

Interacción Receptor-Ligando (I)

Ismael Acosta
(iacosta@fcien.edu.uy)
Facultad de Ciencias, UdelaR

Contenido de la clase

- Receptor con un único sitio de unión
- Análisis de datos experimentales y linealizaciones
- Modelo de Hill (Semana del 17/04-21/04)
- Modelo de Adair (Semana del 17/04-21/04)
- Cooperatividad (Semana del 17/04-21/04)

Objetivos del práctico

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

Contenido de la clase

- Receptor con un único sitio de unión
- Análisis de datos experimentales y linealizaciones

Contenido de la clase

- **Receptor con un único sitio de unión**
- Análisis de datos experimentales y linealizaciones

A partir de la definición de Fracción de Saturación:

$$Y \equiv \frac{\textit{sitios ocupados}}{\textit{sitios totales}}$$

Hallar cómo varía Y en función de la concentración del ligando.

Supongamos un receptor (R) que se une a una única molécula de ligando (L) a través de una reacción *reversible*:



Donde RL es el **Complejo Receptor-Ligando**.

La **Constante de Asociación** (en el equilibrio) para una solución *suficientemente diluida*, se expresa como:

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

En este modelo, la cantidad de sitios ocupados es la concentración del complejo RL (*[sitios ocupados] = [RL]*).

La cantidad de sitios totales del receptor será la cantidad (en concentración) de receptor unido al ligando (complejo RL , $[RL]$) sumado a la cantidad de receptor libre (sin unirse, $[R]$).

Esto es:

$$[\textit{sitios totales}] = [R] + [RL]$$

A partir de la Ecuación de K_a podemos expresar $[RL]$ como:

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

Por lo tanto, Y queda determinado como,

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

Si tomamos factor común $[R]$ en el denominador podemos obtener una expresión *independiente* de $[R]$:

$$Y = \frac{K_a [R][L]}{[R] + K_a [R][L]} = \frac{K_a [R][L]}{[R](1 + K_a [L])} \Rightarrow Y = \frac{K_a [L]}{1 + K_a [L]}$$

Esta expresión ya es suficiente para observar cómo varía Y vs. $[L]$. No obstante, podemos obtener una expresión similar en función de la **Constante de Disociación del RL** (K_d).

La **Constante de Disociación** (K_d) (en el equilibrio) es la constante que relaciona las concentraciones de la reacción $RL \rightleftharpoons R + L$, y es, por tanto, el inverso de K_a :

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

Por lo tanto, podemos expresar la Fracción de Saturación (Y) en función de la Constante de Disociación (K_d), dividiendo numerador y denominador por K_a :

$$Y = \frac{K_a [L]}{1 + K_a [L]} = \frac{\left(\frac{K_a [L]}{K_a}\right)}{\left(\frac{(1 + K_a [L])}{K_a}\right)} = \frac{[L]}{\frac{1}{K_a} + [L]} = \frac{[L]}{K_d + [L]}$$

Esta ecuación pertenece a la familia de **Funciones Racionales:**

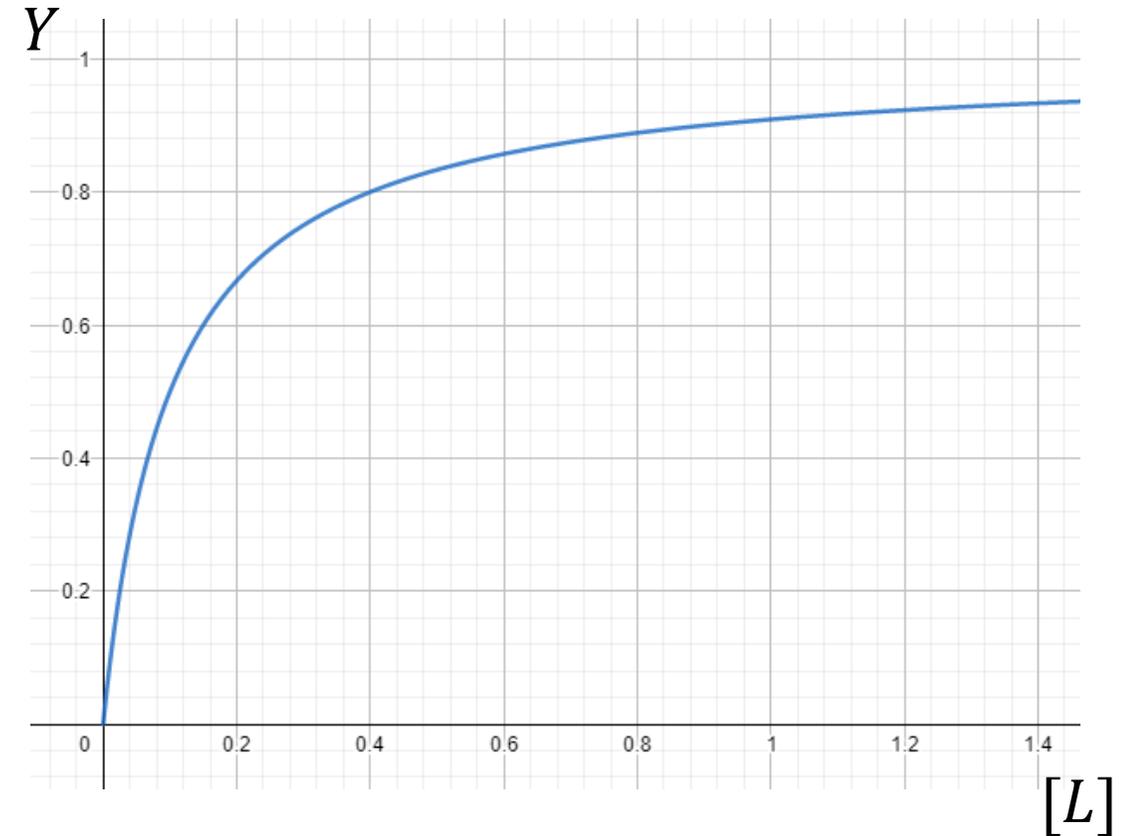
Racionales:

$$f(x) = \frac{ax + b}{cx + d}, \quad a, b, c, d \in \mathbb{R}$$

Notar que en el caso de la **Función de Saturación:**

$$a = 1, b = 0, c = 1, d = K_d$$

Dicha familia de funciones genera curvas conocidas como **Hipérbolas Rectangulares.**



Notar que la función $Y([L])$ posee una **Asíntota Horizontal** en $Y = 1$. Podemos demostrarlo estudiando el límite de Y cuando $[L] \rightarrow +\infty$:

$$\lim_{[L] \rightarrow +\infty} Y = \lim_{[L] \rightarrow +\infty} \frac{[L]}{K_d + [L]} \approx \lim_{[L] \rightarrow +\infty} \frac{[L]}{[L]} = 1$$

¿Qué fracción de los sitios totales se encuentran ocupados cuando la concentración de ligando tiene un valor igual al de la Constante de Disociación?

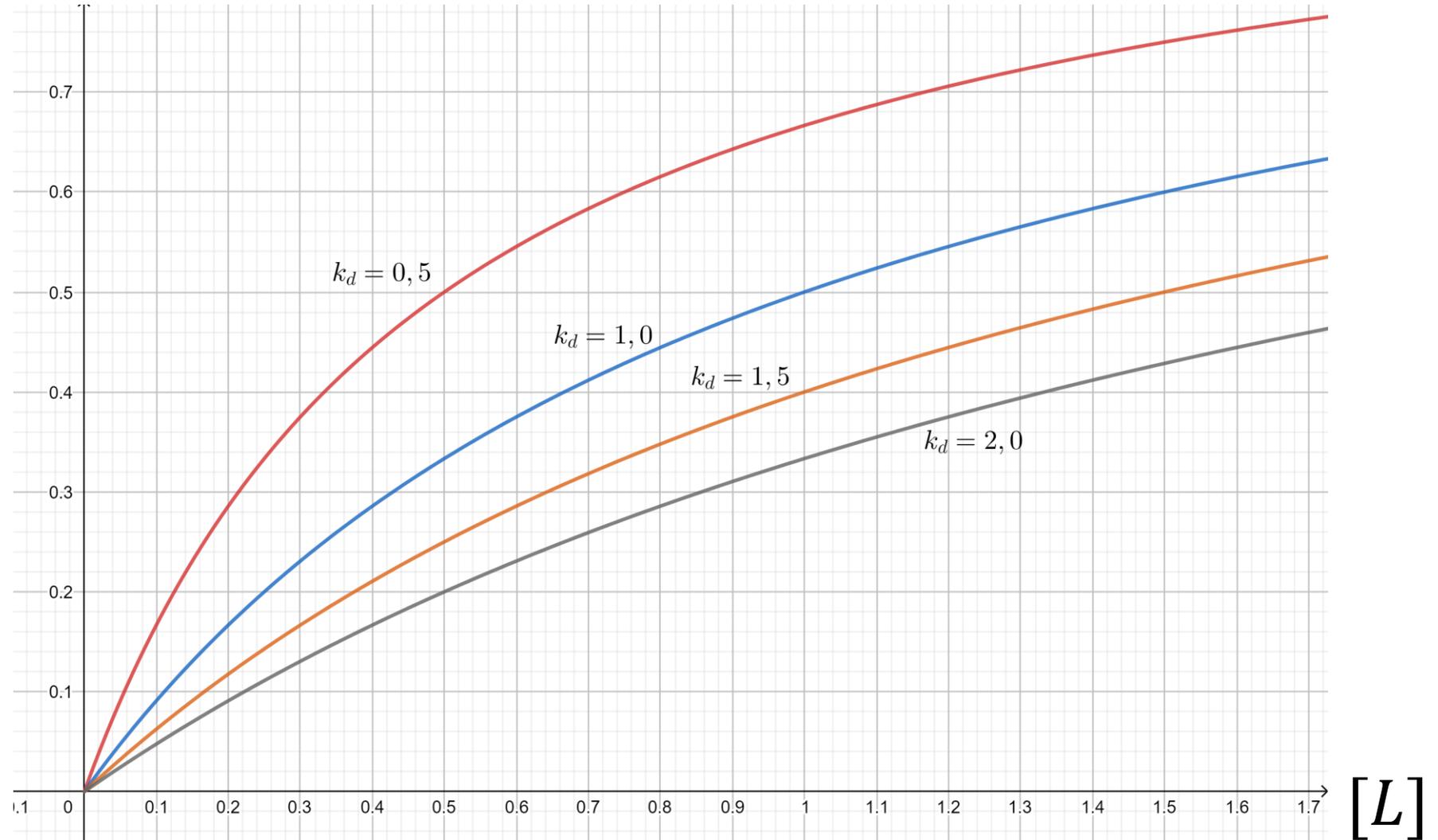
$$\text{si } [L] = K_d \implies Y = \frac{[L]}{[L] + [L]} = \frac{[L]}{2[L]} = \frac{1}{2}$$

Cuando $[L] = K_d$, $Y = 0,5$, es decir, la mitad de los sitios totales se encuentran ocupados por ligando.

A la Constante de Disociación también se le llama **Constante de Semi-Saturación** ($K_{0,5}$).

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; 2, 0.
¿Qué diferencias encuentra al cambiar K_d ?

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



A medida que aumentamos K_d , la fracción de saturación (Y) avanza más lentamente.

Un mayor valor de K_d implica que es *más probable* encontrar receptores libres que receptores formando complejos con el ligando.

La velocidad con la que crece la fracción de saturación posee una relación inversa con la constante de disociación.

¿Cómo demostrarían esta afirmación? [Ver Anexo 1 de esta presentación]

Contenido de la clase

- Receptor con un único sitio de unión
- Análisis de datos experimentales y linealizaciones

Contenido de la clase

- Receptor con un único sitio de unión
- **Análisis de datos experimentales y linealizaciones**

Ahora trabajaremos con una nueva variable, denominada r cuya definición es:

$$r \equiv \frac{[\textit{sitios ocupados}]}{[\textit{concentración total del receptor}]}$$

Si una molécula de receptor tiene n sitios de unión con el ligando, la cantidad de sitios totales puede escribirse como:

$$[\textit{sitios totales}] = n \cdot [\textit{receptor total}]$$

Por lo tanto,

$$r = nY \implies Y = \frac{r}{n}$$

Por lo tanto,

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

Notar que si Y tiene una asíntota horizontal en $Y = 1$, la nueva variable r **tiene una asíntota horizontal en $r = n$** . Notar que n es un número entero positivo ya que es una magnitud discreta que representa del número de sitios de un receptor.

A partir de los datos de las tablas 1-3, realice el gráfico directo r vs. $[L]$. Proponga un posible esquema de unión en cada caso.

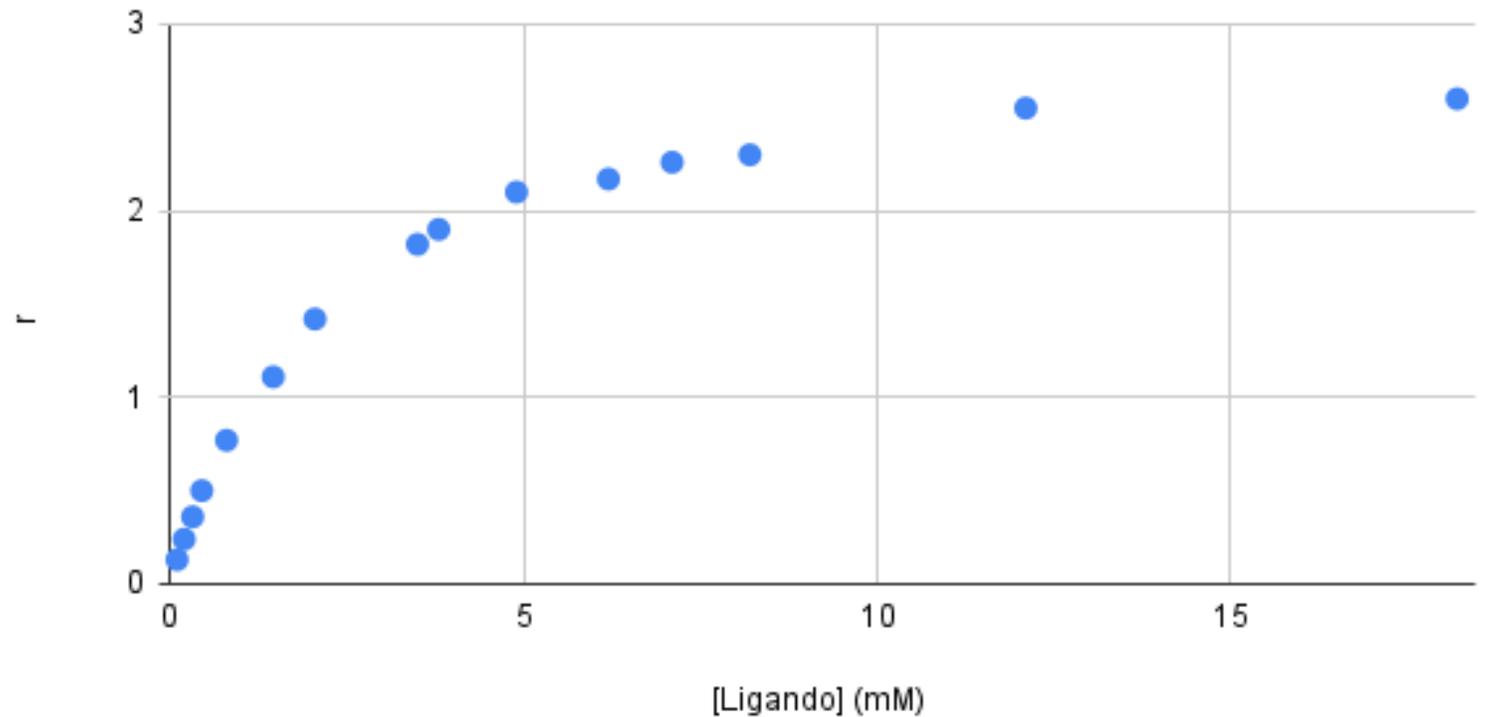
Posible esquema de unión:



Supondremos que la probabilidad de unión de un ligando a un sitio del receptor es independiente de la probabilidad de unión de otro ligando a otro sitio (no cooperativo).

r vs. [Ligando] (mM) - Tabla 1

Interacción Receptor-Ligando



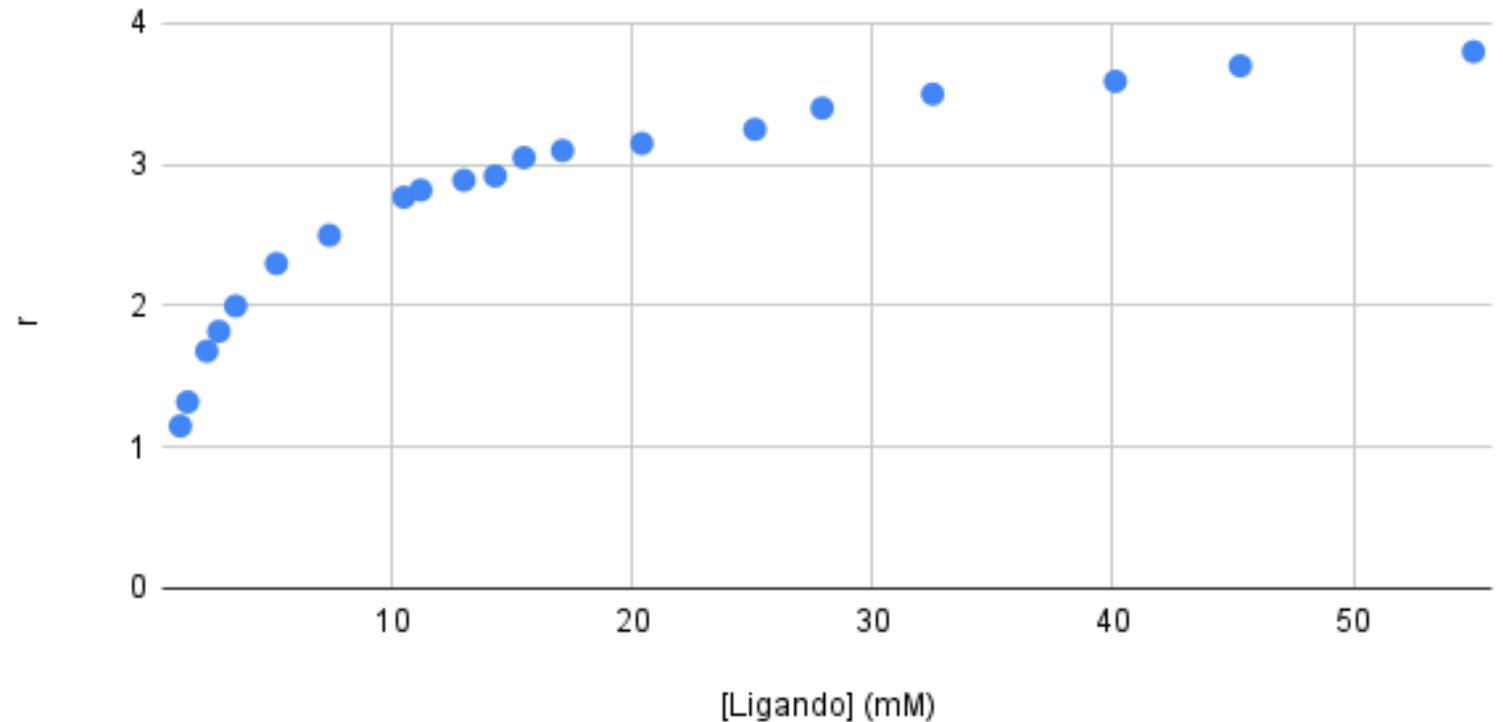
Posible esquema de unión:



Supondremos que la probabilidad de unión de un ligando a un sitio del receptor es independiente de la probabilidad de unión de otro ligando a otro sitio (no cooperativo).

r vs. [Ligando] (mM) - Tabla 2

Interacción Receptor-Ligando



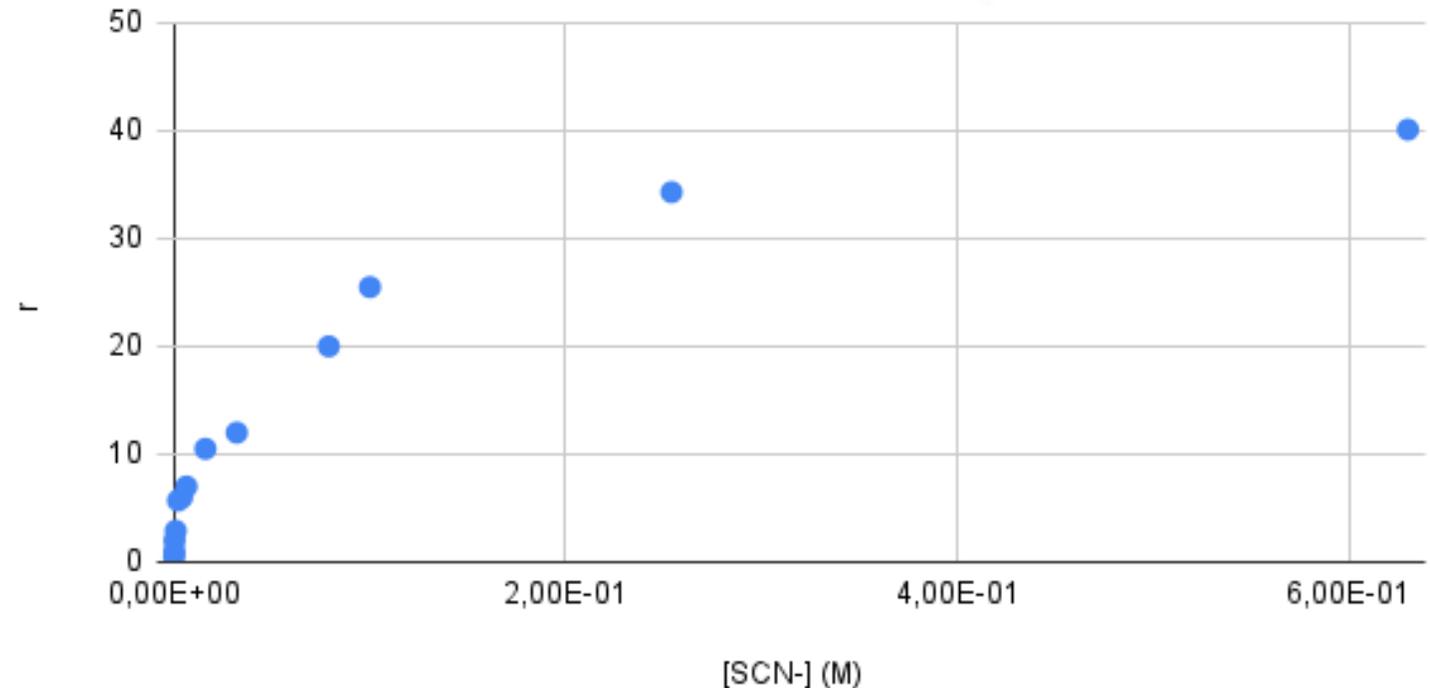
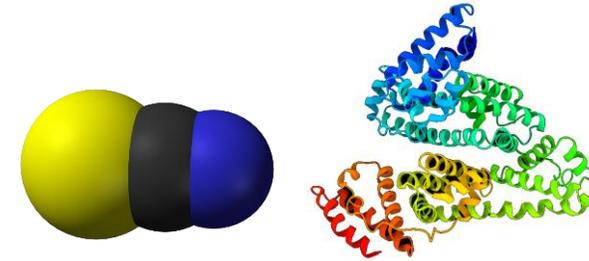
Posible esquema de unión:



Supondremos que la probabilidad de unión de un ligando a un sitio del receptor es independiente de la probabilidad de unión de otro ligando a otro sitio (no cooperativo).

r vs. [SCN⁻] (M) - Tabla 3

Interacción Receptor-Ligando



[Scatchard, G., Scheinberg, I. H., & Armstrong Jr, S. H. \(1950\). Physical Chemistry of Protein Solutions. V. The Combination of Human Serum Albumin with Thiocyanate Ion1a. *Journal of the American Chemical Society*, 72\(1\), 540-546.](#)

Las gráficas r vs. $[L]$ parecen exhibir una curva de tipo hipérbola rectangular. No obstante, no son muy ilustrativas a simple vista.

Tampoco permiten obtener directamente los parámetros del modelo (esto es, K_d y n). Si bien algunos *software* permiten ajustar directamente a una función hiperbólica, normalmente los paquetes informáticos tienen más dificultades para hacerlo.

Se impone la necesidad de trabajar con gráficos más sencillos, ilustrativos y que permitan obtener parámetros de manera directa.

Para ello utilizaremos **Rectificaciones** (o también denominadas Linealizaciones), es decir, transformaciones de la función original (*no lineal*) en una función lineal, cuya ecuación será la **ecuación de una recta** de la forma:

$$y = mx + n \quad n, m \in \mathbb{R}$$

Grafique sus datos utilizando las rectificaciones de la Hipérbola Rectangular.

Scatchard $\left(r \text{ vs. } \frac{r}{[L]} \right)$

Lineweaver-Burk $\left(\frac{1}{r} \text{ vs. } \frac{1}{[L]} \right)$

Langmuir-Hines $\left(\frac{[L]}{r} \text{ vs. } [L] \right)$

$$\text{Si } r = nY = \frac{n[L]}{K_d + [L]}$$

y: variable dependiente
x: variable independiente
m: pendiente
n: ordenada en el origen
 $y = mx + n$

$$\text{Scatchard } \left(r \text{ vs. } \frac{r}{[L]} \right): r = -K_d \frac{r}{[L]} + n$$

$$\text{Lineweaver-Burk } \left(\frac{1}{r} \text{ vs. } \frac{1}{[L]} \right): \frac{1}{r} = \frac{K_d}{n} \frac{1}{[L]} + \frac{1}{n}$$

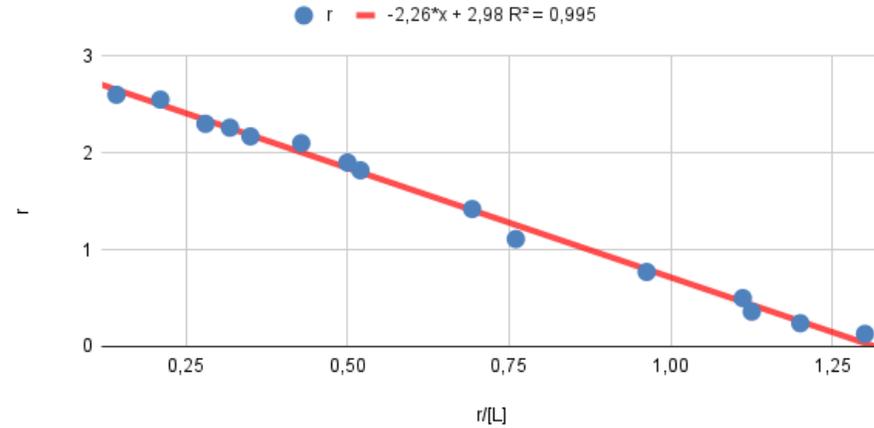
$$\text{Langmuir-Hines } \left(\frac{[L]}{r} \text{ vs. } [L] \right): \frac{[L]}{r} = \frac{1}{n} [L] + \frac{K_d}{n}$$

¿Pueden demostrar estas linealizaciones?
 [Ver Anexo 2 de esta presentación]

Análisis de datos experimentales y linealizaciones

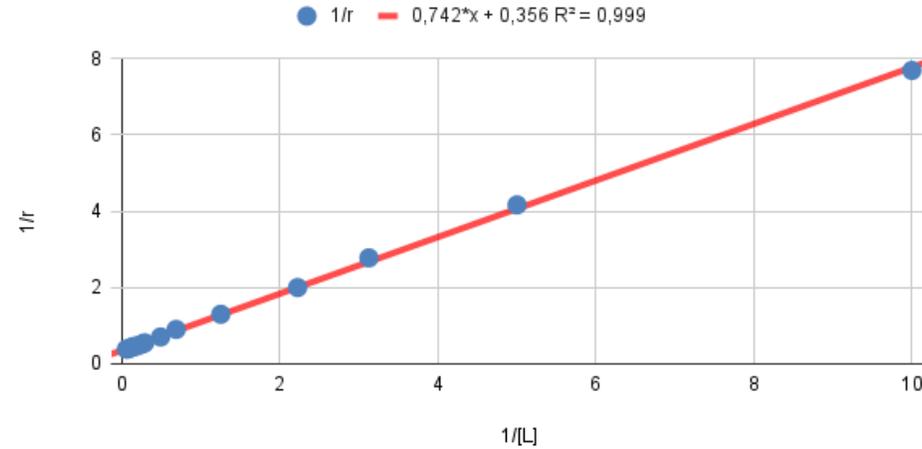
r vs. r/[L] - Tabla 1

Linealización de Scatchard



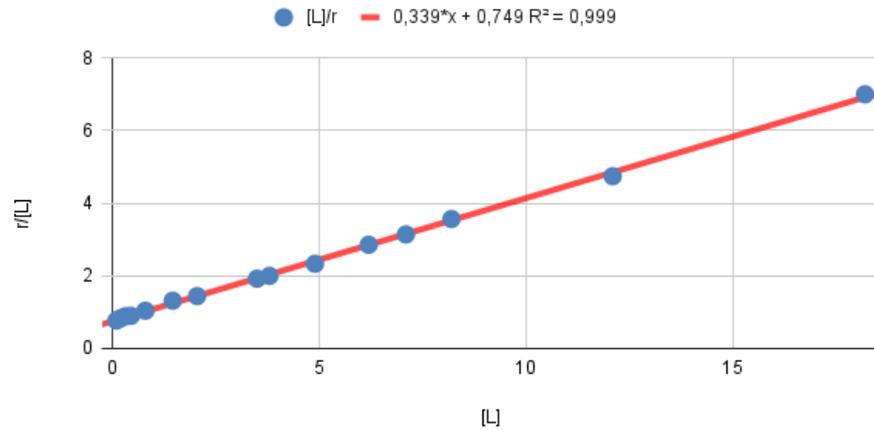
1/r vs. 1/[L] - Tabla 1

Linealización de Lineweaver-Burk (Doble Recíproco)



[L]/r vs. [L] - Tabla 1

Linealización de Langmuir-Hines

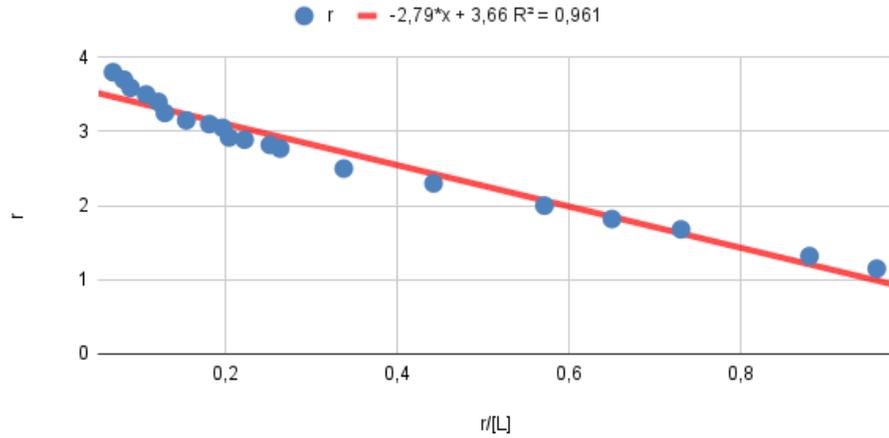


	Scatchard	Lineweaver-Burk	Langmuir-Hines
¿Qué significa este valor? [Ver Anexo 3 de esta presentación]			
¿Cómo se obtienen estas ecuaciones?			
Ecuación	$-2,26x + 2,99$	$0,74x + 0,36$	$0,34x + 0,75$
R²	0,995	0,999	0,999

Análisis de datos experimentales y linealizaciones

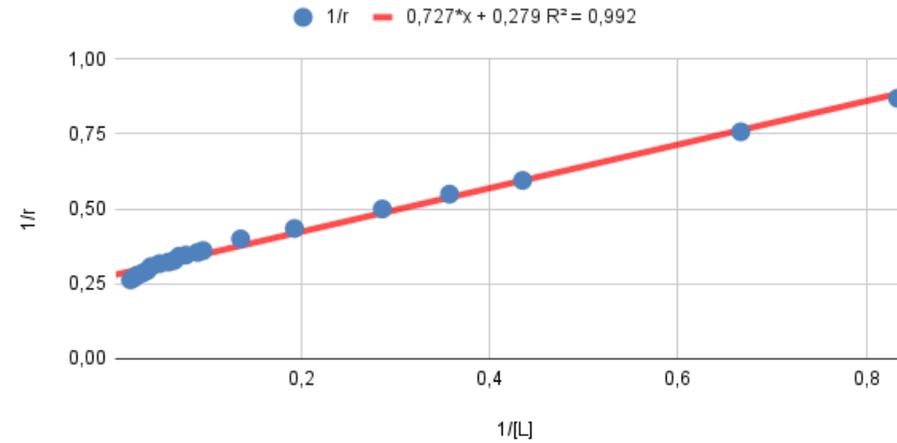
r vs. r/[L] - Tabla 2

Linealización de Scatchard



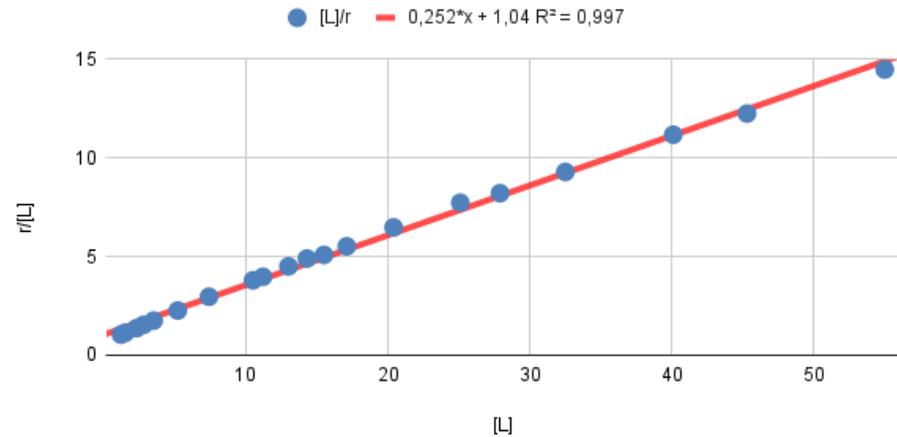
1/r vs. 1/[L] - Tabla 2

Linealización de Lineweaver-Burk (Doble Recíproco)



r/[L] vs. [L] - Tabla 2

Linealización de Langmuir-Hines

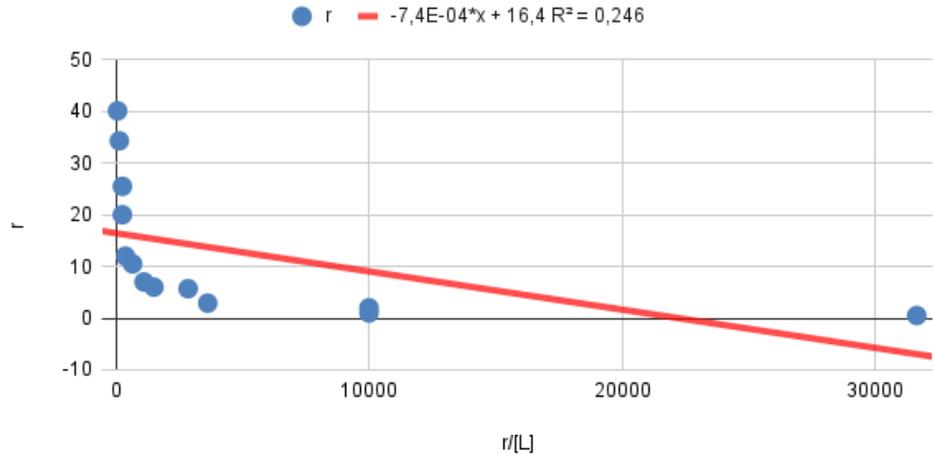


	Scatchard	Lineweaver-Burk	Langmuir-Hines
Ecuación	$-2,79x + 3,66$	$0,73x + 0,28$	$0,25x + 1,04$
R²	0,961	0,992	0,997

Análisis de datos experimentales y linealizaciones

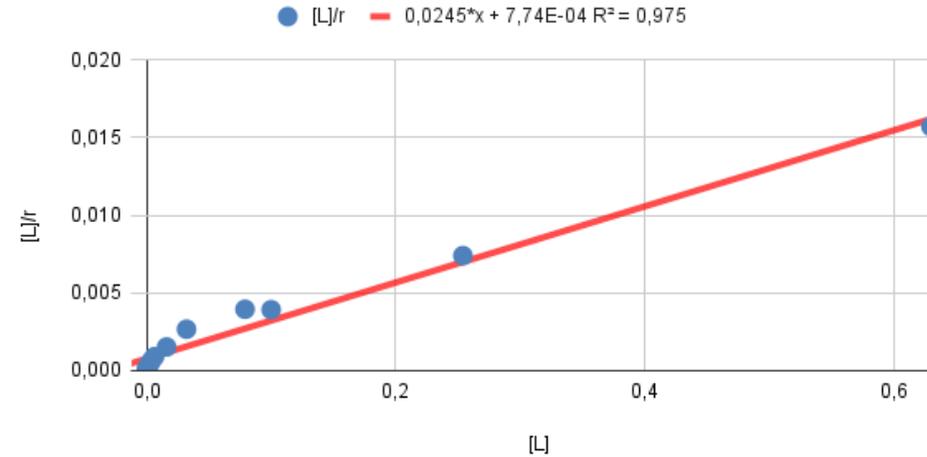
r vs. r/[L] - Tabla 3

Linealización de Scatchard



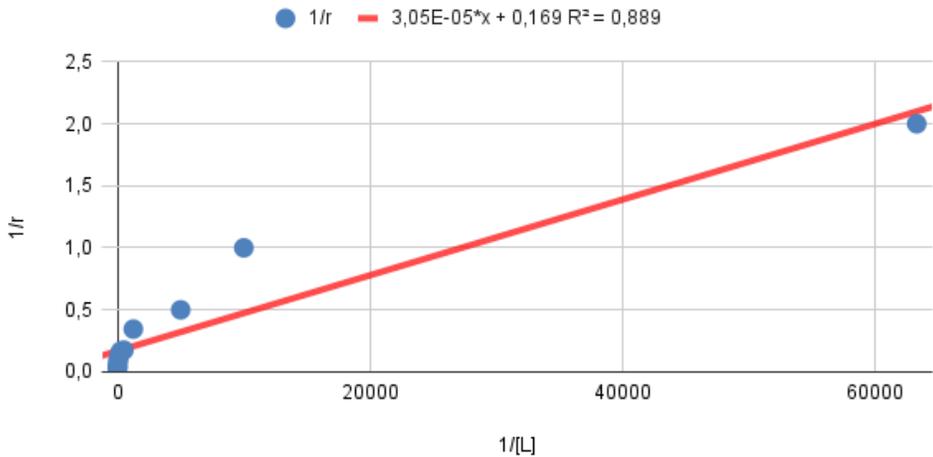
[L]/r vs. [L] - Tabla 3

Linealización de Langmuir-Hines



1/r vs. 1/[L] - Tabla 3

Linealización de Lineweaver-Burk (Doble Recíproco)



	Scatchard	Lineweaver-Burk	Langmuir-Hines
Ecuación	$-(7,4 \times 10^{-4})x + 16,4$	$(3,05 \times 10^{-5})x + 0,169$	$0,0245x + (7,74 \times 10^{-4})$
R²	0,246	0,889	0,975

Análisis de datos experimentales y linealizaciones: Resumen de los datos

		Scatchard	Lineweaver-Burk	Langmuir-Hines
Tabla 1	K_d	2,26	2,06	2,21
	K_a	0,44	0,49	0,45
	n	$2,99 \approx 3$	$2,78 \approx 3$	$2,94 \approx 3$
Tabla 2	K_d	2,79	2,61	4,16
	K_a	0,36	0,38	0,24
	n	$3,66 \approx 4$	$3,57 \approx 4$	≈ 4
Tabla 3	K_d	$7,4 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^{-4}$	$3,2 \times 10^{-2}$
	K_a	-	-	-
	n	$16,4 \approx 16$	$5,92 \approx 6$	$40,82 \approx 41$

Sobre la Tabla 1:

- Los datos se ajustan a los tres tipos de rectificaciones.
- Los parámetros calculados son comparables entre sí.
- El modelo propuesto logra describir los datos observados.

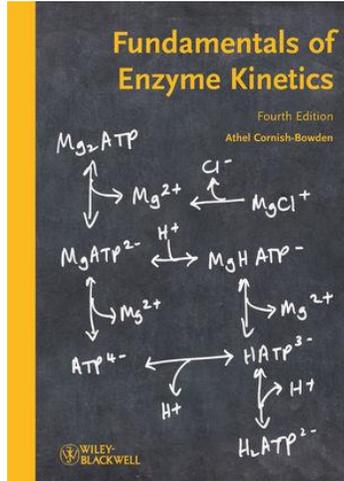
Sobre la Tabla 2:

- Los datos se ajustan a los tres tipos de rectificaciones.
- Los parámetros calculados son comparables entre sí, con excepción del K_d obtenido con la rectificación Langmuir-Hines, que es levemente superior.
- El modelo predicho logra explicar en mayor medida los datos observados aunque se observan algunas discrepancias entre las rectificaciones al momento de obtener los parámetros.

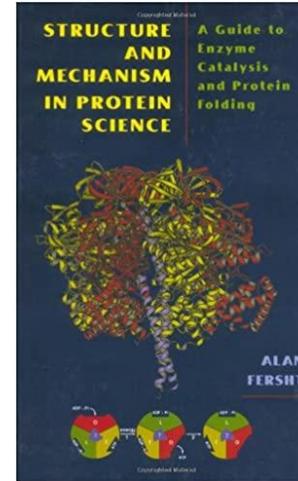
Sobre la Tabla 3:

- Los datos NO se ajustan a los tres tipos de rectificaciones.
- Los parámetros calculados NO son comparables entre sí, e incluso son de diferentes órdenes de magnitud.
- El modelo propuesto NO logra explicar los datos observados por lo que se impone la necesidad de cambiar el modelo, posiblemente por uno que involucre algún *tipo de cooperatividad*.

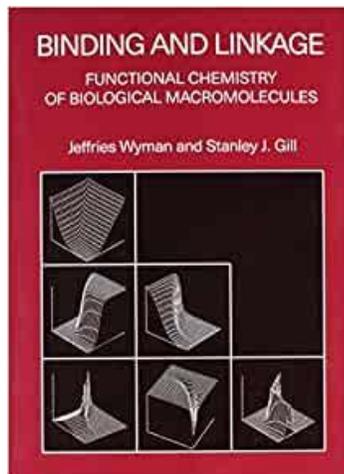
Bibliografía



Cornish-Bowden, A. (2013). *Fundamentals of enzyme kinetics*. John Wiley & Sons. Cap. 2: Introduction to Enzyme Kinetics. [\[Disponible en Biblioteca\]](#) [\[Disponible en EVA\]](#)



Fersht, A. (1999). *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*. Macmillan. Cap. 3: The Basic Equations of Enzyme Kinetics. [\[Disponible en Biblioteca\]](#)



Wyman, J., & Gill, S. J. (1990). *Binding and linkage: functional chemistry of biological macromolecules*. University Science Books. Cap. 2: Properties of Binding Curves. [\[Disponible en EVA\]](#)

Anexo 1

Demostrar que: ***La velocidad con la que crece la fracción de saturación es inversamente proporcional a la constante de disociación.***

La velocidad (o crecimiento) de la Fracción de Saturación es la derivada de la función $Y([L])$ respecto de $[L]$:

$$\frac{dY}{d[L]} = \frac{d}{d[L]} \left(\frac{[L]}{K_d + [L]} \right)$$

Resolver esta derivada implica aplicar la *derivada del cociente entre funciones*:

$$\left(\frac{f(x)}{g(x)}\right)' = \frac{f'(x)g(x) - f(x)g'(x)}{(g(x))^2}$$

Por lo tanto,

$$\frac{dY}{d[L]} = \frac{([L])'(K_d + [L]) - ([L])(K_d + [L])'}{(K_d + [L])^2}$$

$$\begin{aligned} \frac{([L])'(K_d + [L]) - ([L])(K_d + [L])'}{(K_d + [L])^2} &= \frac{(1)(K_d + [L]) - [L](1)}{K_d^2 + 2K_d[L] + [L]^2} \\ &= \frac{K_d + [L] - [L]}{K_d^2 + 2K_d[L] + [L]^2} = \frac{K_d}{K_d^2 + 2K_d[L] + [L]^2} \end{aligned}$$

Estudiando el límite cuando $K_d \rightarrow +\infty$ se observa que:

$$\lim_{K_d \rightarrow +\infty} \frac{dY}{d[L]} = \lim_{K_d \rightarrow +\infty} \frac{K_d}{K_d^2 + 2K_d[L] + [L]^2} \approx \lim_{K_d \rightarrow +\infty} \frac{K_d}{K_d^2} = \frac{1}{K_d} = 0$$

Por lo tanto, podemos concluir que:

$$\frac{dY}{d[L]} \propto \frac{1}{K_d}$$

Queda demostrado que el crecimiento (derivada) de la Fracción de Saturación es inversamente proporcional a la Constante de Disociación.

- $si K_d \rightarrow +\infty \implies \frac{dY}{d[L]} \rightarrow 0$
- $si K_d \rightarrow 0 \implies \frac{dY}{d[L]} \rightarrow +\infty$

Anexo 2

Linealización de **Scatchard**:

$$r = \frac{n[L]}{K_d + [L]} \Rightarrow r(K_d + [L]) = n[L] \Rightarrow rK_d + r[L] = n[L]$$

$$\Rightarrow r[L] = n[L] - rK_d \Rightarrow \frac{r[L]}{[L]} = \frac{n[L] - rK_d}{[L]} \Rightarrow r = \frac{n[L]}{[L]} - \frac{rK_d}{[L]}$$

$$\Rightarrow r = n - K_d \left(\frac{r}{[L]} \right) \Rightarrow \mathbf{r = -K_d \left(\frac{r}{[L]} \right) + n}$$

Linealización de Lineweaver-Burk:

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

$$\Rightarrow \frac{1}{r} = \frac{K_d}{n[L]} + \frac{[L]}{n[L]} \Rightarrow \frac{1}{r} = \frac{K_d}{n} \left(\frac{1}{[L]} \right) + \frac{1}{n}$$

Linealización de **Langmuir-Hines**:

$$\begin{aligned}
 r &= \frac{n[L]}{K_d + [L]} \implies \frac{1}{r} = \frac{1}{\frac{n[L]}{K_d + [L]}} \implies \frac{1}{r} = \frac{(K_d + [L])}{n[L]} \\
 \implies \frac{[L]}{r} &= \frac{(K_d + [L])}{n} \implies \frac{[L]}{r} = \frac{K_d}{n} + \frac{[L]}{n} \implies \frac{[L]}{r} = \frac{1}{n} [L] + \frac{K_d}{n}
 \end{aligned}$$

Anexo 3

R^2 es conocido como **Coeficiente de Determinación**, y se define como una variable estadística que mide la calidad del modelo propuesto para explicar (replicar) los resultados observados.

En el contexto de este práctico, el ajuste de los datos observados a las ecuaciones de rectificación es de **tipo Lineal**, por lo que R^2 mide la dependencia lineal de nuestra serie de datos. Cuanto más cercano a 1 sea R^2 mejor será nuestro ajuste.

Anexo 3

Las planillas de cálculo (Excel, Calc, Google Sheets) utilizan el **Método de Mínimos Cuadrados**.

Consiste en calcular las distancias entre los datos observados y las rectas de ajuste de manera tal que se minimice dicha distancia entre ellos.

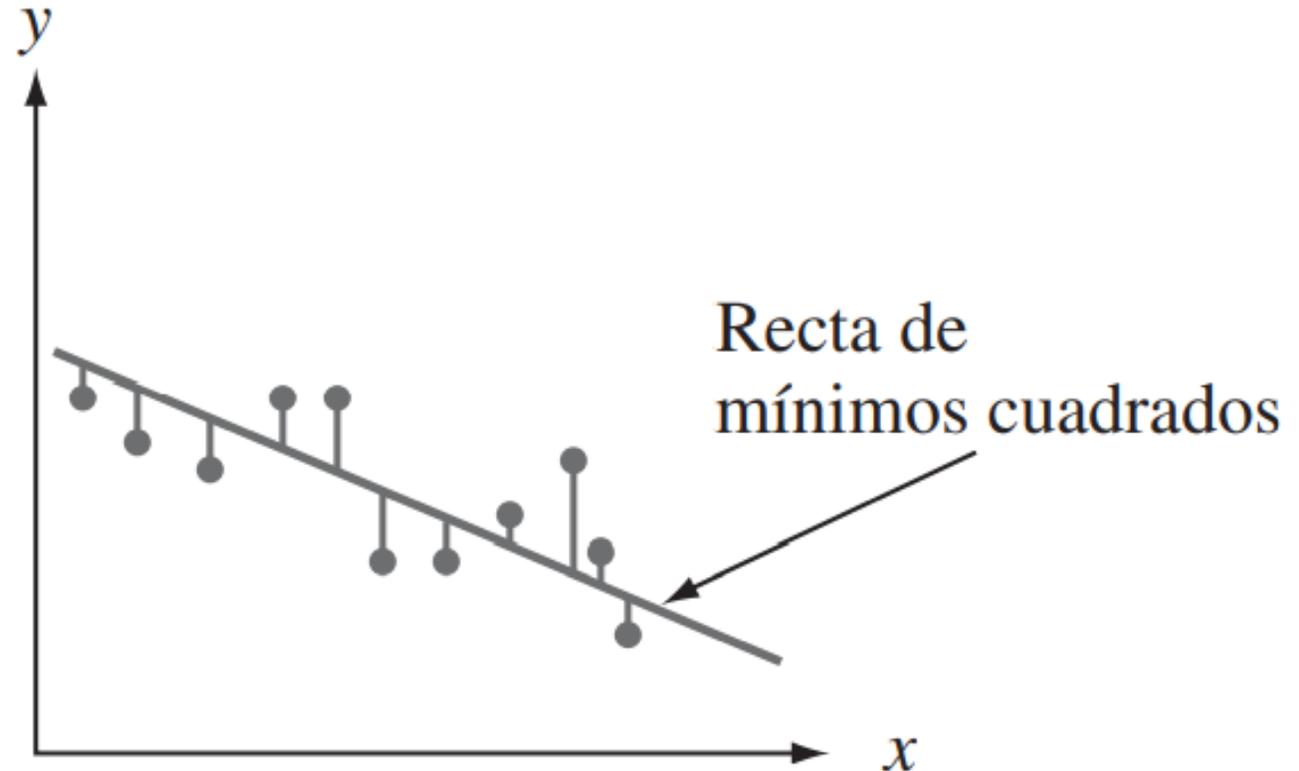
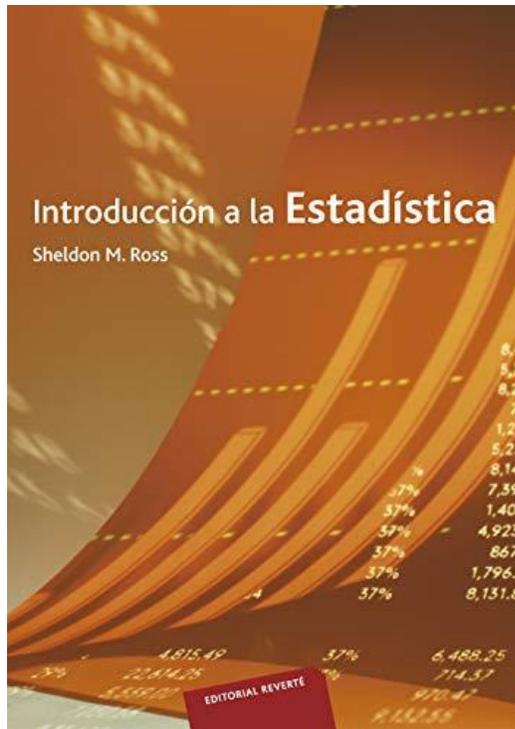


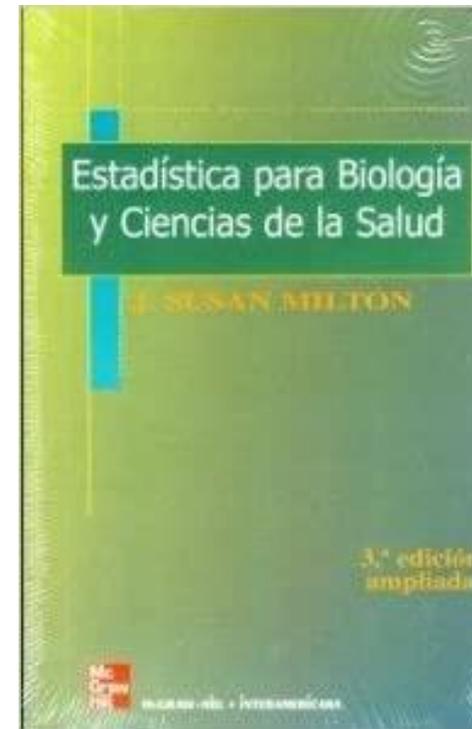
Gráfico extraído de: Devore, J. L. (2018). *Fundamentos de probabilidad y estadística*. Cengage Learning. Págs.: 299-309.

Anexo 3

Bibliografía sobre Regresión Lineal y Coeficiente de Determinación:



Ross, S. M.
(2018). *Introducción a la estadística*. Reverté.
Cap. 12: Regresión Lineal.
[Disponible en Biblioteca]



Milton, J. S.
(2001). *Estadística para biología y ciencias de la salud* (No. QH 323.5. M5418 2001). Cap. 11: Regresión y Correlación.
[Disponible en Biblioteca]