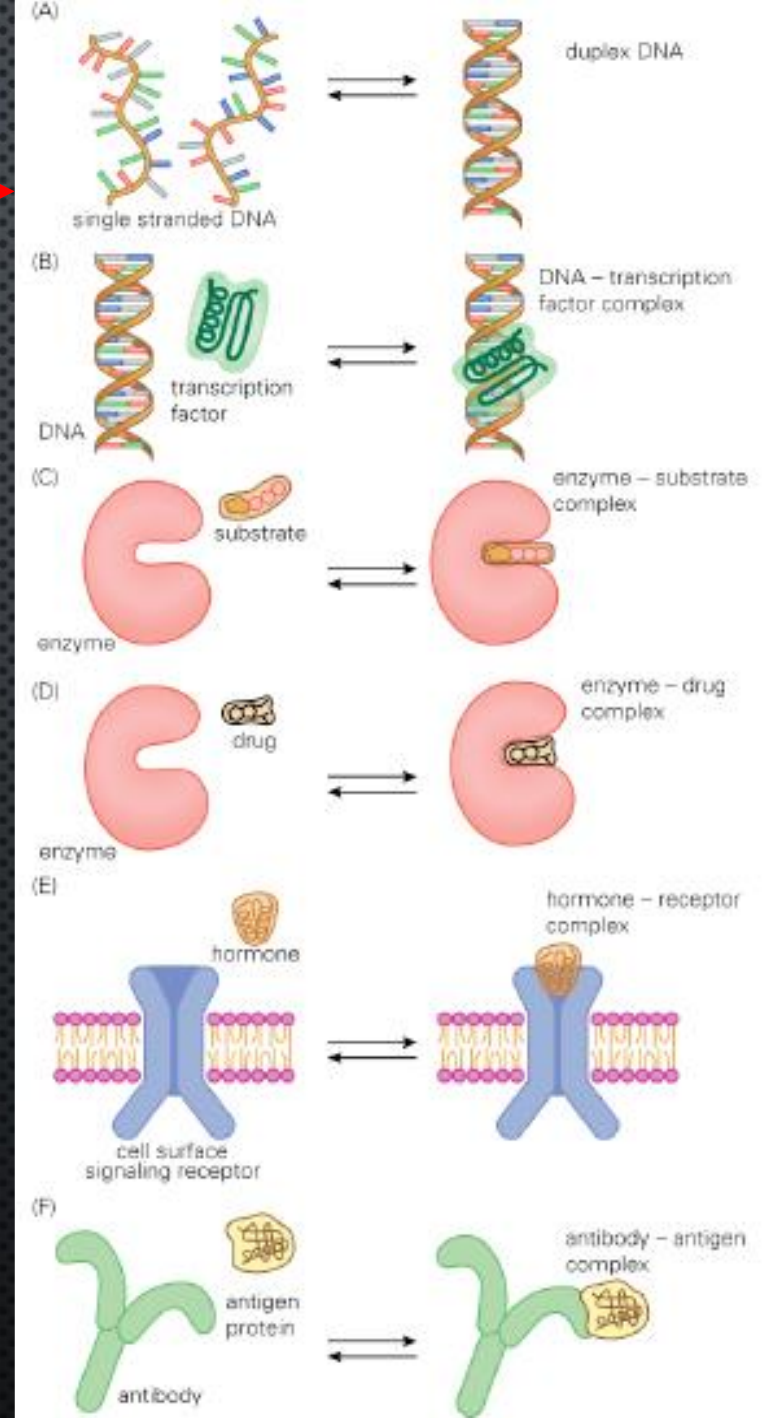


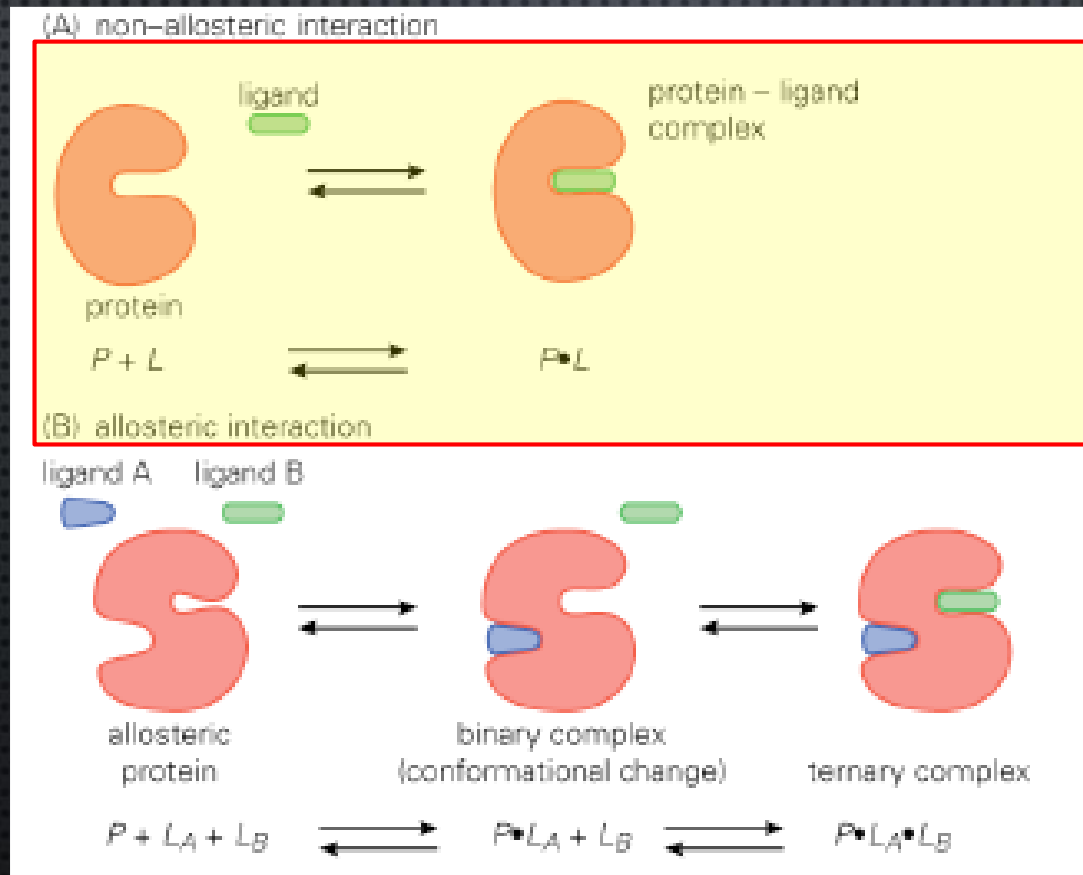
## AFINITET I SPECIFIČNOST

- **molekulsko prepoznavanje** predstavlja osnovu odvijanja većine esencijalnih bioloških procesa (enzimske reakcije, stanična signalizacija, replikacija DNA, ...)
- najčešće se zasniva na **nekovalentnim interakcijama** - zašto?
- pod pojmom **ligand** najčešće podrazumijevamo „malu“ molekulu koja se veže na biomakromolekulu koju nazivamo **receptorom**
- vezanje liganda na receptor karakterizira **afinitet** (vdW) i **specifičnost** (H-veze) - **objasni**



# MOLEKULSKO PREPOZNAVANJE

- vezanje liganda i receptora može biti praćeno alosteričkim efektom, mi ćemo se, za sada, ograničiti na situacije bez alosterije



## MOLEKULSKO PREPOZNAVANJE

- **afinitet** liganda prema receptoru (ili obrnuto) najčešće se kvantitativno izražava **konstantom disocijacije** ( $K_d$ ) koja je recipročna konstanti asocijacije ( $K_A$ )



$$K_A = \frac{[P \cdot L]}{[P][L]}$$

$$K_D \text{ (dissociation constant)} = \frac{[P][L]}{[P \cdot L]} = \frac{1}{K_A}$$

- iz konstante disocijacije (ili asocijacije) lako se može izračunati slobodna energija vezanja liganda na receptor:

$$\Delta G_{bind}^{\circ} = -RT \ln K_A$$

$$\Delta G_{bind}^{\circ} = +RT \ln K_D$$

## MOLEKULSKO PREPOZNAVANJE

### IZVOD ZA $\Delta G^\circ = -RT \ln K$ preko statističke termodinamike!!

- iako je konstanta ravnoteže formalno **bezdimenzijska veličina**, u praksi se često izražava u **molarnim jedinicama!**
- formalni izraz za konstantu ravnoteže (konkretno disocijacije kompleksa protein-ligand) jest:

$$K_D = \frac{\frac{[P]}{[P]^\circ} \frac{[L]}{[L]^\circ}}{\frac{[P \cdot L]}{[P \cdot L]^\circ}}$$

$[P]^\circ, [L]^\circ, [P \cdot L]^\circ$  - standardne koncentracije i iznose 1 mol/dm<sup>3</sup>

- što implicira:

$$K_D = \left( \frac{[P \cdot L]^\circ}{[P]^\circ [L]^\circ} \right) \frac{[P][L]}{[P \cdot L]} = \left( \frac{[P \cdot L]^\circ}{[P]^\circ [L]^\circ} \right) K_D^*$$

$$K_D^* = \left( \frac{[P][L]}{[P \cdot L]} \right)$$

# MOLEKULSKO PREPOZNAVANJE

- u praksi koristimo molarnu konstantu ravnoteže (ponekad se naziva pseudokonstantom):

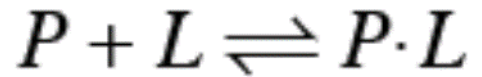
$$K_D^* = \left( \frac{[P][L]}{[P \cdot L]} \right)$$

te **afinitet** proteina za ligand izražavamo **jedinicama koncentracije**

- u praksi, vezanje koje karakteriziraju **nanomolarne** (ili čak **pikomolarne**) konstante disocijacije smatra vezanjem **velikog afiniteta**, dok se vezanjem vrlo slabog afiniteta smatra vezanje koje karakteriziraju **milimolarne konstante**

Type of Interaction	$K_D$ (molar)	$\Delta G_{bind}^0$ (at 300K) kJ mol <sup>-1</sup>
Enzyme:ATP	$\sim 1 \times 10^{-3}$ to $\sim 1 \times 10^{-6}$ (millimolar to micromolar)	-17 to -35
signaling protein binding to a target	$\sim 1 \times 10^{-6}$ (micromolar)	-35
Sequence-specific recognition of DNA by a transcription factor	$\sim 1 \times 10^{-9}$ (nanomolar)	-52
small molecule inhibitors of proteins (drugs)	$\sim 1 \times 10^{-9}$ to $\sim 1 \times 10^{-12}$ (nanomolar to picomolar)	-52 to -69
biotin binding to avidin protein (strongest known non-covalent interaction)	$\sim 1 \times 10^{-15}$ (femtomolar)	-86

## MOLEKULSKO PREPOZNAVANJE



- $K_d$  odgovara koncentraciji liganda pri kojoj je **polovica** molekula receptora zasićena ligandom pri određenoj **temperaturi**

- **$f$  – frakcijska zasićenost**

$$f = \frac{[P \cdot L]}{[P] + [P \cdot L]}$$

- uvrštavanjem

$$[P \cdot L] = \frac{[P][L]}{K_d}$$

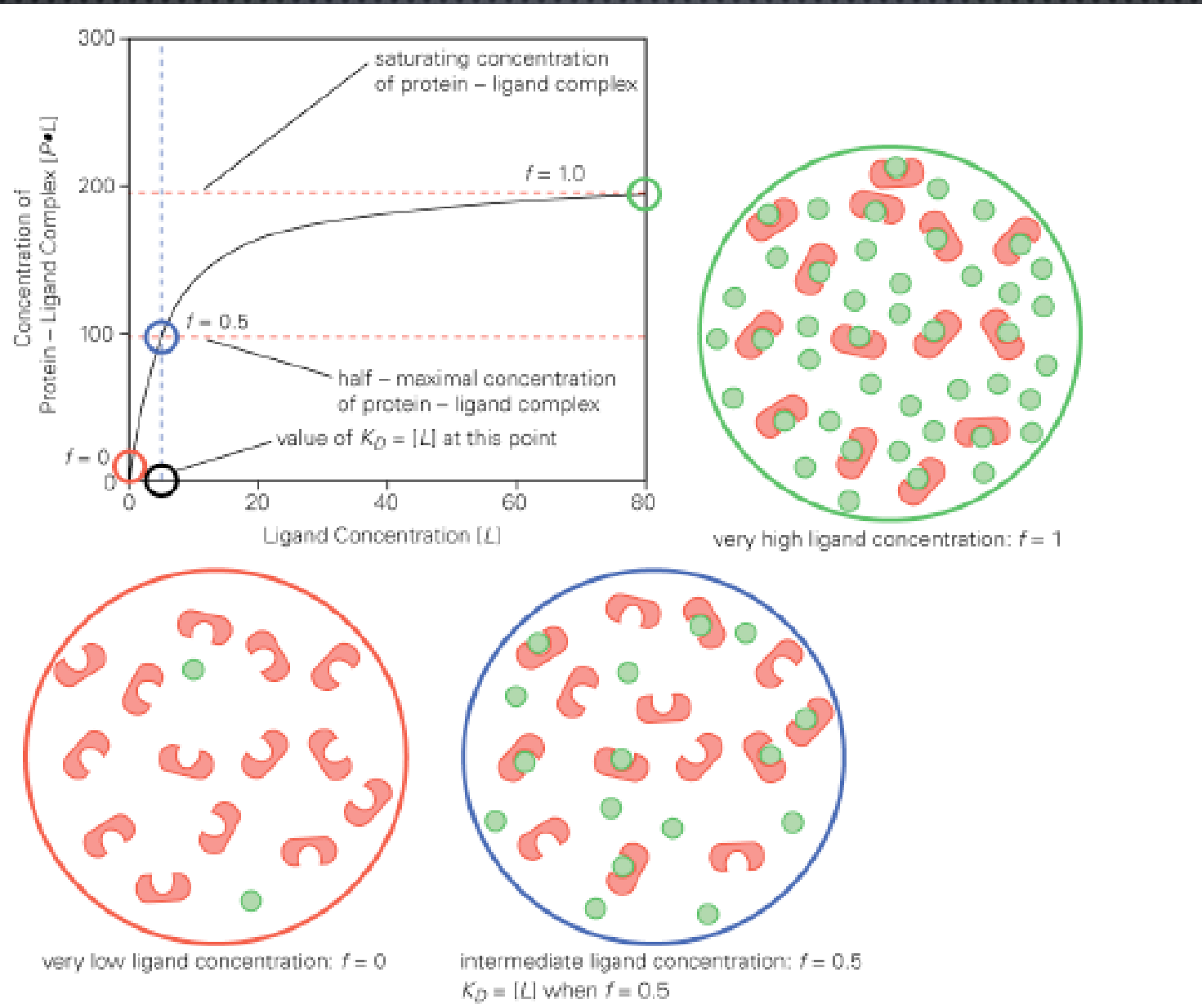
- izvod

- lako se može izvesti da je

$$f = \frac{[L]}{[L] + K_d}$$

- što implicira da je  **$f=1/2$**  u situaciji kada je koncentracija liganda **jednaka** konstanti disocijacije!

# MOLEKULSKO PREPOZNAVANJE



## MOLEKULSKO PREPOZNAVANJE

- iz krivulje ovisnosti frakcijske zasićenosti o koncentraciji liganda **može se odrediti konstanta disocijacije pri određenoj temperaturi**
- **odstupanje od hiperboličnog oblika** te krivulje upućuje na postojanje više mjesta vezanja liganda na receptor i eventualnog alosteričkog efekta
- za izvođenje takvih eksperimenata koriste se različite **metode** kojima se prati koncentracija slobodnog liganda u otopini (spektroskopske metode (UV, fluorescencija, NMR, ...), mikrokolorimetrija (ITC), ...) – **važno je da metoda razlučuje koncentraciju slobodne specije (liganda) od specije u kompleksu**



# MOLEKULSKO PREPOZNAVANJE

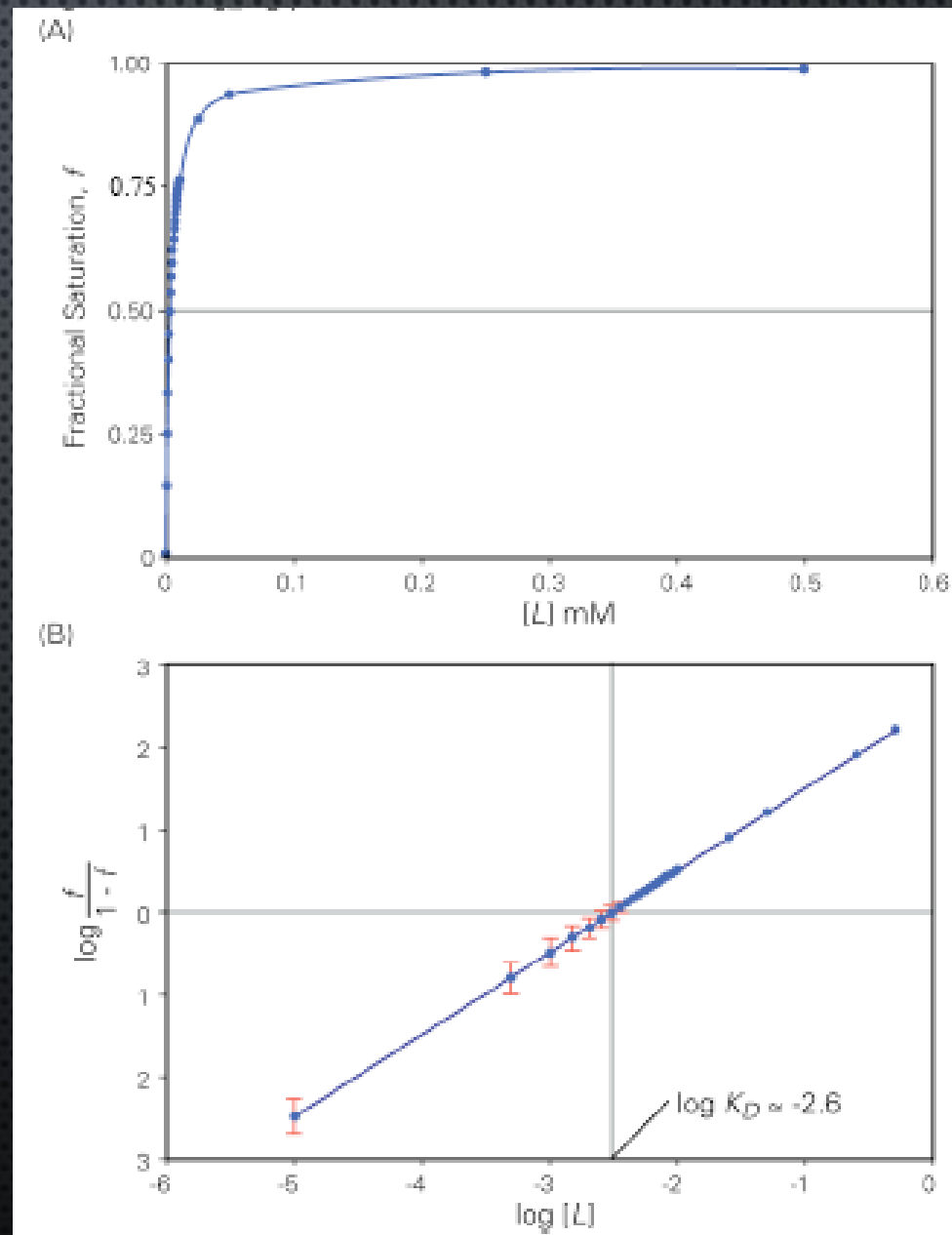
- radi preglednijeg prikaza i preciznijeg određivanja  $K_d$ , u praksi se često koristi **logaritamski prikaz**

## IZVOD

$$\log\left(\frac{f}{1-f}\right) = \log\left(\frac{[L]}{K_D}\right) = \log[L] - \log K_D$$

- iz **odsječka** pravca odredimo  $K_d$

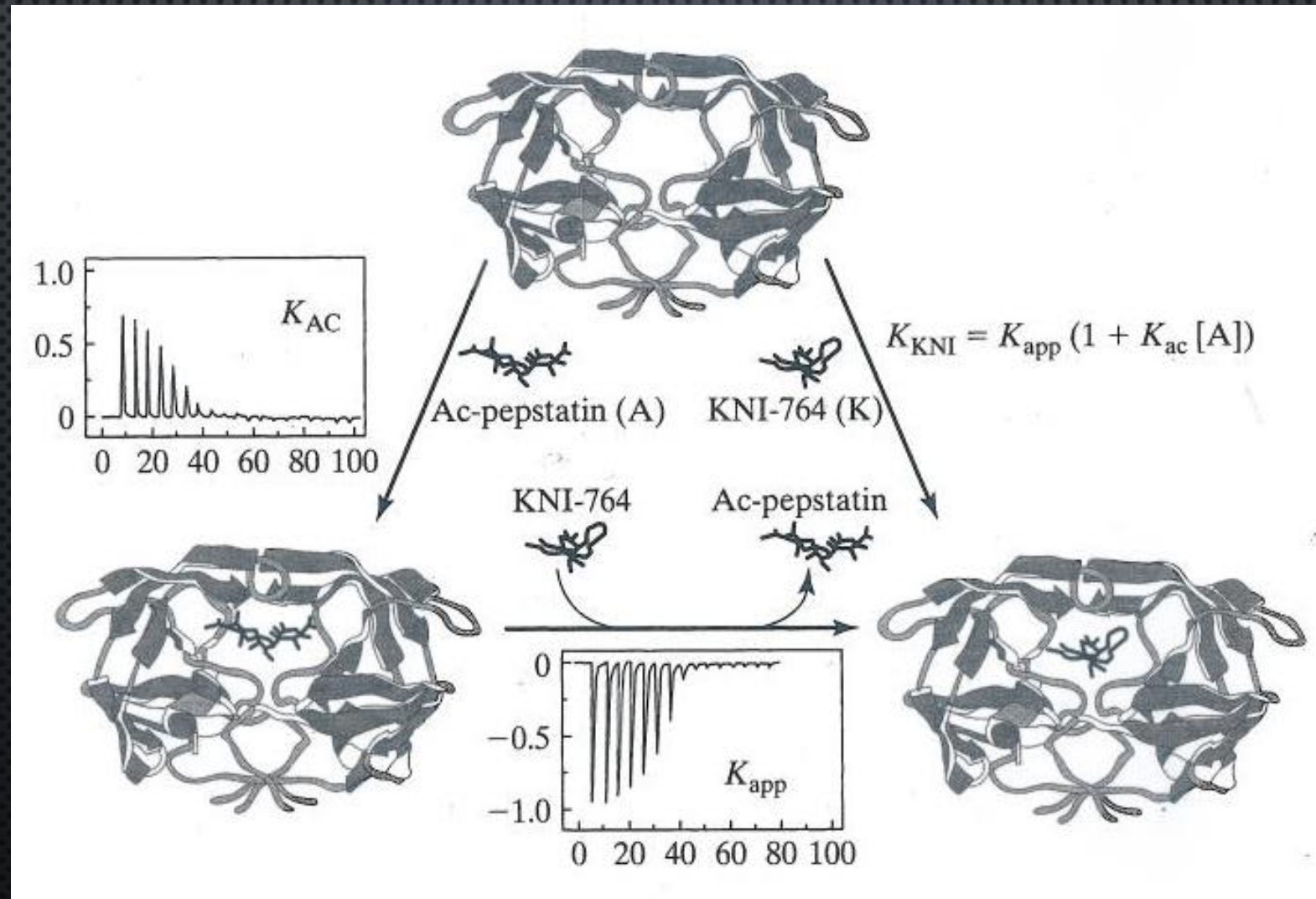
N.B. pri **niskim koncentracijama** liganda imamo **veliku pogrešku** mjerenja što se i vidi iz grafa



# MOLEKULSKO PREPOZNAVANJE

- ŠTO UČINITI KADA JE  $K_d$  PREMALA ZA DIREKTNO ODREĐIVANJE?

## KOMPETICIJSKI EKSPERIMENT



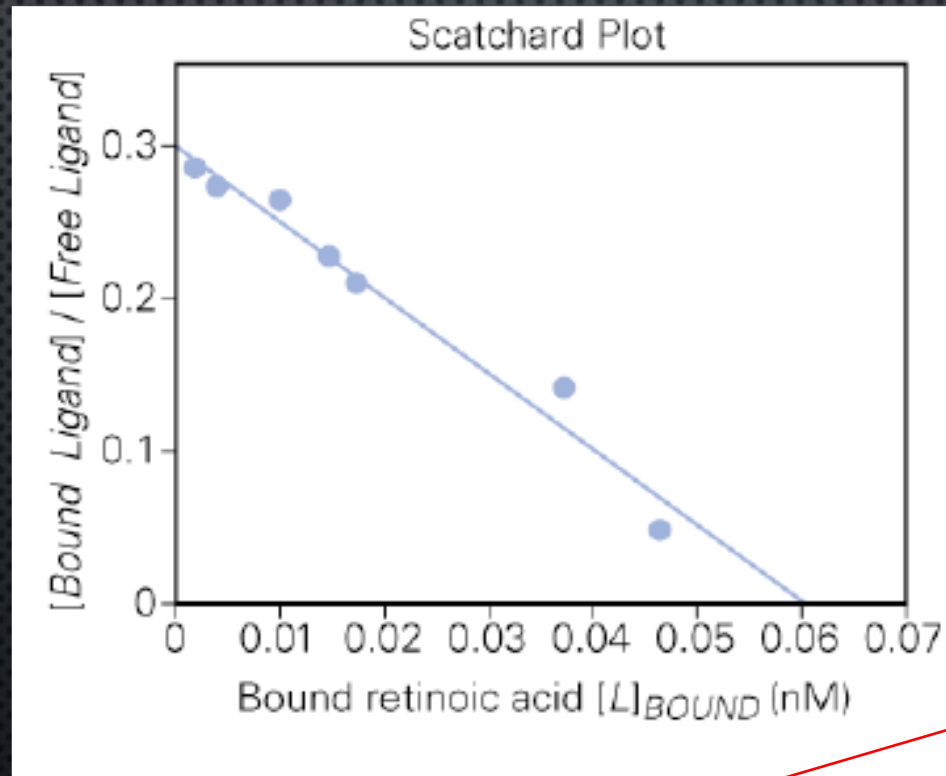
# MOLEKULSKO PREPOZNAVANJE

## SCATCHARDOVA analiza

$$\frac{[L]_{\text{BOUND}}}{[L]} = -\frac{1}{K_D} [L]_{\text{BOUND}} + \frac{[P]_{\text{TOTAL}}}{K_D}$$

prednost te analize je što **ne moramo znati točnu koncentraciju receptora** što je često zapreka

- **IZVOD**



$$\frac{[L]_{\text{BOUND}}}{[L]} = -\frac{1}{K_D} [L]_{\text{BOUND}} + \frac{[P]_{\text{TOTAL}}}{K_D}$$

- pratimo **ovisnost omjera vezanog i slobodnog liganda** o koncentraciji **vezanog liganda** te iz odsječka i nagiba takvog pravca odredimo **K<sub>D</sub>** i **ukupnu koncentraciju receptora**

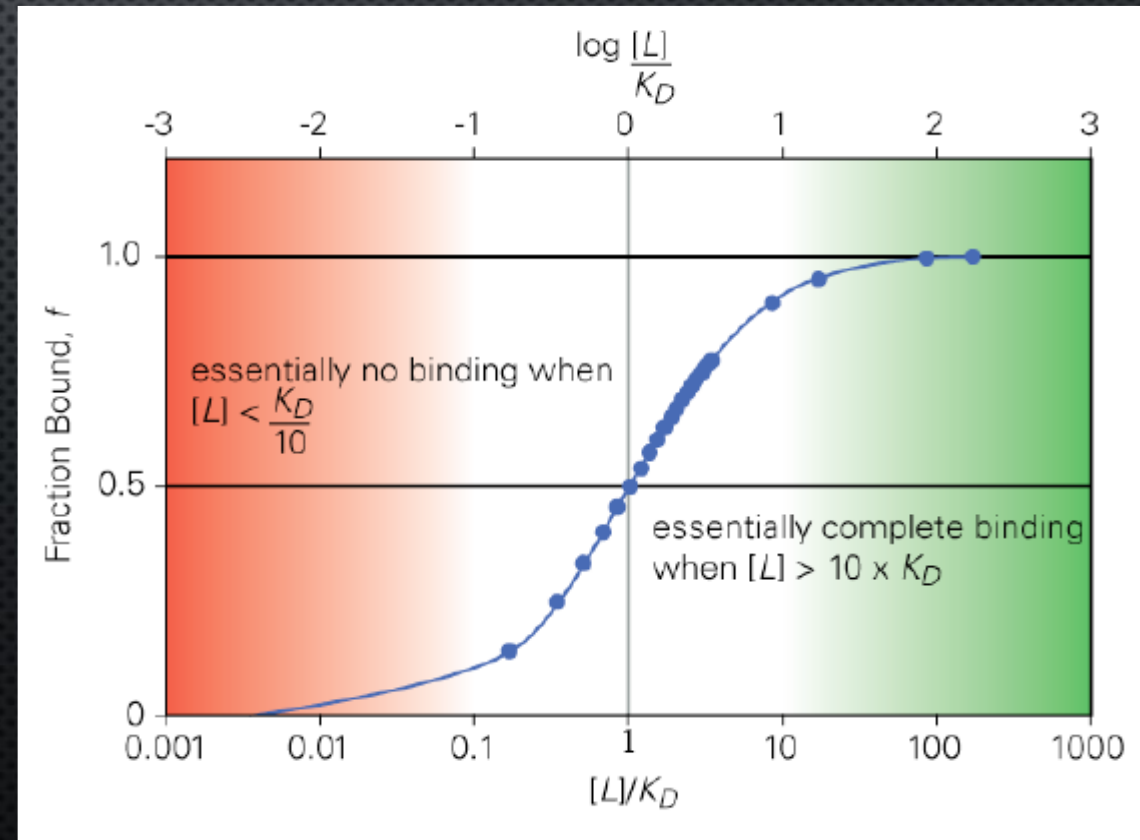
## MOLEKULSKO PREPOZNAVANJE

- iz vrijednosti  $K_D$  možemo procijeniti **koncentraciju liganda** potrebnu za **efektivno vezanje** na receptor
- ako je **koncentracija liganda 10 puta veća od  $K_D$** , oko 90% receptora je zasićeno ligandom

$$f = \frac{[L]}{[L] + K_D} = \frac{10 \times K_D}{10 \times K_D + K_D} = \frac{10}{11} = 0.91$$

- ako je **koncentracija liganda  $0,1 \times K_D$** , svega 10-tak posto receptora je zasićeno ligandom

$$f = \frac{0.1K_D}{K_D + 0.1K_D} = \frac{0.1}{1.1} = 11\%$$



## MOLEKULSKO PREPOZNAVANJE

### PRIMJER

Pretpostavimo da imamo supstancu (lijek) koja se veže na protein A, te time ostvaruje svoju ciljanu biološku aktivnost, ali se veže i na protein B, što je nuspojava.

- ako je  $K_d$  za vezanje na **protein A 1 nM**, a  $K_d$  za vezanje na **protein B 10  $\mu$ M**, procijenite koncentraciju supstance pri kojoj će protein A biti zasićen supstancom, dok će vezanje na protein B biti zanemarivo (uz pretpostavku da oba proteina imaju istu koncentraciju u otopini).

- pri **koncentraciji supstance od 0,1  $\mu$ M**, **protein A** bit će u potpunosti zasićen, dok će zasićenost **proteina B** biti svega 0.0001%

$$\frac{[L]}{K_D}$$

$$(0,1 \cdot 10^{-6}) / (10^{-9}) = 100 - \text{za A}$$

$$(0,1 \cdot 10^{-6}) / (10 \cdot 10^{-5}) = 0,01 - \text{za B}$$

- iz navedenog primjera je jasno zbog čega je za lijekove važan nanomolarni (ili veći) afinitet
- iz navedenog primjera vidi se i **povezanost afiniteta i specifičnosti!** (supstanca **velikog afiniteta** za neki receptor, vjerojatno, **ali ne i nužno**, imat će i **veliku specifičnost**)

