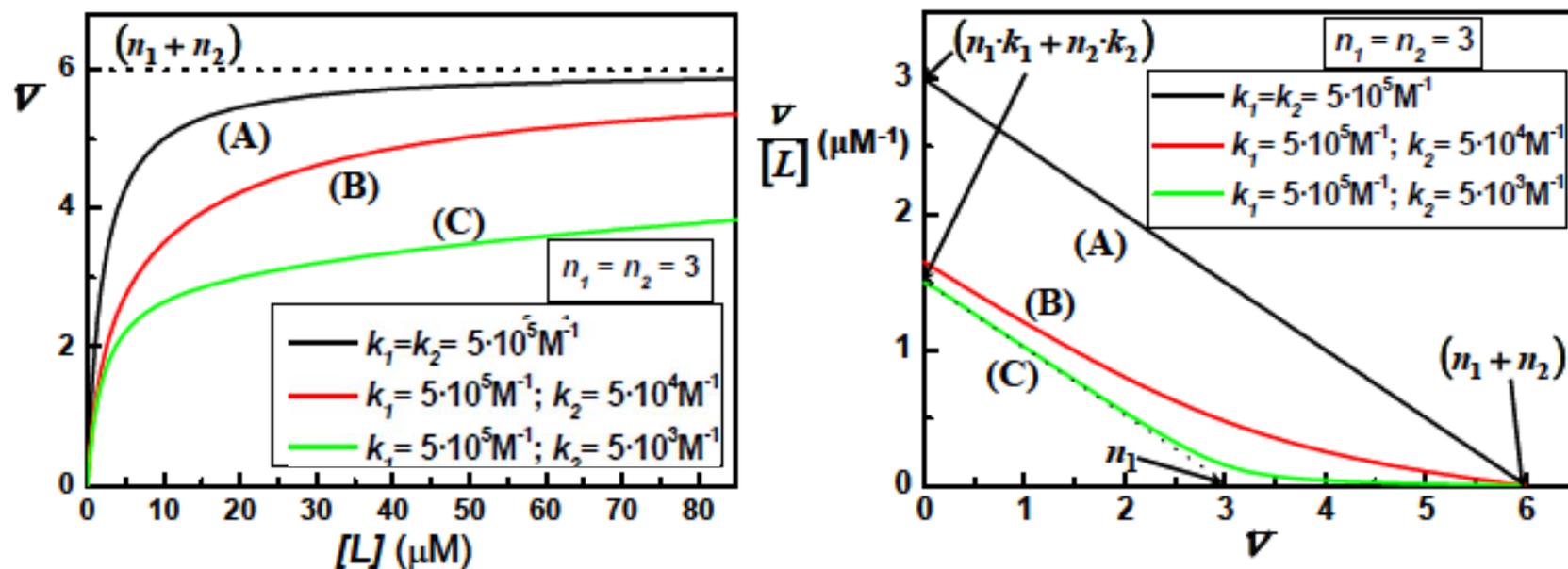


Figure 3. Binding to independent sites



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 $5 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$. 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 k_0 la costante di dissociazione microscopica per $\nu = 0$.

Quando ν aumenta, l'interazione tra i siti fa variare il valore di k .

Se ΔG_o° è la variazione di energia libera standard per la dissociazione di un ligando legato:

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

dove

$$\Delta G_o^\circ = -RT \ln k_o$$

$$k_o = k(\nu=0)$$

e $\phi(\nu)$ è una funzione che, per definizione, prende in considerazione gli effetti delle **interazioni tra siti** che variano con il grado di saturazione.

Allora:

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

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

dove $\phi(\nu) = 0$ per $\nu = 0$

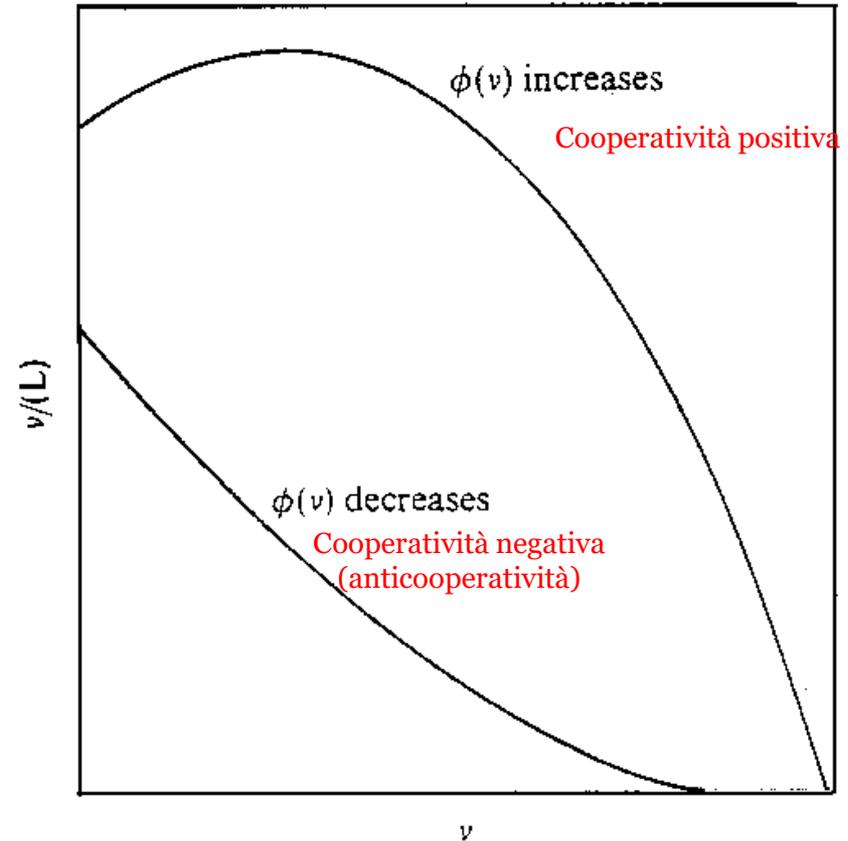
$$\ln k(\nu) = \ln k_0 - \phi(\nu)$$

Possiamo allora usare le equazioni di Scatchard con k sostituito da $k(\nu)$.

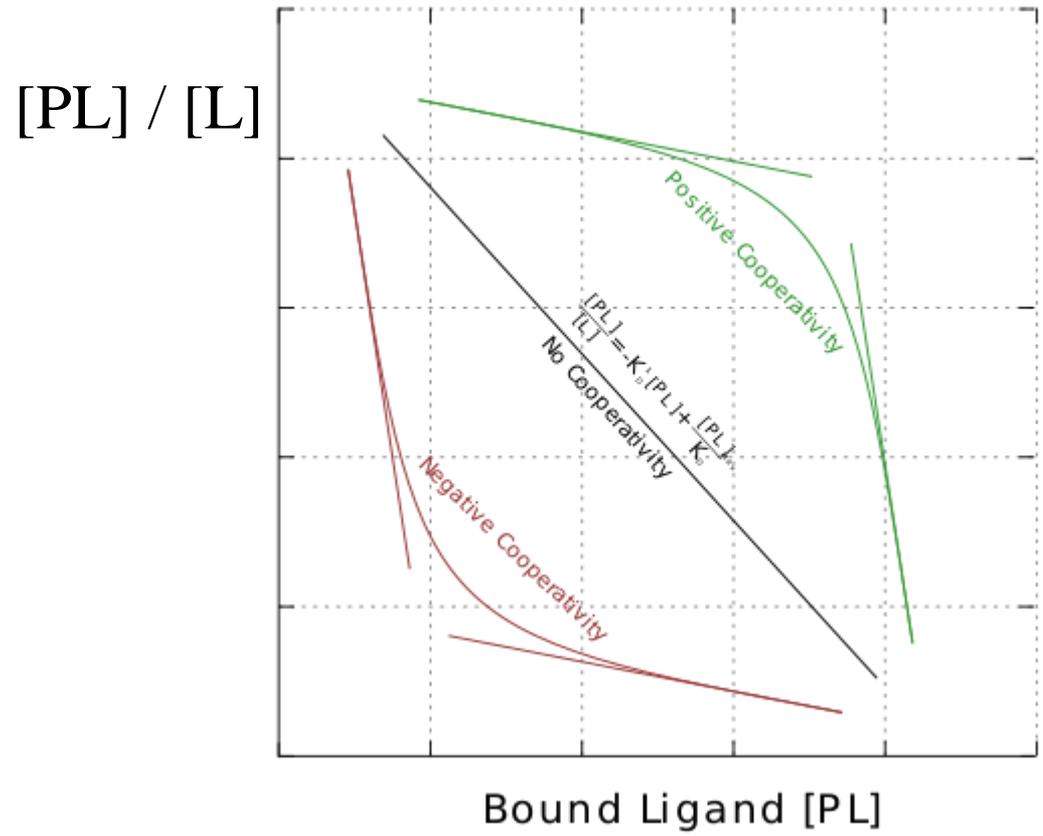
Se $\phi(\nu)$ è una funzione decrescente di ν allora $k(\nu)$ cresce con la saturazione: in questo caso il grafico di Scatchard sarà curvo con la concavità verso l'alto (anticooperatività).

D'altra parte, se $\phi(\nu)$ 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 di *dissociazione*, allora attraverso il trattamento statistico visto precedentemente

$$K_i = \frac{\Omega_{n,i-1}}{\Omega_{n,i}} k \quad \text{con} \quad \Omega_{n,i} = \frac{n!}{(n-i)! i!}$$

con K_i le costanti macroscopiche di dissociazione.

E' possibile conoscere le quattro costanti *macroscopiche*:

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

dove $K_1 < K_2 < K_3 < K_4$ e quindi il processo di *binding*, 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** del binding.

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.

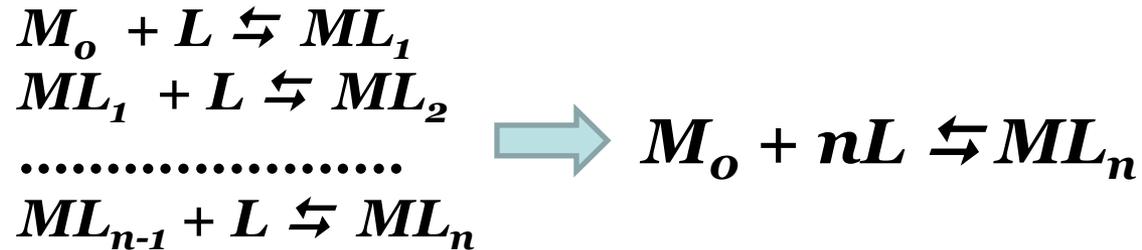
Nell'esempio della macromolecola con 4 siti questo vuol dire che, **se c'è cooperatività** tra il primo ed il secondo stadio, si ha:

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

Se tutti gli stadi coinvolgono un *binding* 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



Considerando un sistema infinitamente cooperativo in cui le costanti di dissociazione K_i sono uguali per ogni stadio:

$$K_i = K = \frac{[ML_{i-1}][L]}{[ML_i]} \quad \text{allora} \quad K^n = \frac{[M_o][L]^n}{[ML_n]}$$

Il parametro ν è dato da:

$$\nu = \frac{n[ML_n]}{[M_o] + [ML_n]} = \frac{n[M_o][L]^n/K^n}{[M_o] + [M_o][L]^n/K^n} = \frac{n[L]^n/K^n}{1 + [L]^n/K^n}$$

L'ultima equazione si basa sull'assunzione del *binding* infinitamente cooperativo per tutti gli n ligandi.

Nella pratica, questa condizione non si verifica usualmente.

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

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

dove: $1 \leq n_H \leq n$

è conosciuta come **costante di Hill** ed è un **indice di cooperatività**.

K' è la costante di binding, il reciproco della costante di dissociazione

$$K' = 1 / K$$

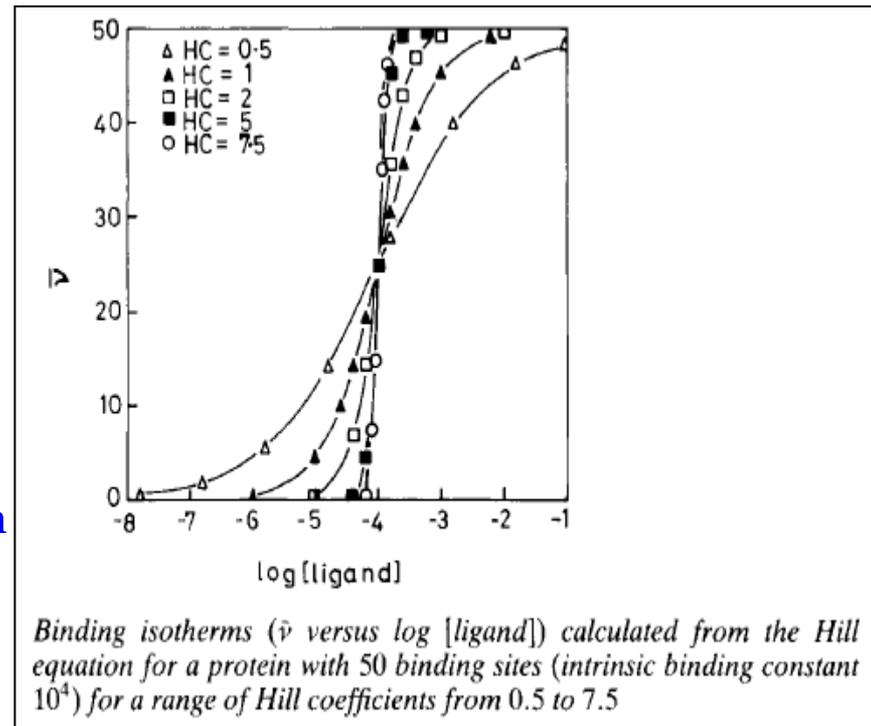
$$\nu = \frac{n(K'[L])^{n_H}}{1 + (K'[L])^{n_H}}$$

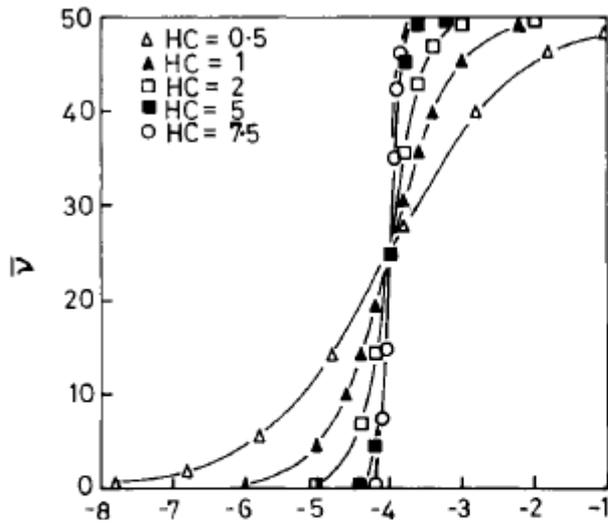
Per $n^H=1$ si rientra nelle condizioni binding di siti identici ed indipendenti come previsto nell'equazione di Scatchard (**non cooperativo**).

Per $n^H=n$ il sistema si comporta in modo perfettamente cooperativo.

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

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





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 ($n^H > 1$)

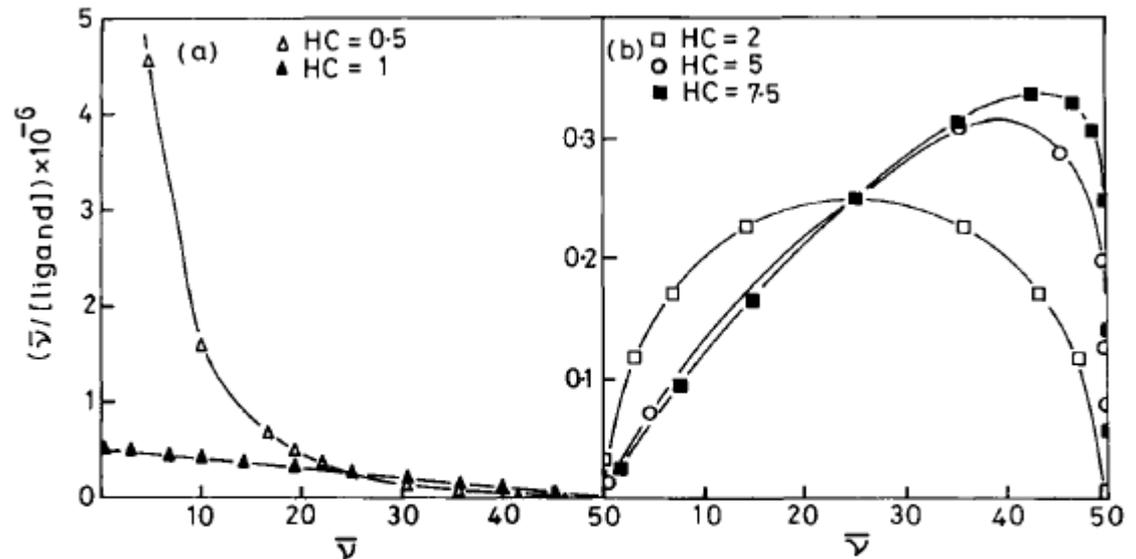
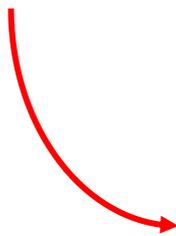
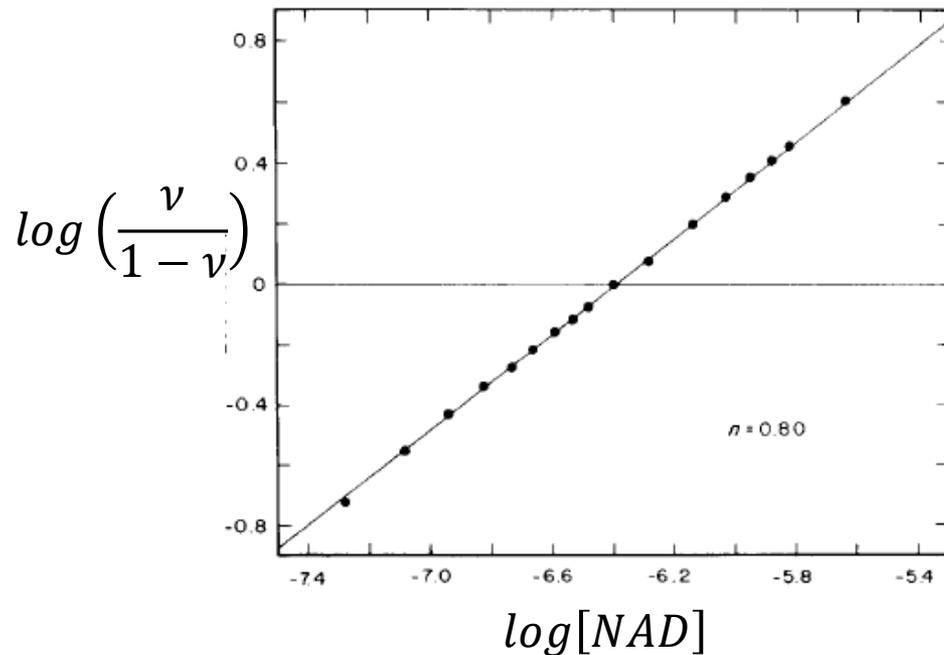
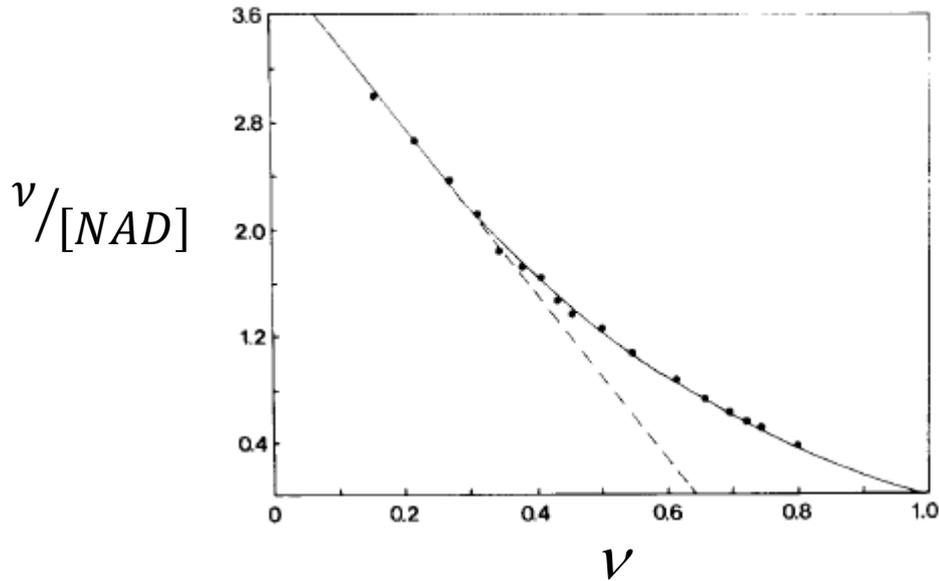


Figure 3 Scatchard plots ($\bar{v}/[\text{ligand}]_{\text{free}}$ versus \bar{v}) for the isotherms of Figure 2 for a protein with 50 binding sites (intrinsic binding constant 10^4) for a range of Hill coefficients from 0.5 to 7.5



Diagrammi di Scatchard e Hill per il legame di NAD e la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi isolata dal muscolo di storione.

Questo legame è caratterizzato da una cooperatività negativa.

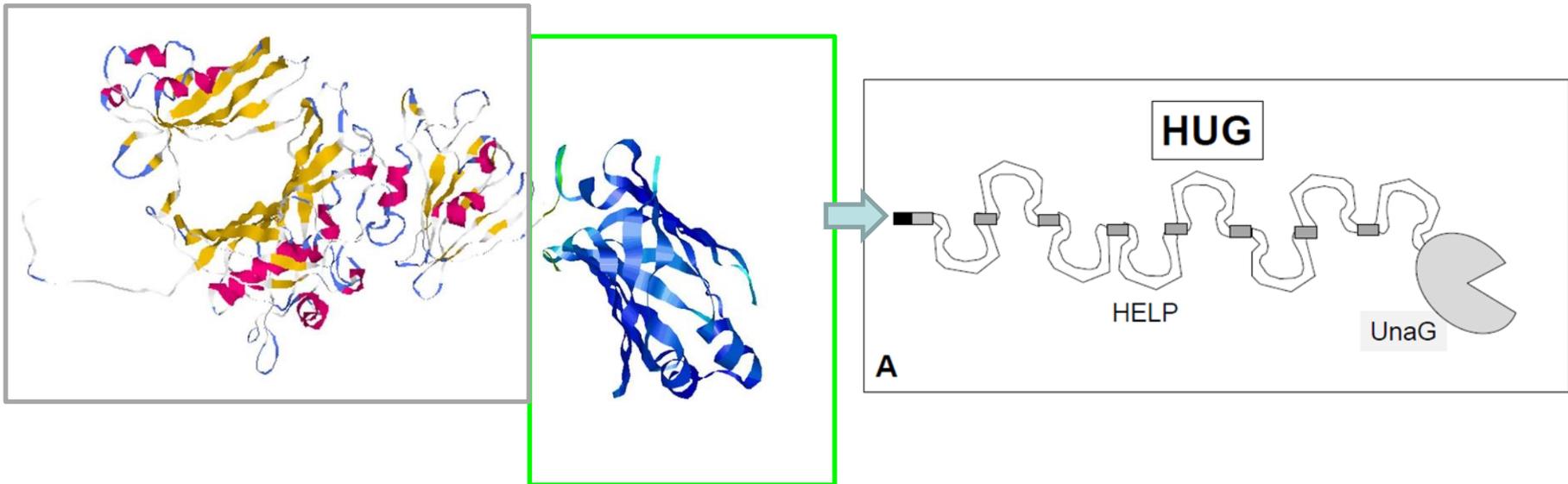
Il diagramma di Scatchard è concavo e decisamente non lineare. Il grafico Hill è invece lineare.

La pendenza del diagramma di Hill è inferiore all'unità, 0.80 ± 0.2 (cooperatività negativa).

HUG

A bi-functional, synthetic protein

HUG is composed of a bilirubin-binding domain (UnaG) fused with a scaffold (HELP, **H**uman **E**lastin-**L**ike **P**rotein)



HUG is the acronym of **H**ELP-**U**na**G**

Nel 2013 è stata identificata e isolata una nuova proteina, chiamata **UnaG**, dal muscolo dell'anguilla giapponese (*Anguilla japonica*).
(N.B. è la prima proteina fluorescente derivata dai vertebrati).

Questa proteina che lega gli acidi grassi liberi (*free-fatty acid binding protein*, FFABP) lega pure la **bilirubina non coniugata** (Br) in modo altamente specifico e selettivo, emettendo una forte **fluorescenza** (Kumagai et al., 2013).

Il **gene UnaG** è stato clonato al C-terminale del gene che codifica il polipeptide HELP ottenendo un nuovo polipeptide sintetico funzionalizzato chiamato HUG, acronimo che indica la sequenza **HELP-UnaG**.

HUG (HELP-UnaG) è stato prodotto da un gene sintetico del polipeptide HELP fuso con la sequenza codificante di 139 aminoacidi della proteina UnaG.

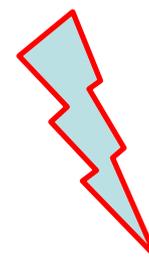
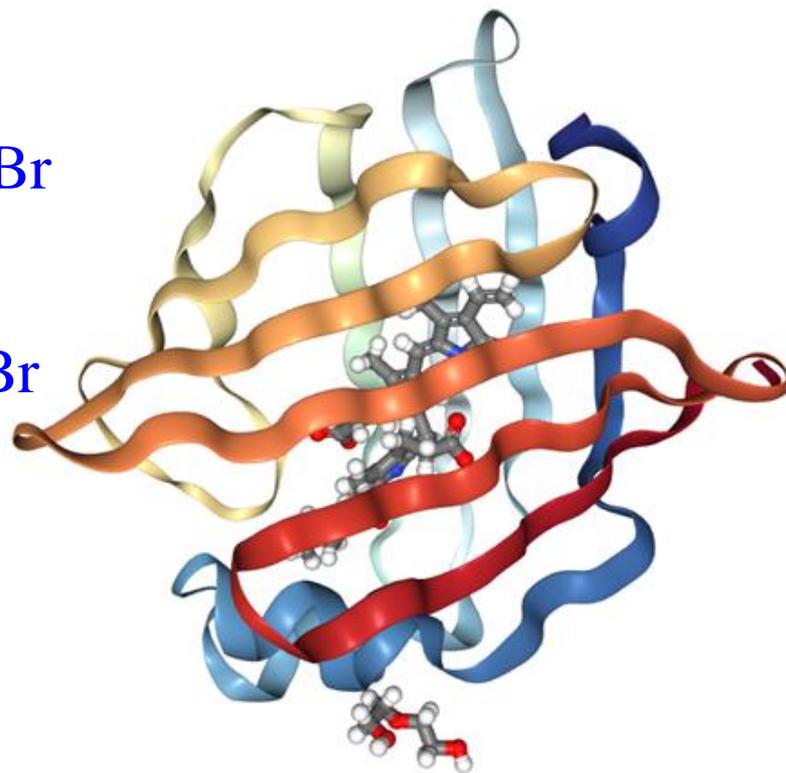
N.B. La sua proprietà molecolare appare molto interessante perché la bilirubina non coniugata (bilirubina indiretta) è difficilmente misurabile con il tradizionale dosaggio colorimetrico.

UnaG + Br \longrightarrow

UnaG·Br

HUG + Br \longrightarrow

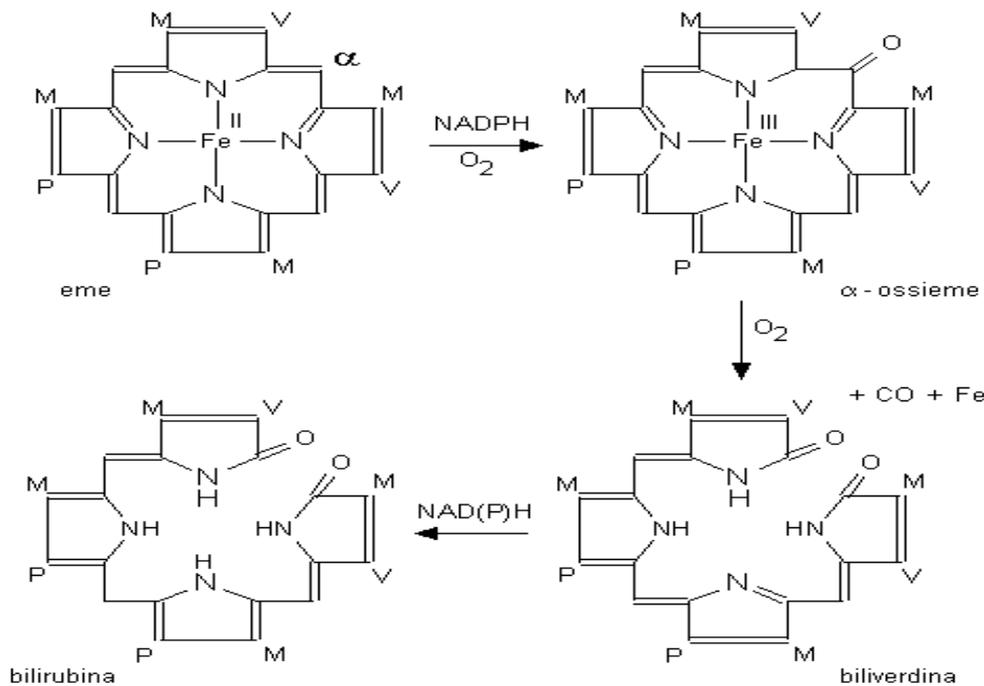
HUG·Br



Fluorescenza

La **bilirubina** (dal latino bilis = bile e ruber = rosso) è un pigmento di colore rosso-arancione che deriva per l'80% dal catabolismo dell'eme dell'emoglobina (Hb) e per il restante 20% da altre emoproteine, come le mioglobine e i citocromi.

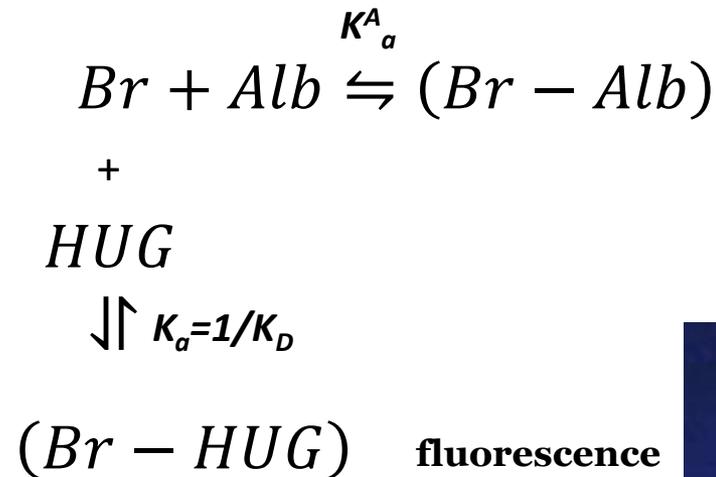
La bilirubina si ottiene dal processo di **degradazione della ferroporfirina**, o gruppo eme, dell'emoglobina, rilasciata durante la distruzione dei globuli rossi, o eritrociti, nella milza.

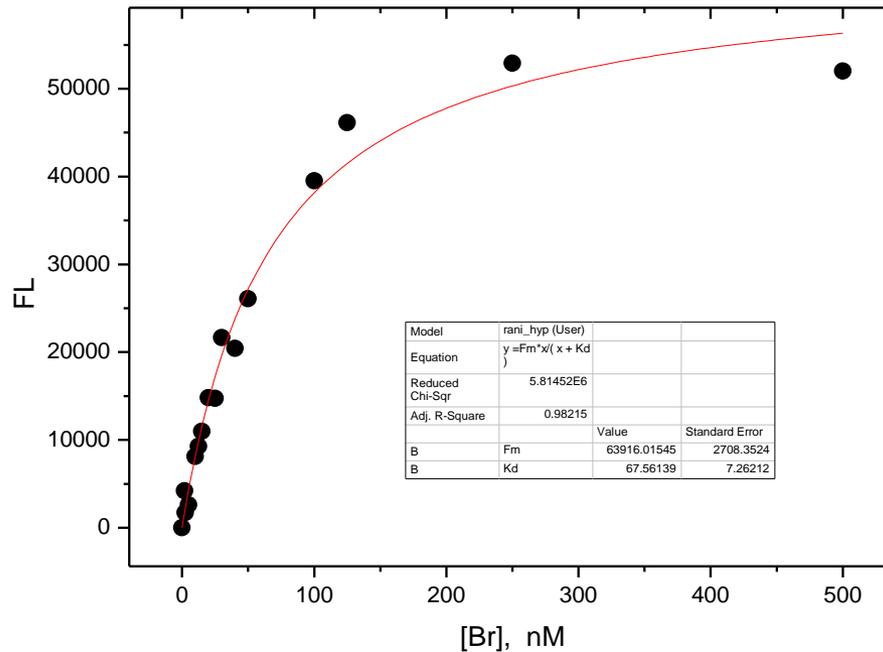


il metabolismo della bilirubina non coniugata avviene a livello epatico, dopo essere stata trasportata nel sangue da una proteina di trasporto, l'albumina, in virtù della sua insolubilità in acqua (liposolubilità);

Binding of bilirubin to HUG protein

The Br-HUG interaction was studied by mean of the fluorescence titration technique assessing the intensity enhancement during ligand addition





For each fluorescence value (F), the fractional enhancement (Y) was computed by the equation:

$$Y = \frac{F}{F_0}$$

where Y is the fractional saturation related to the extent of binding and F_0 the fluorescence intensity at the Br/HUG ratio greater than 1 (the asymptotic value).

$$K_d = \frac{[\text{HUG}][\text{BR}]}{[\text{BR-HUG}]}$$

Durante la titolazione, la concentrazione di BR aumenta e la saturazione Y è espressa in termini di concentrazione del complesso BR-HUG

$$Y = \frac{[\text{BR-HUG}]}{[\text{HUG}]_T}$$

$$[\text{BR-HUG}] = \frac{[\text{HUG}][\text{BR}]}{K_d}$$

$$[\text{HUG}]_T = [\text{HUG}] + [\text{BR-HUG}] = P_T$$

$$Y = \frac{[\text{HUG}][\text{BR}]/K_d}{[\text{HUG}] + [\text{HUG}][\text{BR}]/K_d}$$

$$Y = \frac{[\text{BR}]}{K_d + [\text{BR}]}$$

Poiché nell'esperimento di binding, invece delle concentrazioni delle specie libere, sono note le concentrazioni **totali** di proteina e ligando, l'espressione di **Y** in funzione delle quantità totali viene ottenuta come segue

$$[\text{BR}] = [\text{BR}]_T - [\text{BR-HUG}] = L_T - [\text{BR-HUG}]$$

$$K_d = \frac{(L_T - [\text{BR-HUG}])(P_T - [\text{BR-HUG}])}{[\text{BR-HUG}]}$$

$$K_d[\text{BR-HUG}] = P_T L_T - (P_T + L_T)[\text{BR-HUG}] + [\text{BR-HUG}]^2$$

$$[\text{BR-HUG}]^2 - (P_T + L_T + K_d)[\text{BR-HUG}] + P_T L_T = 0$$

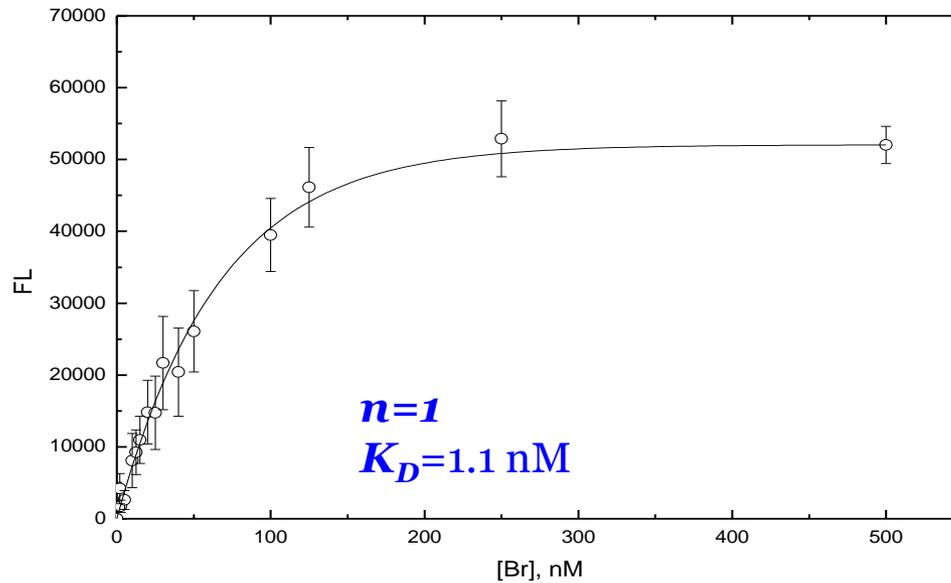
Le radici dell'equazione di secondo grado è:

$$[\text{BR-HUG}] = \frac{(P_T + L_T + K_d) - \sqrt{\{[-(P_T + L_T + K_d)]^2 - 4P_T L_T\}}}{2}$$

che sostituita nell'equazione di $Y = \frac{[\text{BR-HUG}]}{[\text{HUG}]_T}$

$$Y = \frac{(P_T + L_T + K_d) - \sqrt{\{[-(P_T + L_T + K_d)]^2 - 4P_T L_T\}}}{2P_T}$$

Il grafico di $F=F_oY$ rispetto a $L_T = [Br]$ è mostrato in Figura, dove sono riportati i valori medi di tutti i risultati ottenuti da diversi esperimenti.

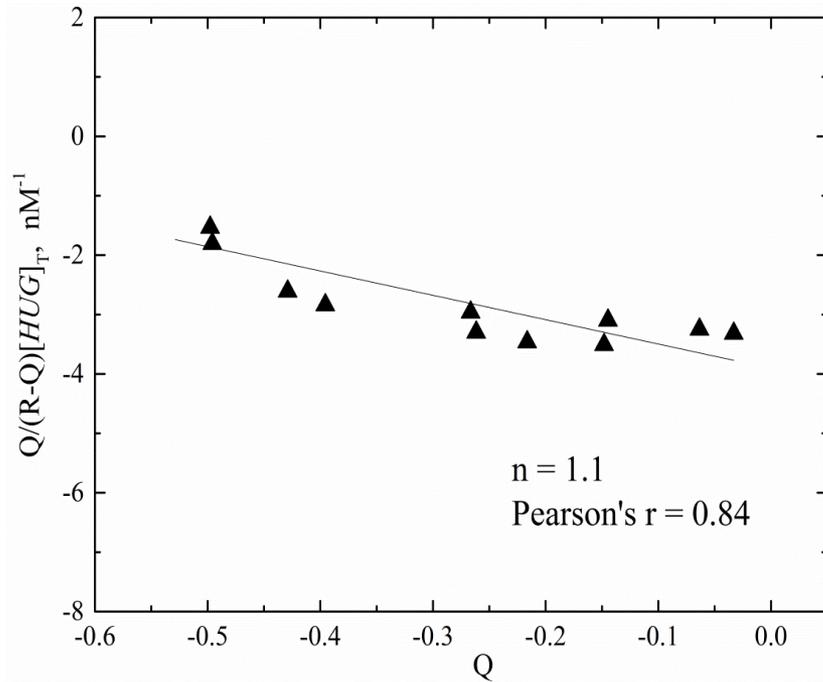


Mediante fitting non lineare della curva iperbolica si ottengono i valori delle costanti di dissociazione e di binding ($K_D=1.1 \text{ nM}$, $K_A=0,91 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) e del valore massimo di fluorescenza della proteina legata al ligando ($F_o=65600$).

L'assunzione del modello con $n=1$ è confermata dal diagramma di Scatchard.

Il valore della costante $K_a = 0,91 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ per il complesso BR-HUG ha dato un valore maggiore di quello del complesso BR-Albumina ($K_a \approx 10^7$), che determina il sequestro da parte di HUG di BR dall'albumina.

Scatchard plot for BR and HUG binding.



The Scatchard plot was obtained by using equation (Levine, 1977):

$$v/C_f = \frac{Q}{(R-Q)[HUG]_T} = nK_a - K_a Q$$

where:

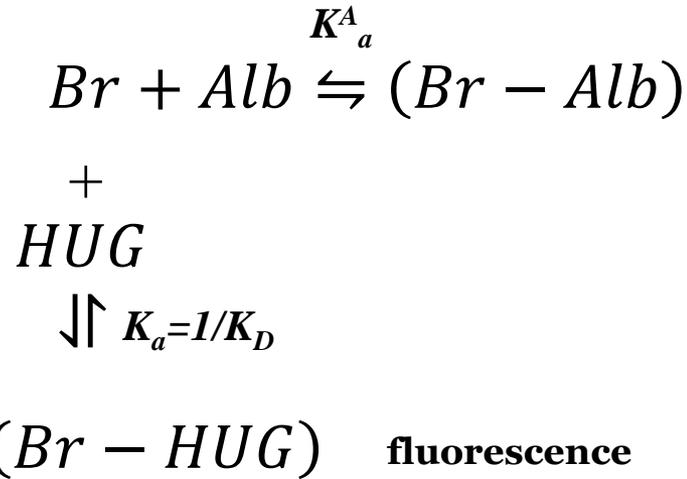
$$Q = \frac{[BR-HUG]_T}{[HUG]_T} = v$$

$$R = \frac{[BR]_T}{[HUG]_T}$$

with $[HUG]_T$ and $[BR]_T$ the total concentration of HUG and BR, respectively.

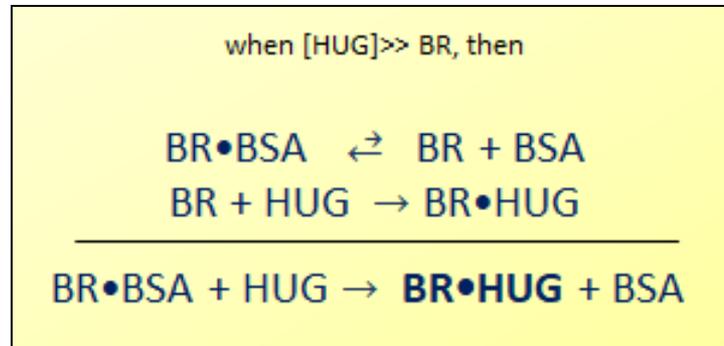
Q is related to the fractional saturation $Y = F/F_o$ as defined above.

The linear fitting of data in Figure gives **$n = 1.1$**



$$K_a = 1/K_D = 0,91 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ per } Br-HUG$$

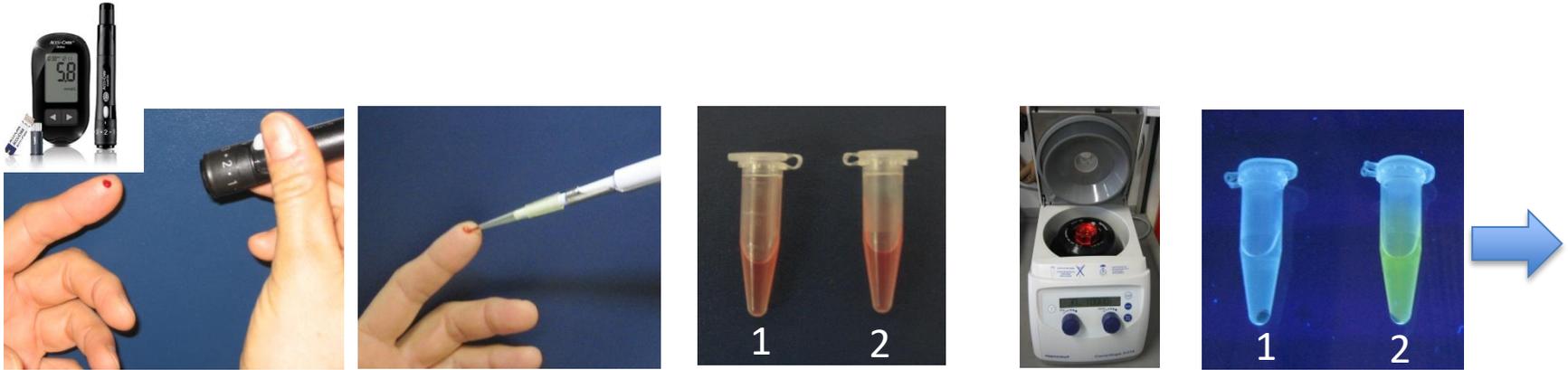
$$K_a^A = 1/K_D = \text{ca } 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ per } Br-Alb$$



Alb = BSA

FLUORIMETRIC ASSAY OF *BILIRUBIN*

Biofluorimetric assay of bilirubin in whole blood



punch a finger

aspire 5 μ L capillary blood

5 μ L to 1 mL PBS (blank)

5 μ L to 1 mL PBS + HUG

spin

ADD SAMPLES \pm ENZYMES



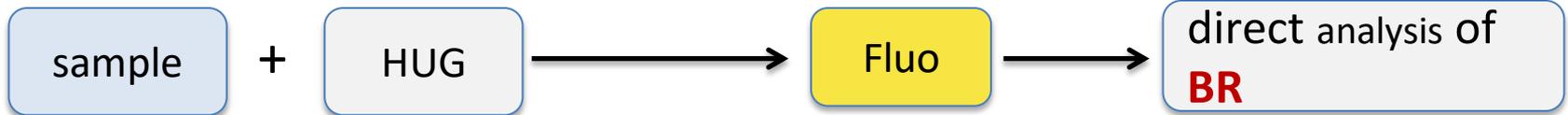
ALLOW HUG•BR TO FORM, 1 h

GO TO FLUORESCENCE READER



GET YOUR DATA

	1	2	3
A	3355	4259	4627
B	3604	4216	4295
C	3831	3693	4013
D	3886	3660	4616
E	4152	8339	4323
F	4186	15666	4269
G	3850	10972	4688
H	3517	6778	5225



Versatility of the assay

BR Standard solutions, in

- (1) PBS-DMSO pH 7.4 and 8.5
- (2) PBS-BSA 0.4 g/L pH 7.4 and 8.5
- (3) Hepes
- (4) Tris
- (5) Hanks

1h at 25°C

(1)-(3)-(4)-(5)

2h at 25°C

(2)

Pre-clinical samples

cell lysates
tissue
homogenates
organ perfusions
cell culture media *
(interferences)

2h at 25°C

1h at 37°C

with enzymes

Clinical samples

Blood
plasma
serum
saliva (?)
urine (?)

2h at 25°

1h at 37°C

with enzymes

Protocollo in via di validazione per diverse matrici:

Sangue e siero

Sangue di pesce, di ratto

Saliva

Riassunto grafico

