

## Tesna vezava ligandov

---

Pri klasičnih mehanizmih velja, da do vezave liganda prihaja ob znatnem prebitku le-tega nad akceptorjem  $[L]_t \gg [P]_t$ , torej velja približek  $[L] \approx [L]_t$ .

Pri tesni vezavi prihaja do tvorbe stabilnega kompleksa že pri koncentracijah  $[L]_t \approx [P]_t$ , zato  $[L] \neq [L]_t$ , ampak je  $[L]_t = [L] + [L]_{vezan}$  oz.  $[L]_t = [L] + [PL]$ .

Za tesno vezavo pogosto rečemo, da je na meji med reverzibilno in ireverzibilno. Dejansko je tesna vezava odvisna od eksperimentalnih pogojev, natančneje od razmerja med  $K$  (oz.  $K_d$ ) in  $[P]_t$ .

# Tesna vezava ligandov

Izpeljava enačbe za primer receptorja z enim vezavnim mestom:

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{([P]_t - [PL])([L]_t - [PL])}{[PL]}$$

$$K_d[PL] = ([P]_t - [PL])([L]_t - [PL])$$

$$K_d[PL] = [P]_t[L]_t - ([P]_t + [L]_t)[PL] + [PL]^2$$

$$0 = [PL]^2 - ([P]_t + [L]_t + K_d)[PL] + [P]_t[L]_t$$

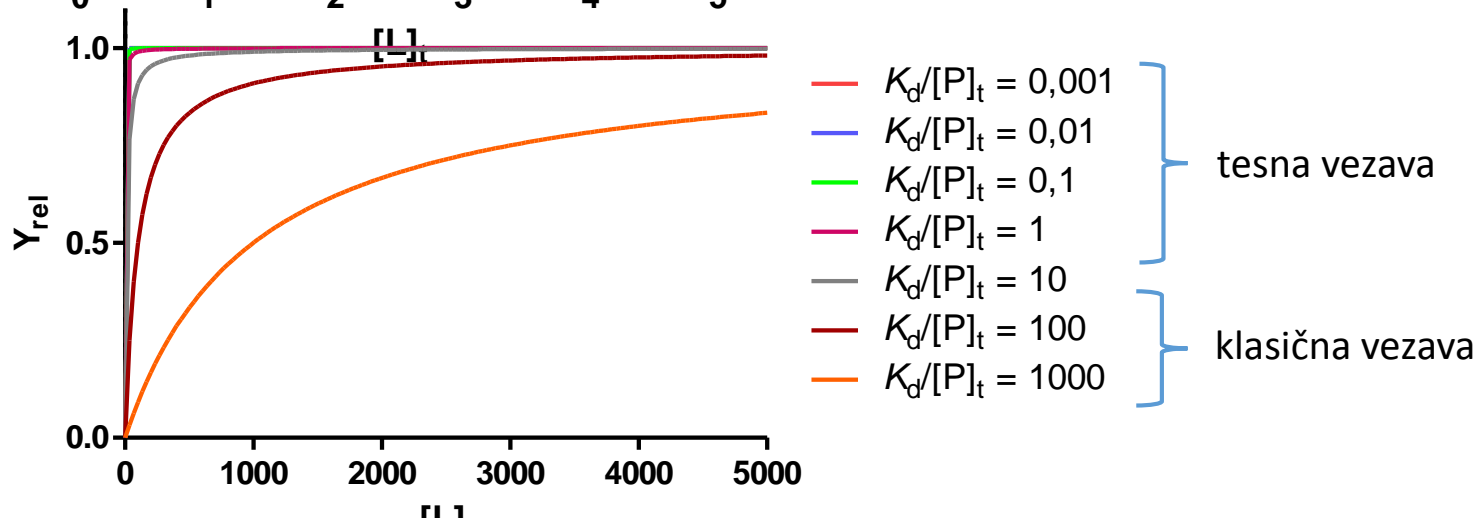
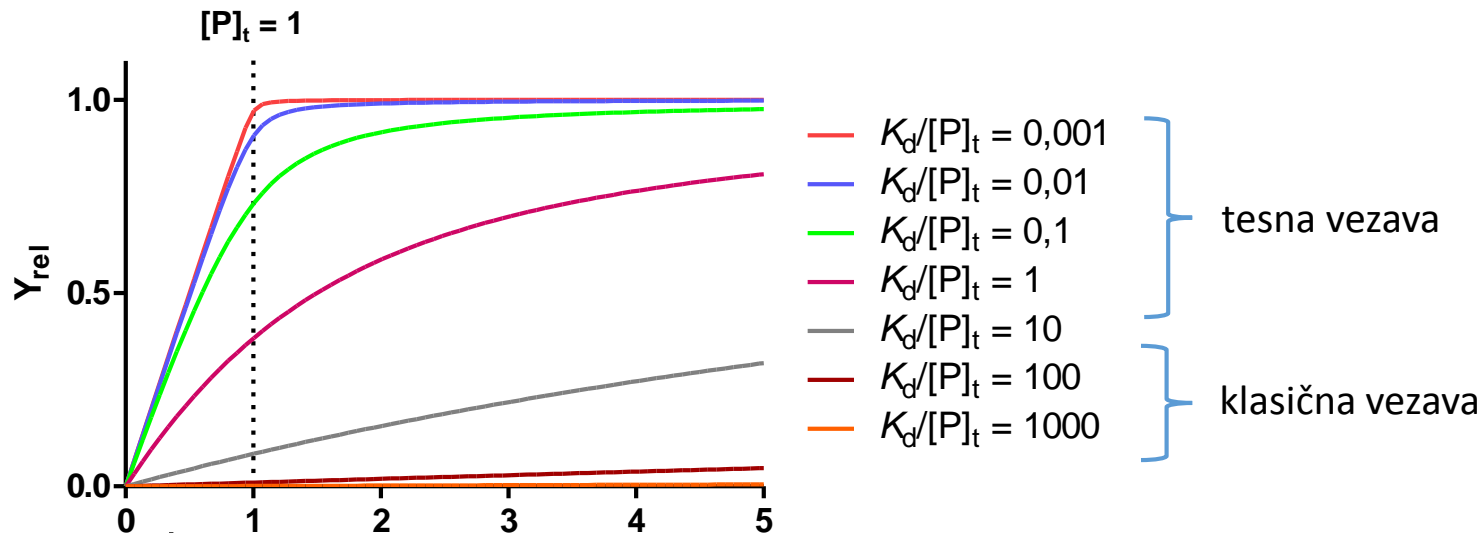
$$[PL] = \frac{[P]_t + [L]_t + K_d - \sqrt{([P]_t + [L]_t + K_d)^2 - 4[P]_t[L]_t}}{2}$$

le ena rešitev ima  
fizikalni pomen  
(opisuje nasičenje)

$$Y = \frac{[PL]}{[E]_t} = \frac{[P]_t + [L]_t + K_d - \sqrt{([P]_t + [L]_t + K_d)^2 - 4[P]_t[L]_t}}{2[E]_t}$$

# Tesna vezava ligandov

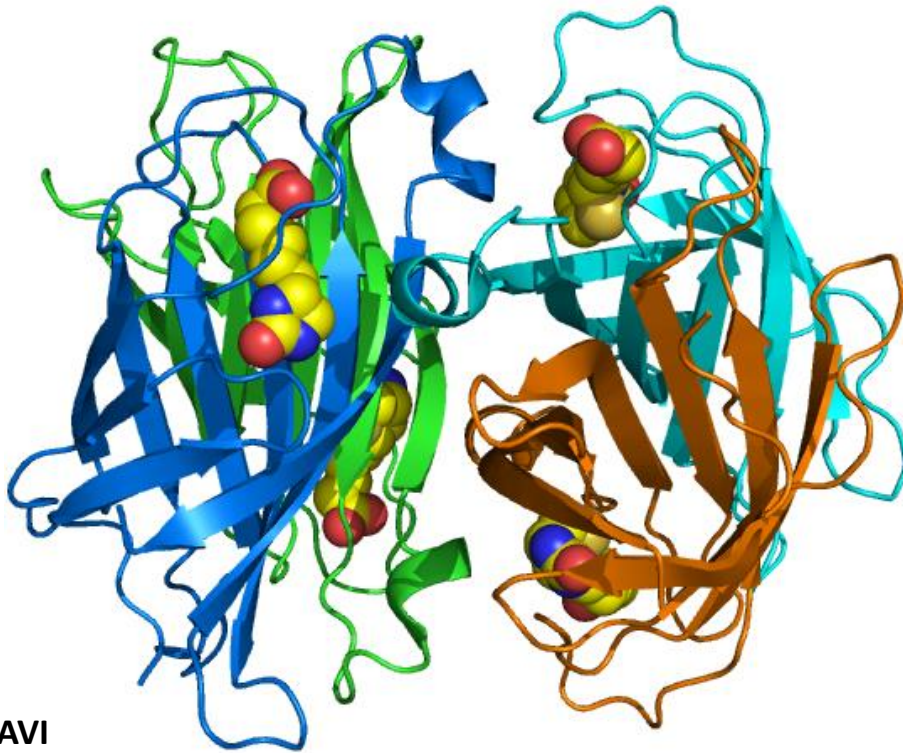
$$Y = \frac{[PL]}{[E]_t} = \frac{[P]_t + [L]_t + K_d - \sqrt{([P]_t + [L]_t + K_d)^2 - 4[P]_t[L]_t}}{2[E]_t}$$



# Tesna vezava ligandov

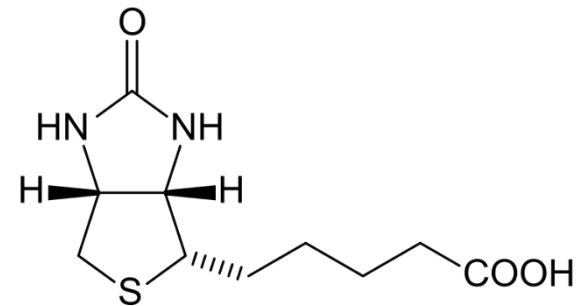
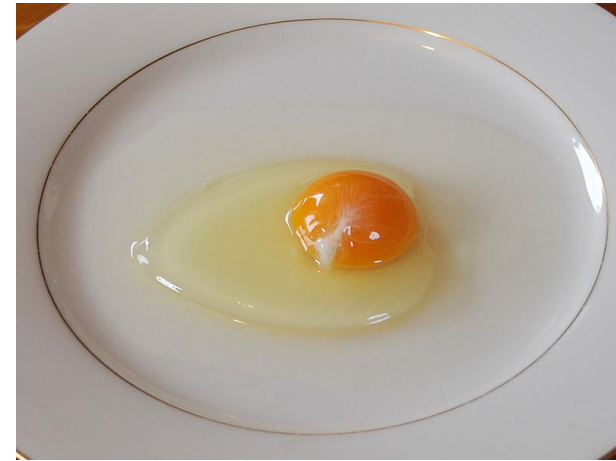
## Primer: avidin-biotin

Ena najmočnejših nekovalentnih interakcij v naravi. Avidin je tetramerni glikoprotein v ptičjih in plazilskih jajcih.



PDB 2AVI

$$K_d = 10^{-15} \text{ M}$$

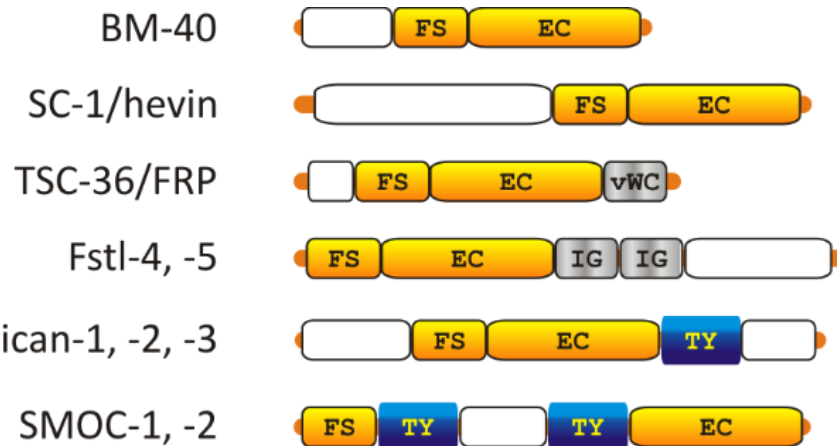


biotin (vitamin B<sub>7</sub>)

# Tesna vezava ligandov

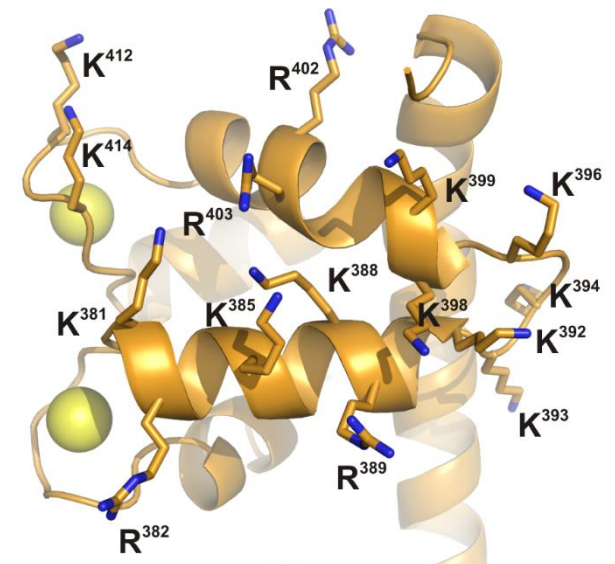
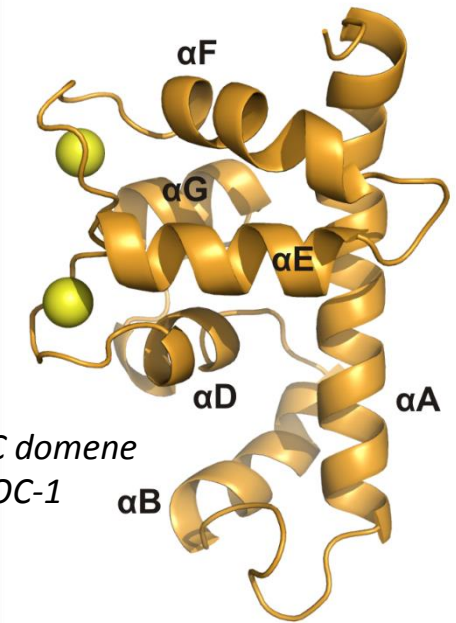
Primer: tesna vezava heparina na SMOC-1

Proteina SMOC spada v družino BM-40 matriceličnih proteinov.



Poravnava EC domen:

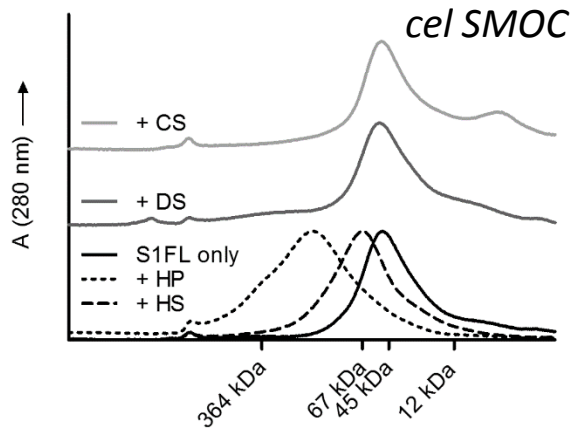
	$\alpha E$	$\alpha F$
SMOC-1	377-NDINK <b>KREMKPFKRYVKKKAKPKKCARR</b> FTDYCDL	
SMOC-2	365-GDIG <b>KKEIKPFKRFLRKKSKPKKCVKKFVEY</b> CDV	
BM-40	245-GYLSHTE LAPLR---APLIPMEHCTTRFFETCDL	
SC1	606-RVLTHSELAPLR---ASLVPMEHCITRFFEECDP	
TST-1	261-LLDPSEINAI-----YLDKYEPCKPLFNSCDS	
TST-2	263-LFLDQTE LA AI-----NLDKYEVCIRPFNFSCDT	
TST-3	263-LLDQSELRSI-----YLDKNEQCTKAFFNFSCDT	



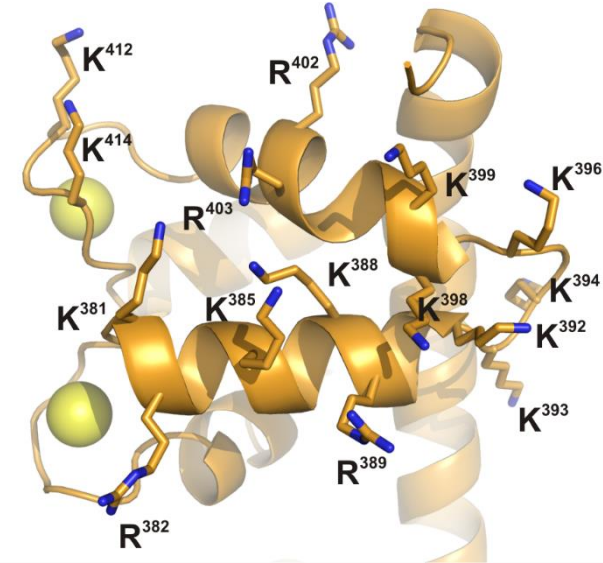
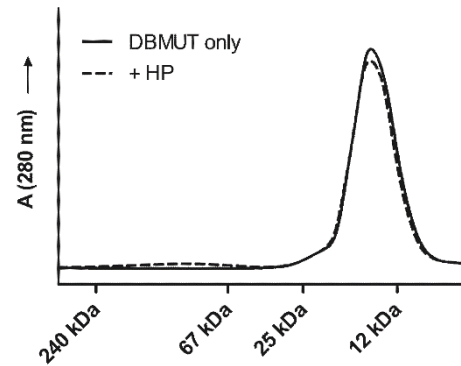
# Tesna vezava ligandov

## Primer: tesna vezava heparina na SMOC-1 – gelska filtracija

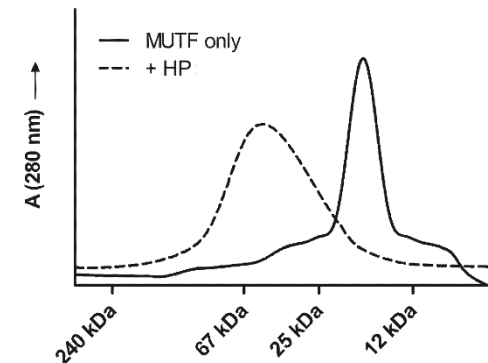
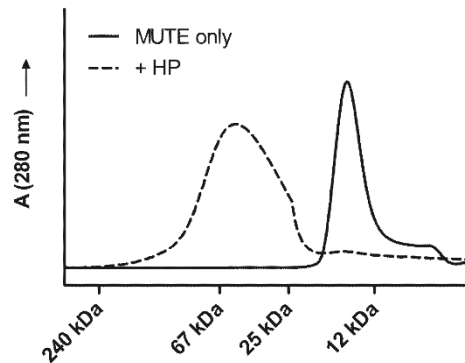
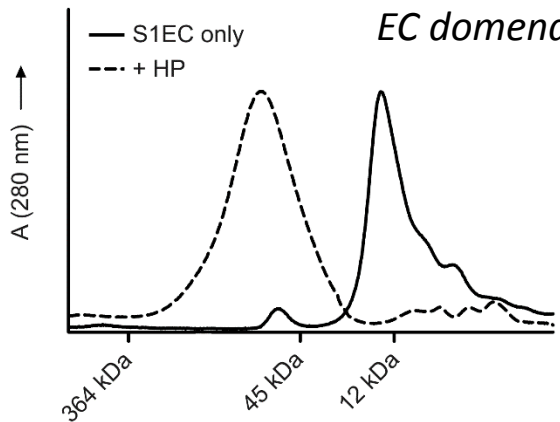
### A gelska filtracija



### *mutageneza poz. nabitih AK v Ala*

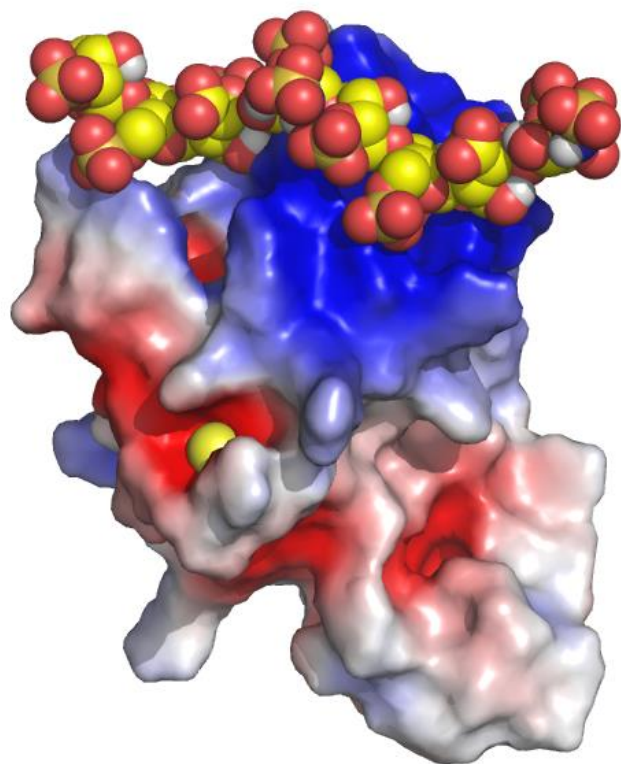


### B *EC domena*



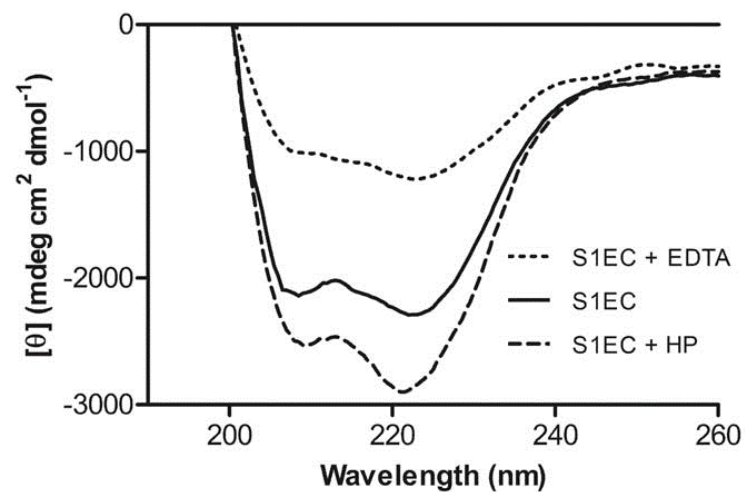
# Tesna vezava ligandov

Primer: tesna vezava heparina na SMOC-1



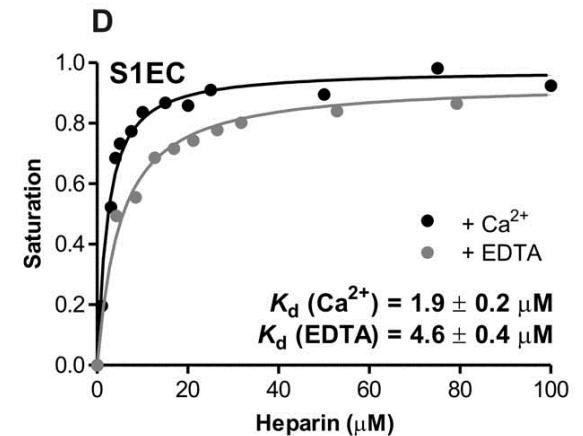
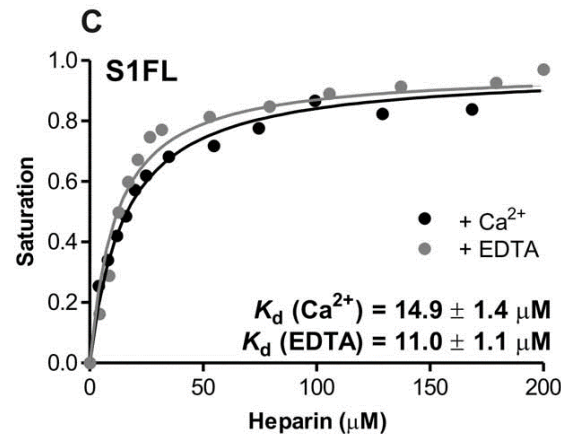
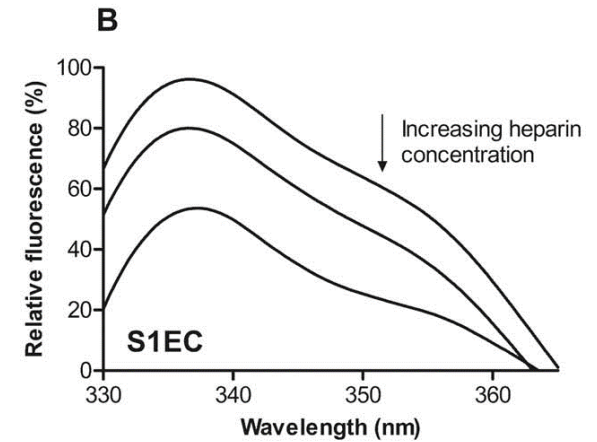
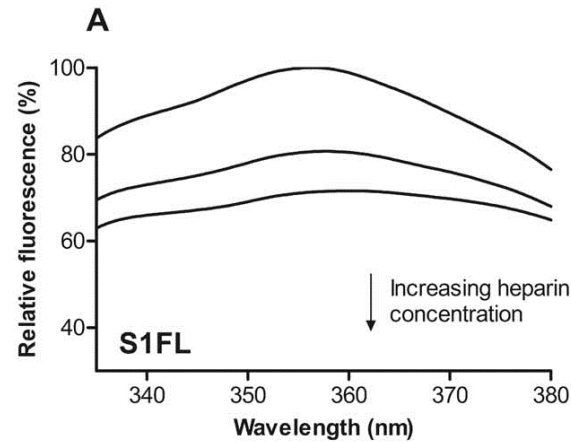
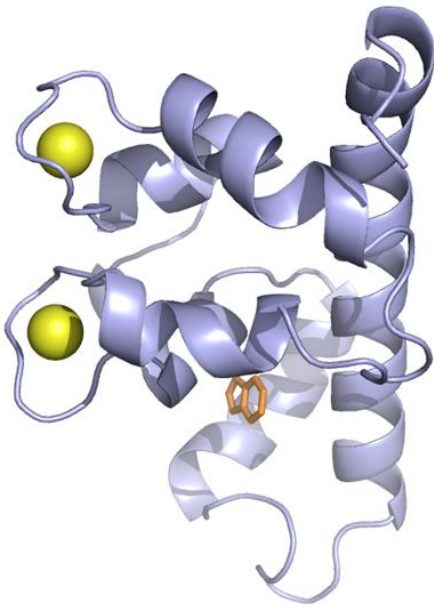
*model vezave oktasaharida  
heparina na protein*

*CD spektroskopija*



# Tesna vezava ligandov

## Primer: tesna vezava heparina na SMOC-1 – intrinzična fluorescenca Trp



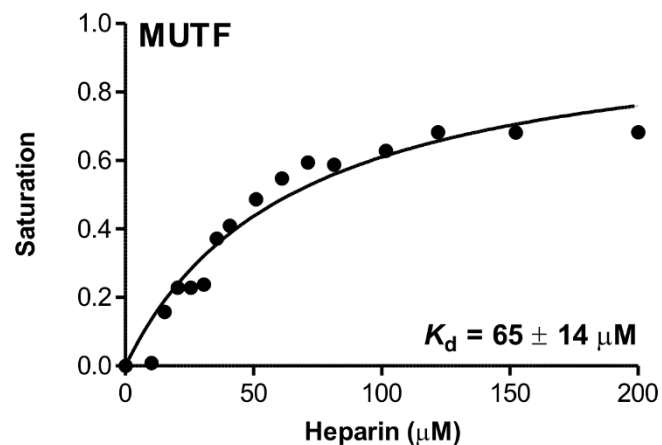
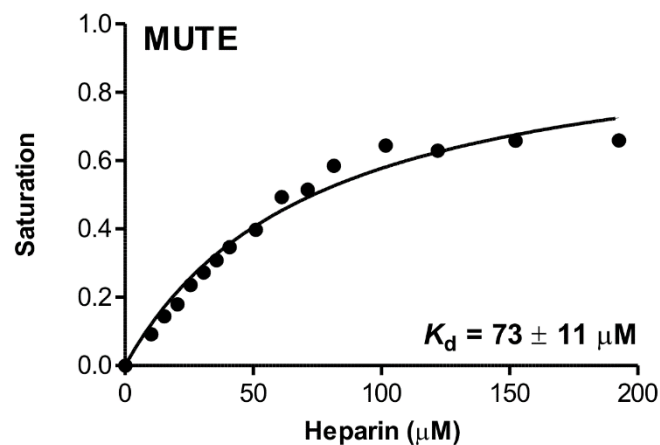
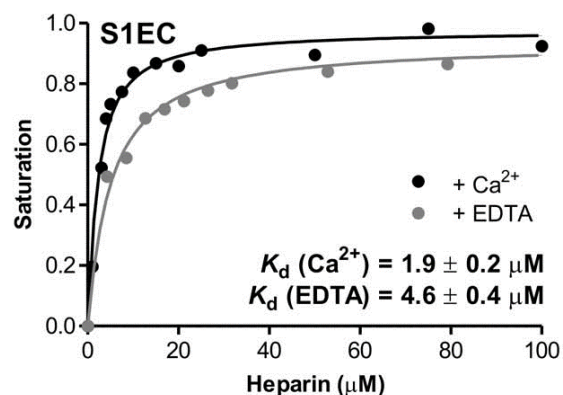
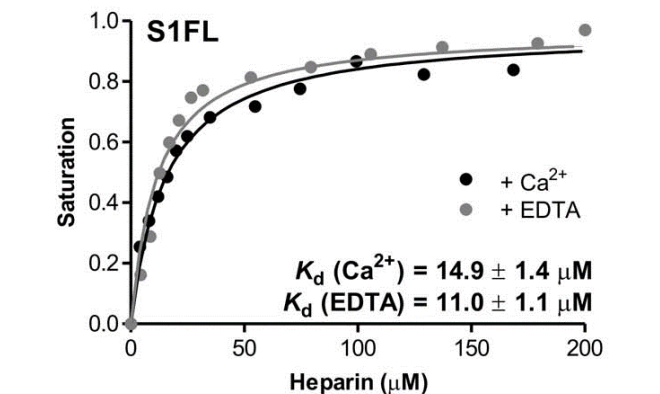
$[P]_t$  v eksperimentih je bil  $1 \mu\text{M}$ .

Eksperimentalne točke smo zadovoljivo opisali z modelom tesne vezave liganda.



# Tesna vezava ligandov

Primer: tesna vezava heparina na SMOC-1 – intrinzična fluorescenca Trp



$[P]_t$  v eksperimentih je bil  $1 \mu\text{M}$ .

# Tesna vezava modifikatorjev encimov

Tesna vezava je pogost pojav pri modifikatorjih encimov. Mehanizmi inhibicije so enaki kot pri klasični inhibiciji. Za linearne mehanizme je splošno enačbo izpeljal Morrison (1969):

$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{([E]_t + [I]_t + K_i^{nav}) - \sqrt{([E]_t + [I]_t + K_i^{nav})^2 - 4[E]_t[I]_t}}{2[E]_t}$$

kompetitivna inhibicija  $K_i^{nav} = K_i \left( 1 + \frac{[S]}{K_m} \right)$

akompetitivna inhibicija  $K_i^{nav} = K_i \left( 1 + \frac{K_m}{[S]} \right)$

mešana inhibicija  $K_i^{nav} = \frac{[S] + K_m}{\frac{K_m}{K_i} + \frac{[S]}{\alpha K_i}}$

nekompetitivna inhibicija  $K_i^{nav} = K_i$

# Tesna vezava modifikatorjev encimov

Enačbo za hiperbolične mehanizme sta na osnovi splošnega mehanizma modifikatorjev izpeljala Baici in Szedlaczek (1987):

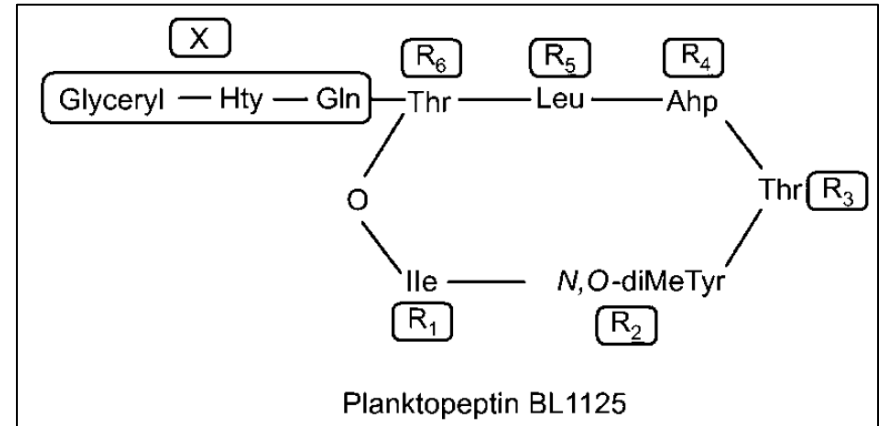
$$v_i = \frac{v_0}{2} \left( \frac{\alpha + \sigma - \beta(1 + \sigma)}{\alpha + \sigma} \right) \left\{ \sqrt{\left[ \left( \frac{1 + \sigma}{\alpha + \sigma} \frac{\alpha K_i}{[E]_t} + \frac{[I]_t}{[E]_t} - 1 \right)^2 + 4 \frac{1 + \sigma}{\alpha + \sigma} \frac{\alpha K_i}{[E]_t} \right]} + \frac{\alpha + \sigma + \beta(1 + \sigma)}{\alpha + \sigma - \beta(1 + \sigma)} - \frac{1 + \sigma}{\alpha + \sigma} \frac{\alpha K_i}{[E]_t} - \frac{[I]_t}{[E]_t} \right\}$$

$$\sigma = \frac{[S]}{K_m}$$

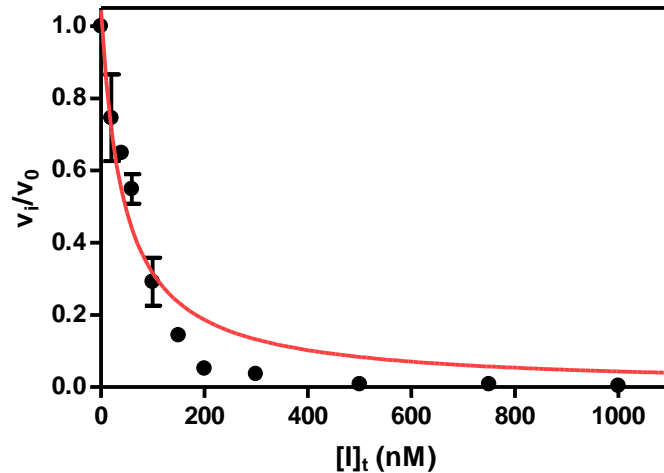
Seveda enačba velja tudi za linearne mehanizme ( $\beta = 0$ ) in za klasične inhibitorje ( $[E]_t \rightarrow 0$ ).

# Tesna vezava modifikatorjev encimov

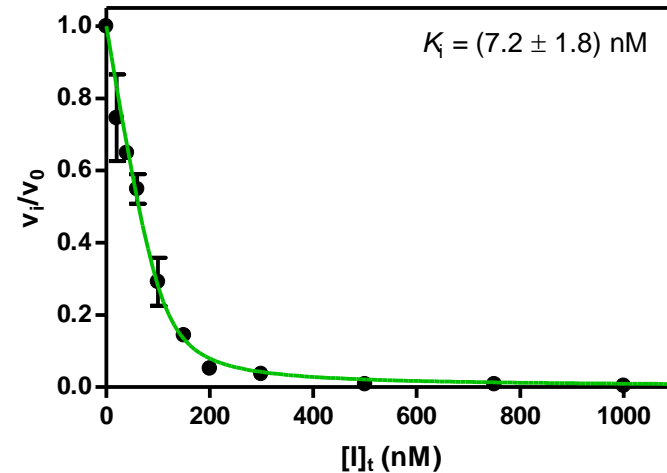
Primer: tesna vezava cikličnega peptida planktopeptin BL1125 izoliranega iz cianobakterije iz Blejskega jezera na pankreasno elastazo.



Prileganje modela  
linearne kompetitivne inhibicije



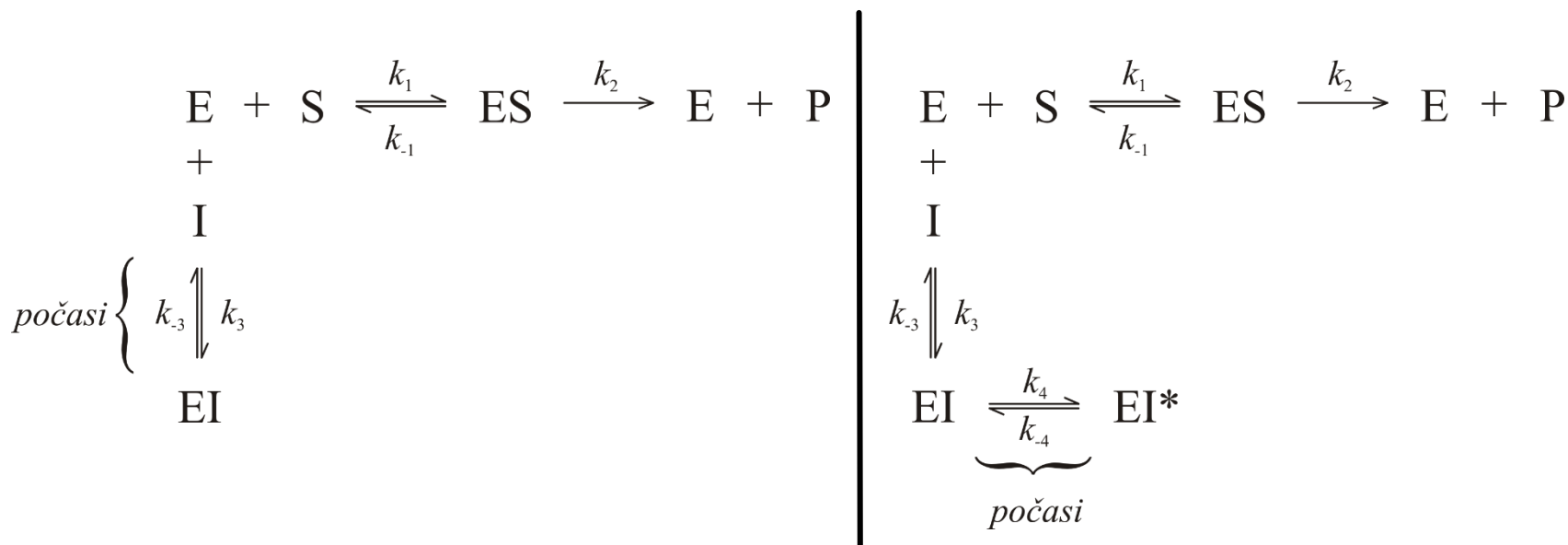
Prileganje modela  
linearne kompetitivne inhibicije  
s tesno vezavo



# Počasna vezava inhibitorjev encimov

Počasna vezava se lahko pojavlja pri vseh možnih mehanizmih interakcij in je lahko hkrati tudi tesna.

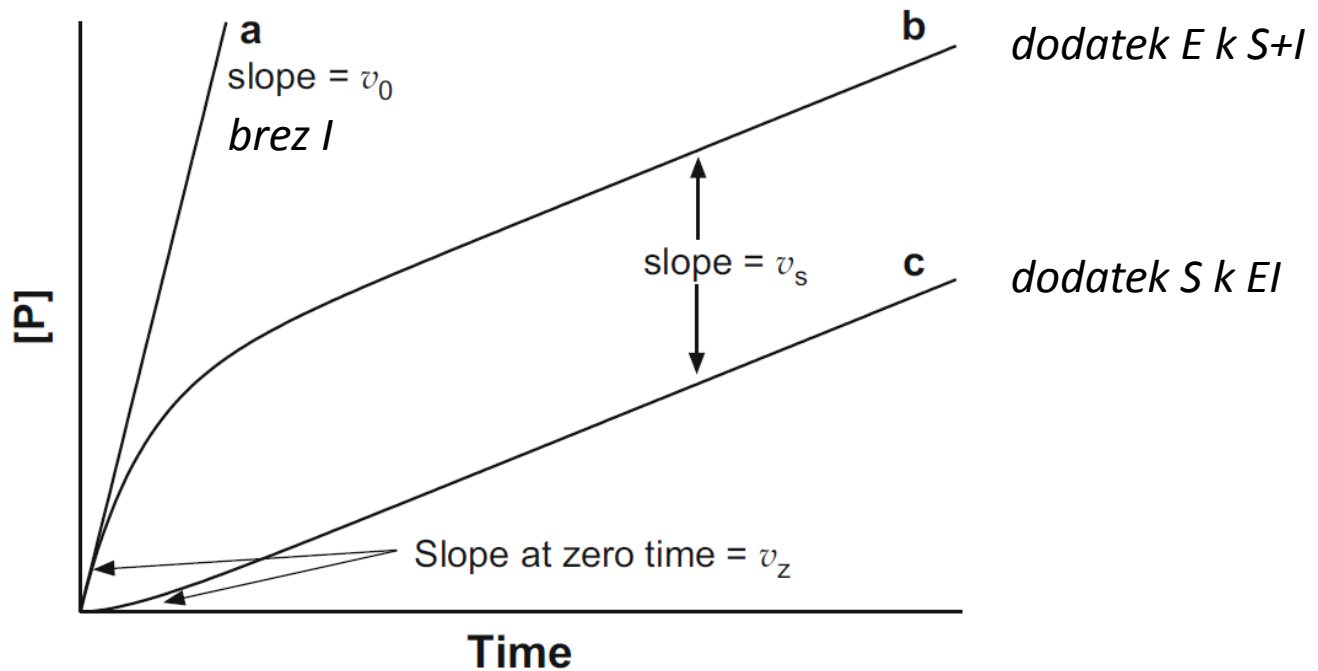
Najenostavnejša primera: linearna kompetitivna inhibicija v enem ali dveh korakih.



# Počasna vezava inhibitorjev encimov

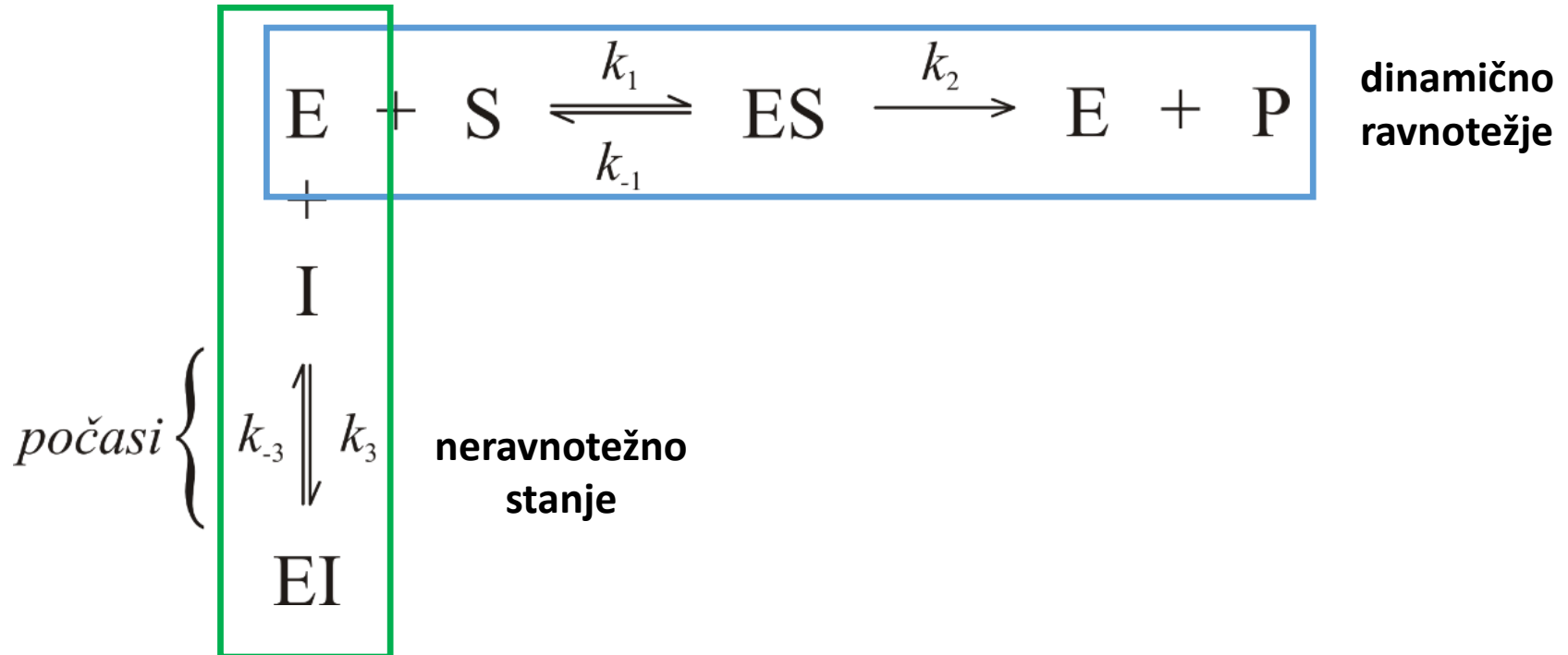
Počasna vezava se lahko pojavlja pri vseh možnih mehanizmih interakcij in je lahko hkrati tudi tesna.

Reakcijo lahko zasledujemo na dva načina: začnemo z dodatkom E v mešanico I in S, ali z dodatkom S v predinkubirano mešanico E in I. Zasledujemo dve hitrosti – ob času 0 ( $v_z$ ) in v dinamičnem ravnotežju ( $v_s$ ).



# Počasna vezava inhibitorjev encimov

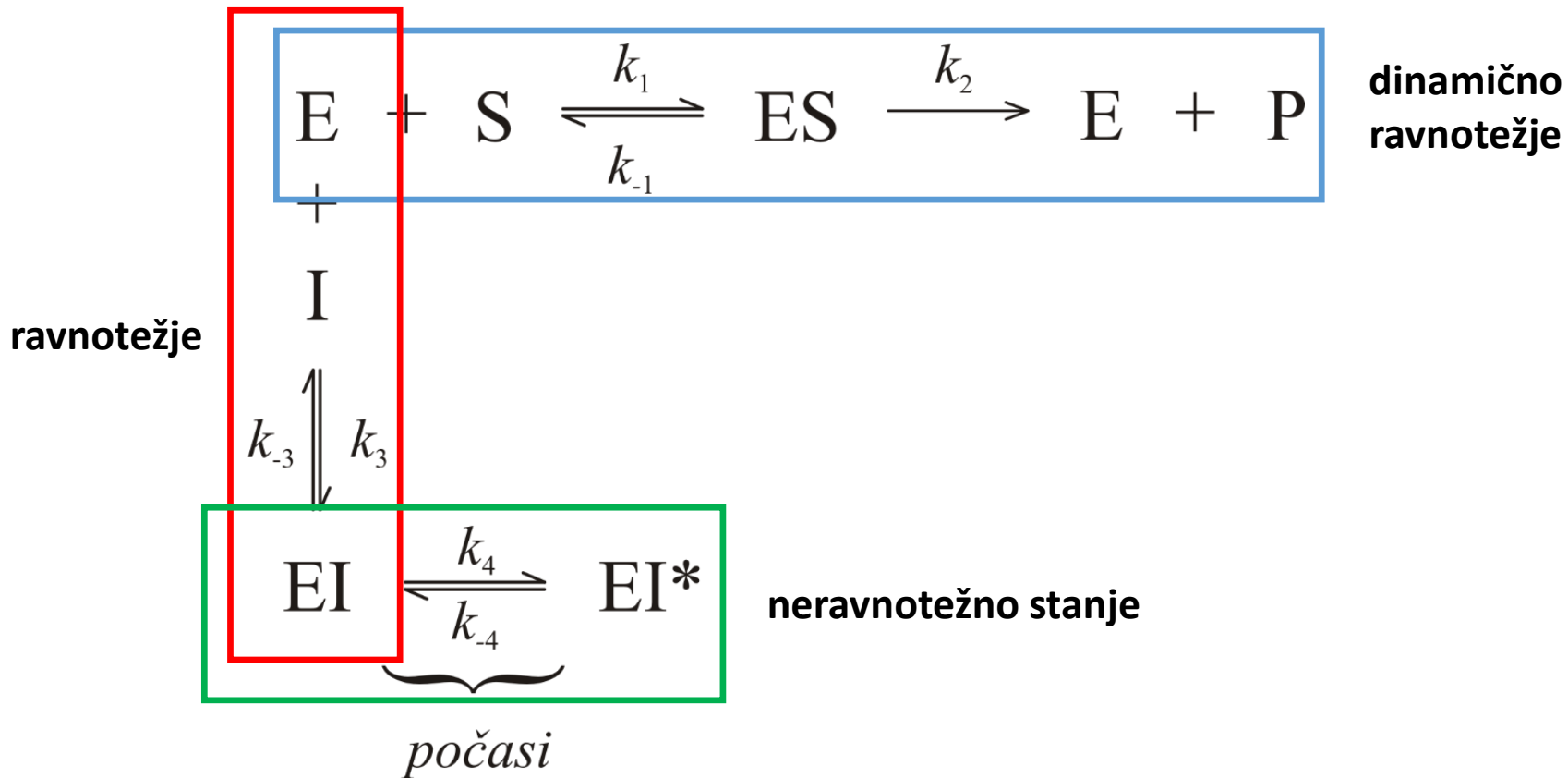
Ob začetku reakcije veljajo naslednji pogoji:



Predpostavimo, da se ravnotežje vzpostavi bistveno hitreje od počasnega koraka.

# Počasna vezava inhibitorjev encimov

Ob začetku reakcije veljajo naslednji pogoji:

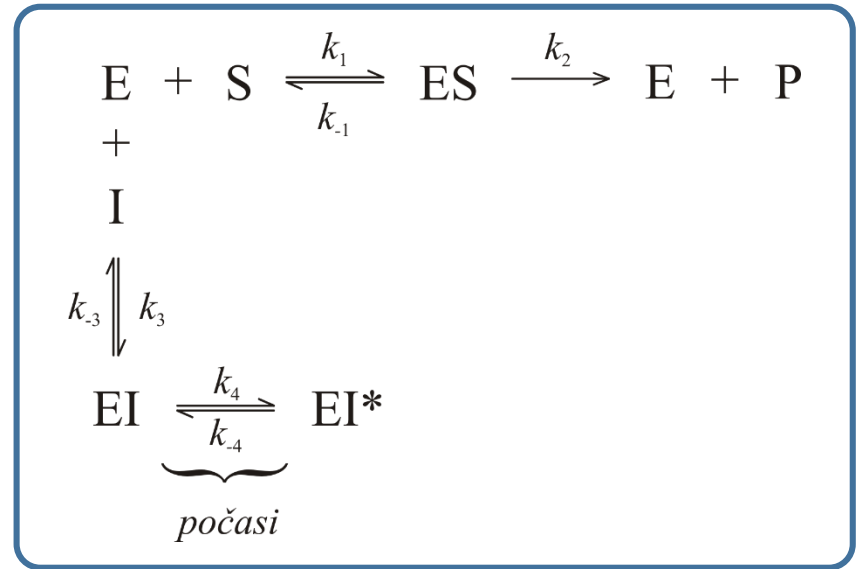


Predpostavimo, da se obe ravnotežji vzpostavita bistveno hitreje od počasnega koraka.



# Počasna vezava inhibitorjev encimov

Izpeljava enačbe za mehanizem v dveh korakih



Predpostavke:

1. Encim je stabilen  $\frac{d[E]_t}{dt} = 0$

2. Koncentracija substrata se med reakcijo bistveno ne spremeni.

3. Med E in ES obstaja dinamično ravnotežje  $\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0$

4. Kompleks EI je v ravnotežju z E in I  $K_i = \frac{k_{-3}}{k_3} = \frac{[E][I]}{[EI]}$

5.  $[I]_t \gg [E]_t \rightarrow [I]_t \approx [I]$

6. Katalitičen korak ( $k_2$ ) je ireverzibilen

# Počasna vezava inhibitorjev encimov

Izpeljava enačbe za mehanizem v dveh korakih

$$[E]_t = [E] + [ES] + [EI] + [EI^*]$$

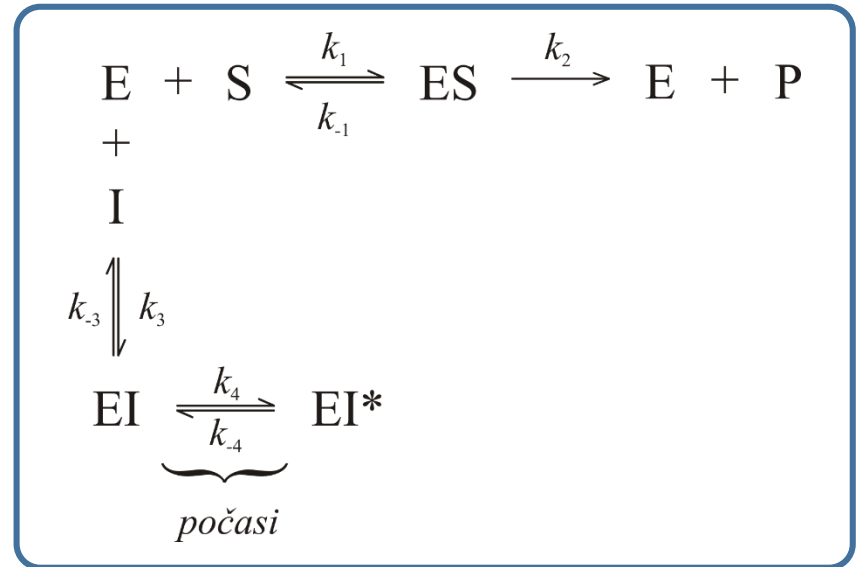
$$\frac{d[E]_t}{dt} = 0$$

$$\frac{d[EI^*]}{dt} = k_4[EI] - k_{-4}[EI^*] \neq 0$$

$$-\frac{d[EI^*]}{dt} = \frac{d[E + ES + EI]}{dt}$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES]$$

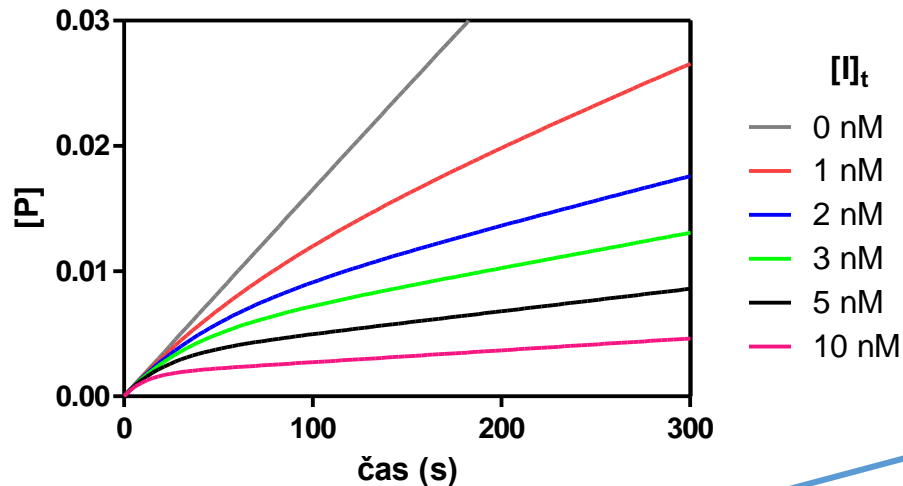
$$[P] = v_s t + \frac{v_z - v_s}{k} (1 - e^{-kt})$$



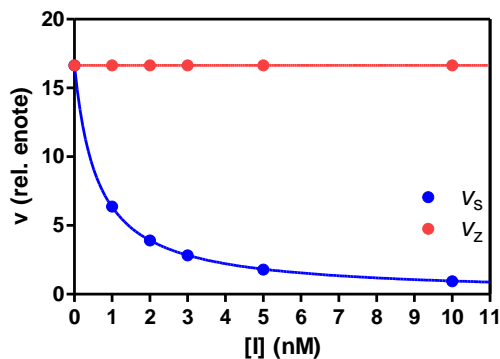
Enačba velja za vse sisteme,  
glede na mehanizem se razlikujejo izrazi za  $k$ .

# Počasna vezava inhibitorjev encimov

Analiza podatkov in identifikacija mehanizma – mehanizem v enem koraku



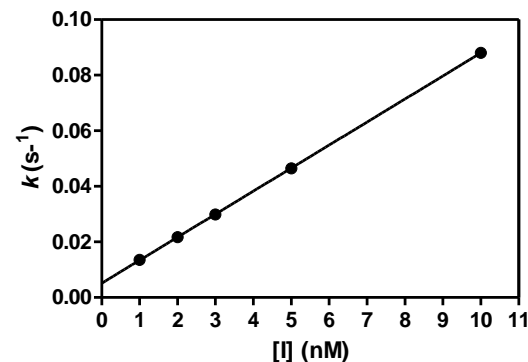
$$[P] = v_s t + \frac{v_z - v_s}{k} (1 - e^{-kt})$$



$$k = k_{-3} + \frac{k_3}{1 + \sigma} [I]_t$$

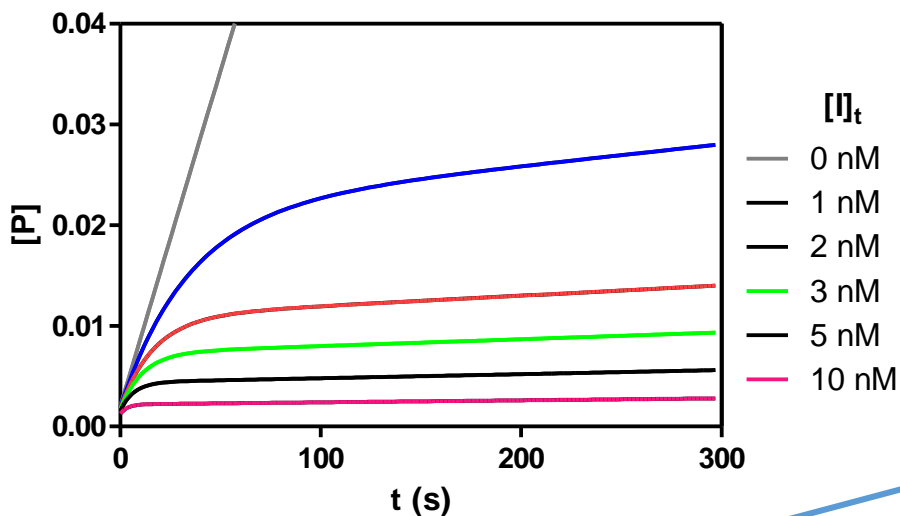
$$v_z = v_0$$

$$v_s = \frac{v_0(1 + \sigma)}{1 + \sigma + \frac{[I]}{K_i}}$$

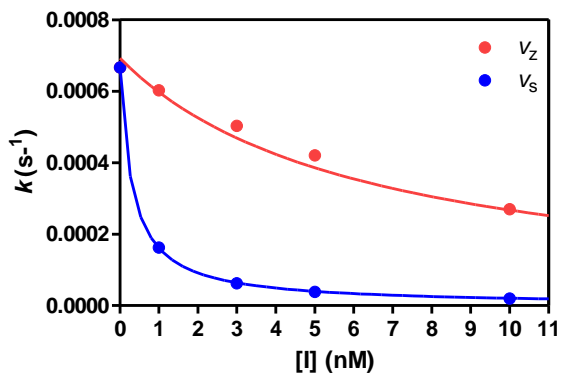


# Počasna vezava inhibitorjev encimov

Analiza podatkov in identifikacija mehanizma – mehanizem v dveh korakih



$$[P] = v_s t + \frac{v_z - v_s}{k} (1 - e^{-kt})$$

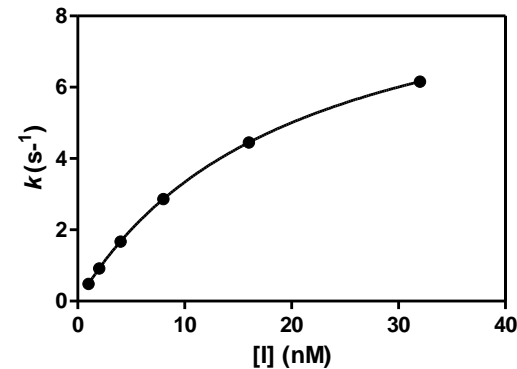


$$k = k_{-4} + \frac{k_4 \frac{[I]}{K_i}}{1 + \sigma + \frac{[I]}{K_i}}$$

$$v_z = \frac{v_0(1 + \sigma)}{1 + \sigma + \frac{[I]}{K_i}}$$

$$v_s = \frac{v_0(1 + \sigma)}{1 + \sigma + \frac{[I]}{K_i^*}}$$

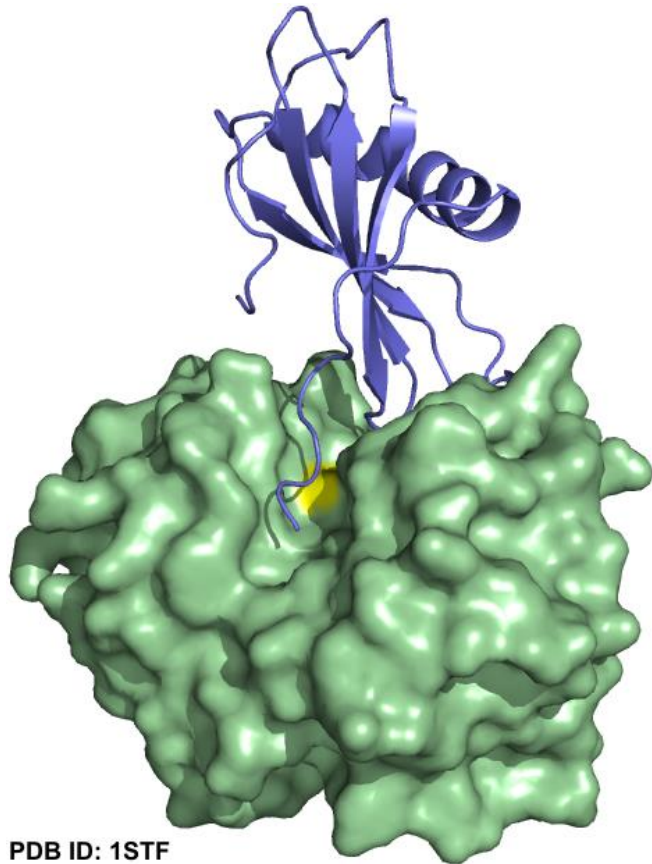
$$K_i^* = K_i \left( \frac{k_{-4}}{k_4 + k_{-4}} \right)$$



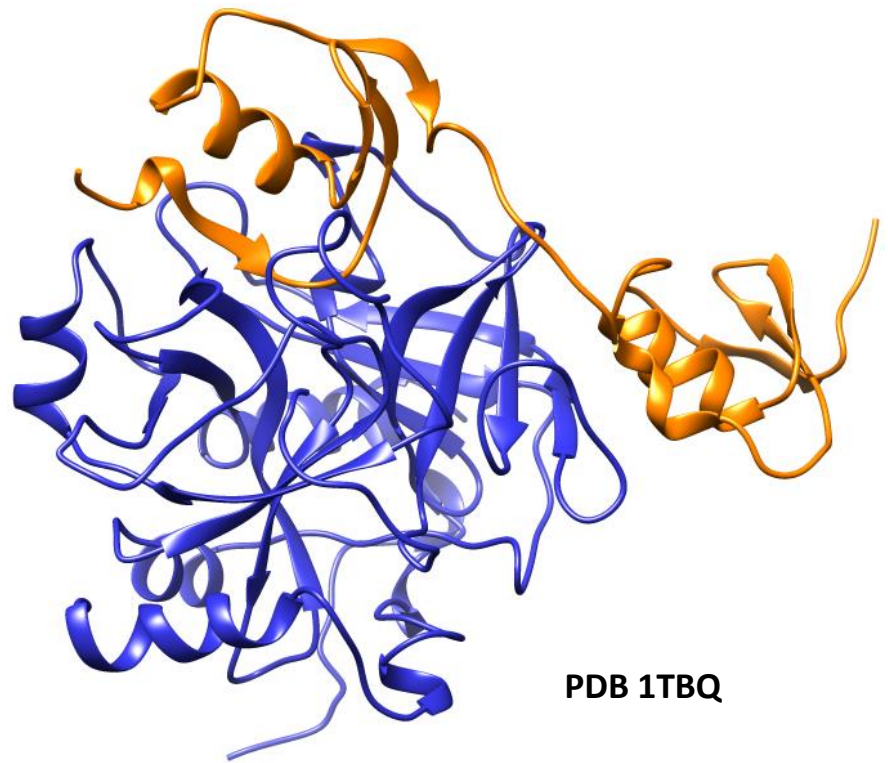
# Počasna vezava inhibitorjev encimov

Primeri: inhibitorji proteaz

stefin A - papain



rodniin - trombin



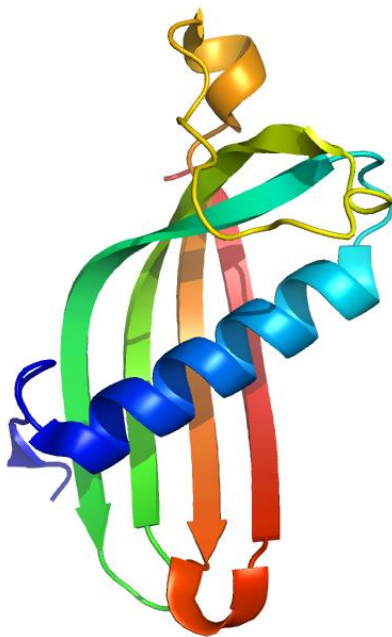
$$K_d = 0.2 \text{ pM}$$

$$k_{-1} = 4.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

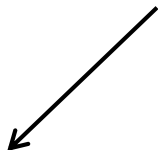
$$t_{1/2} = 1611 \text{ s } (\sim 27 \text{ min})$$

# Počasna vezava inhibitorjev encimov

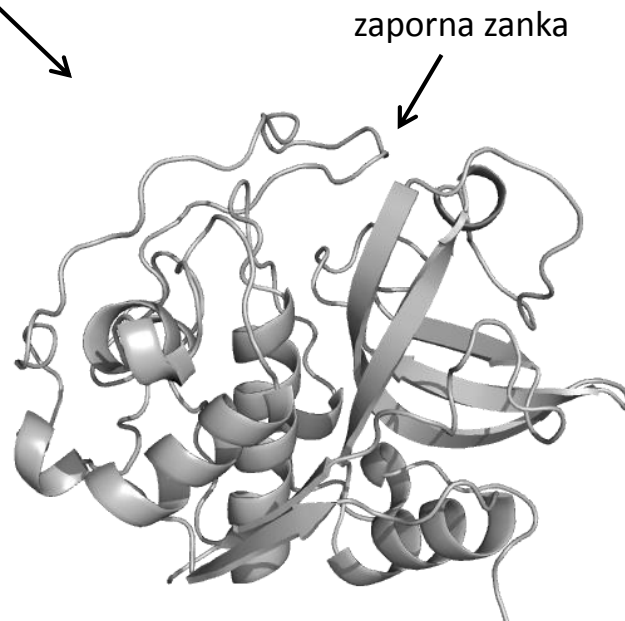
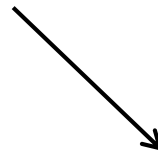
Primeri: inhibitorji proteaz



**cistatin C**  
nespecifičen zunajceličen  
inhibitor cisteinskih  
katepsinov



papainu podobne endopeptidaze  
mehanizem v enem koraku

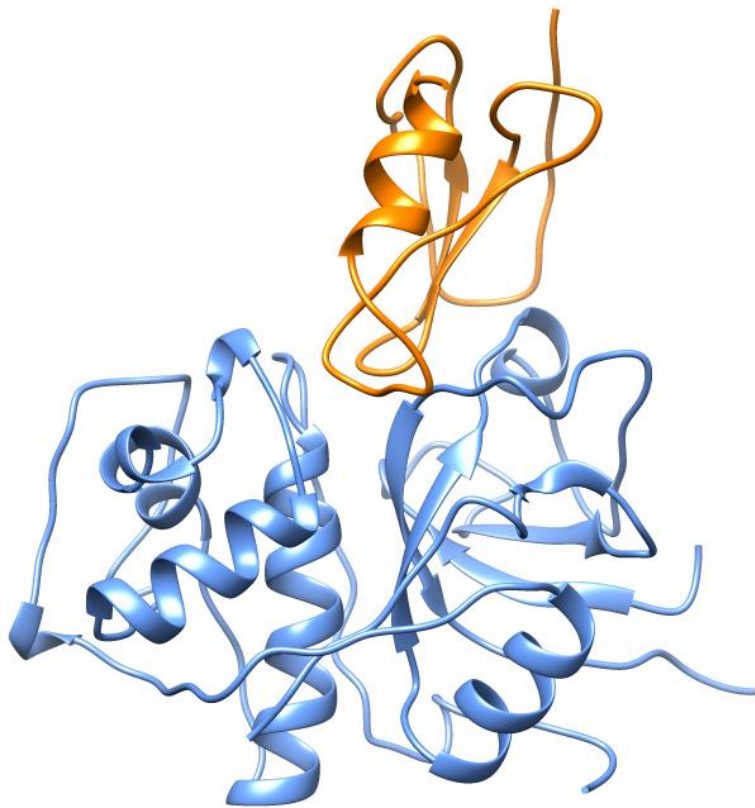


katepsin B (peptidil-dipeptidaza)  
mehanizem v dveh korakih

# Počasna vezava inhibitorjev encimov

Primeri: inhibitorji proteaz

p41 fragment li – katepsin L



tiropini so bolj specifični kot cistatini

Human p41 fragment	$k_{ass} \times 10^{-7} (M^{-1}s^{-1})$	$k_{diss} \times 10^5 (s^{-1})$	$K_i (M)$
Human cathepsin L	$1.7 \pm 0.61$	$9.51 \pm 1.03$	$(5.52 \pm 2.03) \times 10^{-12}$
Human cathepsin S	nd	nd	$(208 \pm 25) \times 10^{-9}$

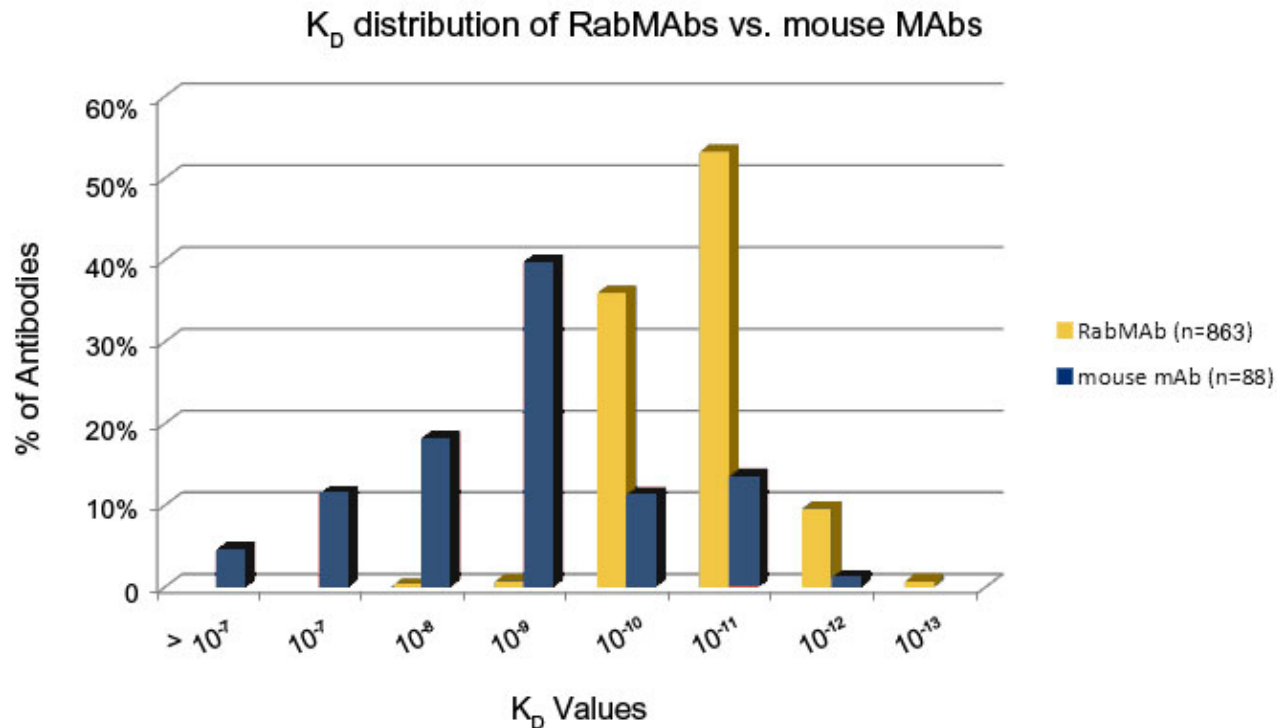
	$k_a \times 10^{-7}$	$k_d \times 10^5$	$K_i$
	$M^{-1} s^{-1}$	$s^{-1}$	$M$
<b>Human p41 fragment</b>			
Human cathepsin V	$0.66 \pm 0.03$	$4.75 \pm 0.63$	$(7.21 \pm 2.03) \times 10^{-12}$
Human cathepsin K	ND <sup>a</sup>	ND	$(90 \pm 8) \times 10^{-12}$
Human cathepsin F	ND	ND	$(0.51 \pm 0.09) \times 10^{-9}$
Human cathepsin X	ND	ND	$>1000 \times 10^{-9}$

# Počasná vezava ligandov - protitelesa

Antibody	Ligand	$k_1$	$k_{-1}$	$K_a$	$K_d$
Anti-DNP	$\epsilon$ -DNP-L-lysine	$8 \times 10^7$	1	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^{-8}$
Anti-fluorescein	Fluorescein	$4 \times 10^8$	$5 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{11}$	$1 \times 10^{-11}$
Anti-bovine serum albumin (BSA)	Dansyl-BSA	$3 \times 10^5$	$2 \times 10^{-3}$	$1.7 \times 10^8$	$5.9 \times 10^{-9}$

SOURCE: Adapted from H. N. Eisen, 1990, *Immunology*, 3rd ed., Harper & Row, Publishers.

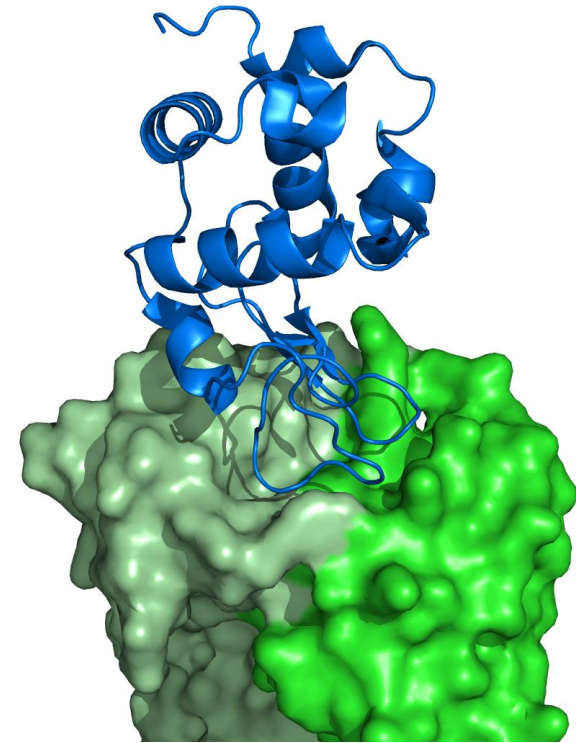
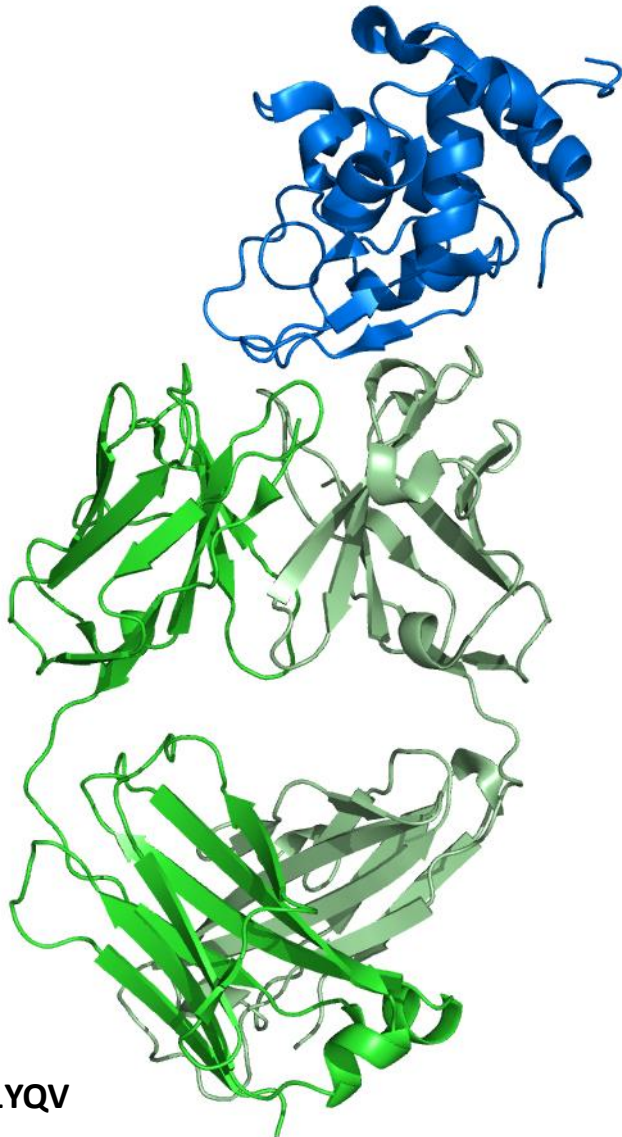
Table 6-1  
 Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition  
 © 2007 W. H. Freeman and Company





# Počasna vezava ligandov - protitelesa

Mišje HyHEL-5 protitelo proti kokošjem lizocimu.



**TABLE 5** Rate and equilibrium constants for the HyHEL-5/HEL and the HyHEL-10/HEL systems\*

System	$k_{\text{assn}}^{\#}$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{diss}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_d$ (pM) (calculated)	$K_d$ (pM) (literature)
HyHEL-5/HEL	$1.5\text{--}3.3 \times 10^7$	$2.2 \times 10^{-4}$	6.7–14.7	$\sim 25^{\S}$
HyHEL-10/HEL	$4.1\text{--}9.3 \times 10^6$	$\sim 3.2 \times 10^{-5}$	3.4–7.8	$\sim 22^{\P}$

\*Sodium phosphate buffer was used at pH 8.0 and 25°C.

<sup>#</sup>Range of  $k_{\text{assn}}$  values is given for different ionic strengths.

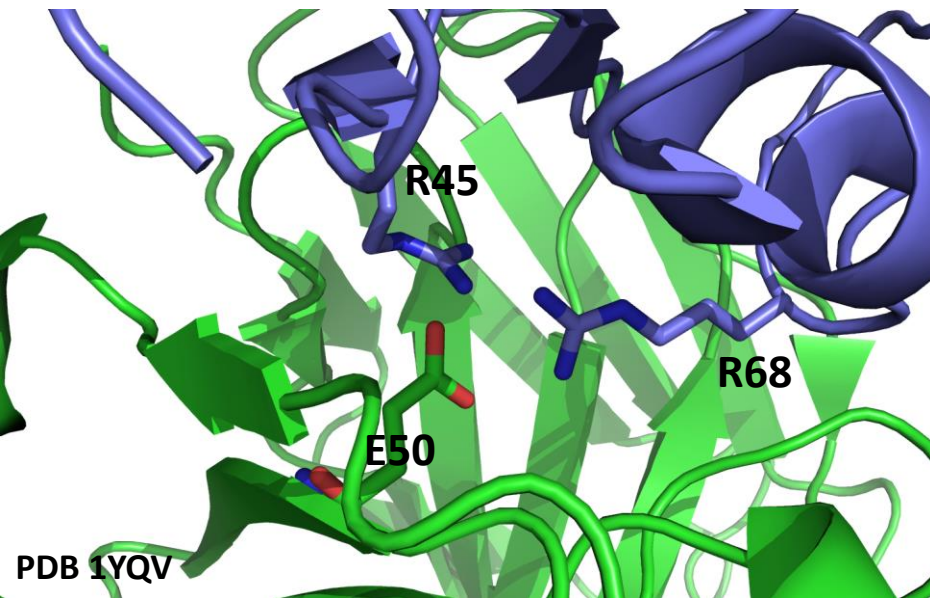
<sup>§</sup>Determined by PCFIA (Lavoie et al., 1990).

<sup>¶</sup>Determined by PCFIA (Lavoie et al., 1992).

# Počasna vezava ligandov - protitelesa

Mišje HyHEL-5 protitelo proti kokošjem lizocimu. Dominantno vlogo ima solni mostiček na sliki.

kokošji lizocim



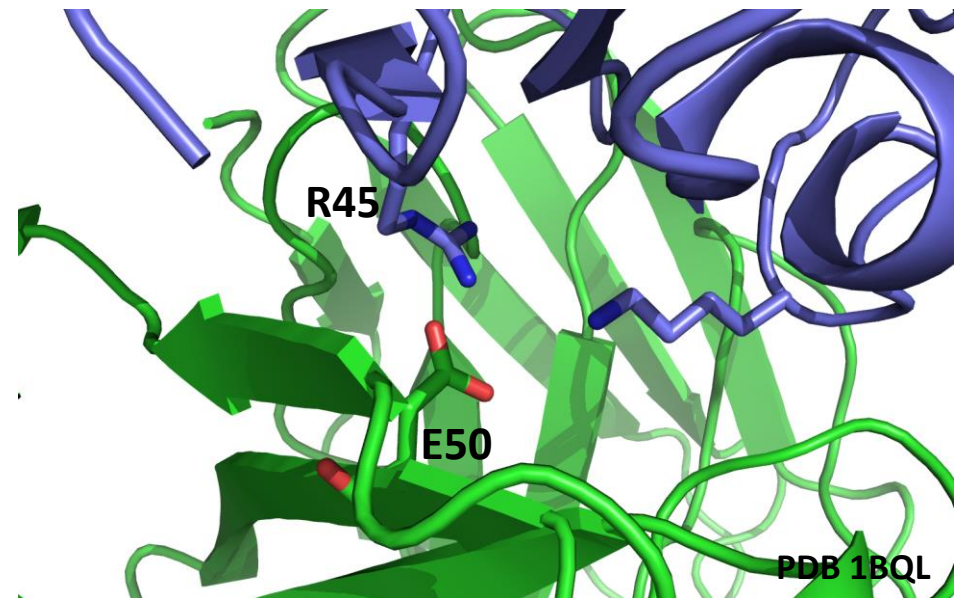
HyHEL5 Fab

$K_d = 25 \text{ pM}$   
 $\Delta H^0 = -23 \text{ kcal/mol}$

E50<sub>H</sub>D mutanta

$K_d = 20 \text{ nM}$   
 $\Delta H^0 = -19 \text{ kcal/mol}$

prepeličji lizocim

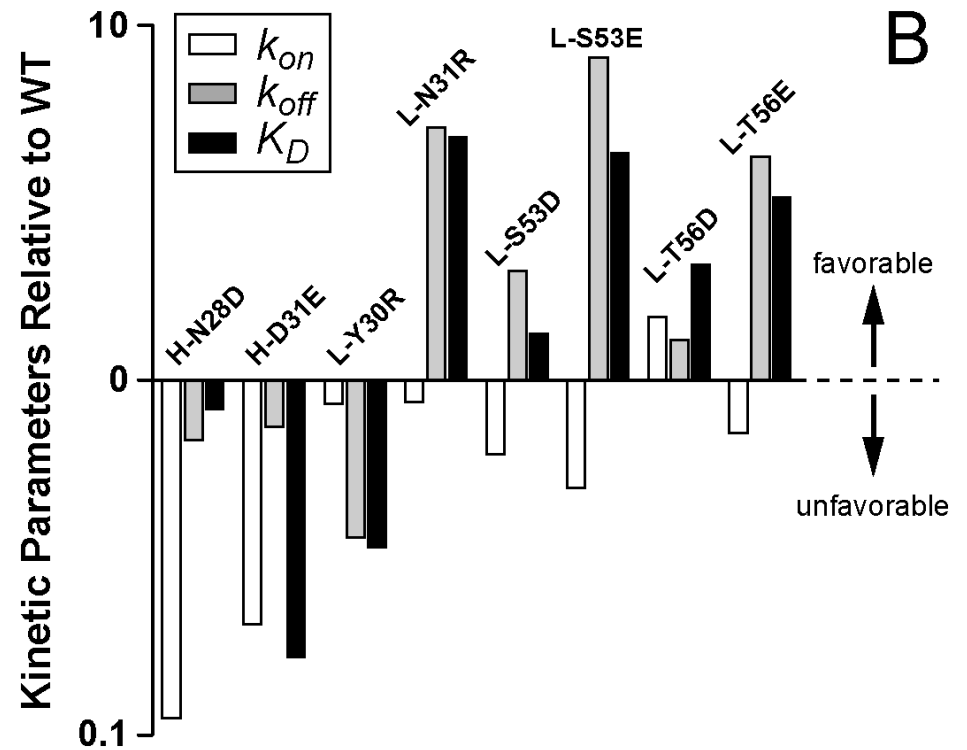
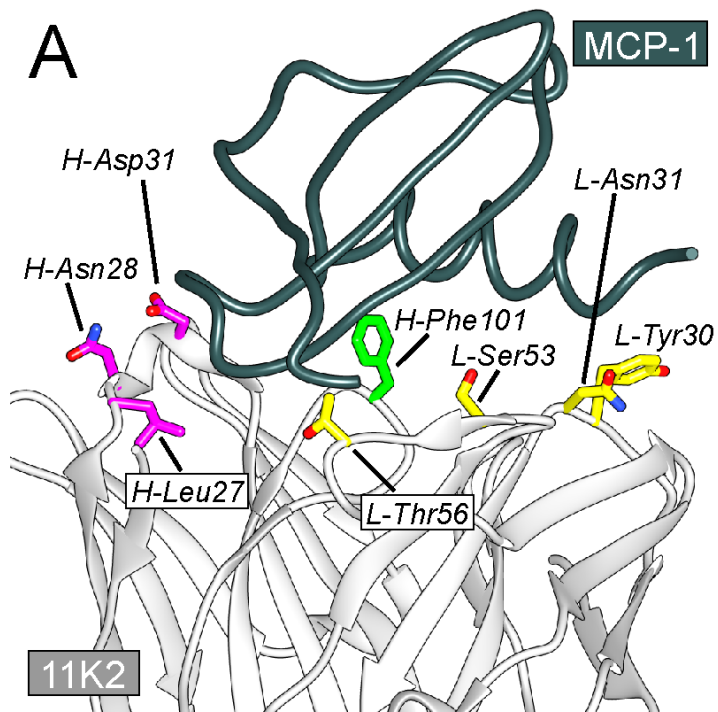


HyHEL5 Fab

$K_d = 150 \text{ nM}$   
 $\Delta H^0 = -18 \text{ kcal/mol}$

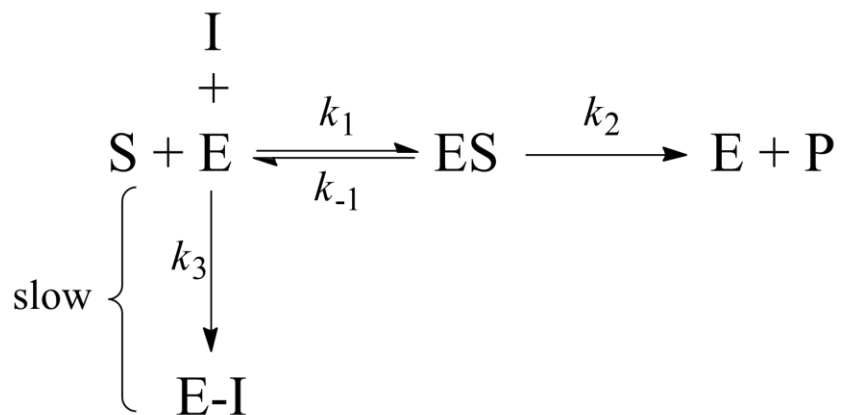
# Počasna vezava ligandov - protitelesa

Vezavne lastnosti protiteles lahko optimiziramo *in vitro*.

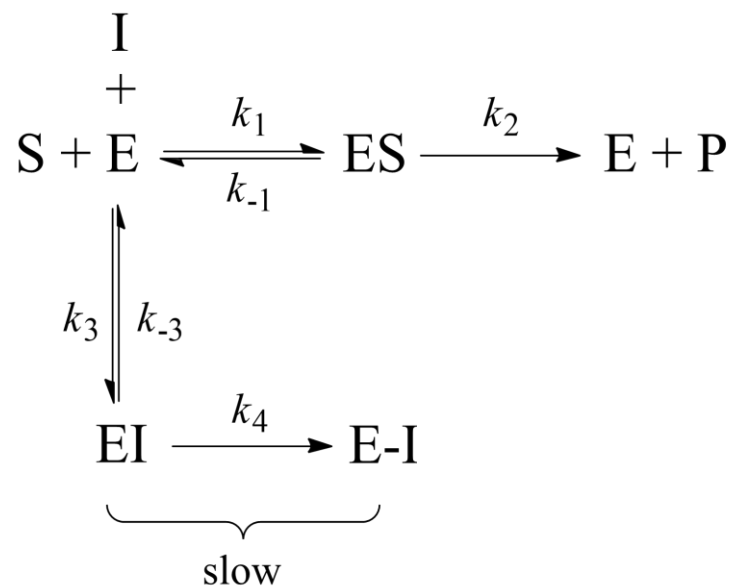


# Počasna inaktivacija encimov

Je analogna počasni inhibiciji.



v enem koraku  
(nespecifična inaktivacija)



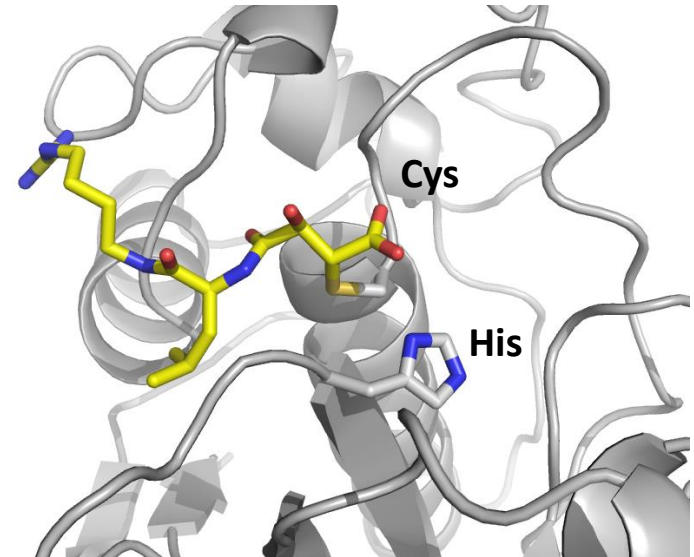
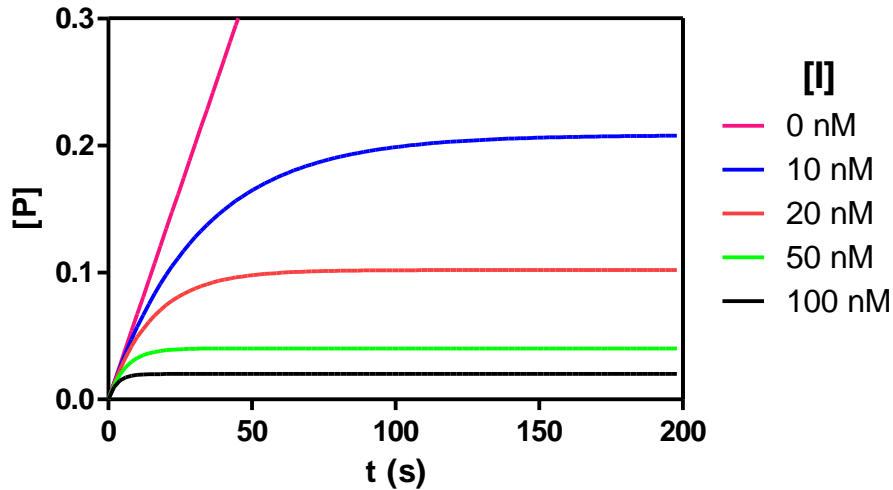
v dveh korakih  
(specifična inaktivacija)

$$[P] = \frac{v_z}{k} (1 - e^{-kt})$$

# Počasna inaktivacija encimov

Izpeljava enačb in obdelava podatkov je analogna počasni inhibiciji.

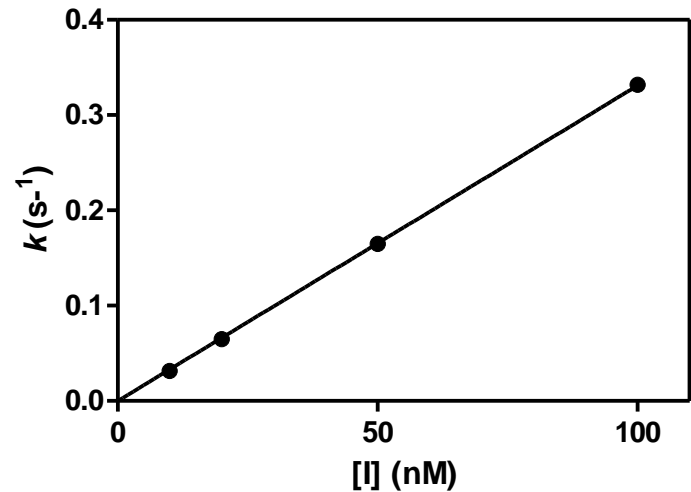
Mehanizem v enem koraku:



$$[P] = \frac{v_z}{k} (1 - e^{-kt})$$

$$k = \frac{k_3}{1 + \sigma} [I]_t$$

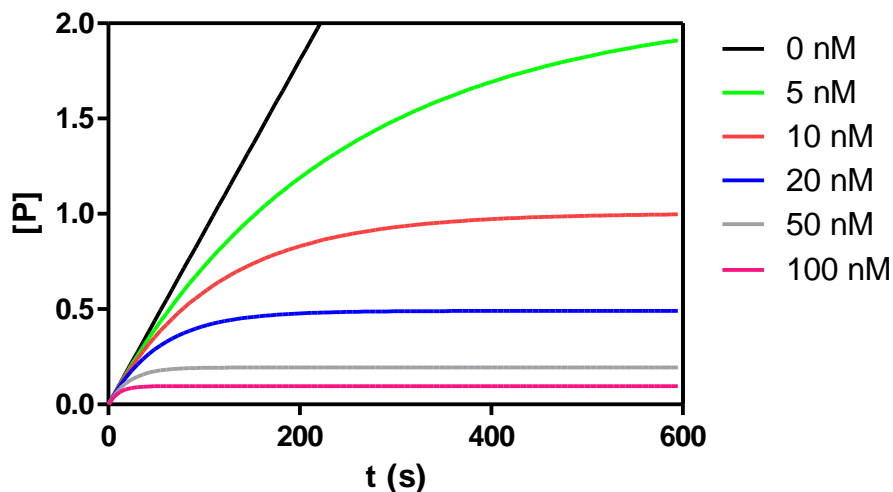
$$v_z = v_0$$



# Počasna inaktivacija encimov

Izpeljava enačb in obdelava podatkov je analogna počasni inhibiciji.

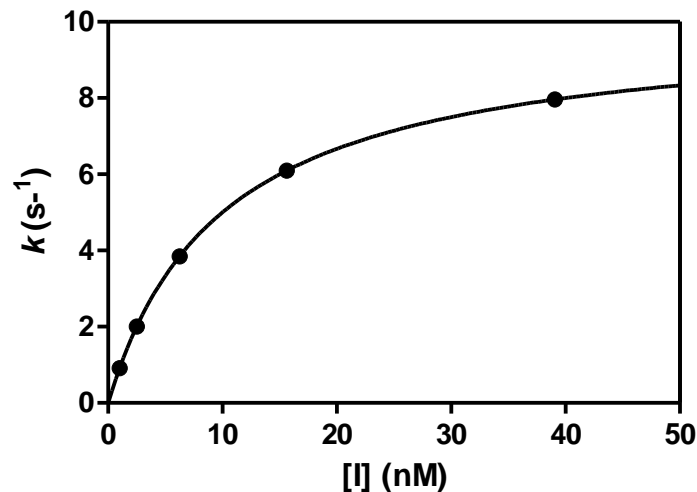
Mehanizem v dveh korakih:



$$[P] = \frac{v_z}{k} (1 - e^{-kt})$$

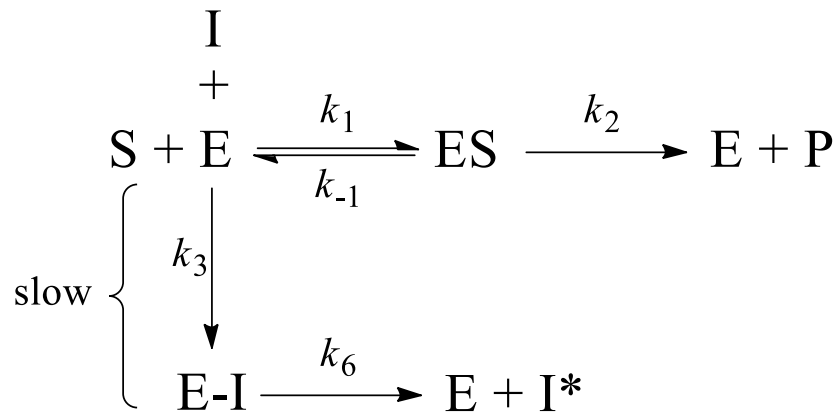
$$k = k_{-4} + \frac{k_4 \frac{[I]}{K_i}}{1 + \sigma + \frac{[I]}{K_i}}$$

$$v_z = \frac{v_0(1 + \sigma)}{1 + \sigma + \frac{[I]}{K_i}}$$

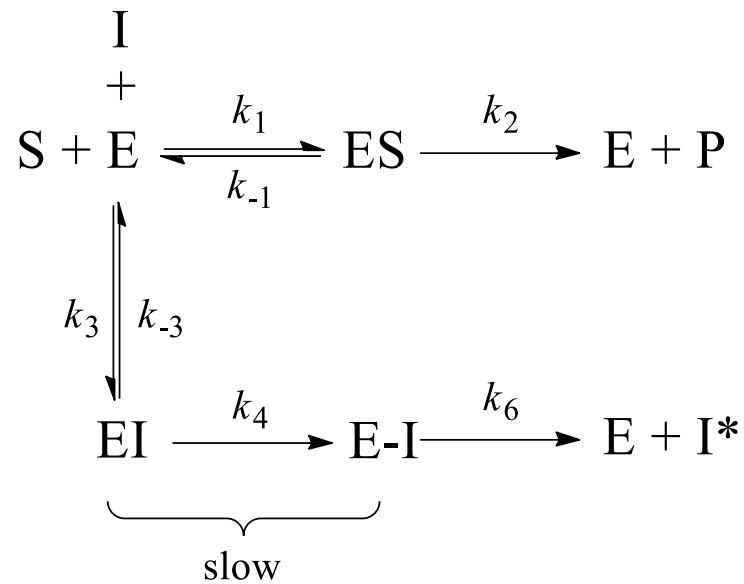


# Počasna inaktivacija encimov

Lahko pride do reaktivacije encima.



v enem koraku  
(nespecifična inaktivacija)

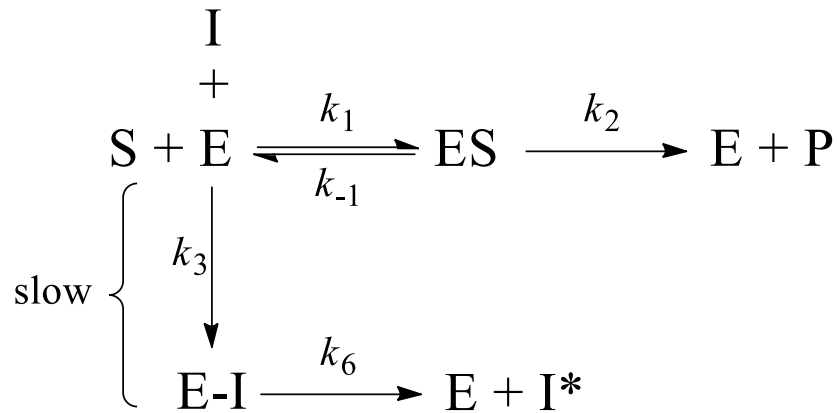


v dveh korakih  
(specifična inaktivacija)

$$[P] = v_{\infty}t + \frac{v_z - v_{\infty}}{k} (1 - e^{-kt})$$

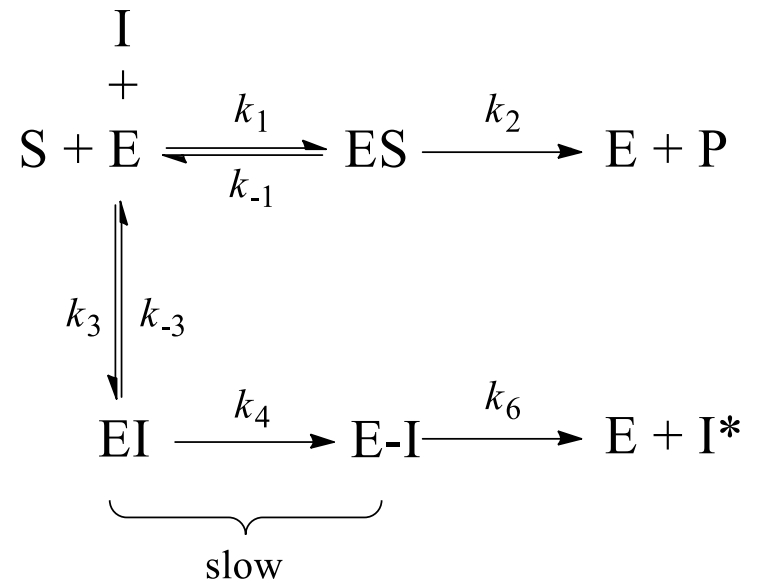
# Počasna inaktivacija encimov

Lahko pride do reaktivacije encima.



$$k = k_6 + \frac{k_3}{1 + \sigma} [I]$$

$$v_\infty = \frac{v_0(1 + \sigma)}{1 + \sigma + \frac{k_3}{k_6} [I]}$$



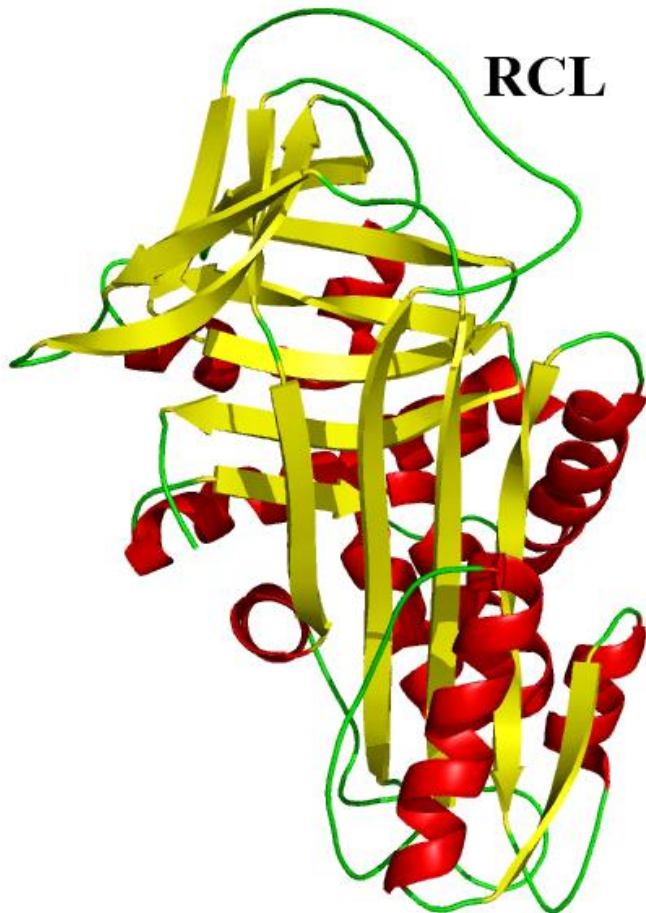
$$k = k_6 + \frac{k_4 \frac{[I]}{K_i}}{1 + \sigma + \frac{[I]}{K_i}}$$

$$v_\infty = \frac{v_0(1 + \sigma)}{1 + \sigma + \left(1 + \frac{k_4}{k_6}\right) \frac{[I]}{K_i}}$$



# Počasna inaktivacija encimov

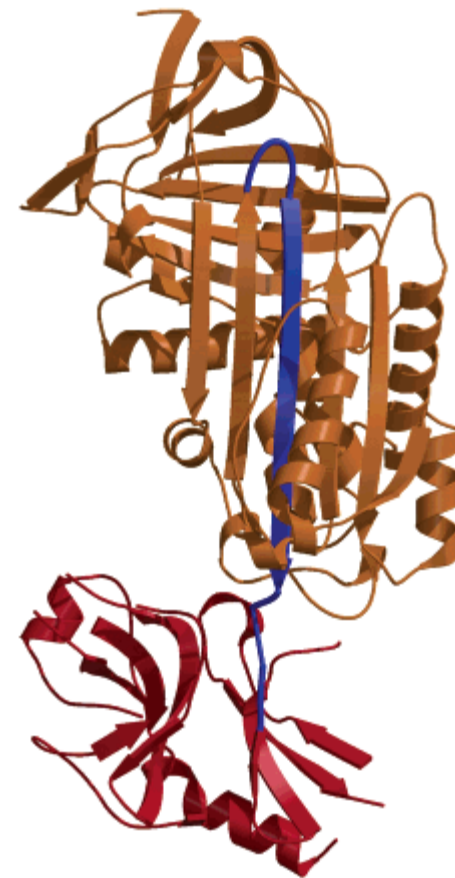
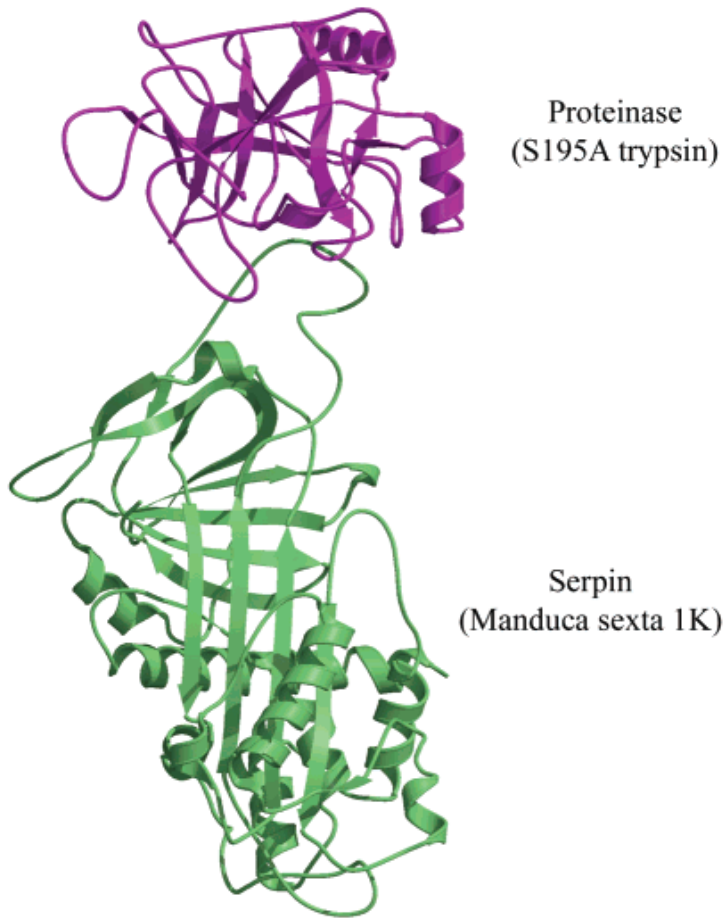
Primer: **serpini** – inhibitorji serinskih peptidaz



Reactive Center Loop interagira z aktivnim mestom peptidaze. Lahko tvori nekovalenten ali kovalenten kompleks. Pri tvorbi kovalentnega kompleksa pride do cepitve in konformacijske spremembe serpina.

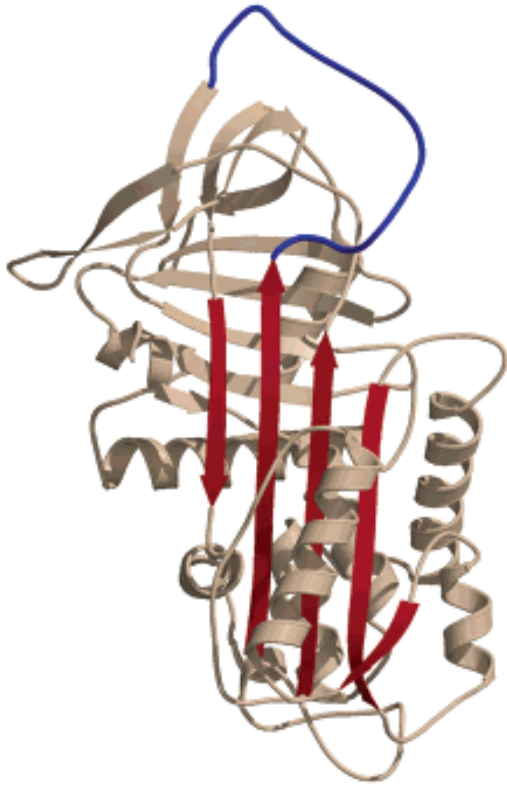
# Počasna inaktivacija encimov

Primer: **serpini** – inhibitorji serinskih peptidaz

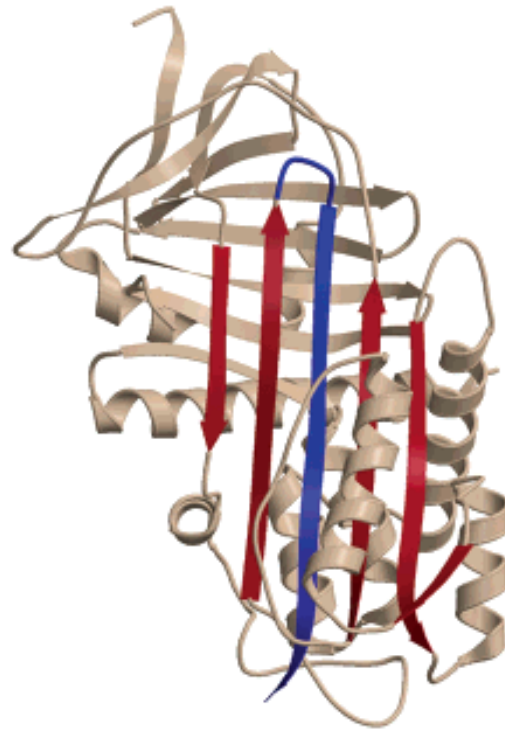


# Počasna inaktivacija encimov

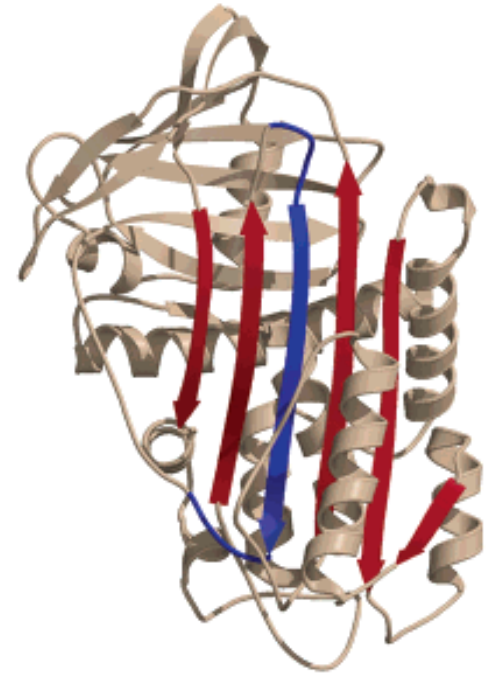
Primer: **serpini** – inhibitorji serinskih peptidaz



**Native  
(single chain)**



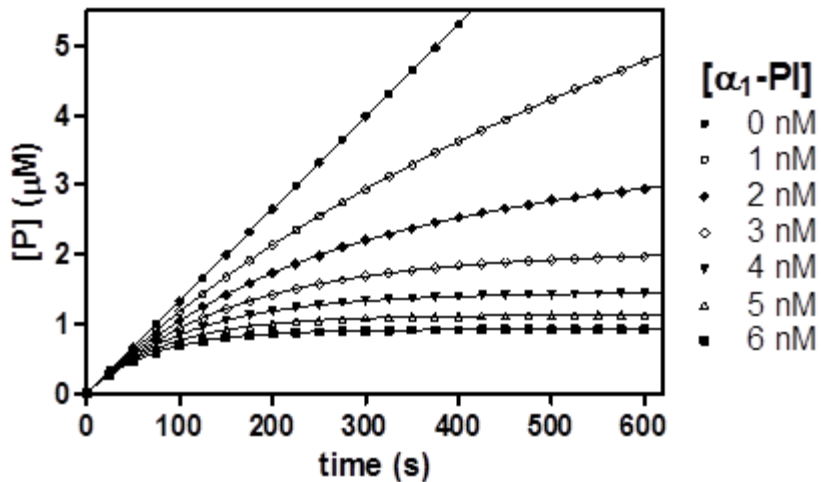
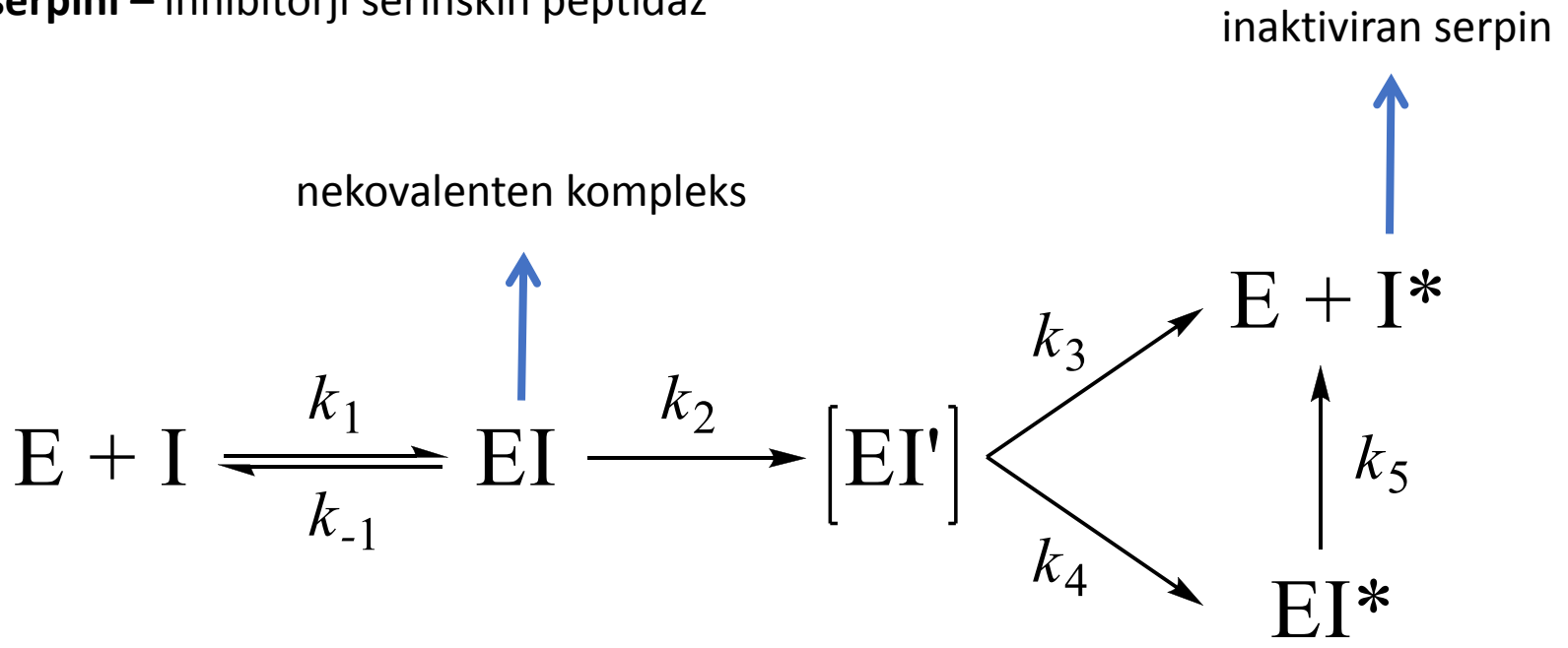
**Cleaved  
(two chain)**



**Latent  
(single chain)**

# Počasna inaktivacija encimov

Primer: **serpini** – inhibitorji serinskih peptidaz



Stehiometrija inhibicije:  $SI = \frac{k_3 + k_4}{k_4}$