

1. **Комплекс белок-лиганд** – это комплекс, образованный в результате взаимодействия между белками, или белка с другими молекулами. Образование комплекса основано на молекулярном распознавании между **активными центрами макромолекул и лигандами**¹. **Молекулярное распознавание** – это ключевой механизм, без которого невозможно большинство биологических процессов, таких как, например, репликация, метаболизм, обработка информации. Молекулярное распознавание зависит от таких характеристик взаимодействия, как аффинность и специфичность. **Аффинность**² – это характеристика, которая определяет какие концентрации партнеров (молекула или другая биомолекула) необходимы для образования комплекса. Численная характеристика для аффинности – это константа диссоциации K_d (или константа ассоциации $K_a = 1/K_d$). А **специфичность** – это способность белка отличать более аффинных партнеров от менее аффинных (с большими значениями K_d). Специфичность взаимодействия белков с лигандами обеспечивается особым строением участков связывания – **активных центров**.

2. **Активный центр. Комплементарность.**

The active site is a groove or pocket formed by the folding pattern of the protein. This three-dimensional structure, together with the chemical and electrical properties of the amino acids and cofactors within the active site, permits only a... ..of contact is called the active site. <https://www.britannica.com/science/active-site>

Согласно этому формальному определению, «активный центр - **это бороздка или карман, образованный паттерном**³ упаковки белка. Это участок белка с особой трехмерной структурой, как по пространственной форме, так и химическими и электрическими свойствами, образующих активный центр аминокислот и кофакторов...».

Еще до того, как была определена атомная структура первых биомолекул, физик Г.Р. Крейн сформулировал два принципа, в соответствии с которыми должно происходить макромолекулярное узнавание в самособирающихся системах.

Во-первых, “...for a high degree of specificity the contact or combining spots on the two particles must be multiple and weak.” - для обеспечения высокой специфичности между интерфейсными поверхностями обеих взаимодействующих частей должно образовываться много слабых взаимодействий. Этот принцип совсем не очевиден. Может показаться, что, наоборот, лучше использовать одну, но сильную связь. Использование одной или нескольких прочных связей, действительно, обеспечит высокую стабильность. Но не обеспечит специфичность. Поскольку одинаковое пространственное расположение всего двух (или нескольких) атомов может быть (случайно) достигнуто для, вообще говоря, произвольной комбинации взаимодействующих частиц, то это увеличивает риск образования случайных неверных комплексов. А вот использование целого массива слабых парных взаимодействий гарантирует специфичность, ибо каждая пара взаимодействующих атомов вносит свой вклад в суммарное взаимодействие, обеспечивая тем самым необходимую силу связи между двумя биомолекулярными объектами.

Во-вторых, “...one particle must have a geometrical arrangement which is complementary to the arrangement on the other.” - взаимодействующие поверхности двух биомолекул должны быть геометрически (топологически) подобны, точнее, должны быть комплементарны друг другу. Именно такая комплементарность обеспечит правильное взаимное расположение атомов так, чтобы сформировалась система множественных взаимодействий. В

¹ [https://ru.wikipedia.org/wiki/Лиганд_\(биохимия\)](https://ru.wikipedia.org/wiki/Лиганд_(биохимия))

² <https://ru.wikipedia.org/wiki/Аффинность>

³ <https://ru.wikipedia.org/wiki/Паттерн>

биологических молекулах эта комплементарность включает в себя как геометрическую комплементарность, когда выступы на поверхности одной молекулы точно совпадают с впадинами на поверхности другой молекулы, так и "химическую комплементарность", при которой в нужных позициях оказываются именно те атомы и функциональные группы, которые и формируют водородные связи или электростатическое притяжение.

Цит. по: https://ru.wikipedia.org/wiki/Участок_связывания_лиганда_с_рецептором

Участок связывания лиганда с рецептором (*ligand-binding site*), участок связывания, участок связывания лиганда с рецептором, он же домен связывания лиганда с рецептором, домен связывания (*ligand-binding domain*), он же активный участок рецептора (*active site*) или активный домен рецептора (*active domain*) — участок клеточного рецептора, с которым связывается эндогенный физиологический лиганд-агонист (специфическая молекула или ион, такая, как гормон, цитокин или нейромедиатор). Лиганд формирует с этим участком рецептора обратимую нековалентную химическую связь. При этом устанавливается химическое равновесие между несвязанным (свободным) лигандом и лигандом, связанным с рецептором — лиганд диссоциирует, присоединяется, снова диссоциирует. Процесс описывается кинетикой рецептор-лигандных взаимодействий.

Термин «процент занятости рецепторов» (*receptor occupancy*) описывает процент рецепторов, связавшихся с лигандом, от общего количества доступных рецепторов (вернее, их участков связывания). В случаях, когда более одного лиганда может связываться с одним и тем же участком связывания, они конкурируют между собой за соединение с рецептором.

Сайт связывания рецептора проявляет ту или иную степень химической специфичности (ограничивающей химическое строение лигандов, которые могут связываться с данным сайтом) и пространственной специфичности (ограничивающей пространственную структуру лигандов, которые могут связываться с данным участком связывания), а также ту или иную степень сродства к конкретному лиганду, или так называемой аффинности (аффинность есть мера силы связывания рецептора с лигандом, степени сродства рецептора к лиганду).

Участки связывания лигандов с рецепторами являются важной функциональной характеристикой рецепторов.

3. Аффинность. Константа диссоциации.

Количественной мерой аффинности служит константа диссоциации K_d (или константа ассоциации $K_a = 1 / K_d$)⁴. В биохимии и фармакологии это особый вид константы равновесия, который отражает способность лиганда образовывать обратимый комплекс с активным центром.

3.А. Один лиганд при одном активном центра белка.

Для одного активного центра **A** и одного лиганда **L** это равновесие отражается следующим выражением:



где $[A]$ и $[L]$ – концентрации свободных активных центров и лиганда,

$[AL]$ – концентрация комплекса, а k_{+1} и k_{-1} – скорости образования и распада комплекса.

При этом считается, что общая концентрация активных центров $[A_0] = [A] + [AL]$, а изменением концентрации лиганда в среде при образовании комплекса можно пренебречь.

Константа диссоциации K_d равна:

$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[A] * [L]}{[AL]} \quad (2)$$

⁴ <https://ru.wikipedia.org/> Константа_диссоциации

Доля связанного с лигандом **белка** (насыщения) определяется выражением:

$$[AL], \% = \frac{L}{L + K_d} \quad (3)$$

Физический смысл константы диссоциации: K_d – это концентрация лиганда (моль/л), при которой связанной оказывается половина активных центров (рис.1, $n=1$).

Специфичность образования комплекса лиганд-активный центр.

Повторим определение: **специфичность** – это способность белка отличать более аффинных партнеров от менее аффинных (с большими значениями K_d). Как известно состояние термодинамического равновесия – это состояние с минимально возможной энергии системы, в котором все компоненты (микросостояния) распределены в соответствии с их термодинамической вероятностью:

$$p_i = \exp\left(-\frac{G_i}{kT}\right)$$

Соответственно (выражение (2)) константа диссоциации зависит от разницы энергии (обозначим как $\Delta G_{\text{связи}}$) свободных форм и связанной формы, которая равна:

$$\Delta G_{\text{связи}} = RT * \ln K_d$$

А поскольку $\Delta G_{\text{связи}}$ – это сумма малых энергий взаимодействия (электростатических, гидрофобных, водородных связей), то минимальные значения K_d могут быть достигнуты при полном структурном соответствии (комплементарности) активного центра и лиганда.

Расчет характеристик с использованием уравнения линейной регрессии. На практике пользоваться для расчетов гиперболической зависимостью не очень удобно. Известно использование несколько способов линеаризации этой зависимости, которые традиционно использовались для анализа данных по лиганд-белковым взаимодействиям или по кинетике ферментативных реакций.

А. Координаты **Лайнуивера-Берка**⁵ (двойные обратные координаты, математически близок к графику Хейнса — Вульфа⁶). Главный недостаток способа – высокий вклад в результат вносят точки в области низких концентраций, для которых свойственна максимальная погрешность определения.

$\frac{1}{[AL]} = 1 + K_d * \frac{1}{[L]}$	Аналогично кинетике ферментативных реакций (уравнению Михаэлиса-Ментен) $1/[V] = \frac{1}{V_{max}} + \frac{k_m}{V_{max}} * \frac{1}{[S]}$
--	---

⁵ https://ru.wikipedia.org/wiki/График_Лайнвивера_—_Берка

⁶ https://en.wikipedia.org/wiki/Hanes-Woolf_plot

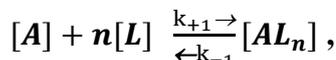
Б. Координаты **Скетчарда**⁷, популярные в исследовании лиганд-рецепторных взаимодействий, математически близки координатам **Иди-Хофсти**⁸. С практической точки зрения, использование уравнения Иди-Хофсти более удобно, поскольку более просто рассчитать не только значения K_d или k_m , но и ошибку их определения.

$[AL] = 1 - K_d * \frac{[AL]}{[L]}$	Кинетика ферментативных реакций $V = V_{max} - k_m * \frac{V}{[S]}$
-------------------------------------	--

3.Б. Один лиганд и несколько активных центров белка: кооперативность связывания.

Если в молекуле белка существует несколько одинаковых активных центров, то возникает вопрос: - как влияет присоединение лиганда к одному активному центру на свойства остальных? То есть, характерно ли для нашего белка такое явление как **кооперативность**⁹? Если сродство к лиганду при этом повышается, - то это положительный кооперативный эффект; а если снижается – то отрицательный.

Для нескольких активных центров вместо выражения (1) состояние равновесия описывается следующим выражением:



Константа диссоциации в этом случае (*уравнение Хилла-Ленгмюра*)¹⁰ равна:

$$K_d = \frac{[A] * [L]^n}{[AL_n]}, \quad \text{где } n \text{ – коэффициент кооперативности Хилла}$$

Доля связанного с лигандом белка θ в этом случае будет равна:

$$\theta = \frac{[L]^n}{K_d + [L]^n} = \frac{[L]^n}{(K_A)^n + [L]^n} = \frac{1}{1 + \left(\frac{K_A}{[L]}\right)^n}$$

В этом выражении K_d – это константа диссоциации для одного активного центра, но в эксперименте обычно измеряется степень связывания с лигандом всего белка, т.е. всех активных центров. И константа K_A – это концентрация лиганда при которой оказывается связанной половина активных центров (Рис.1).

⁷ https://en.wikipedia.org/wiki/Scatchard_equation

⁸ https://en.wikipedia.org/wiki/Eadie-Hofstee_diagram

⁹ <https://ru.wikipedia.org/wiki/Кооперативность>

¹⁰ [https://en.wikipedia.org/wiki/Hill_equation_\(biochemistry\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Hill_equation_(biochemistry))

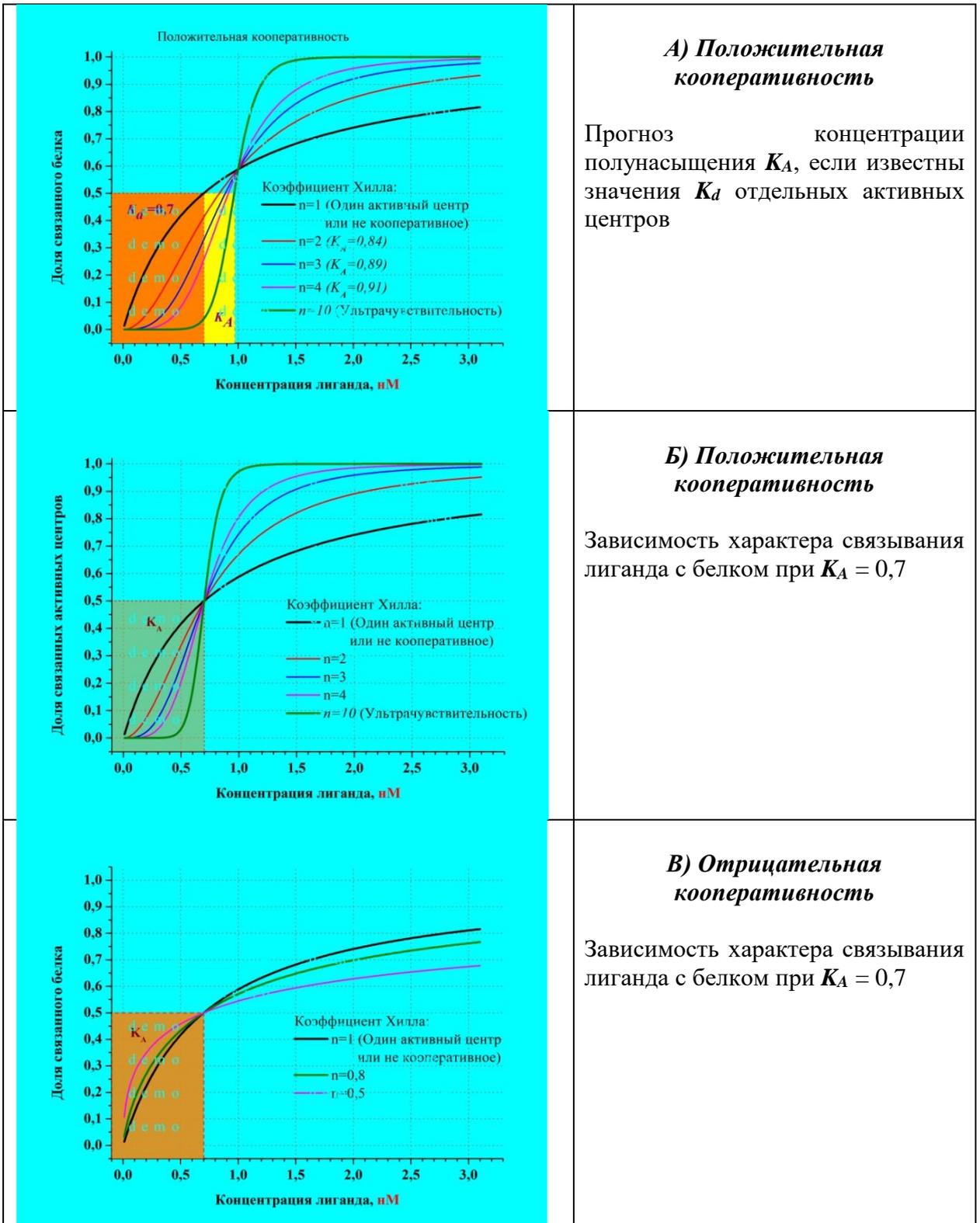


Рис.1. Зависимости характеристик связывания лиганд-белок от параметра кооперативности Хилла.

Линеаризация уравнения Хилла (график Хилла).

Отношение долей связанной и не связанной с лигандом фракций белка определяется выражением:

$$\frac{\theta}{1-\theta} = \frac{[L]^n}{K_d} = \frac{[L]^n}{(K_A)^n}$$

После логарифмирования получим:

$$\log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) = n * \log[L] - \log K_d = n * \log[L] - n * \log K_A$$

График, построенный в этих координатах, называется *графиком Хилла*. Тангенс угла наклона на этом графике (рис.2) равен коэффициенту Хилла n_H . Линия пересекается с осью ординат в точке $X = \log K_A$. В зависимости от полученного значения n_H :

- $n_H = 1$ - нет кооперативного эффекта;
- $n_H > 1$ - положительный кооперативный эффект;
- $n_H < 1$ - отрицательный кооперативный эффект.

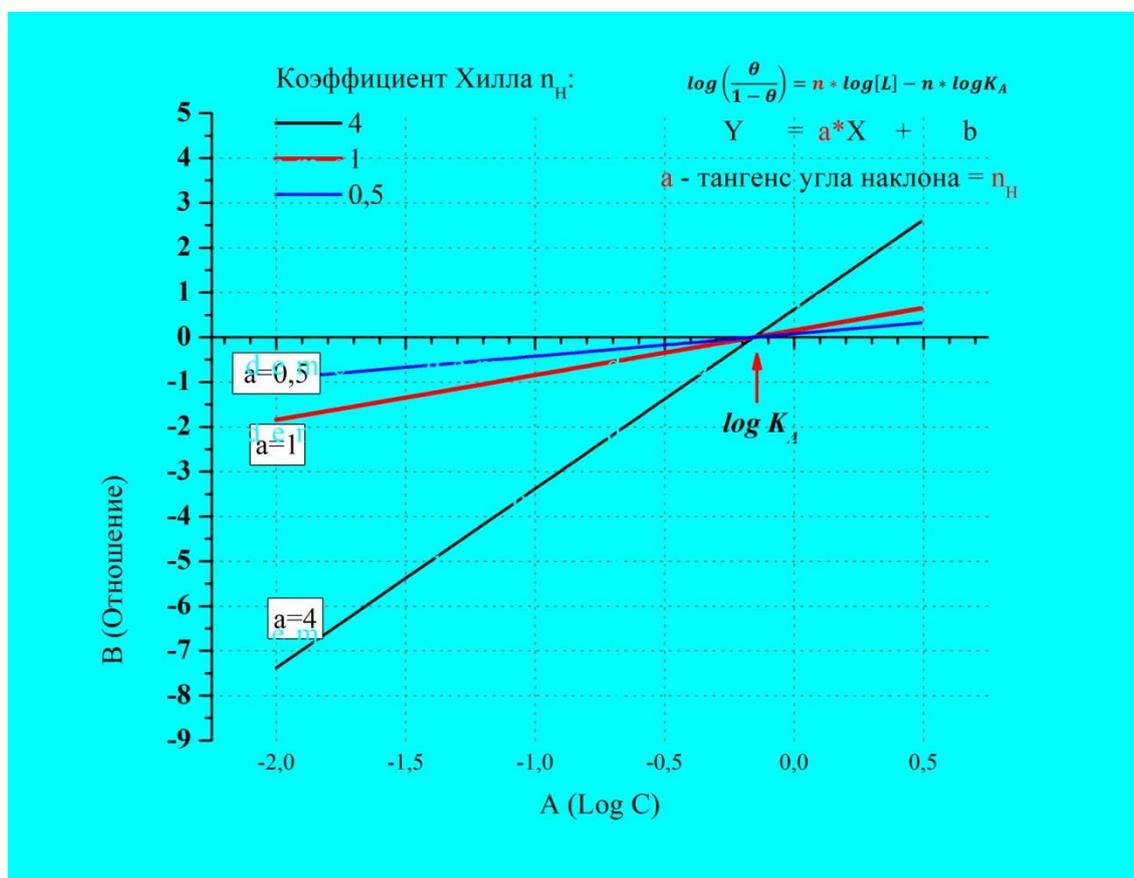


Рис.2. График Хилла