

## 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 esperaba obtener al realizar la rectificación del modelo de la hipérbola rectangular con estos datos? Pruébelo.
- 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).

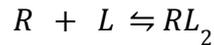
### 4. Modelo de Adair para un dímero

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.<sup>1</sup>
- ¿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.

---

<sup>1</sup> 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<sup>-</sup> a la seroalbúmina humana.</i>	
<i>[Ligando] mM</i>	<i>r</i>	<i>[Ligando] mM</i>	<i>r</i>	<i>[SCN<sup>-</sup>] 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