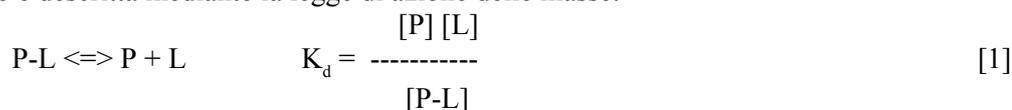


TEORIA E METODI PER LO STUDIO DELLA COMBINAZIONE REVERSIBILE TRA PROTEINE E LEGANTI.

E' frequente che la funzione di una proteina (ad es. un enzima; un recettore; un trasportatore) comporti l'interazione reversibile con una piccola molecola o ione (un legante: substrato, ormone, etc.); è inoltre frequente che interazioni di questo tipo esercitino un controllo sulla funzione della proteina (si consideri il caso dell'inibizione enzimatica). In questo testo vengono riassunte le basi teoriche e metodologiche per lo studio di questo tipo di problema.

1. Generalità; legge di azione delle masse e sue rappresentazioni grafiche

L'interazione reversibile tra proteina (P) e legante (L) deve essere trattata come un qualsiasi equilibrio chimico e descritta mediante la legge di azione delle masse:



valgono le seguenti definizioni:

$$[P_{tot}] = [P] + [P-L] \quad [2]$$

$$[L_{tot}] = [L] + [P-L] \quad [3]$$

L'equazione [1] può essere riscritta nella forma:

$$[P-L] / [P] = [L] / K_d \quad [4]$$

Combinando le equazioni [2] e [4] si ricava:

$$Y = \frac{[P-L]}{[P_{tot}]} = \frac{[L]}{K_d + [L]} \quad [5]$$

La rappresentazione grafica dell'equazione [5] è un'iperbole equilatera che ha [L] per ascissa, la frazione di proteina combinata (Y) per ordinata, inizio nell'origine degli assi e asintoto = 1. Curve non iperboliche possono occasionalmente essere osservate ed indicano che lo schema di reazione è più complesso di quello descritto dall'equazione [1]; alcuni casi notevoli saranno trattati più avanti.

Quando $[P-L] / [P_{tot}] = 0,5$ si ha $[L] = K_d$; questo comporta che la costante di dissociazione corrisponde alla concentrazione di legante libero necessaria per ottenere la semisaturazione della proteina (un valore spesso indicato come $[L]_{50}$ o L_{50}).

E' importante notare che la K_d è omogenea con una concentrazione (cioè ha le stesse unità di misura) ed è perciò possibile esprimere [L] come un multiplo o un sottomultiplo di K_d . Se si opera in questo modo si osserva una interessante proprietà dell'eq. [5]: scegliendo due valori di L che siano rispettivamente un multiplo e un sottomultiplo di K_d secondo lo stesso fattore, la somma dei due valori di Y corrispondenti è 1, ovvero ciascuno dei due dista dall'asintoto superiore tanto quanto l'altro dista dall'asintoto inferiore¹; ad esempio prendendo i due valori di [L] pari a $K_d/3$ e $3.K_d$ si ottengono rispettivamente $Y=0,25$ e $Y=0,75$. Una conseguenza di questa proprietà è che il grafico di Y in funzione di $\log([L])$ è una sigmoide simmetrica per rotazione di 180° intorno al punto di coordinate $(\log K_d, 0,5)$, come si può vedere nella fig.1.

L'equazione [3], $Y = \frac{[L]}{K_d + [L]}$, descrive un'iperbole equilatera che ha:
 ascissa = [L]
 ordinata = Y
 inizio nell'origine (per [L] = 0 si ha Y = 0)
 asintoto = 1

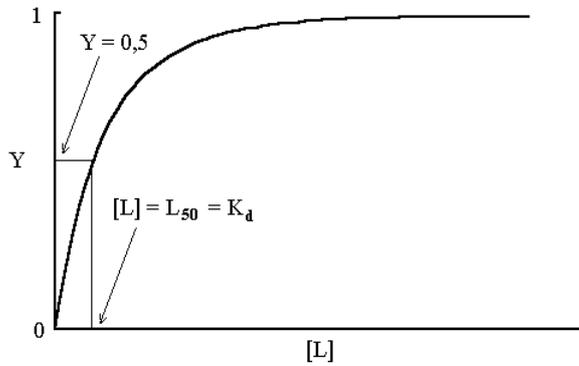


Figura 1

E' importante tener presente che il rapporto stechiometrico tra proteina e legante è meno importante delle concentrazioni assolute dei due ai fini di promuovere la dissociazione; infatti l'eq. [1] descrive un equilibrio di dissociazione e pertanto obbedisce alla legge di Ostwald: all'aumento della concentrazione diminuisce il grado di dissociazione (aumenta Y) e viceversa alla diminuzione della concentrazione aumenta il grado di dissociazione (diminuisce Y) anche se rimane invariato il rapporto stechiometrico $[L_{tot}]/[P_{tot}]$.

E' di fondamentale importanza considerare che le concentrazioni che compaiono nella legge di azione delle masse (eq. 1) sono le concentrazioni ad equilibrio di ciascuna specie, mentre le concentrazioni note allo sperimentatore in molti casi sono le concentrazioni totali (eq. 2 e 3). Ci sono eccezioni a questa regola; ad esempio in molti esperimenti basati su radioattivi vengono misurati direttamente [L] e [PL]. Se però la regola è valida, cioè se lo sperimentatore ha pesato e misurato $[P_{tot}]$ e $[L_{tot}]$, più un parametro che da indicazioni sul rapporto tra [P] e [PL] (ad es. spettroscopico), l'equazione 1 va riscritta nella forma:

$$K_d = \frac{[P][L]}{[P-L]} = \frac{[P]([L_{tot}] - [PL])}{[PL]} \quad [6]$$

In questa equazione [P] e [PL] possono essere calcolate usando $[P_{tot}]$ e il parametro misurato, mentre [L] viene calcolato per sottrazione, noti $[L_{tot}]$ e [PL]. Se l'affinità della proteina per il ligando è alta ed il parametro misurabile richiede concentrazioni elevate di proteina, il termine [L] risulterà piccolo rispetto a $[L_{tot}]$ e [PL] e pertanto la sua determinazione sarà gravata da un grande errore sperimentale, come si discute nella prossima sezione.

2. Effetti pratici della concentrazione della proteina e del legante

Per poter determinare K_d è necessario misurare almeno due concentrazioni delle tre che compaiono nell'eq. [1] (ad es. [L] e [P-L]), e ripetere la misura in varie condizioni sperimentali (ad es. mantenendo costante $[P_{tot}]$ e variando $[L_{tot}]$). Sebbene in teoria il risultato dell'esperimento sia indipendente dalla concentrazione assoluta di proteina e legante, in pratica si incontreranno precise limitazioni.

Occorre considerare che perché l'esperimento sia possibile, il complesso P-L deve poter essere distinto dalla miscela di P ed L; ad esempio lo spettro di assorbimento o di fluorescenza (di eccitazione e/o di emissione) della coppia P ed L potrebbe differire da quello del complesso P-L. Ogni differenza tra le proprietà della miscela e quelle del complesso richiederà un metodo di rivelazione, ed ogni metodo ha una sua sensibilità, che condiziona le concentrazioni di P, L e P-L rivelabili.

Si devono considerare le implicazioni metodologiche di tre possibili condizioni:

1) la sensibilità dello strumento di misura è tale che si può rivelare $[L]$ o $[P-L] \lll L_{50}$

- 2) la sensibilità dello strumento di misura è tale che si può rivelare $[L]$ o $[P-L] \approx L_{50}$
 3) la sensibilità dello strumento di misura è tale che si può rivelare $[L]$ o $[P-L] \gg \gg L_{50}$

Caso 1.

Questo caso è il più favorevole per ottenere una precisa determinazione di K_d e consente di condurre l'esperimento in questo modo:

- Si pone in soluzione $[P_{tot}] \ll \ll L_{50}$
- Si aggiunge L in piccole aggiunte successive in modo da esplorare un intervallo di concentrazione compreso tra $L_{50}/100$ e $100 L_{50}$, preferibilmente diviso su una scala logaritmica (ad es. cinque aggiunte di L pari a $L_{50}/100$, $L_{50}/10$, L_{50} , $10 L_{50}$ e $100 L_{50}$). Poiché in genere L_{50} non è noto a priori conviene effettuare un esperimento pilota prima di iniziare la determinazione definitiva, esplorando un intervallo più ampio di $[L_{tot}]$.
- Per ogni aggiunta si attende un tempo adeguato (anche questo deve essere cercato con un esperimento pilota) e si determina in modo non distruttivo o su una piccolissima aliquota del campione la concentrazione di P-L. Non è necessario determinare $[L]$ poiché essendo $[P_{tot}] \ll \ll L_{50}$, $[L] \approx [L_{tot}]$.
- Si mette in grafico $[P-L]$ in funzione di $[L_{tot}]$ alle diverse aggiunte e si ottiene (se tutto è andato per il verso giusto) un'iperbole con asintoto pari a $[P_{tot}]$ (tutta la proteina si è combinata col legante; la concentrazione finale del legante è saturante).

Se questa condizione consente di determinare con il minimo errore la K_d , non consente però di determinare la stechiometria di legame (non consente cioè di stabilire se il complesso abbia la formula P-L oppure, ad esempio, P-L₂, a meno che la proteina non leghi le due molecole di legante con affinità diversa, cosa che produrrebbe un'iperbole deformata, vedi oltre).

Caso 2.

Rispetto al caso 1 valgono le seguenti differenze:

- Non è possibile porre $[P_{tot}] \ll \ll L_{50}$ perché si scenderebbe al di sotto del limite di sensibilità del metodo di rivelazione impiegato.
- Non è possibile assumere che $[L] \approx [L_{tot}]$ e pertanto per ogni aggiunta devono essere determinati sia $[L]$ che $[P-L]$. Quando non sia possibile misurare $[L]$, si può essere tentati di calcolarlo dall'eq. 3. E' però importante considerare che la determinazione di $[P-L]$, comunque effettuata, comporta un errore sperimentale, che si ripercuote inevitabilmente sul calcolo di $[L]$; quindi questa procedura è molto meno accurata della determinazione diretta. - Si deve graficare $[P-L]$ in funzione di $[L]$ e non di $[L_{tot}]$.

Questa condizione è la sfortunata perché, pur consentendo di determinare sia la K_d che la stechiometria del complesso proteina-legante, soffre di un errore sperimentale piuttosto grande.

Caso 3.

Quando la concentrazione di proteina richiesta per la determinazione di $[P-L]$ è molto maggiore della L_{50} , la concentrazione del legante libero $[L]$ è così piccola che si approssima $[L_{tot}] \approx [P-L]$ e $[L] \approx 0$. In questo caso in genere non è più possibile ottenere il grafico di un'iperbole perché l'errore che si compie sulla determinazione di $[L]$ è molto grande, e si grafica invece $[P-L]$ in funzione di $[L_{tot}]$ per ottenere una retta di **titolazione**. E' importante sottolineare che non è tanto importante se L_{50} sia in assoluto alto o basso, quanto se sia alto o basso rispetto alla sensibilità dello strumento impiegato: infatti l'eq. [1] descrive un equilibrio di dissociazione per il quale vale la legge di Ostwald ed è sempre possibile diluire il sistema fino a porsi nella condizione ideale di $[L] \approx [L_{tot}]$, il limite principale essendo la rivelazione delle concentrazioni di L e P-L così ottenute. Questa condizione consente di determinare con grande precisione la stechiometria del complesso proteina-legante, ma non consente di determinare la K_d .

Spesso e' possibile sfruttare a proprio vantaggio le caratteristiche di uno strumento od un'altro per ottimizzare la concentrazione di $[P_{tot}]$ rispetto alle proprie necessita': ad esempio la sensibilità di uno spettrofluorimetro e' almeno 100 volte piu' alta di quella di uno spettrofotometro e questo consente una grande flessibilità nella selezione delle condizioni sperimentali (purche' entrambe le tecniche diano un segnale utilizzabile).

E' quindi evidente che i casi 1, 2 e 3 non sono in sé buoni o cattivi, ed è vantaggioso disporre di tecniche diverse che consentano di esplorare la combinazione tra proteina e legante in un intervallo il più ampio possibile di concentrazione della proteina per determinare sia la stechiometria del complesso che la K_d .

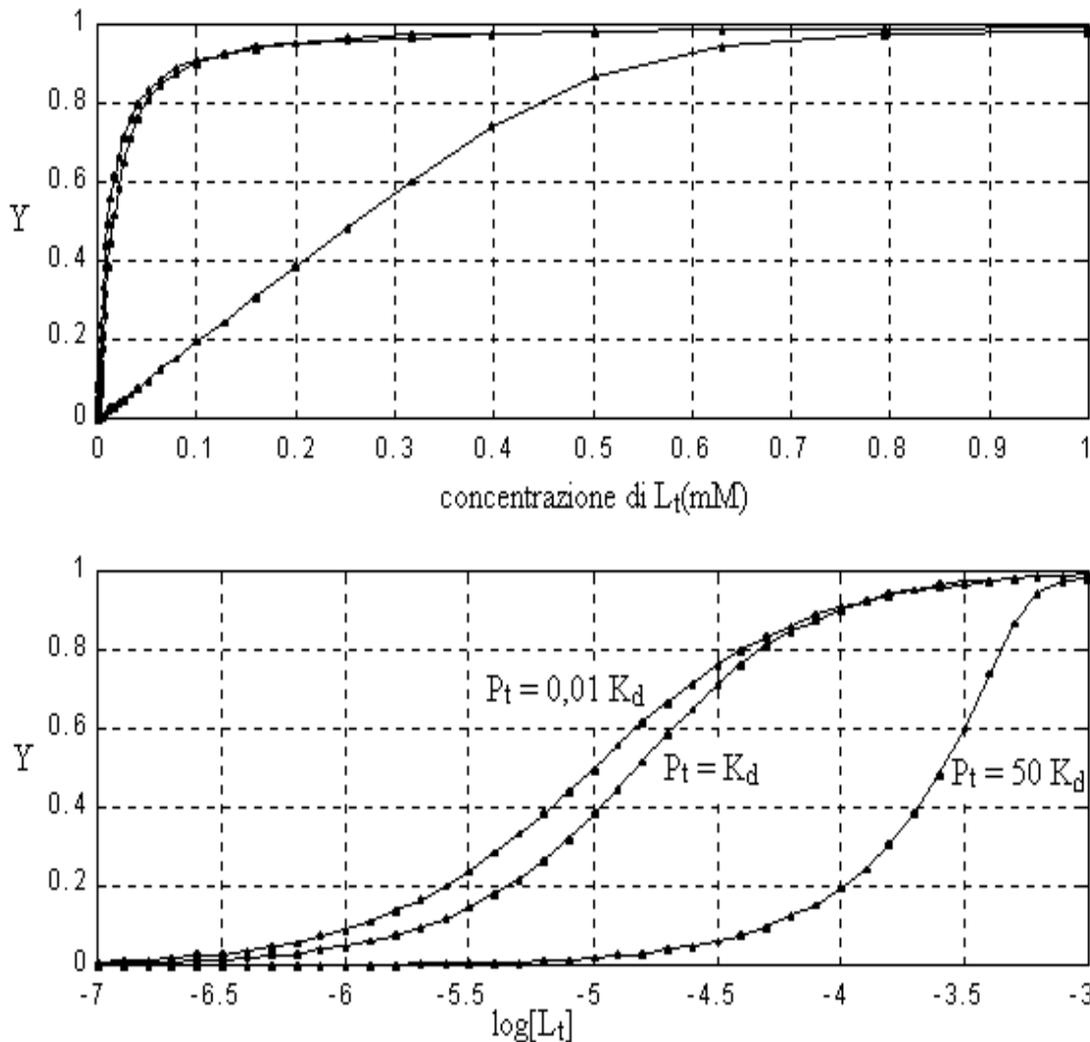


figura 2: effetto della concentrazione della proteina sulla rappresentazione di Y in funzione di $[L_t]$ o $\log[L_t]$

A commento della fig.2 si deve notare che se fosse riportato in ascissa il valore di $[L]$ anziché di $[L_{tot}]$, le tre curve risulterebbero perfettamente sovrapposte; purtroppo però in genere si conosce il secondo e non il primo.

3. Analisi dell'esperimento realizzato

Prima della diffusione dei personal computers era difficile stimare in modo statisticamente corretto un parametro che, come la K_d , appare in una funzione algebrica non lineare. Per questo motivo sono state proposte varie trasformazioni dell'eq. [4], intese a generare grafici lineari dai quali fosse possibile ricavare la K_d graficamente o analiticamente. Nomino, per pure ragioni storiche, i grafici di Hill e Scatchard:

$$\text{Hill: } \log \left(\frac{[P-L]}{[P]} \right) = \log \left[\frac{Y}{1-Y} \right] = \log [L] - \log K_d \quad [7]$$

il grafico di $\log [Y/(1-Y)]$ in funzione di $\log [L]$ è una retta con coefficiente angolare pari ad 1 (o all'indice stechiometrico del complesso P-L_n) e intercetta pari a $-K_d$.

$$\text{Scatchard: } \frac{[P-L]}{[L]} = \frac{[P]}{K_d} \quad [8]$$

il grafico di $[P-L]/[L]$ in funzione di $[P]$ è una retta con coefficiente angolare $1/K_d$. E' importante notare che sono state proposte alcune varianti di questa equazione e pertanto si possono trovare in letteratura altri grafici "di Scatchard".

Il difetto principale di queste trasformazioni è che deformano in modo arbitrario l'errore di misura; come conseguenza la K_d determinata con questi metodi è più imprecisa di quanto la misura consentirebbe (si veda la fig.3).

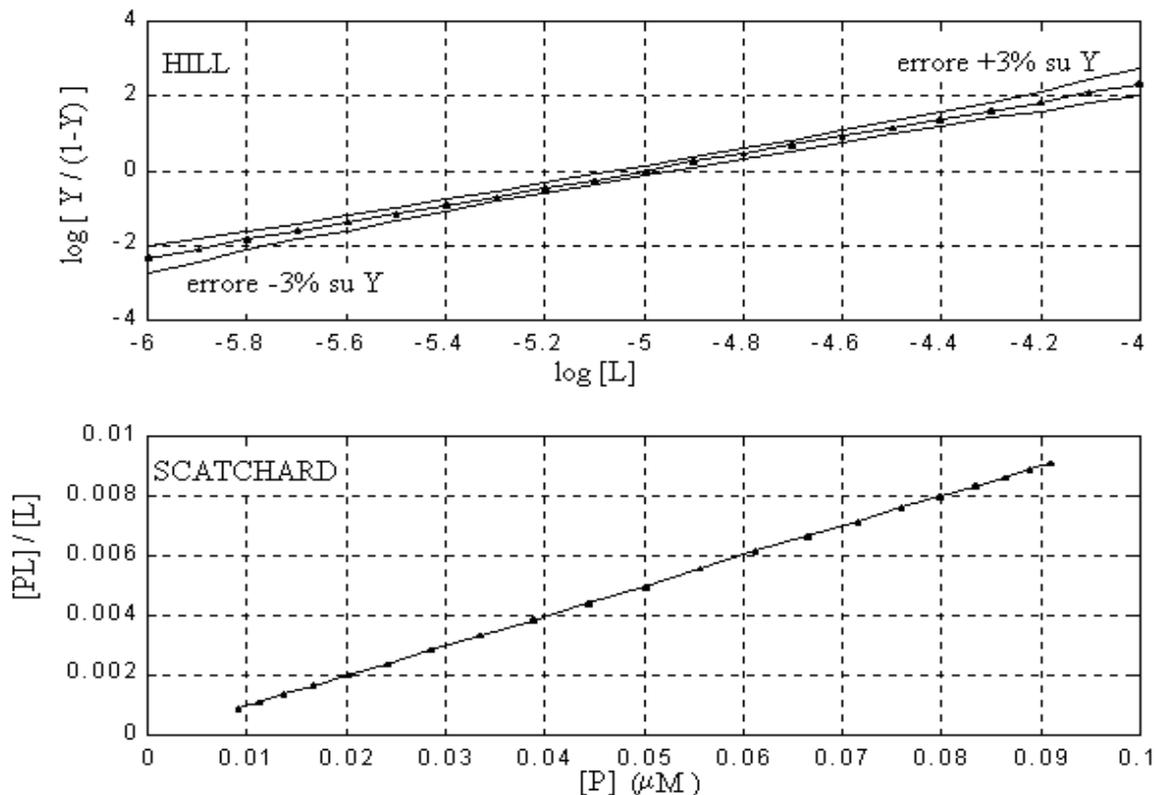


figura 3: i grafici di Hill e Scatchard; nel grafico di Hill è riportata anche la distorsione dell'errore su Y

Il modo corretto per analizzare un esperimento di equilibrio chimico è il seguente:

- occorre scrivere una equazione che calcoli il dato sperimentale, per ogni set di parametri $[L_{tot}]$, $[P_{tot}]$ e K_d ; sovente questa includerà alcune semplificazioni (ad es. $[L] = [L_{tot}]$) ed alcune complicazioni (ad es. se la determinazione di $[P-L]$ è stata effettuata mediante spettrofotometria sarà necessario includere il coefficiente di estinzione di questa specie).
- mediante questa equazione si potrà calcolare la devianza tra i punti sperimentali e quelli calcolati (somma dei quadrati degli scarti).
- si utilizzerà un programma di regressione non lineare per minimizzare la devianza con metodo iterativo, consentendo al calcolatore di variare i parametri non noti (spesso la sola K_d).

4. ISOFORME

Spesso la purificazione di una proteina restituisce non una specie pura ma una miscela di isoforme che condividono la funzione biologica. Le isoforme possono essere tali per natura, e cioè corrispondere a geni diversi, oppure possono essere varianti alleliche dello stesso gene. Quando se ne studi la combinazione con un legante, le isoforme danno la stessa reazione ma con costanti di equilibrio diverse. Poiché ciascuna isoforma è indipendente dalle altre l'equazione che descrive la saturazione in funzione del legante per ciascuna di esse è uguale all'eq. [5], e per l'intera miscela alla loro somma.

Considero solo il caso in cui ci siano due isoforme della stessa proteina, P^a e P^b , con diverse costanti di dissociazione per lo stesso legante K_d^a e K_d^b . Le due frazioni di proteina combinata sono rispettivamente:

$$Y^a = [L] / (K_d^a + [L]) \quad \text{e} \quad Y^b = [L] / (K_d^b + [L]);$$

la frazione di proteina complessiva combinata con il legante risulta:

$$Y = ([P_t^a] Y^a + [P_t^b] Y^b) / ([P_t^a] + [P_t^b]).$$

Il grafico che si ottiene è quello di due iperboli (o due sigmoidi se espresso in funzione di $\log[L]$) sovrapposte; a basse concentrazioni di legante si legherà prevalentemente l'isoforma più affine, ad alte

concentrazioni di legante, quando l'isoforma più affine sarà pressoché completamente combinata si legherà anche la meno affine (fig.4).

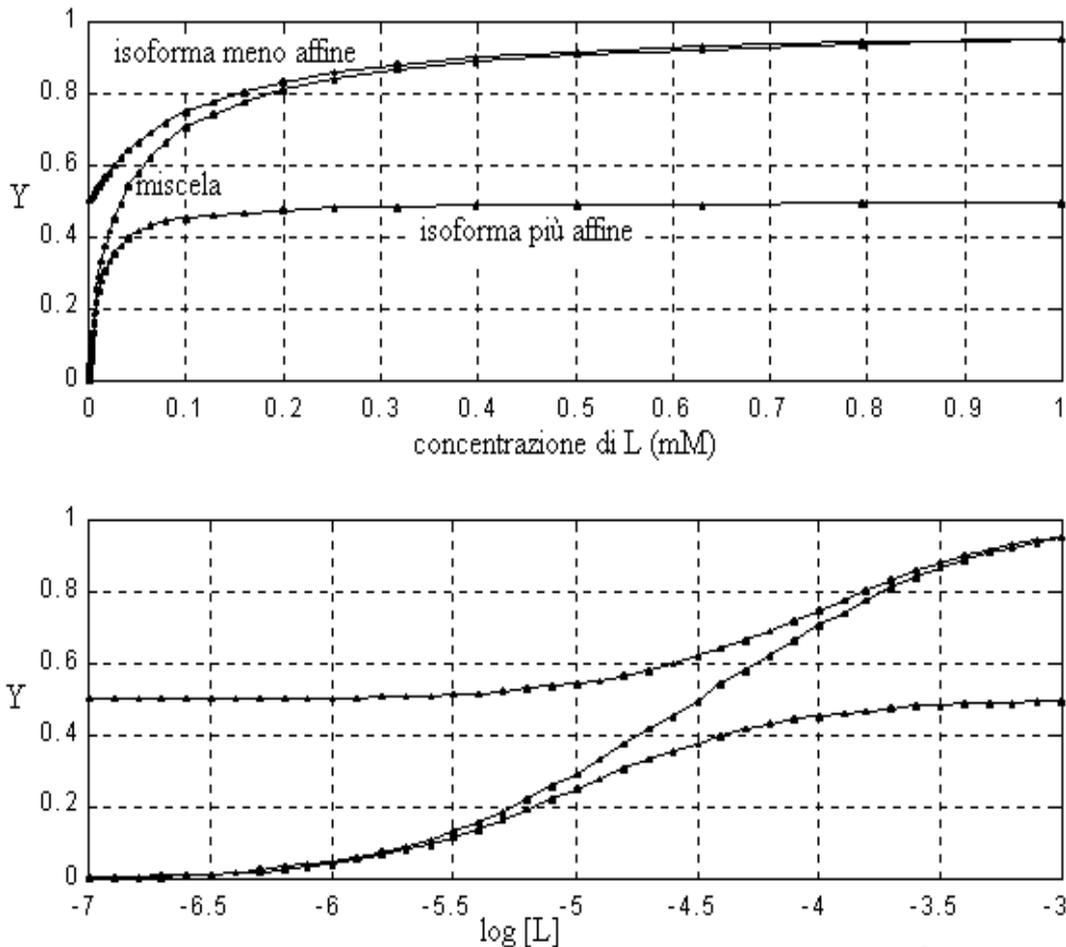


figura 4: rappresentazione di Y per una miscela di due isoforme al 50%, con $K_1 = 10^{-5} M$ e $K_2 = 10^{-4} M$

5. Proteine che legano più di una molecola di legante

La stechiometria del complesso tra proteina e legante è variabile; ad esempio le reazioni della mioglobina (Mb) e dell'emoglobina (Hb) coinvolgono rispettivamente 1 e 4 molecole di ossigeno:



Quando la stechiometria del complesso è superiore ad 1 occorre considerare equilibri multipli, che risultano in genere abbastanza difficili dal punto di vista algebrico e non saranno trattati esaurientemente in questa sede. Per semplicità descriverò 2 possibili casi per un complesso con stechiometria 1:2 del tipo:



I due equilibri chimici rilevanti hanno le costanti di dissociazione K_1 e K_2 così definite:

$$K_1 = \frac{[P][L]}{[P-L]} \quad [12]$$

$$K_2 = \frac{[P-L][L]}{[P-L_2]} \quad [13]$$

Per motivi che saranno chiariti più avanti, il trattamento del sistema utilizza le costanti di equilibrio apparenti K_1' e K_2' , che a seconda del caso specifico possono essere uguali o diverse dalle costanti intrinseche K_1 e K_2 .

Da queste è possibile ricavare:

$$[P-L] = [P] [L] / K'_1 \quad [14]$$

$$[P-L_2] = [P-L] [L] / K'_2 = [P] [L]^2 / K'_1 K'_2 \quad [15]$$

La frazione di siti di combinazione occupati dal legante, tenendo conto che i siti totali sono $2[P_{tot}]$, e che in P-L c'è un solo sito occupato mentre in P-L₂ ce ne sono due, risulta:

$$Y = \frac{[P-L] + 2 [P-L_2]}{[P]} = \frac{[P-L] + 2 [P-L_2]}{2 ([P] + [P-L] + [P-L_2])} = \frac{[L]/K'_1 + 2 [L]^2/K'_1 K'_2}{2 (1 + [L]/K'_1 + [L]^2/K'_1 K'_2)} \quad [16]$$

caso 1: dei siti simmetrici.

Questo caso è frequente ed è quello di una proteina omodimerica, nella quale l'eventuale differenza di affinità tra il primo ed il secondo sito viene introdotta soltanto dopo che il primo sito si è combinato con il legante. In ogni molecola proteica ci sono, per così dire, due primi siti ed un solo secondo sito: cioè la prima molecola di legante si lega con uguale affinità ad uno qualunque dei due, e la seconda con il sito rimasto libero. Per questo motivo le costanti apparenti K'_1 e K'_2 risultano dal prodotto di due fattori: le corrispondenti costanti intrinseche ed i relativi fattori statistici: $K'_1 = K_1/2$ e $K'_2 = 2 K_2$.

I fattori statistici sono calcolati con riferimento alla cinetica di combinazione e dissociazione: per il primo sito la molecola di legante ha una sola possibilità per dissociarsi e due per combinarsi (fattore 1/2); per il secondo sito invece la molecola di legante ha due possibilità per dissociarsi e una sola per combinarsi (fattore 2/1). Se invece delle costanti di dissociazione sono state scritte le equazioni delle costanti di associazione, i fattori statistici saranno i reciproci di quelli qui descritti.

Si considerino le seguenti tre possibilità:

1a) **Siti simmetrici indipendenti:** le due costanti intrinseche sono uguali e sono genericamente indicate come K ($K = K_2 = K_1$); le costanti apparenti risultano $K'_1 = K/2$ e $K'_2 = 2 K$ e pertanto il loro prodotto è: $K'_2 K'_1 = K^2$, mentre il loro rapporto è: $K'_2 / K'_1 = 4$ (cioè per motivi statistici il primo sito sembra più affine del secondo, di un fattore pari al rapporto tra i fattori statistici). Si ottiene:

$$Y = \frac{2 [L]/K + 2 [L]^2/K^2}{2 (1 + 2 [L]/K + [L]^2/K^2)} = \frac{2 [L]/K (1 + [L]/K)}{2 (1 + [L]/K)^2} = \frac{[L]/K}{1 + [L]/K} = \frac{[L]}{K + [L]} \quad [17]$$

L'eq.[17] è uguale alla [5]; infatti i due siti sono equivalenti, a meno del solo fattore statistico. I grafici di Y in funzione di [L] e di log[L] sono ovviamente identici a quelli riportati nella fig. 1 (si veda la fig.5).

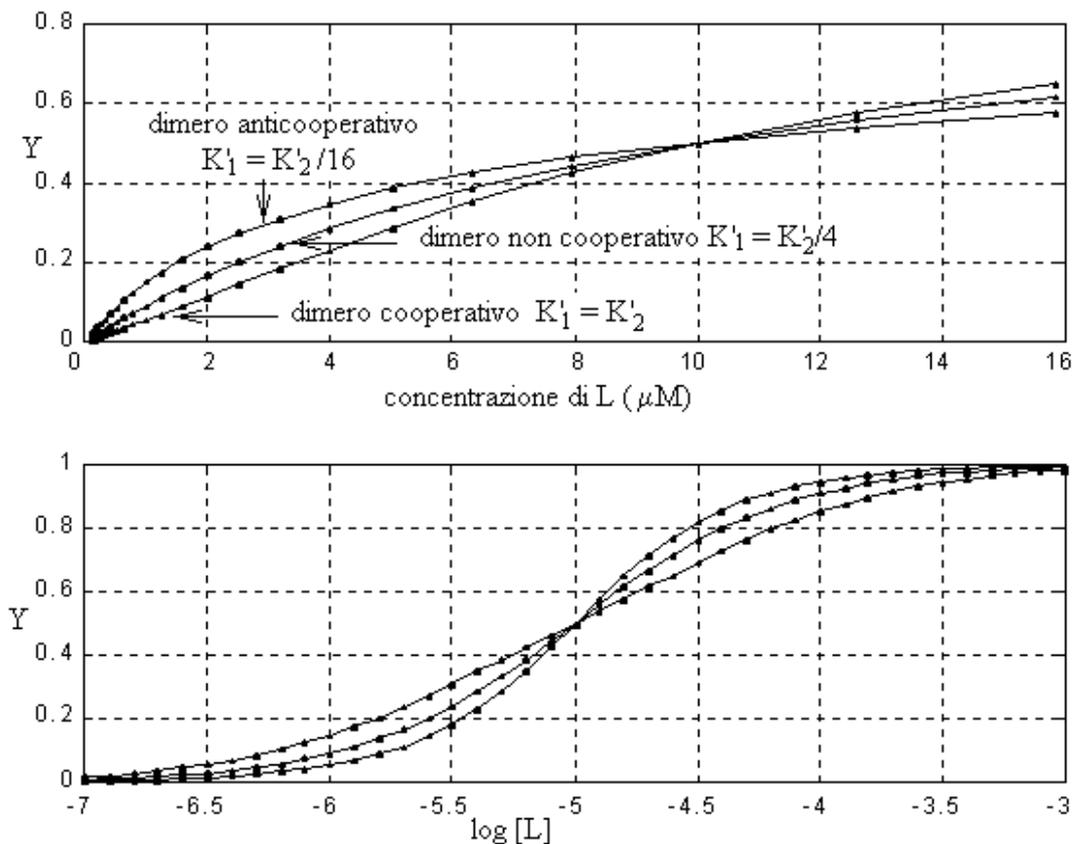
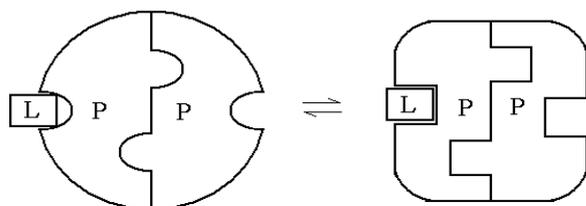


figura 5: isoterme di equilibrio per 3 proteine dimeriche non cooperativa, cooperativa e anticooperativa

1b) **Siti simmetrici cooperativi:** l'affinità del secondo sito per il legante è maggiore di quella del primo sito ($K_2 < K_1$; $K'_2 / K'_1 < 4$); i due siti sono **cooperativi**. Questo caso, che è frequente, non consente di semplificare l'eq. [15] che va usata così com'è; il grafico di Y in funzione di [L] è una sigmoide asimmetrica, quello di Y in funzione di $\log[L]$ è una sigmoide simmetrica più ripida di quella osservata nel caso precedente (cioè è richiesta una variazione più piccola della scala di $\log[L]$ per ottenere la stessa variazione di Y rispetto al caso 1a; si veda la fig.5).

La cooperatività è importante in biologia perché amplifica la risposta della proteina a piccole variazioni di concentrazione del ligando (ad es. un recettore potrebbe rispondere con un cambiamento conformazionale del tutto o nulla all'aumento della concentrazione del mediatore corrispondente). Sebbene sembri un meccanismo assai complesso, la base della sua spiegazione sta nella simmetria della macromolecola cooperativa rispetto ai suoi monomeri (fig. 6):

La cooperatività è un riflesso della simmetria in un sistema proteico polimerico (almeno dimerico) stabile in due conformazioni stereochimiche distinte e alternative.



Se la prima molecola di ligando che si lega modifica il sito di legame per renderlo più idoneo in senso stereochimico, questo si riflette anche sul sito non legato, migliorandone la complementarietà stereochimica col ligando, grazie alla simmetria della molecola.

Figura 6: effetto del ligando sulla struttura di un dimero cooperativo simmetrico

1c) **Siti simmetrici anticooperativi:** l'affinità del secondo sito per il legante è minore di quella del primo sito ($K_2 > K_1$; $K'_2 / K'_1 > 4$); i due siti sono detti **anticooperativi**.

Non solo questo caso non consente nessuna semplificazione, come il precedente, ma è anche difficilmente distinguibile dal prossimo caso 2, dei siti non simmetrici. Nell'ambito delle macromolecole questo caso è forse più raro dei due precedenti (1a e 1b); è invece frequente nelle piccole molecole simmetriche; ad esempio applica alla dissociazione degli acidi diprotici quali l'ossalico o il succinico.

Una proprietà interessante di questi sistemi è la seguente: la concentrazione di legante necessaria per ottenere la semisaturazione della proteina (L_{50}) è pari alla media geometrica delle costanti di dissociazione (è inoltre evidente che le costanti apparenti K'_n e le costanti intrinseche K_n hanno la stessa media geometrica). Quando una proteina ha più di due siti di legame per lo stesso legante, può accadere che la sigmoide di saturazione che descrive la variazione di Y in funzione di $\log[L]$ non sia simmetrica. In questo caso si definisce un ulteriore parametro, L_m o $[L]_m$, che rappresenta la concentrazione di legante necessaria a promuovere la metà della transizione energetica (DG). La L_m in genere è prossima alla L_{50} ed è uguale alla media geometrica delle costanti di dissociazione.

caso 2: dei siti non simmetrici.

Questo caso è anch'esso frequente ed è quello di proteine monomeriche che presentano due o più siti distinti per lo stesso legante (ad es. la calmodulina). Se i siti di legame sono indipendenti si ha semplicemente che le due costanti apparenti corrispondono a quelle intrinseche ($K_1=K'_1$ e $K_2=K'_2$) e la molecola si comporta come una miscela di due o più isoforme presenti alla stessa concentrazione; infatti per il legante i due siti sono non equivalenti. Se i siti di legame, oltre ad essere intrinsecamente distinti, sono anche cooperativi o anticooperativi il caso è di difficile soluzione e non può essere trattato in questa sede.

6. Alcuni metodi classici per lo studio della combinazione reversibile di una proteina con un legante

Il dettaglio metodologico delle determinazioni chimiche di [P], [L] e [P-L] esula dagli scopi di questo seminario; considero pertanto solo alcuni esempi paradigmatici. Si deve sottolineare che la costante di equilibrio dipende dalla temperatura e pertanto tutte le misurazioni devono essere effettuate a temperatura costante.

1) Tecniche gas manometriche

Se il legante è gassoso, si può procedere facilmente alla sua determinazione come segue: si equilibra la soluzione di proteina con il legante, si determina la pressione parziale del gas, si denatura la proteina (senza aprire il recipiente) e si determina nuovamente la pressione parziale del gas che risulterà aumentata per via del legante rilasciato dalla proteina denaturata. Il metodo determina con accuratezza $[L_{tot}]$ mentre [L] può essere calcolata dal coefficiente di solubilità del gas. Il principale difetto sta nel fatto che il metodo richiede quantità molto grandi di proteina; il parametro $[P_{tot}]$ ed il volume della soluzione devono essere determinati indipendentemente. E' stato usato nelle prime determinazioni delle isoterme di combinazione dell'emoglobina con l'ossigeno. Un metodo meno impegnativo consiste nell'aggiungere il gas ad una soluzione di proteina e determinare la frazione del complesso formato mediante spettroscopia (purché la combinazione dia luogo ad un cambiamento di assorbenza).

2) Equilibrio di dialisi

Se il legante attraversa facilmente i pori di un tubo da dialisi si può dializzare la proteina in una soluzione di legante e determinare la concentrazione del legante dentro e fuori del tubo da dialisi chimicamente o avendo l'accortezza di usare legante radioattivo. La concentrazione di legante nel liquido di dialisi corrisponde a [L], quella all'interno del tubo a $[L_{tot}]$. Il metodo è preciso, ma richiede tempi piuttosto lunghi per consentire l'equilibrio tra il contenuto del tubo ed il liquido di dialisi. Qualora il legante sia una molecola carica e la soluzione sia povera di ioni occorre tener conto del possibile effetto Donnan, perché la carica elettrica netta della proteina segregata nel tubo da dialisi attrae gli ioni di carica opposta e respinge quelli con carica uguale; come conseguenza, in questo caso $[L]_{interno}$ è diverso da $[L]_{esterno}$ (forse in questo caso è meglio usare direttamente un altro metodo).

3) Metodi spettroscopici

I metodi spettroscopici, quando sono applicabili, risultano di gran lunga i più convenienti per rapidità ed

economia di materiale. Perché si possano applicare occorre che la proteina o il legante diano un segnale spettroscopico e che questo segnale vari in funzione del loro stato libero o legato. Il segnale può essere qualunque: di assorbimento, fluorescenza, dicroismo circolare, etc. ed il ricercatore deve conoscere la legge che correla il segnale alla concentrazione del cromoforo.

Per semplicità descriverò soltanto il seguente caso: la proteina ha un assorbimento e questo varia in relazione al fatto che sia o non sia combinata con il legante; il legante libero non ha assorbimento nell'intervallo di lunghezze d'onda esaminato. La legge che correla l'assorbimento alla concentrazione del cromoforo è quella di Lambert e Beer: $OD_1 = \epsilon_1 l c$ (la densità ottica alla lunghezza d'onda l è proporzionale al coefficiente di estinzione a quella lunghezza d'onda, alla lunghezza del percorso ottico in centimetri e alla concentrazione del cromoforo). Nel nostro caso alla densità ottica della soluzione contribuiscono due specie colorate, P e P-L, con diverso coefficiente di estinzione; pertanto:

$$OD_1 = l (\epsilon_{1,P} [P] + \epsilon_{1,P-L} [P-L]) \quad [18]$$

Definendo $\Delta\epsilon = \epsilon_{1,P-L} - \epsilon_{1,P}$ e combinando l'eq. [18] con la [2] otteniamo:

$$OD_1 = l (\epsilon_{1,P} ([P_t] - [P-L]) + \epsilon_{1,P-L} [P-L]) = l (\Delta\epsilon [P-L] + \epsilon_{1,L} [P_t]) \quad [19]$$

L'eq. [19] dimostra come la densità ottica della soluzione sia direttamente proporzionale a $[P-L]$ (o, con ragionamento analogo, a $[P]$). Il valore di $[L]$ deve essere calcolato sottraendo $[P-L]$ da $[L_{tot}]$, ed è in genere preferibile condurre l'esperimento nella condizione $[P_{tot}] \ll K_d$ che comporta $[L] \approx [L_t]$. pertanto una titolazione condotta con questo metodo si presenterà come un grafico di $[P-L]$ in funzione di $[L]$ o di $\log[L]$ moltiplicato per il termine $l \Delta\epsilon$ e sommato alla costante $\epsilon_{1,L} [P_t]$.

I metodi spettroscopici presentano una difficoltà importante: alcune proteine nella combinazione con il legante cambiano la loro conformazione sterica e di conseguenza il loro coefficiente di estinzione; quando la proteina è polimerica e lega più molecole di legante la proporzionalità diretta tra OD e $[P-L]$ implicata nell'eq. [18] potrebbe venir meno. Pertanto se è necessario effettuare determinazioni rigorose occorre dimostrare empiricamente la validità dell'eq. [18] confrontando il risultato di una titolazione spettroscopica con una effettuata con i metodi precedentemente descritti, o effettuando la misura nella condizione di $[P_{tot}] \gg K_d$, che consentirà di valutare la linearità tra segnale spettroscopico e combinazione del legante.

4) Calorimetria

Da quanto detto fin qui si evince che qualunque generico segnale a carico del legante o della proteina che distingue L da P-L o P da P-L può essere utilizzato per stimare la frazione di P-L in funzione della variazione di concentrazione di uno o di entrambi i reagenti (P_{tot} ed L_{tot}) e conseguentemente per stimare la costante di equilibrio e la stechiometria. I metodi diretti di determinazione sono numerosi e l'elenco presentato non ambisce ad essere completo ma esemplificativo; nomino ancora la calorimetria differenziale, che misura il calore rilasciato o assorbito nella formazione o rottura del legame, e pertanto è sensibile non alla concentrazione di P-L ma alla sua formazione in seguito all'aggiunta di legante o di proteina.

5) Metodi indiretti

Quando non è facilmente disponibile un segnale che distingue il legante legato dal legante libero o la proteina legata dalla proteina libera, si può spesso ricorrere a metodi di determinazione indiretti. Questi in genere misurano la frazione di proteina legata sfruttando la sua diversa attività biologica. Si consideri a titolo di esempio il caso di un inibitore dell'attività enzimatica che non dia segnale spettroscopico né nella forma libera né in quella legata all'enzima. Se si dispone di un saggio di attività enzimatica si può testare l'attività dell'enzima in presenza di varie concentrazioni dell'inibitore e ricavare da queste una stima di quale frazione dell'enzima sia inibito (cioè combinato con l'inibitore; in breve quale frazione dell'enzima si trovi nello stato che abbiamo finora definito P-L). I metodi indiretti sono molto potenti perché estendono la possibilità di effettuare misure a coppie proteina-legante che sarebbero altrimenti difficilmente esplorabili; sono però estremamente delicati da maneggiare perché la presenza del legante potrebbe influenzare il saggio accoppiato. Per rimanere nel tema del nostro esempio, se l'inibitore è perfettamente non competitivo, la frazione $[P-L]/[P_{tot}]$,

che in questo caso dovremmo più propriamente indicare come $[E-I]/[E_{tot}]$ non è influenzata dalla presenza del substrato nel saggio di attività. Per contro se l'inibitore è competitivo, la frazione $[E-I]/[E_{tot}]$ è maggiore in assenza del substrato e pertanto, almeno in teoria, è influenzata dal saggio che viene applicato per rivelarla.

7. EQUILIBRIO DI PARTIZIONE TRA DUE LIGANDI

Un equilibrio di partizione si stabilisce quando la proteina è in soluzione insieme a due ligandi competitivi. Il caso è frequente nei sistemi biologici e nelle applicazioni farmacologiche: enzima, substrato e inibitore; recettore, agonista e antagonista; etc.

L'equilibrio segue lo schema di reazione:



Se la concentrazione dei ligandi è elevata rispetto alla loro K_d , si può assumere che la concentrazione della proteina non legata (P) sia trascurabile; ovvero:

$$[P] \approx [P-L_1] + [P-L_2]$$

La costante di equilibrio, definita costante di partizione risulta:

$$K_p = \frac{[P-L_2][L_1]}{[P-L_1][L_2]} = \frac{[L_1][P]}{[P-L_1]} \frac{[P-L_2]}{[L_2][P]} = \frac{K_{d,1}}{K_{d,2}} \quad [20]$$

In genere l'esperimento viene condotto mantenendo costante la concentrazione di un ligando (ad es. L_2) e variando sistematicamente quella dell'altro (ad es. L_1). Se la concentrazione di entrambi i ligandi è elevata rispetto a quella della proteina (cioè se la quantità di L_2 rilasciato nel corso dell'esperimento è trascurabile), si assume $[L_2]_{free} = \text{costante}$ e si scrive:

$$K_{app} = K_p [L_2] = \frac{[P-L_2][L_1]}{[P-L_1]} \quad [21]$$

L'eq. 21 è analoga alla [1] e con procedimento molto simile a quello già presentato si può derivare la frazione di proteina presente nella forma di complesso con il ligando a concentrazione variabile:

$$\frac{[P-L_1]}{[P]} = \frac{[L_1]}{K_{app} + [L_1]} \quad [22]$$

Se la costante di dissociazione di uno dei due ligandi è nota, l'eq. 20 consente di ricavare l'altra dalla costante di partizione.

Il termine costante K_{app} in questo esperimento è analogo alla costante di dissociazione del complesso dell'eq. 1, ma può essere controllato a piacere dallo sperimentatore che sceglie la concentrazione di L_2 in funzione delle necessità dell'esperimento. Questo è molto importante quando l'affinità della proteina per il ligando variabile L_1 è molto alta: infatti facendo competere L_1 con una elevata concentrazione di L_2 , si portano le concentrazioni di P ed L_1 in un intervallo accessibile allo strumento di misura utilizzato. Ad esempio, se si avessero i seguenti valori: $K_{d,1} = 10^{-6}$ M; $K_{d,2} = 10^{-4}$ M, $K_p = 10^{-2}$, un equilibrio di dissociazione del complesso $P-L_1$ nella condizione ideale $[P] \ll [L_{1,t}]$ richiederebbe concentrazioni nanomolari di proteina e micromolari di L_1 , probabilmente difficili da rivelare; facendo competere L_1 con 10 mM L_2 la concentrazione di L_1 necessaria per saturare il 50% della proteina presente sarebbe pari a $K_{app} = K_p [L_2] = 10^{-4}$ M; inoltre questo consentirebbe di lavorare con concentrazioni micromolari di proteina.

Per quale motivo si ricorre agli esperimenti di competizione tra ligandi? La prima ragione, come già dimostrato è quella di determinare affinità molto elevate (K_d molto basse) che sarebbe difficile investigare altrimenti; ed è necessario in questi casi porre speciale attenzione al raggiungimento delle condizioni di equilibrio dopo ogni aggiunta di ligando. Un'altra ragione è quella di utilizzare un ligando non interessante, ma capace di dare un segnale spettroscopico o di altro tipo per determinare l'affinità di un ligando interessante ma che non dia segnale.

8. LINKED FUNCTIONS

Mentre nel caso precedente abbiamo considerato l'equilibrio di una proteina con due ligandi che competono per lo stesso sito di legame, in questo caso consideriamo l'equilibrio di una proteina con due ligandi che si combinano con siti di legame diversi. Questo accade frequentemente: quasi tutti gli enzimi legano ioni idrogeno e altri effettori oltre al substrato e lo stesso vale per l'emoglobina.

Lo schema di reazione è il seguente:

Le costanti di equilibrio sono:

$$K_L = [P] [L] / [PL] \quad [23]$$

$$K_M = [P] [M] / [PM] \quad [24]$$

$${}^M K_L = [PM] [L] / [PLM] \quad [25]$$

$${}^L K_M = [PL] [M] / [PLM] \quad [26]$$

Il sistema costituisce un "quadrato termodinamico", per il quale vale la relazione:

$${}^L K_M K_L = {}^M K_L K_M \quad [27]$$

La formula indica che le due strade che portano da (PLM) a (P + L + M) sono termodinamicamente equivalenti (e se fosse altrimenti sarebbe violato il primo principio della termodinamica); può essere dimostrata in vari modi, il più semplice dei quali è:

$$[PL] [M] / [PLM] \times [P] [L] / [PL] = [P] [L] [M] / [PLM] = [PM] [L] / [PLM] \times [P] [M] / [PM]$$

La [26] indica che date tre delle costanti di equilibrio risulta automaticamente determinata anche la quarta e quindi che tre costanti devono essere sufficienti per definire il sistema; useremo nel trattamento che segue le costanti [23], [24] e [26]. Definiamo le concentrazioni delle varie specie della proteina in funzione di P (proteina non legata) come segue:

$$[PL] = [P] \times [L] / K_L$$

$$[PM] = [P] \times [M] / K_M$$

$$[PLM] = [PL] \times [M] / {}^L K_M = [P] \times [M] / {}^L K_M \times [L] / K_L$$

La proteina totale risulta quindi:

$$\begin{aligned} [P_{tot}] &= [P] (1 + [L]/K_L + [M]/K_M + [M]/{}^L K_M \times [L]/K_L) \\ &= [P] (K_M K_L {}^L K_M + [L] K_M {}^L K_M + [M] K_L {}^L K_M + [M] [L] K_M) / K_M K_L {}^L K_M \end{aligned}$$

Ciò che si vuole considerare è l'azione dell'effettore allosterico M sul ligando principale L; la frazione di saturazione rispetto ad L risulta:

$$\begin{aligned} ([PL] + [PLM]) / [P_{tot}] &= ([L] K_M {}^L K_M + [M] [L] K_M) / (K_M K_L {}^L K_M + [L] K_M {}^L K_M + [M] K_L {}^L K_M + [M] [L] K_M) \\ &= [L] K_M ({}^L K_M + [M]) / [{}^L K_M K_L (K_M + [M]) + [L] K_M ({}^L K_M + [M])] \end{aligned}$$

Se $([PL] + [PLM]) / [P_{tot}] = Y = 0,5$ si ha:

$$[L]_{50} K_M ({}^L K_M + [M]) = {}^L K_M K_L (K_M + [M])$$

$$\begin{aligned} [L]_{50} &= {}^L K_M K_L (K_M + [M]) / K_M ({}^L K_M + [M]) = K_L [({}^L K_M K_M + {}^L K_M [M]) / (K_M {}^L K_M + K_M [M])] = \\ &= K_L [(1 + [M] / K_M) / (1 + [M] / {}^L K_M)] \end{aligned}$$

Si nota in questa equazione che:

se $[M] = 0$ si ha, come atteso, $[L]_{50} = K_L$

se $[M] \gg K_M$ e $[M] \gg {}^L K_M$ si ha $[L]_{50} = K_L ({}^L K_M / K_M)$ questo comporta che:

se ${}^L K_M > K_M$ (in presenza di L la proteina ha minore affinità per M) $[L]_{50} > K_L$ (M sfavorisce L)

se ${}^L K_M < K_M$ (in presenza di L la proteina ha maggiore affinità per M) $[L]_{50} < K_L$ (M favorisce L)