

## Práctico 3

### Anexo-Interacciones receptor-ligando

*Sección Biofísica*

*Facultad de Ciencias, Universidad de la República*

#### Apéndice: Algunos fundamentos

A nivel bioquímico, muchas de las actividades de los seres vivos dependen de la unión entre moléculas pequeñas y macromoléculas o de éstas con otras macromoléculas. En este módulo, estudiaremos las interacciones entre receptores (término que se usa para designar a la molécula “grande”) y ligandos (moléculas pequeñas) en el equilibrio.

Supongamos que nuestro receptor une una única molécula de ligando, lo que podemos representar por:



Donde  $R$  es el receptor,  $L$  el ligando y  $RL$  es el complejo que forman;  $K_a$  es la constante de equilibrio de asociación que, para una solución suficientemente diluida, puede expresarse como:

$$K_a = \frac{[RL]}{[R][L]}$$

Una de las variables medidas en este tipo de estudios es la fracción de saturación, definida como la fracción de los sitios totales de receptor que están ocupados:

$$Y \equiv \frac{[\text{sitios ocupados}]}{[\text{sitios totales del receptor}]} = \frac{[RL]}{[R] + [RL]}$$

Esta podría calcularse a partir de la medida de alguna propiedad fisicoquímica que varíe con la unión del ligando al receptor, por ejemplo, la variación de absorbancia del complejo respecto a la forma libre del receptor.

Otra variable que generalmente se obtiene de experiencia de diálisis de equilibrio es la cantidad de sitios ocupados por molécula de receptor, que notamos como  $r$ :

$$r \equiv \frac{[\text{sitios ocupados}]}{[\text{concentración total del receptor}]} = \frac{[RL]}{[R] + [RL]}$$

Nótese que para el ejemplo de un receptor con un único sitio, ambas funciones coinciden. No obstante, es fácil ver que si una molécula tiene sitios para el ligando, la cantidad de sitios totales puede calcularse como sigue:

$$[\text{sitios totales}] = n \times [\text{receptor total}]$$

de donde se obtiene que:

$$Y = \frac{[\text{sitios ocupados}]}{n \times [\text{receptor total}]} = \frac{r}{n}$$

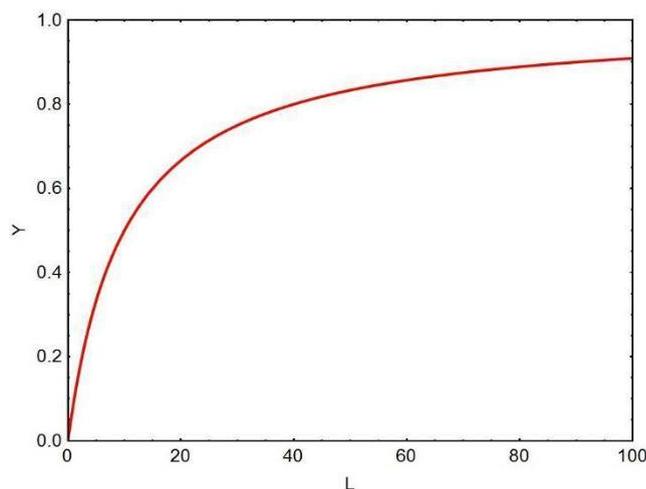
Como en general se miden las funciones o en función de la concentración de ligando, es más útil obtener una expresión de las primeras en función de esta última. Utilizando la definición de  $K_a$ , como  $[RL] = K_a [R][L]$ , podemos escribir:

$$Y = \frac{K_a [R][L]}{[R] + K_a [R][L]} = \frac{K_a [L]}{1 + K_a [L]} = \frac{[L]}{K_d + [L]}$$

En la última igualdad,  $K_d$  es la constante de equilibrio de la reacción de disociación

$$K_d = \frac{1}{K_a}$$

Un gráfico de  $Y$  vs  $[L]$  debería tener la siguiente forma:



**Figura 1**

Un tipo de receptor que muestra este tipo de curva de saturación es la mioglobina, que liga oxígeno en los tejidos. A su vez, esta curva la presentan las enzimas cuya

cinética es descrita por la ecuación de Michaelis y Menten. En ambos casos, las ecuaciones describen una hipérbola rectangular como la de la Figura 1.

Se puede demostrar (ver ejercicios) que, si un receptor tiene todos sus sitios idénticos e independientes entre sí, la curva que se obtiene es de este tipo. La única diferencia, es que si bien la gráfica de  $Y$  vs  $[L]$  sigue teniendo una asíntota horizontal en 1, el gráfico de  $r$  vs  $[L]$  daría, en el caso de varios sitios idénticos e independientes entre sí, una hipérbola con asíntota horizontal en un número entero que corresponde al número de sitios por receptor ( $n$ ). De hecho, esto nos provee de un método para determinar el número de sitios de unión de un receptor.

### Determinando parámetros

Es posible a partir de un experimento en el que se miden  $r$  y  $[L]$  determinar parámetros como el número de sitios y la constante de asociación. Entonces, el problema es encontrar una ecuación que ajuste los datos experimentales. Si pensamos que puede tratarse de una hipérbola rectangular, se puede intentar aplicar un ajuste no lineal, disponible en varios programas computacionales. Sin embargo, esta metodología por sí sola no es adecuada para descartar otros modelos de unión. Además, es difícil saber qué hace un programa a la hora de realizar el ajuste, a menos que se tenga un gran dominio del mismo.

La forma tradicional de resolver este problema es realizar una transformación de los datos que permita linealizarlos, ya que de esta manera es más fácil para el ojo humano detectar desviaciones respecto al comportamiento esperado. Asumiendo que el modelo es válido, se hace una transformación de la función de saturación que puede representarse según:

$$g([L], r) = a * f([L], r) + b$$

de manera que al graficar  $g$  vs  $f$  se obtenga una recta.

Si al transformar los datos y realizar el ajuste no se obtiene una recta, tenemos argumentos para pensar que el modelo de unión propuesto no es el correcto. Si da una recta podemos obtener los parámetros  $a$  y  $b$ . A modo de ejemplo puede verse que:

$$\frac{1}{r} = \frac{K_d}{n} \frac{1}{[L]} + \frac{1}{n}$$

es una transformación de la hipérbola original, de manera que graficando  $1/r$  vs  $1/n$  deberíamos obtener una recta. Si utilizamos un ajuste por mínimos cuadrados podemos obtener la pendiente y la ordenada en el origen de la mejor recta, y a partir

de estos datos calcular los parámetros que nos interesan ( $K_d$ ,  $n$ ). El problema con esto es que la recta obtenida por mínimos cuadrados es la que mejor se ajusta a los datos originales, en el caso de que los errores de medida tengan ciertas propiedades que generalmente no cumplen los datos transformados (ver bibliografía, “Fundamentals of Enzyme Kinetics”).

En definitiva, es bueno utilizar una combinación de varias linealizaciones y ajustes no lineales para analizar los datos, siempre siendo consciente de lo que se está haciendo.

### Otros casos importantes

Se ha dicho que en el caso de enfrentarnos a un receptor simple las diferentes transformaciones deben dar rectas, pero ¿en qué ocasiones esto no ocurre? Si analizamos la saturación de la hemoglobina por  $O_2$ , se obtiene una curva como la siguiente:

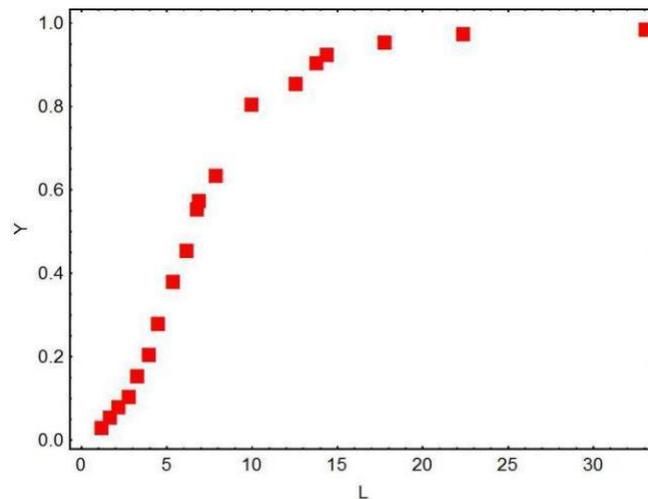
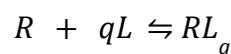


Figura 2

Obviamente no podemos ajustar una hipérbola a esta curva. Los receptores que muestran una curva de saturación sigmoide como esta, se dice que son cooperativos. Hay otros casos en los que no es evidente qué tipo de curva se ajusta a la gráfica y se requieren otros criterios para entender lo que pasa.

Una posibilidad para explicar el gráfico sería suponer que el receptor une  $q$  moléculas de ligando en una oportunidad



En este caso la función de saturación sería:

$$Y = \frac{[L]^q}{K_d + [L]^q}$$

La función de saturación también puede expresarse en función de la constante de semi-saturación ( $K_{0.5}$ ), que es la concentración de ligando a la cual  $Y = \frac{1}{2}$ , entonces:

$$\frac{[L]^q}{K_d + [L]^q} = \frac{1}{2} \Rightarrow K_d = [L]^q$$

por lo que la concentración de ligando a la cual  $Y = \frac{1}{2}$  es  $[L]_{0.5} = \sqrt[q]{K_d} = K_{0.5}$ .

Por lo tanto, la función de saturación puede expresarse como:

$$Y = \frac{[L]^q}{K_{0.5}^q + [L]^q}$$

Una forma de obtener una recta a partir de esta función de saturación es graficar  $\log\left(\frac{Y}{1-Y}\right)$  vs  $\log[L]$  en donde generalmente se utiliza logaritmo neperiano. Este se conoce como el gráfico de Hill (en honor a quien lo propuso, A.V. Hill).

Según este modelo, si se satisface la función de saturación propuesta, al realizar el gráfico los puntos deben alinearse en una recta cuya pendiente se corresponde con el número de sitios de unión en la molécula. No obstante, si se realiza el gráfico de Hill para la hemoglobina, que tiene 4 sitios de unión para el  $O_2$ , se obtiene una pendiente de aproximadamente 2.8. ¿Cómo podría explicarse este resultado?

### Cooperatividad

En general, por cuestiones cinéticas y termodinámicas, las explicaciones de cooperatividad basadas en la unión de varias moléculas a la vez no son buenas y deben postularse especies intermediarias. En ese marco, la cooperatividad resulta del cambio en la afinidad de un sitio por los ligandos al aumentar la saturación; es decir, la unión de un ligando favorece (“cooperatividad positiva”) o desfavorece (“cooperatividad negativa”) la unión de los otros ligandos. La explicación de Hill puede verse como un extremo de cooperatividad positiva, en el que todos los sitios se ocupan de manera concertada o no se ocupan. Se discutirá en los prácticos las implicancias de estos fenómenos y su importancia biológica.

A pesar de que el modelo de unión de Hill en general no es aplicable, puede utilizarse el gráfico de Hill con el fin de decidir si un receptor es o no cooperativo. En este sentido, la pendiente del gráfico de Hill (número de Hill,  $h$ ), ya no sería una

pendiente sino una función de la concentración de ligando  $h([L])$ . Puede demostrarse que esta función tiene un extremo relativo y que su valor  $h_{ext}$  está relacionado con la cooperatividad según el siguiente criterio:

$$h_{ext} < 1 \text{ Cooperatividad negativa}$$

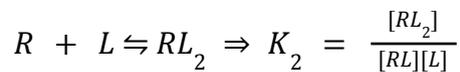
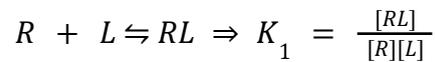
$$h_{ext} = 1 \text{ No cooperatividad}$$

$$h_{ext} > 1 \text{ Cooperatividad positiva}$$

### Algunas consideraciones estadísticas

Cuando se analizan los modelos de unión y se requiere evaluar la interacción entre los sitios, es conveniente definir constantes de afinidad para cada sitio; la constante de afinidad media en cada etapa está relacionada con esas constantes “microscópicas” por factores estadísticos.

Por ejemplo, si tenemos un dímero, las ecuaciones químicas de equilibrio correspondientes serían:



donde  $K_1$  y  $K_2$  son las constantes de asociación macroscópicas.

Ahora bien, hay dos formas de construir el complejo  $RL$ , una es con el ligando en un sitio (que simbolizamos con  $L - R$ ) y la otra es con el ligando en otro sitio ( $R - L$ ) según el siguiente esquema:



donde  $K'_{1a}$ ,  $K'_{1b}$ ,  $K'_{2a}$ ,  $K'_{2b}$  son las constantes de asociación microscópicas.

Se puede ver que  $K_1 = K'_{1a} + K'_{1b}$  y que  $K_2 = \frac{K'_{2a}K'_{2b}}{K'_{2a} + K'_{2b}}$ . En el caso particular

en el que el dímero es simétrico, quedaría  $K_1 = 2K'_{1a}$  y  $K_2 = \frac{K'_{2a}}{2}$ . A los factores que multiplican a las constantes microscópicas para dar las macroscópicas es a los que llamamos factores estadísticos (en nuestro ejemplo 2 y 1/2). Un razonamiento similar en el caso general de una macromolécula con sitios, muestra que en la unión de la  $i$  – ésima molécula de ligando, la relación entre constantes microscópicas y macroscópicas (en condiciones de simetría) es:

$$K_i = \frac{N-i+1}{i} K'_i$$

## Enzimas

La aplicación de lo discutido a enzimas es delicada, ya que requiere suponer que la unión de los sustratos es mucho más rápida que la catálisis, con lo que se aproxima a una situación de equilibrio de unión. Más aún, en algunos casos la interpretación se complica con diferentes constantes catalíticas en los distintos sitios. De todas formas, algunos de los conceptos extraídos de los ensayos de unión son extrapolables al trabajo con enzimas si se toman las precauciones necesarias.

## Bibliografía

- A. Cornish-Bowden (1995) 'Fundamentals of Enzyme kinetics'
- B. Levitzky (1978) 'Cuantitative Aspects of Allosteric Mechanisms'  
Springer-Verlag, Berlin
- C. Alan Fersht (1985) 'Enzyme Structure and Mechanism'