

Práctico 3

INTERACCIONES RECEPTOR-LIGANDO

Sección Biofísica

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

En este módulo se pretende analizar las interacciones receptor-ligando en el equilibrio.

Los objetivos de esta clase son:

- Analizar resultados experimentales de unión receptor-ligando en diferentes sistemas.
- Comprender cómo y por qué realizar rectificaciones.
- Discutir diferentes modelos que me permitan explicar los datos experimentales.
- Discutir los aspectos moleculares de la cooperatividad.

Actividades**1. Receptor con un único sitio de unión**

- A partir de la definición de fracción de saturación $Y = \frac{\text{sitios ocupados}}{\text{sitios totales}}$, hallar cómo varía Y en función de la concentración de ligando.
- ¿Qué fracción de los sitios se encuentran ocupados cuando la concentración de ligando tiene un valor igual al de la constante de disociación?
- Graficar en un mismo eje de coordenadas, la fracción de saturación en función de la concentración de ligando tomando los siguientes valores de k_d : 0.5, 1, 1.5 y 20. ¿Qué diferencias encuentra al cambiar k_d ?

Para esto puede utilizarse una planilla de cálculo (Excel, por ejemplo) tomando un rango de concentración de ligando de 0 a 50 y calcular la saturación a partir de la expresión obtenida en a) para los distintos valores de k_d propuestos.

2. Análisis de los datos experimentales (tablas 1, 2 y 3) de unión receptor.

- Realice el gráfico directo (r vs $[L]$). Proponga un posible esquema de unión.

- b. Grafique sus datos utilizando las rectificaciones de la hipérbola rectangular. Por ejemplo, puede realizar el gráfico de Scatchard (r vs $\frac{r}{[L]}$), el de Lineweaver-Burk ($\frac{1}{r}$ vs $\frac{1}{[L]}$) y el de Langmuir-Hines ($\frac{[L]}{r}$ vs $[L]$).
- c. Compare sus resultados con las hipótesis realizadas en la parte a. y, de ser posible, obtenga el número de sitios de unión al ligando presentes en la macromolécula y la (o las) constantes de equilibrio correspondientes

3. Análisis de los datos experimentales para la Hemoglobina y estudio del modelo de Hill

- a. Realice el gráfico directo con los datos de la tabla 4.
- b. ¿Qué esperarías obtener al realizar la rectificación del modelo de la hipérbola rectangular con estos datos? Pruébalo.
- c. Proponga un esquema de unión alternativo.
- d. Realice el gráfico de Hill ($\ln(\frac{Y}{1-Y})$ vs $\ln[L]$)
- e. ¿Qué información obtenemos de la pendiente del gráfico? ¿Y de la ordenada en el origen?
- f. El 2,3-bisfosfoglicerato (BPG) se une a la hemoglobina y tiene un gran efecto sobre la afinidad de ésta por el oxígeno. Si denominamos P_{50} a la presión parcial de oxígeno en la cual el 50 % de los sitios de unión se encuentran ocupados, encontramos que el valor de esta es de 1 y 26 en ausencia y presencia de BPG respectivamente.

Realice el gráfico de fracción de saturación en función de la presión parcial de oxígeno en ausencia y presencia de BPG, compare las gráficas e indique qué consecuencias trae la unión del BPG a la desoxihemoglobina. (Sugerencia: Puede utilizar un procedimiento similar al usado en 1c).

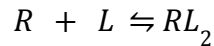
4. Modelo de Adair para un dímero

Un modelo fenomenológico más complejo que el de Hill, y que explica mejor la unión receptor-ligando cooperativa, es el de Adair, el cual involucra la consideración de complejos de composición intermedia.

Supone la unión secuencial de los ligandos a los sitios del receptor, pero sin proponer ningún mecanismo en particular.

En el caso de un dímero:





- Escribir la fracción de saturación para este ejemplo, utilizando tanto constantes macroscópicas como microscópicas.¹
- ¿Qué sucede cuando los sitios no interactúan? (Para ello puede suponerse que $k'_1 = k'_2 = k'$)
- Para el dímero simétrico, grafique la fracción de saturación (y) en función de la concentración de ligando para distintos valores de k'_1 y k'_2 , pasando por las tres condiciones siguientes: (1) $k'_1 = k'_2$, (2) $k'_1 > k'_2$ y (3) $k'_1 < k'_2$.
- Explicar por qué un dímero asimétrico sin interacción entre los sitios exhibe cooperatividad negativa.
- (*) Mostrar de manera general que el número de Hill extremo es un indicador de cooperatividad y en particular en el caso del dímero simétrico mostrar que la cooperatividad exhibida depende de los valores de k'_1 y k'_2 .

5. Modelos que permiten explicar cómo ocurre la cooperatividad

(Actividad Opcional)

Busque los postulados del modelo simétrico de *Monod, Wyman y Changeaux* y del modelo secuencial de *Koshland, Nemethy y Filmer* e intente dar una explicación intuitiva de porque estos modelos pueden dar lugar a la cooperatividad.

¹ Suponer que el dímero es simétrico, o sea que, refiriéndonos a la nomenclatura utilizada en el anexo teórico, tenemos que $k'_{1a} = k'_{1b} = k'_1$ y $k'_{2a} = k'_{2b} = k'_2$

Anexo - Tablas de datos

| <i>Tabla 1: Datos Simulados I</i> | | <i>Tabla 2: Datos Simulados II</i> | | <i>Tabla 3: Unión de SCN- a la seroalbúmina humana.</i> | |
|-----------------------------------|----------|------------------------------------|----------|---|----------|
| <i>[Ligando] mM</i> | <i>r</i> | <i>[Ligando] mM</i> | <i>r</i> | <i>[SCN⁻] M</i> | <i>r</i> |
| 0.1 | 0.13 | 1.2 | 1.15 | 1.58 E-5 | 0.5 |
| 0.2 | 0.24 | 1.5 | 1.32 | 0.00010 | 1 |
| 0.32 | 0.36 | 2.3 | 1.68 | 0.00020 | 2 |
| 0.45 | 0.5 | 2.8 | 1.82 | 0.00080 | 2.9 |
| 0.8 | 0.77 | 3.5 | 2 | 0.0020 | 5.7 |
| 1.46 | 1.11 | 5.2 | 2.3 | 0.0040 | 6 |
| 2.05 | 1.42 | 7.4 | 2.5 | 0.0063 | 7 |
| 3.5 | 1.82 | 10.5 | 2.77 | 0.016 | 10.5 |
| 3.8 | 1.9 | 11.2 | 2.82 | 0.032 | 12 |
| 4.9 | 2.1 | 13 | 2.89 | 0.079 | 20 |
| 6.2 | 2.17 | 14.3 | 2.92 | 0.1 | 25.5 |
| 7.1 | 2.26 | 15.5 | 3.05 | 0.254 | 34.3 |
| 8.2 | 2.3 | 17.1 | 3.1 | 0.63 | 40.1 |
| 12.1 | 2.55 | 20.4 | 3.15 | | |
| 18.2 | 2.6 | 25.1 | 3.25 | | |
| | | 27.9 | 3.4 | | |
| | | 32.5 | 3.5 | | |
| | | 40.1 | 3.59 | | |
| | | 45.3 | 3.7 | | |
| | | 55 | 3.8 | | |

Los datos de la tabla 3 son de Scatchard, Scheimberg y Armstrong 1950.

Tabla 4: Saturación de la Hemoglobina Humana, extraído de “Linked Functions and Reciprocal Effects in Hemoglobin: A Second Look” J.W. Wyman (1964), *Advances in Protein Chemistry*, pp 223-286.

| pO_2 | $Y(O_2)$ |
|--------|----------|
| 1.2 | 0.025 |
| 1.7 | 0.05 |
| 2.2 | 0.075 |
| 2.8 | 0.1 |
| 3.3 | 0.15 |
| 4.0 | 0.2 |
| 4.5 | 0.275 |
| 5.4 | 0.375 |
| 6.2 | 0.45 |
| 6.8 | 0.55 |
| 6.9 | 0.57 |
| 7.9 | 0.63 |
| 10.0 | 0.8 |
| 12.6 | 0.85 |
| 13.8 | 0.9 |
| 14.4 | 0.92 |
| 17.8 | 0.95 |
| 22.4 | 0.97 |
| 33.1 | 0.98 |