

# Interacción Receptor-Ligando (II)

Ismael Acosta  
([iacosta@fcien.edu.uy](mailto:iacosta@fcien.edu.uy))  
Facultad de Ciencias, UdelaR

# Contenido de la clase

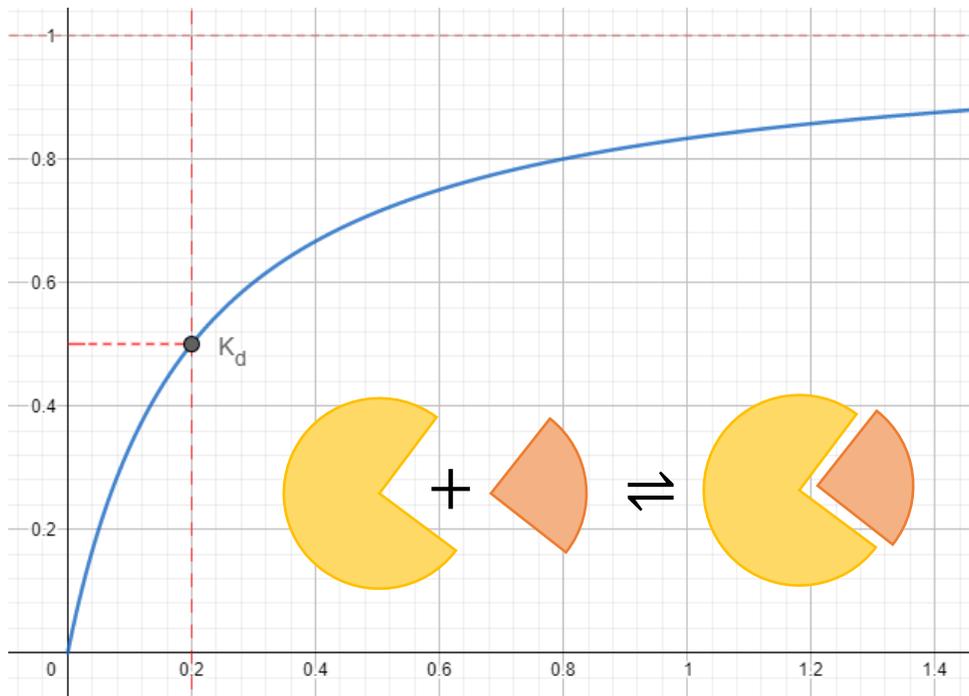
- Recapitulación de clase (Semana 10/04-14/04)
- Modelo de Hill
- Modelo de Adair
- Modelo Concertado (Monod, Wyman, Changeaux)
- Modelo Secuencial (Koshland, Némethy, Filmer)

# Contenido de la clase

- **Recapitulación de clase (Semana 10/04-14/04)**
- Modelo de Hill
- Modelo de Adair
- Modelo Concertado (Monod, Wyman, Changeaux)
- Modelo Secuencial (Koshland, Némethy, Filmer)

# Receptor Simple (1 sitio de unión)

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



27/4/2023

# Receptor Múltiple ( $n$ sitios de unión)

Las probabilidades de unión con el receptor son independientes.

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

Las **linealizaciones** permiten ajustar los datos a una recta y extraer los parámetros del modelo ( $K_d$  y  $n$ ).

Biofísica (2023)

# Contenido de la clase

- Recapitulación de clase (Semana 10/04-14/04)
- Modelo de Hill
- Modelo de Adair
- Modelo Concertado (Monod, Wyman, Changeaux)
- Modelo Secuencial (Koshland, Némethy, Filmer)

# Contenido de la clase

- Recapitulación de clase (Semana 05/04-08/04)
- **Modelo de Hill**
- Modelo de Adair
- Modelo Concertado (Monod, Wyman, Changeaux)
- Modelo Secuencial (Koshland, Némethy, Filmer)

# Modelo de Hill (1913)

Hill desarrolló un *modelo empírico* acerca del comportamiento de la hemoglobina humana (Hb) en presencia de O<sub>2</sub>.

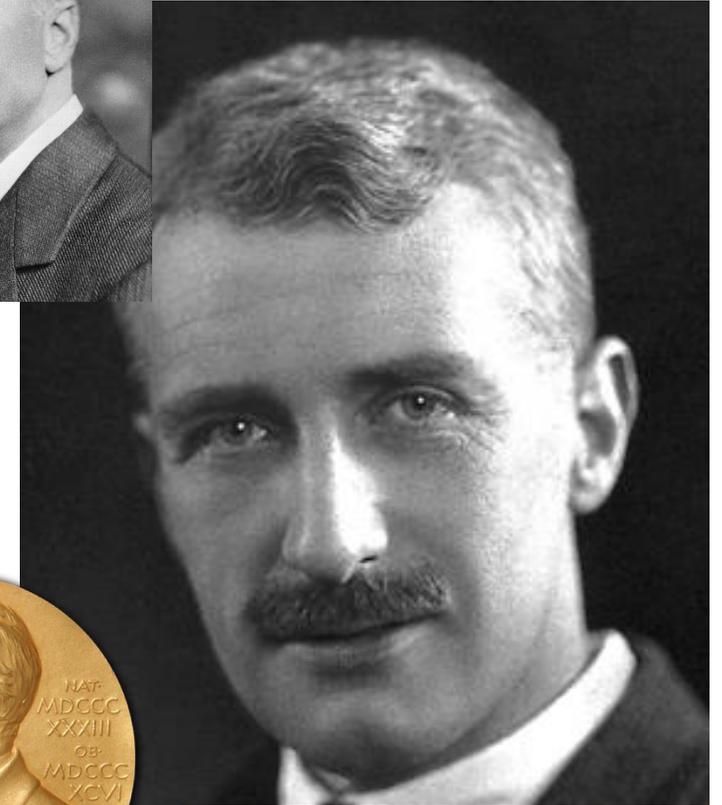
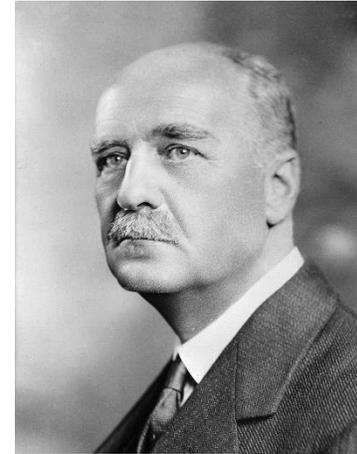
$$R + hL \rightleftharpoons RL_h \implies Y = \frac{[L]^h}{K_{0.5}^h + [L]^h}$$

Donde  $h$  es el número de Hill<sup>[1,2]</sup>.

[1] Hill, A. V. (1913). The combinations of *haemoglobin* with oxygen and with carbon monoxide. I. *Biochemical Journal*, 7(5), 471.

[2] Barcroft, J. (1913). The combinations of *haemoglobin* with oxygen and with carbon monoxide. II. *Biochemical Journal*, 7(5), 481.

Joseph Barcroft (1872-1947)



El Premio Nobel de Medicina o Fisiología de 1922 no se lo dieron por sus trabajos sobre la interacción RL, sino por un modelo termodinámico del músculo (algo que quizás vean más adelante en el Módulo 4 del teórico).

El modelo de Hill contempla escenarios de interacción RL donde la unión de ligando a diferentes sitios no es independiente, sino que existen interacciones tales que favorecen o desfavorecen la unión a nuevos sitios.  $h$  se interpreta como un **Coeficiente de Cooperatividad**.

La derivación de la Ecuación de Hill puede llevar a interpretar  $h$  como el número de sitios del receptor. Sin embargo,  $h$  **puede tomar valores no-enteros**, por tanto, debe tomarse como una constante empírica.  $h$  puede proveer de una *estimación mínima* del número de sitios.

[1] Hill, A. V. (1913). The combinations of *haemoglobin* with oxygen and with carbon monoxide. I. *Biochemical Journal*, 7(5), 471.

[2] Barcroft, J. (1913). The combinations of *haemoglobin* with oxygen and with carbon monoxide. II. *Biochemical Journal*, 7(5), 481.

Este modelo asume que **el receptor de  $n$  sitios completa todos sitios en simultáneo**: no existen especies intermedias donde haya sitios vacíos y sitios unidos al ligando (**modelo no-secuencial**,  $h = constante$ ).

Este supuesto es una de las grandes *debilidades* del modelo.

[1] Hill, A. V. (1913). The combinations of *haemoglobin* with oxygen and with carbon monoxide. I. *Biochemical Journal*, 7(5), 471.

[2] Barcroft, J. (1913). The combinations of *haemoglobin* with oxygen and with carbon monoxide. II. *Biochemical Journal*, 7(5), 481.

# Modelo de Hill (1913)

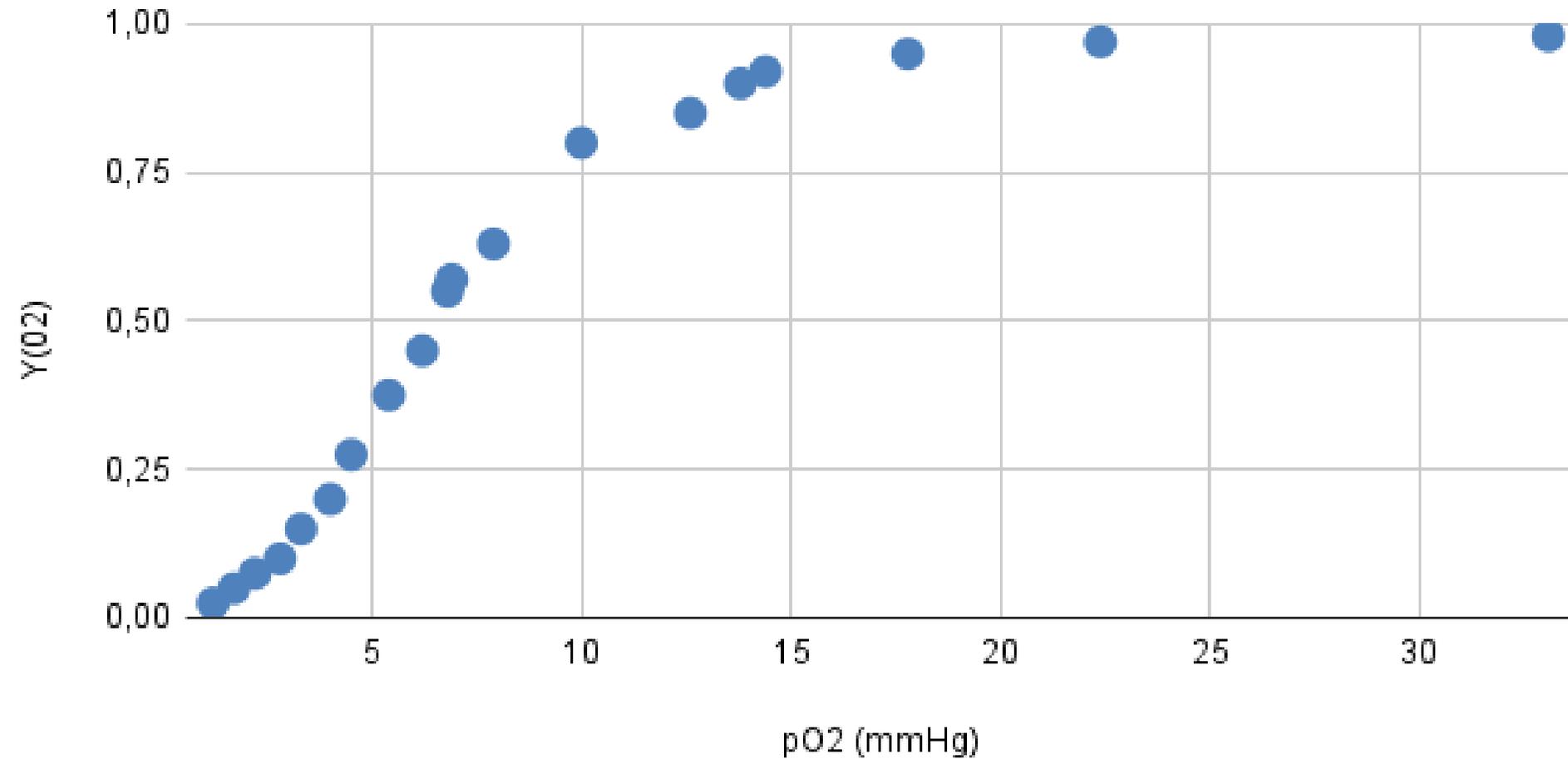
## Actividad 3: Grafique los datos de la Tabla 4.

¿Qué observa? ¿Qué puede decir respecto al mecanismo de unión?

¿Qué se observa al realizar una rectificación de una hipérbola rectangular?

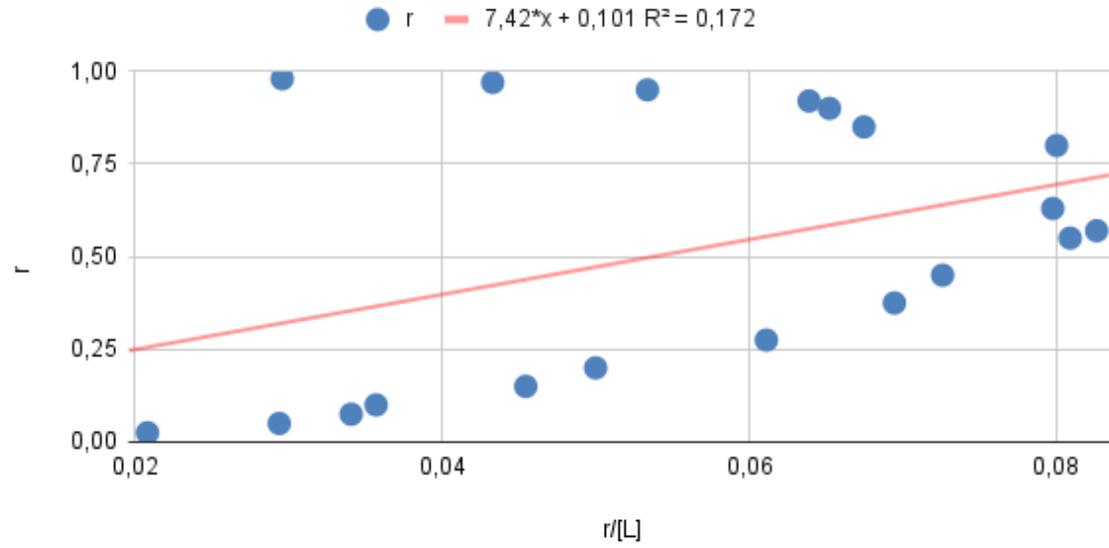
# Y(O<sub>2</sub>) vs. pO<sub>2</sub> (mmHg)

Saturación de la Hemoglobina Humana - Interacción Receptor-Ligando (II)



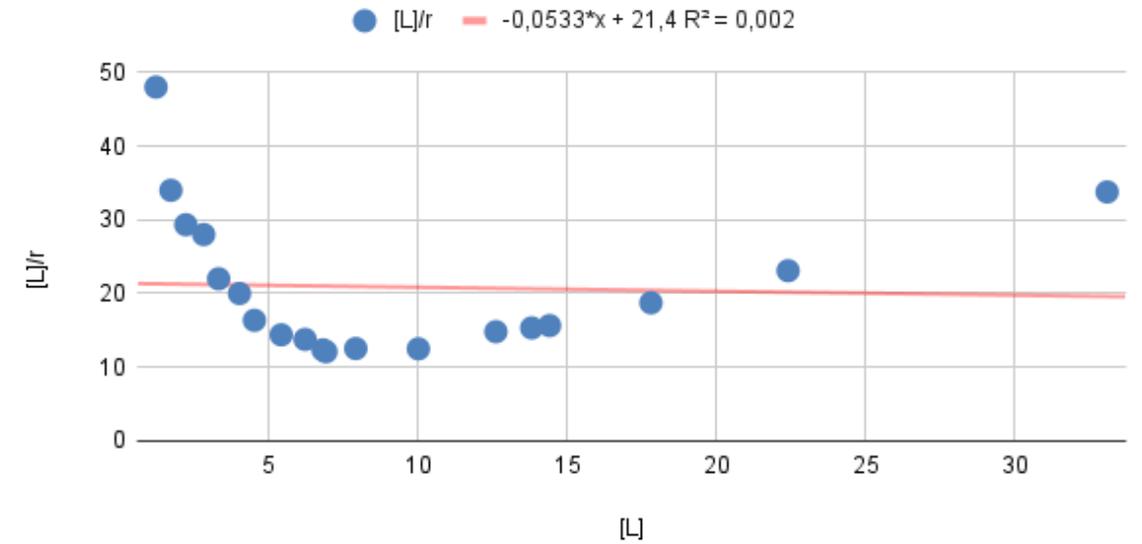
## r vs. r/[L] - Scatchard

Saturación de la Hemoglobina Humana - Interacción Receptor-Ligando (II)



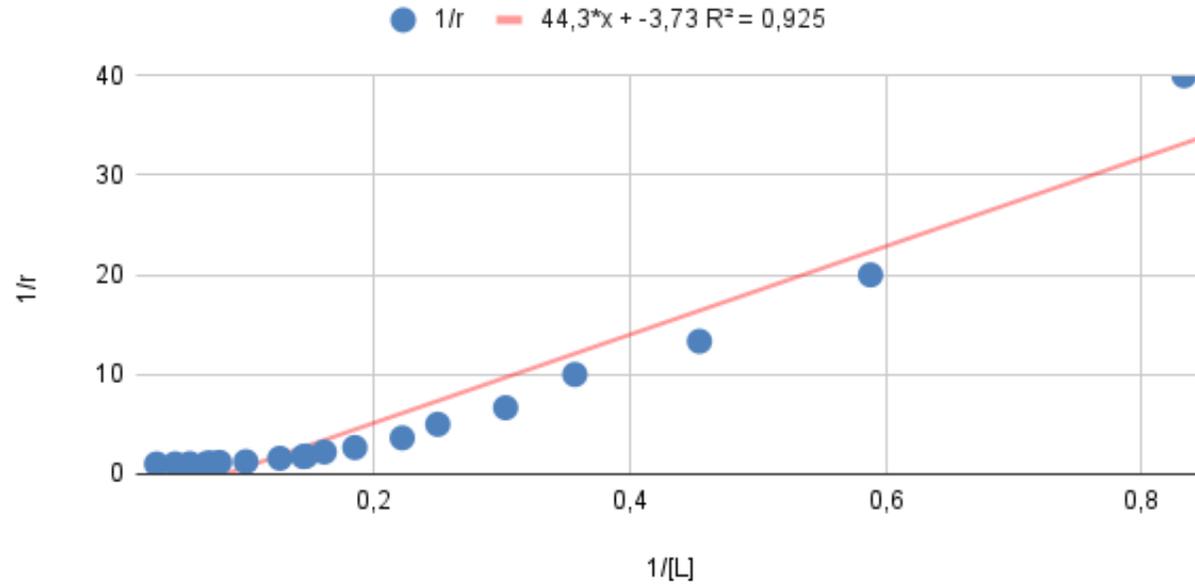
## [L]/r vs. [L] - Langmuir-Hines

Saturación de la Hemoglobina Humana - Interacción Receptor-Ligando (II)



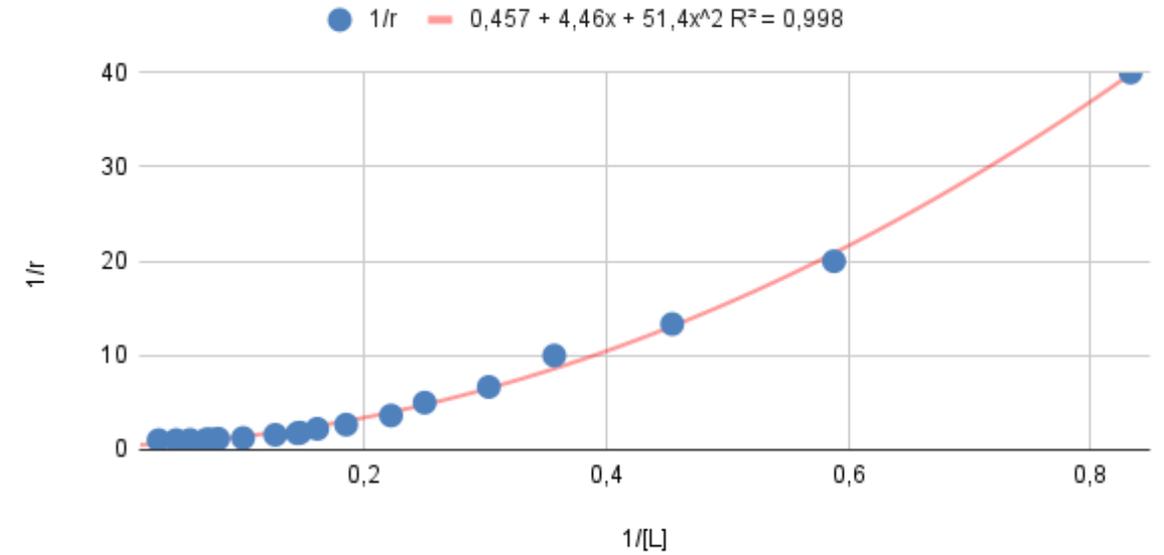
## 1/r vs. 1/[L] - Lineweaver-Burk

Saturación de la Hemoglobina Humana - Interacción Receptor-Ligando (II)



## 1/r vs. 1/[L] - Lineweaver-Burk

Saturación de la Hemoglobina Humana - Interacción Receptor-Ligando (II)



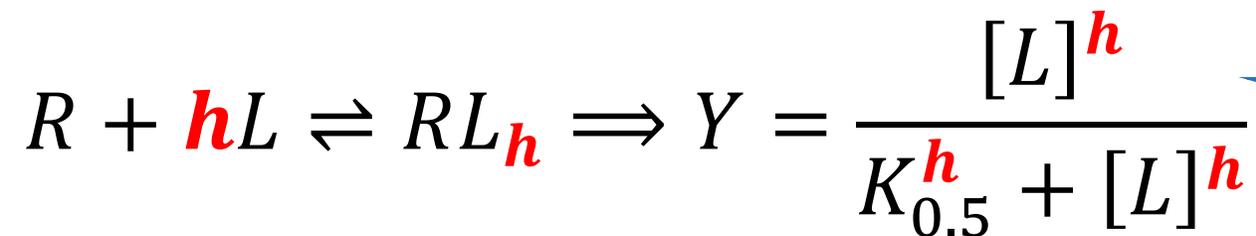
Los datos analizados no siguen el mecanismo propuesto para un receptor de  $n$  sitios con probabilidad de unión independiente. La gráfica de los datos no es una hipérbola rectangular sino una **sigmoide**.

Ninguna de las rectificaciones realizadas se ajusta debidamente a los datos observados. Por lo tanto, **el modelo propuesto no es válido para explicar las observaciones**.

# Modelo de Hill (1913)

## Actividad 3: Proponga un esquema de unión alternativo.

El modelo de Hill ofrece un modelo alternativo de unión RL en donde existe algún tipo de cooperatividad que favorece o desfavorece la unión de ligando a los sitios del receptor.

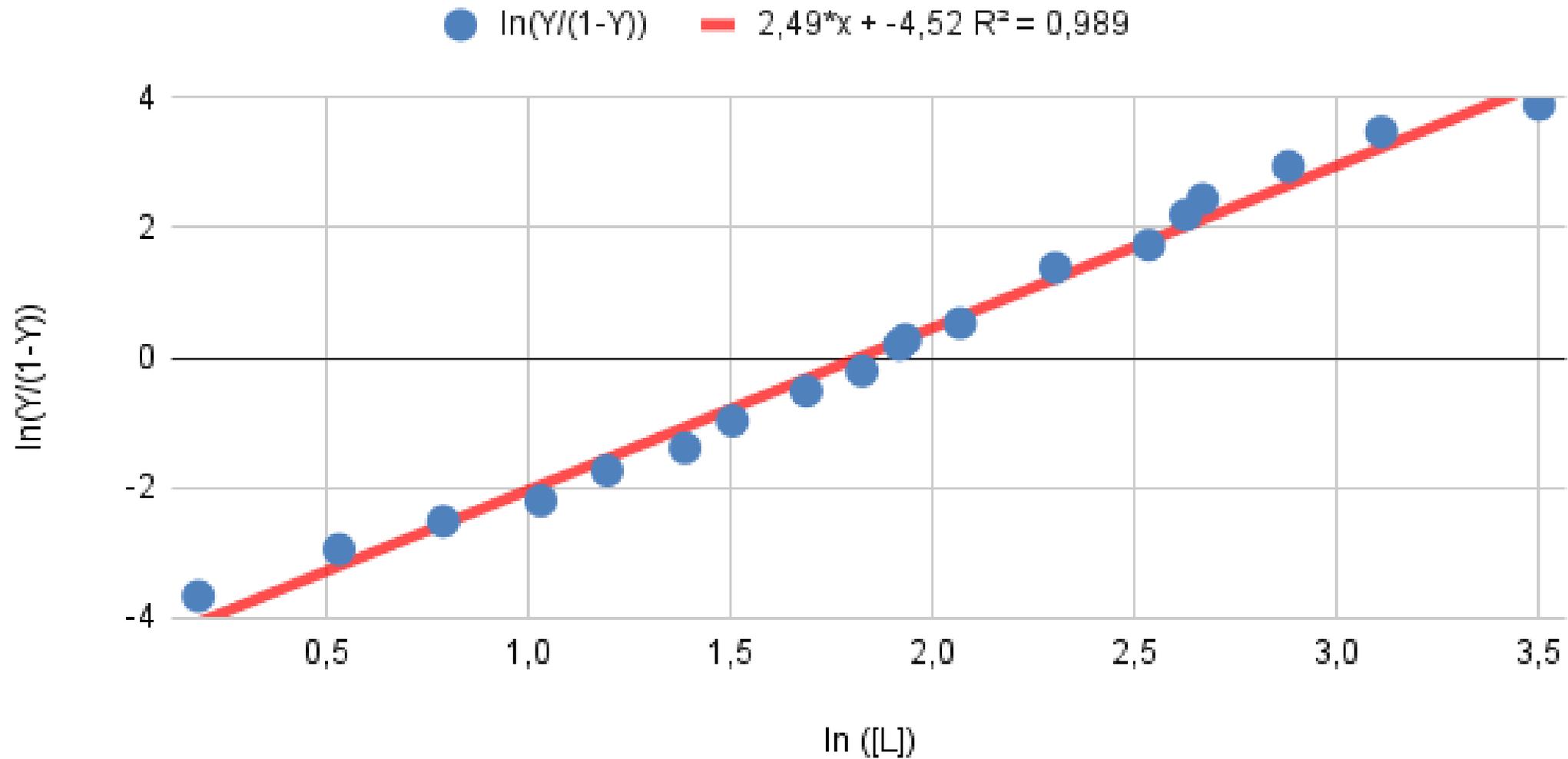


¿Cómo obtengo esta expresión?  
(Ver Anexo 1 de esta presentación)

**Actividad 3: Realice el gráfico  $\ln \left( \frac{Y}{1-Y} \right)$  vs.  $\ln [L]$**

# In [L] frente a In(Y/(1-Y)) - Gráfico de Hill

Saturación de la Hemoglobina Humana - Interacción Receptor-Ligando (II)



$$\begin{aligned}
 \text{si } Y &= \frac{[L]^h}{K_{0.5}^h + [L]^h} \Rightarrow \ln \left( \frac{Y}{1 - Y} \right) = \ln \left( \frac{\left( \frac{[L]^h}{K_{0.5}^h + [L]^h} \right)}{1 - \left( \frac{[L]^h}{K_{0.5}^h + [L]^h} \right)} \right) \\
 &= \ln \left( \frac{\frac{[L]^h}{K_{0.5}^h + [L]^h}}{\frac{K_{0.5}^h + [L]^h - [L]^h}{K_{0.5}^h + [L]^h}} \right) = \ln \left( \frac{\frac{[L]^h}{K_{0.5}^h + [L]^h}}{\frac{K_{0.5}^h}{K_{0.5}^h + [L]^h}} \right)
 \end{aligned}$$

$$= \ln \left( \frac{[L]^h}{K_{0.5}^h + [L]^h} \frac{K_{0.5}^h + [L]^h}{K_{0.5}^h} \right)$$

$$\Rightarrow \ln \left( \frac{Y}{1 - Y} \right) = \ln \left( \frac{[L]^h}{\cancel{K_{0.5}^h} + [L]^h} \frac{\cancel{K_{0.5}^h} + [L]^h}{K_{0.5}^h} \right) = \ln \left( \frac{[L]^h}{K_{0.5}^h} \right)$$

$$= \ln \left( \frac{[L]}{K_{0.5}} \right)^h = h \ln \left( \frac{[L]}{K_{0.5}} \right) = h[\ln[L] - \ln K_{0.5}]$$

$$= \mathbf{h \ln[L] - h \ln K_{0.5}}$$

A partir del Gráfico de Hill podemos obtener:

$$y = ax + b \implies \ln\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = h \ln[L] - h \ln K_{0.5}$$

- **Pendiente:**  $a = h$
- **Ordenada en el Origen:**  $b = -h \ln K_{0.5} \implies K_{0.5} = e^{-\frac{b}{h}}$

Para los datos de la Tabla 4:

$$a = h = 2,49$$

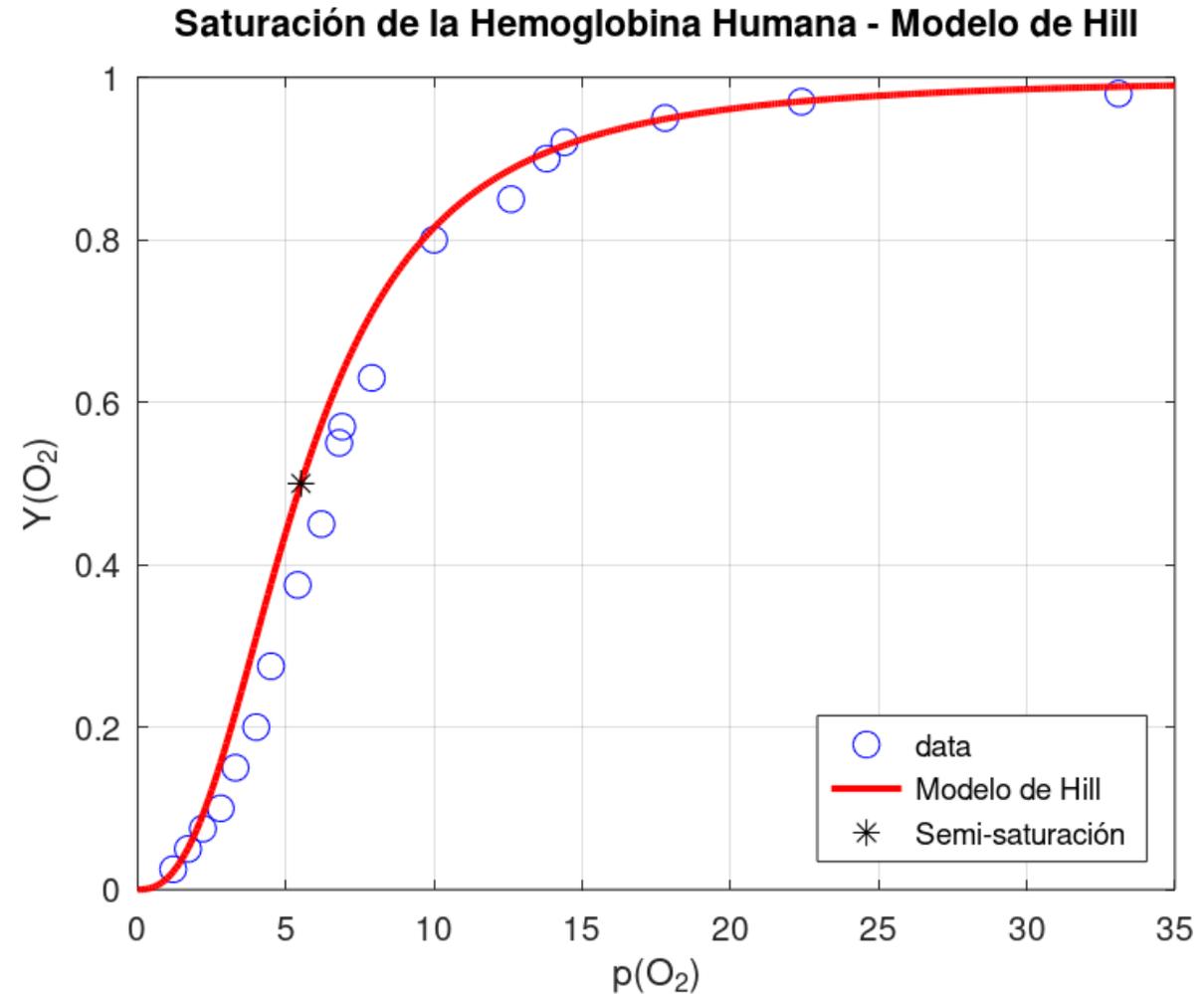
$$b = -h \ln K_d = -4,52 \Rightarrow K_{0.5} = e^{\frac{-4,52}{-2,49}} \cong 6,14$$

$$\Rightarrow K_d = K_{0.5}^h = (6,14)^{2,49} \cong 91,8$$

Notar *gráficamente* que el ajuste del Modelo de Hill con los datos es consistente.

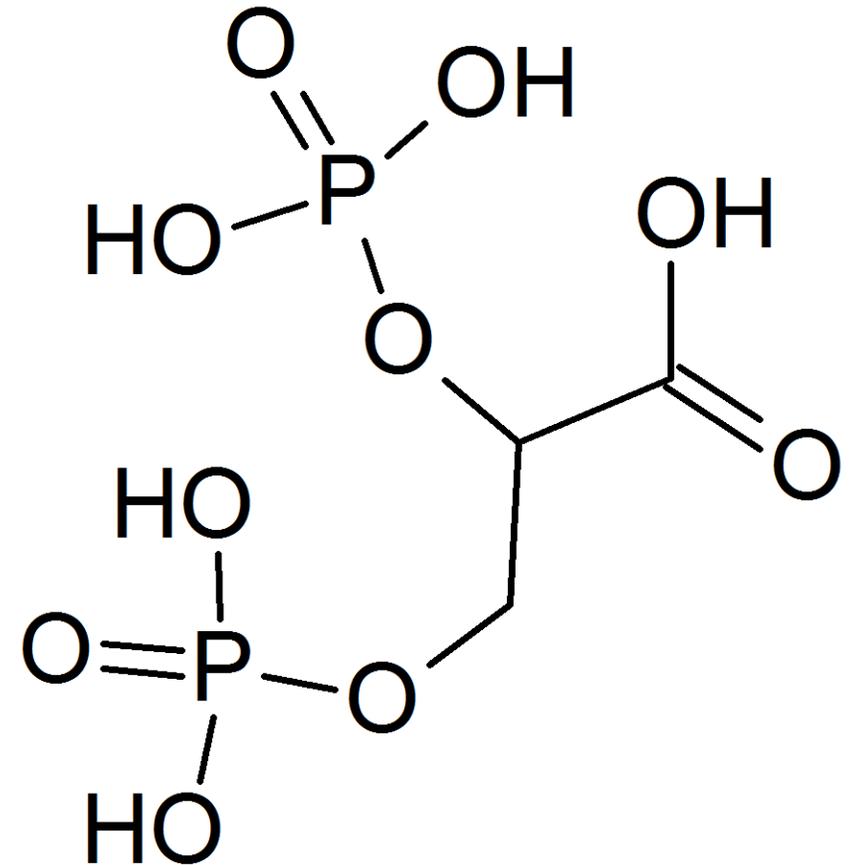
$$Y = \frac{[L]^{2,49}}{(6,14)^{2,49} + [L]^{2,49}}$$

Puesto que  $h > 1$ , el receptor (Hemoglobina Humana) interactúa con los ligandos ( $O_2$ ) a través de un **Mecanismo de Cooperatividad Positiva**.



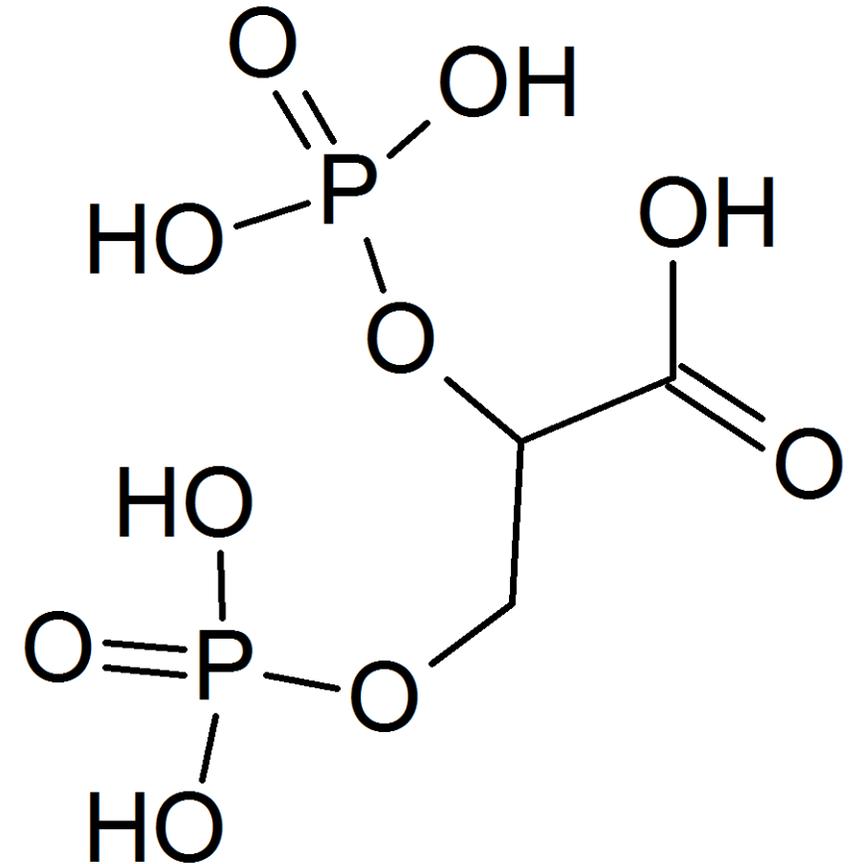
El **2,3-bisfosfoglicerato** (2,3-BPG) se une a la hemoglobina (Hb) y tiene un efecto sobre la afinidad de ésta por el oxígeno molecular ( $O_2$ ).

Si denominamos  $P_{50}$  a la presión parcial del oxígeno en la cual el 50% de los sitios de unión se encuentran ocupados, se observa (experimentalmente) que su valor es 1 en ausencia de 2,3-BPG, y 26 en presencia de 2,3-BPG.



El 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG) se produce en los **glóbulos rojos** durante la **Glucólisis**, a partir de un proceso de isomerización del 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG).

Su concentración depende fuertemente de los niveles de  $O_2$ , ATP y pH en sangre.

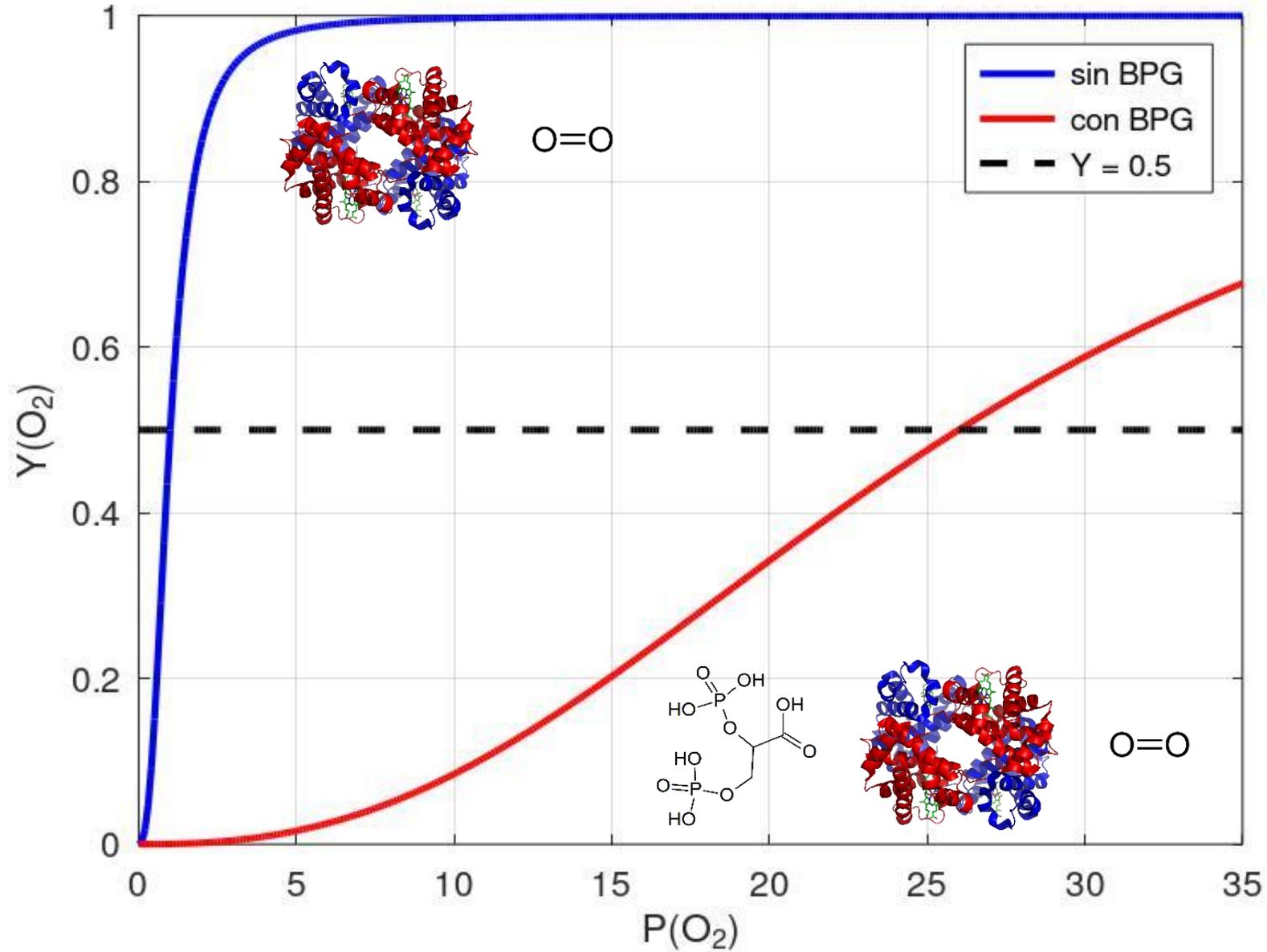


**Realice el gráfico de la fracción de saturación en función de la presión parcial del  $O_2$  en ausencia y presencia de 2,3-BPG.**

¿Qué diferencia observa?

¿Qué puede decir respecto a las consecuencias de unión de BPG a la *desoxihemoglobina*?

# Saturación de la Hb humana en presencia de BPG - Modelo de Hill



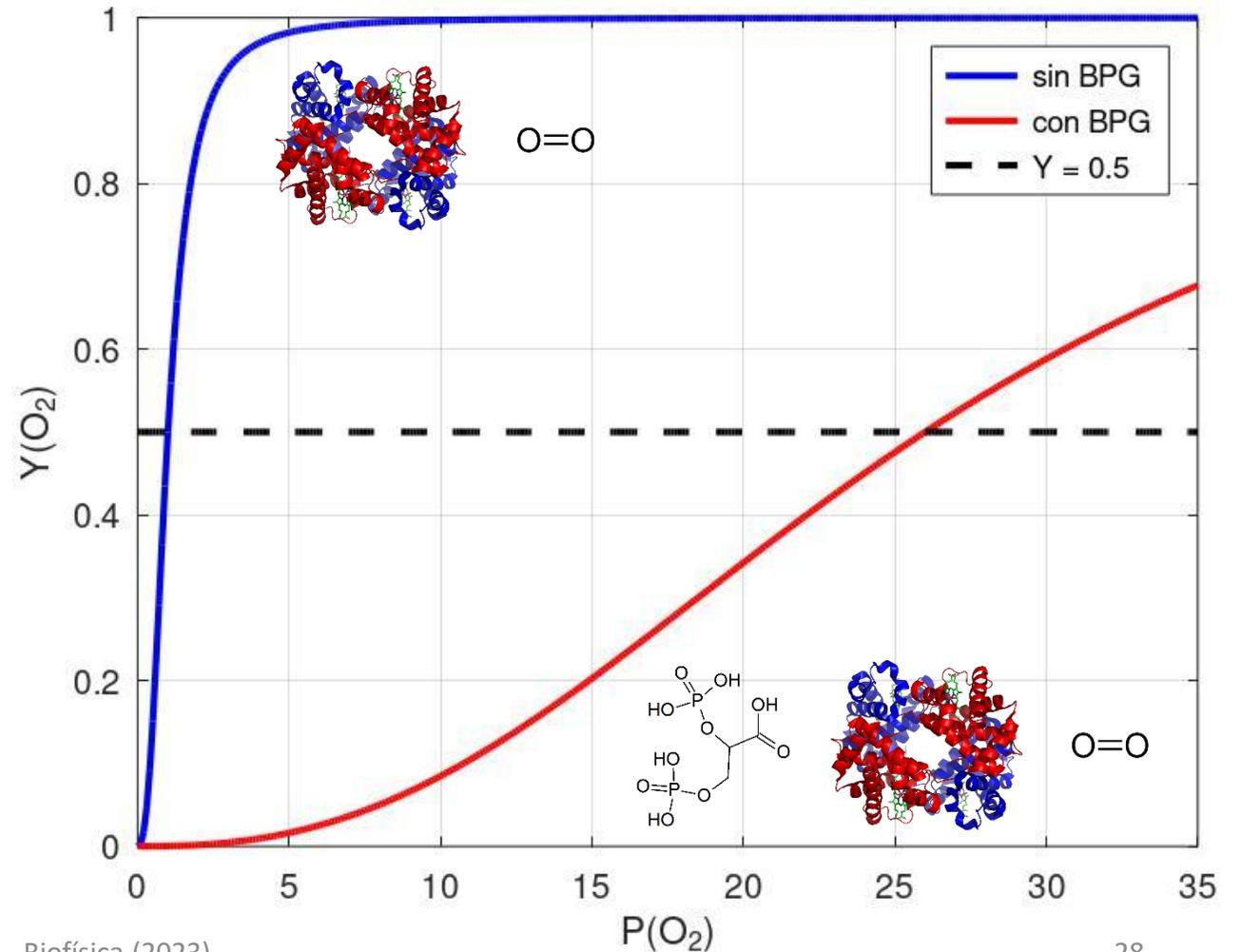
En ausencia de 2,3-BPG, Hb se satura rápidamente de  $O_2$ .  
En presencia de 2,3-BPG, Hb demora más en alcanzar la saturación de  $O_2$ .

En presencia de 2,3-BPG es necesaria una mayor cantidad de  $O_2$  para poder alcanzar el mismo nivel de saturación que en ausencia de 2,3-BPG.

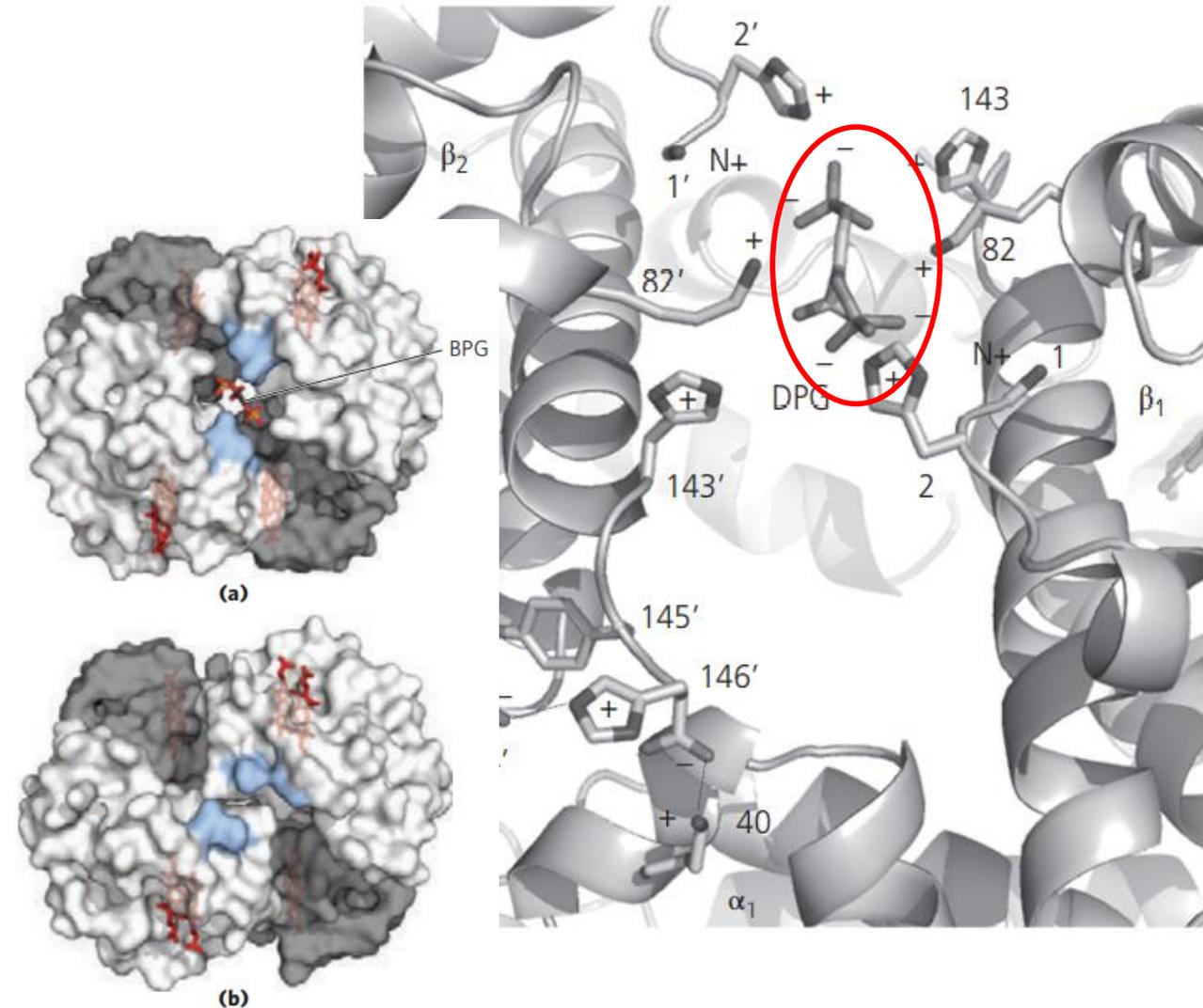
$K_{0.5_{sinBPG}} < K_{0.5_{conBPG}}$  implica que en ausencia de 2,3-BPG es más probable encontrar Hb unida a  $O_2$  que en presencia de BPG. Esto ocurre porque **2,3-BPG está inhibiendo la unión del  $O_2$ .**

La inhibición de 2,3-BPG:  
¿Es por **competición** en el sitio de unión a Hb? ¿O por **inhibición alostérica**?

Saturación de la Hb humana en presencia de BPG - Modelo de Hill

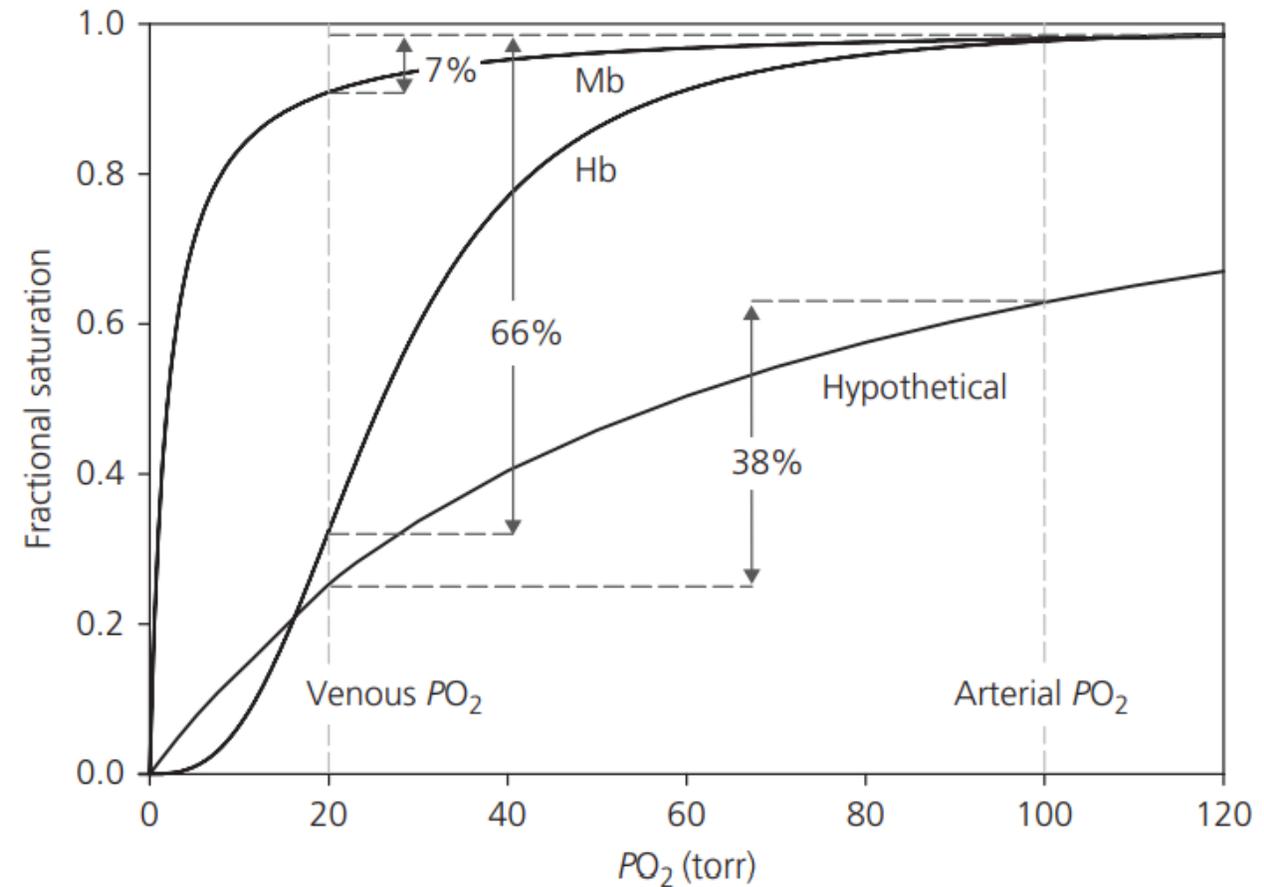


Experimental y computacionalmente se determinó que 2,3-BPG se une a Hb a través de un sitio central cargado positivamente *diferente* al grupo Hemo. El 2,3-BPG es un **inhibidor alostérico** del O<sub>2</sub>.



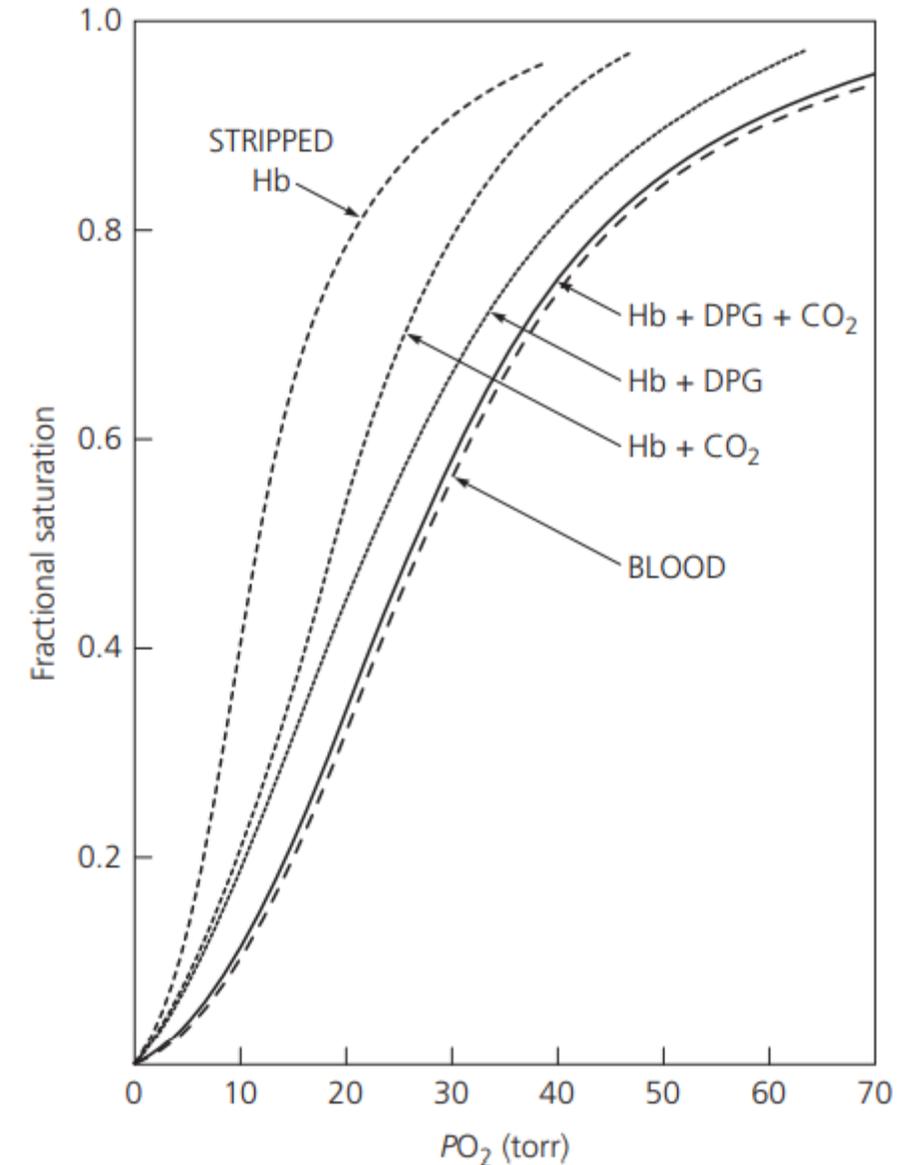
Este mecanismo de cooperatividad positiva permite modular mejor la descarga de  $O_2$  en los diferentes tejidos.

Las interacciones entre subunidades de Hb generan una descarga más eficiente de  $O_2$  que la mioglobina (Mb) o que una hipotética Hb no-cooperativa.



La presencia de 2,3-BPG en tejidos de alta demanda energética favorece la no-uni3n de  $O_2$  con la desoxihemoglobina y permite que sea utilizado por las mitocondrias para la formaci3n de ATP.

Bajo las mismas condiciones, Hb en sangre presenta menor afinidad por el  $O_2$  y mayor cooperatividad que en estado purificado.



# Contenido de la clase

- Recapitulación de clase (Semana 10/04-14/04)
- Modelo de Hill
- Modelo de Adair
- Modelo Concertado (Monod, Wyman, Changeaux)
- Modelo Secuencial (Koshland, Némethy, Filmer)

# Contenido de la clase

- Recapitulación de clase (Semana 10/04-14/04)
- Modelo de Hill
- **Modelo de Adair**
- Modelo Concertado (Monod, Wyman, Changeaux)
- Modelo Secuencial (Koshland, Némethy, Filmer)

# Modelo de Adair (1925)

Adair desarrolló un modelo en el cual se considera un **receptor simétrico oligomérico con  $n$  sitios**, los cuales se van completando de manera **secuencial**, modificando la afinidad del receptor a medida que se va uniendo a más ligandos.

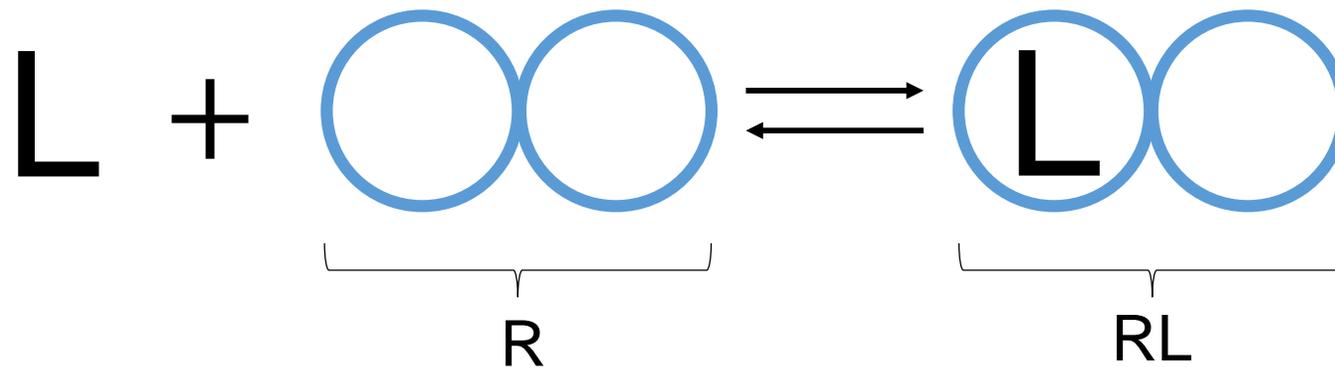
Este modelo permite estudiar especies intermediarias entre el receptor desprovisto de ligando y el receptor completo<sup>[3]</sup>.

[3] [Adair, G. S. \(1925\). The oxygen equilibrium curve of hemoglobin. \*J Biol Chem\*, 63, 529-545.](#)



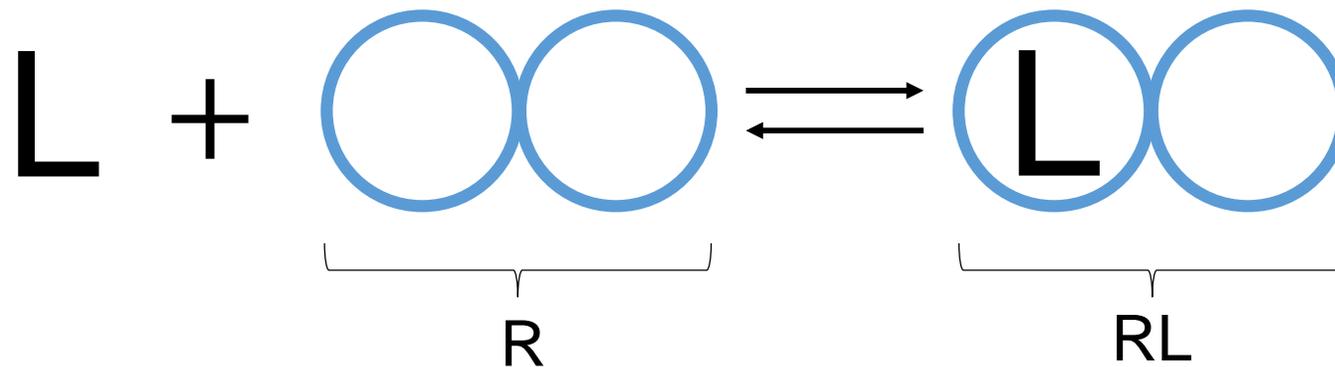
Gilbert S. Adair

El receptor oligomérico más pequeño que podemos estudiar es el **Dímero**. Supongamos un receptor simétrico dimérico formado por dos subunidades idénticas, ambas con la misma capacidad de unirse al ligando. La reacción de interacción RL en el equilibrio es:



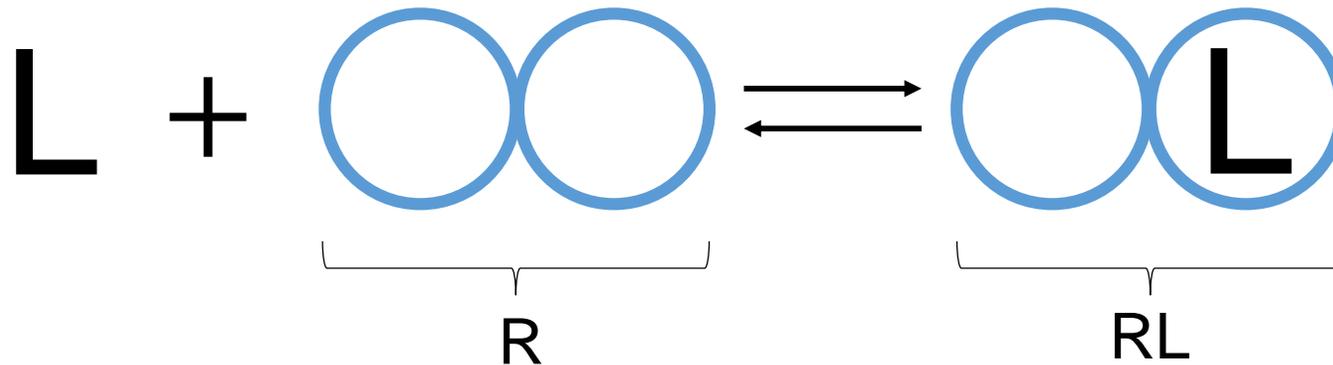
Definimos *una* **Constante de Asociación Microscópica** (en el equilibrio) como la constante de asociación para la cual el ligando se une a la subunidad de la izquierda (1a):

$$k_{1a} = \frac{[\text{L}\text{O}]}{[\text{L}][\text{O}\text{O}]}$$

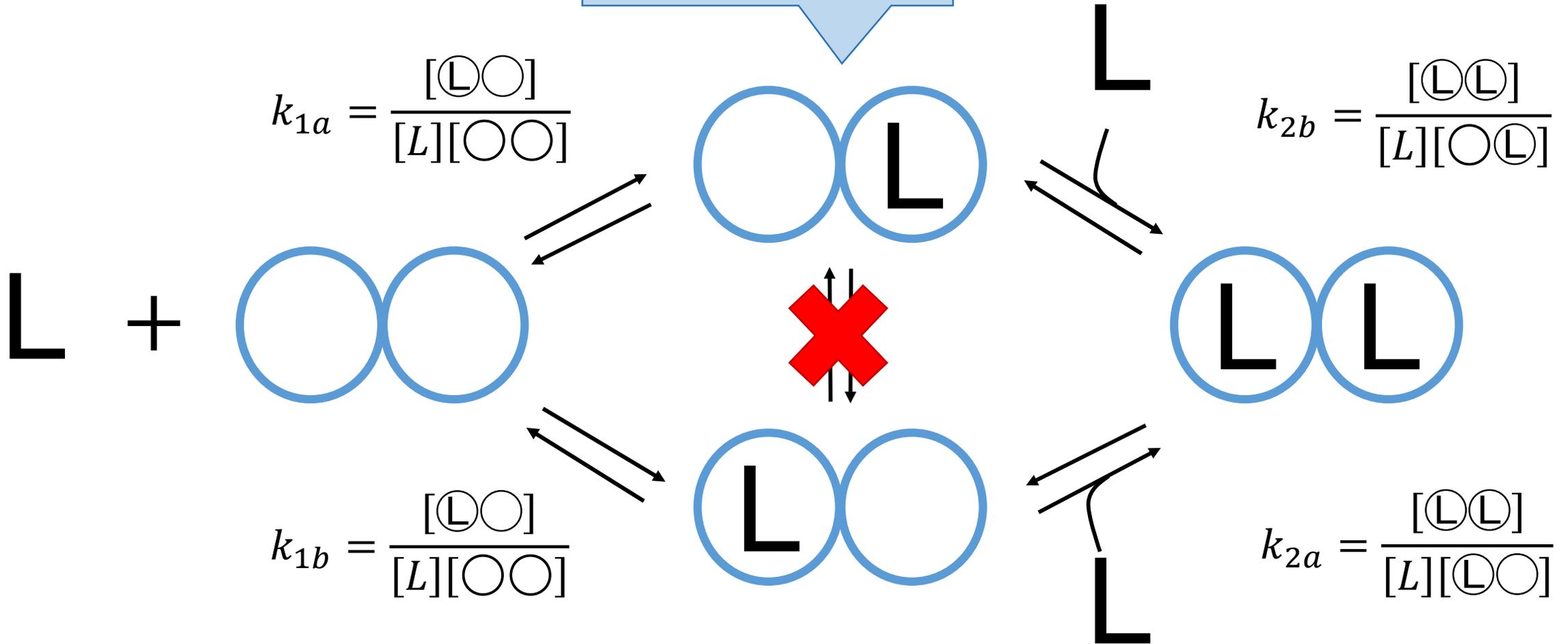


Puesto que asumimos que *las subunidades son iguales*, al igual que sus afinidades con el ligando, la constante de asociación microscópica para la unión del ligando en la subunidad derecha (1b) es idéntica a la anterior:

$$k_{1b} = \frac{[\text{O}\text{L}]}{[L][\text{O}\text{O}]}$$



Asumimos que no hay interconversión de especies intermedias.



## Sobre la notación

Subíndices  $a, b$  se utilizan para indicar la subunidad que se está completando.

Subíndices 1,2 se utilizan para indicar el paso de llenado en el que se encuentra el receptor.

Ej.:  $k_{1a}$  se define como la constante de asociación para el paso 1 (i.e.: llenado de la 1era subunidad) en la subunidad  $a$  (en nuestro ejemplo implica ocupar la subunidad izquierda).

## Condiciones de simetría e interacción

Decimos que el dímero es simétrico cuando las subunidades son idénticas:

$$\textit{subunidad } a = \textit{subunidad } b$$

Decimos que las subunidades del dímero no interactúan entre sí cuando los pasos de completado de las subunidades son independientes:

$$\textit{paso } 1 = \textit{paso } 2$$

Condición de Simetría:  $k_{1a} = k_{1b}, k_{2a} = k_{2b}$

Condición de No-Interacción:  $k_{1a} = k_{2a}, k_{1b} = k_{2b}$

## No-interacción

## Interacción

### Simetría

$$k_{1a} = k_{1b} = k_{2a} = k_{2b}$$

$$k_{1a} = k_{1b}, k_{2a} = k_{2b}$$

$$k_{1a} \neq k_{2a}, k_{1b} \neq k_{2b}$$

$$k_{1a} + k_{2a} = k_{1b} + k_{2b}$$

$$k_{1a}k_{2a} = k_{1b}k_{2b}$$

### Asimetría

$$k_{1a} = k_{2a}, k_{1b} = k_{2b}$$

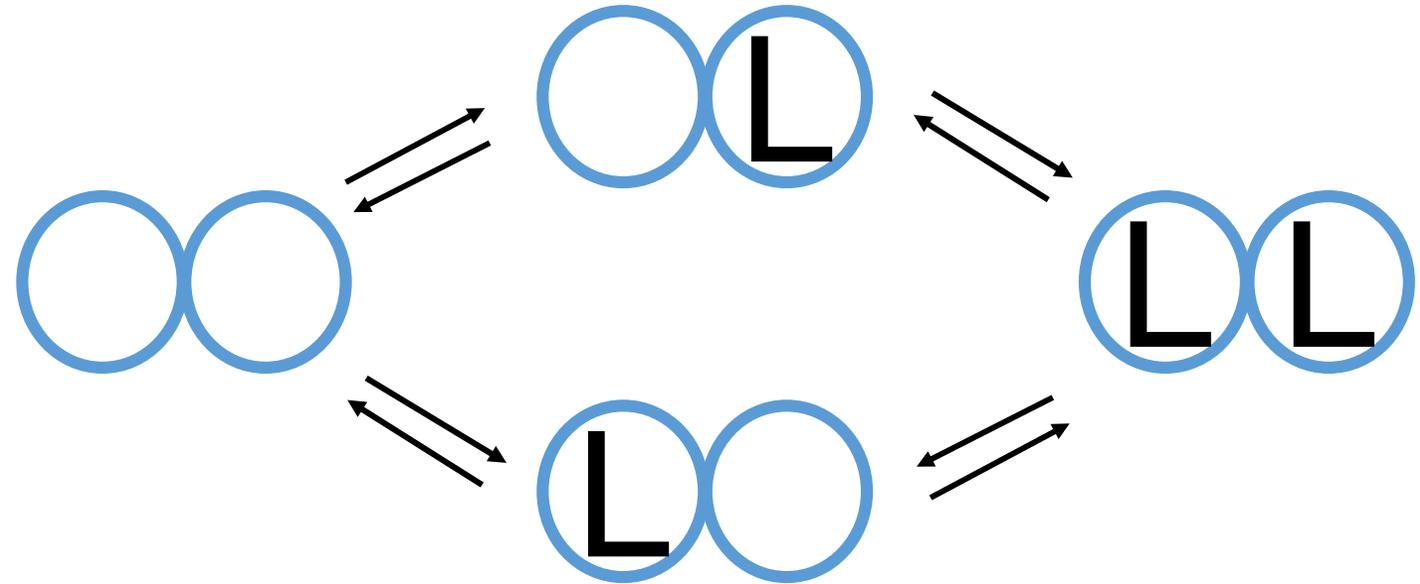
$$k_{1a} \neq k_{1b}, k_{2a} \neq k_{2b}$$

$$k_{1a} + k_{1b} = k_{2a} + k_{2b}$$

$$k_{1a}k_{1b} = k_{2a}k_{2b}$$

$$k_{1a} \neq k_{1b} \neq k_{2a} \neq k_{2b}$$

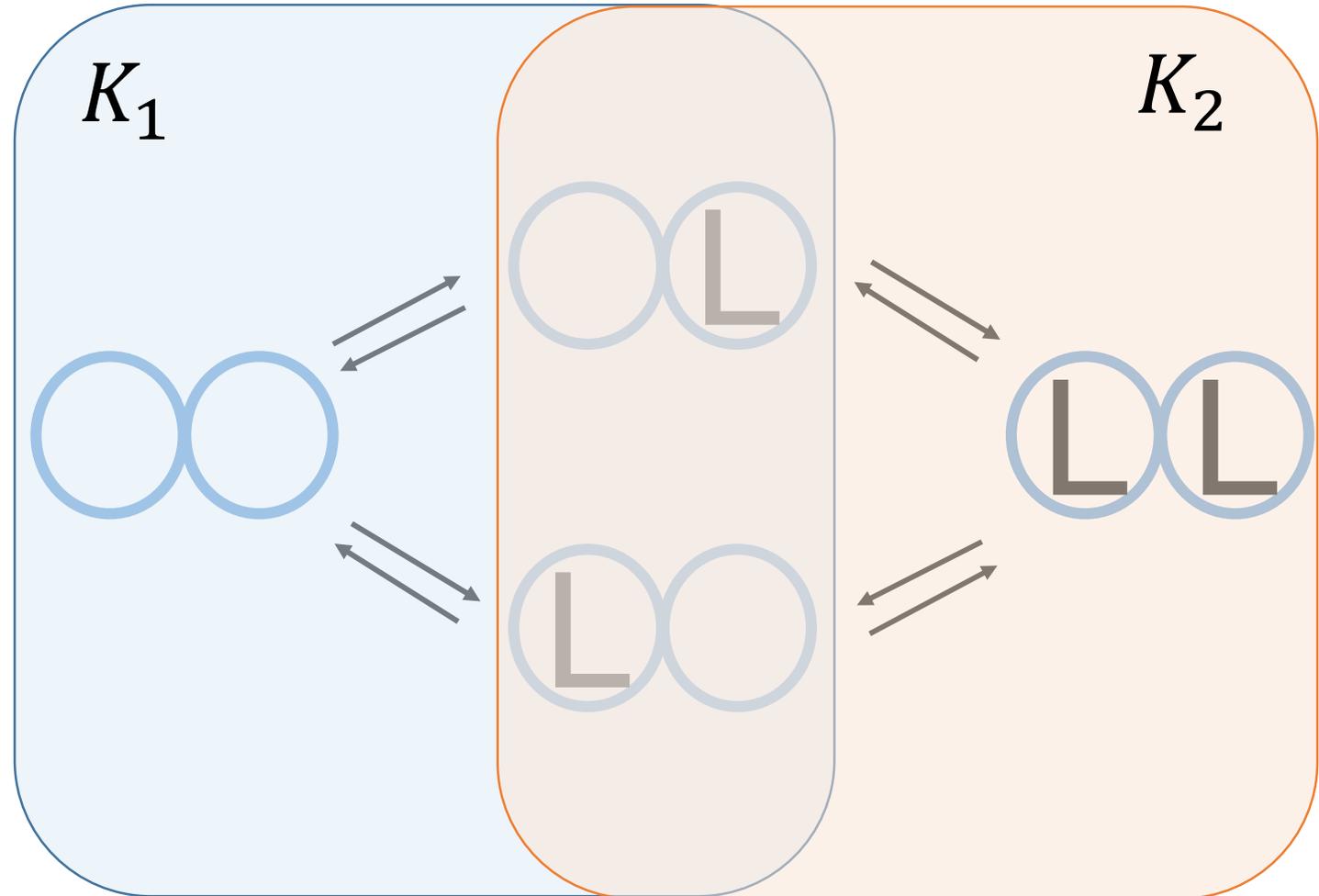
*Experimentalmente*, no es posible distinguir entre  $\textcircled{L}\textcircled{\phantom{L}}$  o  $\textcircled{\phantom{L}}\textcircled{L}$  por lo que en realidad **el sistema tiene solo 3 estados observables**: (1) libre, (2) semi-libre y (3) completo. Por lo tanto, no es posible medir las constantes microscópicas.



Definimos las **Constantes Macroscópicas de Asociación** como:

$$K_1 = \frac{[\text{L}\text{O} + \text{O}\text{L}]}{[L][\text{OO}]}$$

$$K_2 = \frac{[\text{LL}]}{[L][\text{LO} + \text{OL}]}$$



Cambiamos la **notación pictórica** por una **notación simbólica** que permita operar más fácilmente:

$$\bigcirc\bigcirc \equiv e_{00}$$

$$\textcircled{\text{L}}\bigcirc \equiv e_{10}$$

$$\bigcirc\textcircled{\text{L}} \equiv e_{01}$$

$$\textcircled{\text{L}}\textcircled{\text{L}} \equiv e_{11}$$

Escribimos las constantes microscópicas de asociación en función de la nueva notación:

$$k_{1a} = \frac{[\textcircled{L}\textcircled{O}]}{[L][\textcircled{O}\textcircled{O}]} = \frac{e_{10}}{[L]e_{00}}$$

$$k_{1b} = \frac{[\textcircled{O}\textcircled{L}]}{[L][\textcircled{O}\textcircled{O}]} = \frac{e_{01}}{[L]e_{00}}$$

$$k_{2a} = \frac{[\textcircled{L}\textcircled{L}]}{[L][\textcircled{L}\textcircled{O}]} = \frac{e_{11}}{[L]e_{10}}$$

$$k_{2b} = \frac{[\textcircled{L}\textcircled{L}]}{[L][\textcircled{O}\textcircled{L}]} = \frac{e_{11}}{[L]e_{01}}$$

Ahora expresamos las constantes macroscópicas:

$$K_1 = \frac{[\textcircled{L}\textcircled{O} + \textcircled{O}\textcircled{L}]}{[L][\textcircled{O}\textcircled{O}]} = \frac{e_{10} + e_{01}}{[L]e_{00}}$$

$$K_2 = \frac{[\textcircled{L}\textcircled{L}]}{[L][\textcircled{L}\textcircled{O} + \textcircled{O}\textcircled{L}]} = \frac{e_{11}}{[L](e_{10} + e_{01})}$$

**¿Cómo se relacionan las constantes microscópicas con las constantes macroscópicas?**

Los estados son idénticos:  $e_{01} = e_{10}$

$$K_1 = \frac{[\text{L}\text{O} + \text{O}\text{L}]}{[\text{L}][\text{O}\text{O}]} = \frac{e_{10} + e_{01}}{[\text{L}]e_{00}} \Rightarrow e_{10} = K_1[\text{L}]e_{00} - e_{01}$$

$$\text{si } k_{1a} = \frac{e_{10}}{[\text{L}]e_{00}} \Rightarrow k_{1a} = \frac{K_1[\text{L}]e_{00} - e_{01}}{[\text{L}]e_{00}} = \frac{K_1[\text{L}]e_{00}}{[\text{L}]e_{00}} - \frac{e_{01}}{[\text{L}]e_{00}}$$

$$= K_1 - \frac{e_{01}}{[\text{L}]e_{00}} \Rightarrow k_{1a} + \frac{e_{01}}{[\text{L}]e_{00}} = K_1 \Rightarrow \mathbf{K_1 = 2k_{1a} = 2k_{1b}}$$

Los estados son idénticos:  $e_{01} = e_{10}$

$$K_2 = \frac{e_{11}}{[L](e_{10} + e_{01})} \Rightarrow e_{11} = K_2[L](e_{10} + e_{01})$$

$$k_{2a} = \frac{e_{11}}{[L]e_{10}} = \frac{K_2[L](e_{10} + e_{01})}{[L]e_{10}} = \frac{K_2(e_{10} + e_{01})}{e_{10}}$$

$$\Rightarrow K_2 = \frac{e_{10}k_{2a}}{(e_{10} + e_{01})} = \frac{e_{10}k_{2a}}{2e_{10}} \Rightarrow \mathbf{K_2 = \frac{1}{2}k_{2a} = \frac{1}{2}k_{2b}}$$

# Interpretación probabilística

$$K_1 = 2 k_1$$

$$K_2 = \frac{1}{2} k_2$$

Solo existen **dos maneras** de que el primer ligando se una al receptor, pero existe **una única forma** de que el segundo ligando se una. Esta observación muestra que el efecto macroscópico (medible) de las constantes ( $K_1, K_2$ ) es diferente a pesar de que las constantes microscópicas son idénticas.

# Fracción de Saturación ( $Y$ )

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

Nos referiremos a los tres estados posibles del receptor como:

$e_{00} \equiv \textit{receptor libre}$

$e_{xy} \equiv \textit{receptor semi - libre}$

$e_{11} \equiv \textit{receptor completo}$

El receptor en el estado semi-libre  $e_{xy}$  incluye los estados  $e_{10}$  y  $e_{01}$  definidos anteriormente, indistinguibles macroscópicamente.

$$Y = \frac{e_{xy} + 2e_{11}}{2(e_{00} + e_{xy} + e_{11})}$$

La cantidad de sitios ocupados por 1 ligando está dado por el macroestado  $e_{xy}$  ( $e_{xy} = e_{10} + e_{01}$ ). El macroestado “receptor completo” se cuenta 2 veces porque puede formarse por dos vías (microestados) diferentes. La cantidad de sitios totales del receptor es la cantidad de estados del receptor multiplicada por el número de sitios posibles (en este caso 2).

$$Y = \frac{e_{xy} + 2e_{11}}{2(e_{00} + e_{xy} + e_{11})}$$

Las constantes macroscópicas se pueden escribir en términos de los macroestados del dímero:

$$K_1 = \frac{e_{xy}}{[L]e_{00}}, \quad K_2 = \frac{e_{11}}{[L]e_{xy}}$$

$$K_1 = \frac{e_{xy}}{[L]e_{00}} \Rightarrow e_{xy} = K_1[L]e_{00}$$

$$K_2 = \frac{e_{11}}{[L]e_{xy}} \Rightarrow e_{11} = K_2[L]e_{xy} = K_2K_1[L]^2e_{00}$$

$$\Rightarrow Y = \frac{e_{xy} + 2e_{11}}{2(e_{00} + e_{xy} + e_{11})} = \frac{K_1[L]e_{00} + 2(K_1K_2[L]^2e_{00})}{2(e_{00} + K_1[L]e_{00} + K_1K_2[L]^2e_{00})}$$

$$= \frac{e_{00}(K_1[L] + 2K_1K_2[L]^2)}{2e_{00}(1 + K_1[L] + K_1K_2[L]^2)} = \frac{K_1[L] + 2K_1K_2[L]^2}{2(1 + K_1[L] + K_1K_2[L]^2)}$$

En términos de las constantes microscópicas:

$$K_1 = 2k_{1a} = 2k_{1b} = 2k_1, \quad K_2 = \frac{1}{2}k_{2a} = \frac{1}{2}k_{2b} = \frac{1}{2}k_2$$

$$Y = \frac{K_1[L] + 2K_1K_2[L]^2}{2(1 + K_1[L] + K_1K_2[L]^2)}$$

$$= \frac{\cancel{2}k_1[L] + \cancel{2}(\cancel{2}k_1) \left( \frac{1}{\cancel{2}}k_2 \right) [L]^2}{\cancel{2} \left( 1 + 2k_1[L] + (\cancel{2}k_1) \left( \frac{1}{\cancel{2}}k_2 \right) [L]^2 \right)} = \frac{k_1[L] + k_1k_2[L]^2}{1 + 2k_1[L] + k_1k_2[L]^2}$$

$$Y = \frac{k_1[L] + k_1k_2[L]^2}{1 + 2k_1[L] + k_1k_2[L]^2}$$

Notar que:

- Si  $k_1 \gg k_2$ :

$$Y \approx \frac{k_1[L] + k_1[L]^2}{1 + 2k_1[L] + k_1[L]^2} = \frac{k_1[L](1 + [L])}{1 + k_1[L](2 + [L])}$$

- Si  $k_2 \gg k_1$ :

$$Y \approx \frac{k_2[L]^2}{1 + k_2[L]^2}$$

Notar que:

si  $k_1 = k_2 = k$  (condición de no interacción)

$$Y = \frac{k_1[L] + k_1k_2[L]^2}{1 + 2k_1[L] + k_1k_2[L]^2} = \frac{k[L] + k^2[L]^2}{1 + 2k[L] + k^2[L]^2}$$

$$= \frac{k[L] \cancel{(1 + k[L])}}{(1 + k[L])^2} = \frac{k[L]}{1 + k[L]} \rightarrow Y = \frac{K_a[L]}{1 + K_a[L]}$$

Cada una de las subunidades funciona como un receptor independiente.

# ¿Cómo se relaciona el modelo de Adair con el Número de Hill?

Sabemos que:

$$h = \frac{d}{d \ln[L]} \ln \left( \frac{Y}{1 - Y} \right), \quad Y = \frac{k_1[L] + k_1 k_2 [L]^2}{1 + 2k_1[L] + k_1 k_2 [L]^2}$$

Demostrar que:

$$h_{ext} = \frac{2}{1 + \sqrt{\frac{k_1}{k_2}}}$$

# ¿Cómo se relaciona el modelo de Adair con el Número de Hill?

Estrategia:

- 1) Encontrar una expresión de  $\frac{Y}{1-Y}$
- 2) Utilizar la regla de la cadena para encontrar  $\frac{d}{d[L]} \left( \frac{Y}{1-Y} \right)$
- 3) Obtener  $h$  como función de  $[L]$
- 4) Obtener extremo de  $h([L])$  obteniendo  $\frac{dh}{d[L]}$  y tomar  $\frac{dh}{d[L]} = 0$

# Paso 1: Obtener $\frac{Y}{1-Y}$

$$\begin{aligned} Y &= \frac{k_1[L] + k_1k_2[L]^2}{1 + 2k_1[L] + k_1k_2[L]^2} \Rightarrow \frac{Y}{1-Y} = \frac{\left( \frac{k_1[L] + k_1k_2[L]^2}{1 + 2k_1[L] + k_1k_2[L]^2} \right)}{1 - \left( \frac{k_1[L] + k_1k_2[L]^2}{1 + 2k_1[L] + k_1k_2[L]^2} \right)} \\ &\Rightarrow \frac{Y}{1-Y} = \frac{\left( \frac{k_1[L] + k_1k_2[L]^2}{\cancel{1 + 2k_1[L] + k_1k_2[L]^2}} \right)}{\frac{1 + 2k_1[L] + \cancel{k_1k_2[L]^2} - k_1[L] - \cancel{k_1k_2[L]^2}}{\cancel{1 + 2k_1[L] + k_1k_2[L]^2}}} \\ &= \frac{k_1[L] + k_1k_2[L]^2}{1 + k_1[L]} \end{aligned}$$

**Paso 2:** Utilizar la regla de la cadena para obtener  $\frac{d(\ln(\frac{Y}{1-Y}))}{d(\ln[L])}$  como función de  $\frac{d(\frac{Y}{1-Y})}{d([L])}$  y calcular  $\frac{d(\frac{Y}{1-Y})}{d([L])}$

Recordar la regla de la cadena y la derivada del logaritmo:

$$\frac{d(\ln y)}{d(\ln x)} = \frac{dy}{dx} \frac{x}{y}, \quad \frac{d(\ln x)}{dx} = \frac{1}{x}$$

Por lo tanto,

$$h = \frac{d}{d(\ln[L])} \left( \frac{Y}{1-Y} \right) = \frac{d \left( \frac{Y}{1-Y} \right)}{d[L]} \left( \frac{[L]}{Y} \right)$$

$$h = \frac{d \left( \frac{Y}{1-Y} \right)}{d[L]} \left( \frac{[L](1-Y)}{Y} \right)$$

$$\begin{aligned}
 &\Rightarrow \frac{d\left(\frac{Y}{1-Y}\right)}{d[L]} = \frac{d}{d[L]} \left( \frac{k_1[L] + k_1k_2[L]^2}{1 + k_1[L]} \right) \\
 &= \frac{(k_1[L] + k_1k_2[L]^2)'(1 + k_1[L]) - (k_1[L] + k_1k_2[L]^2)(1 + k_1[L])'}{(1 + k_1[L])^2} \\
 &= \frac{(k_1 + 2k_1k_2[L])(1 + k_1[L]) - (k_1[L] + k_1k_2[L]^2)(k_1)}{(1 + k_1[L])^2} \\
 &= \frac{k_1 + 2k_1k_2[L] + k_1^2[L] + 2k_1^2k_2[L]^2 - k_1^2[L] - k_1^2k_2[L]^2}{(1 + k_1[L])^2}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &= \frac{k_1 + 2k_1k_2[L] + \cancel{k_1^2[L]} + 2k_1^2k_2[L]^2 - \cancel{k_1^2[L]} - k_1^2k_2[L]^2}{(1 + k_1[L])^2} \\
 &= \frac{k_1 + 2k_1k_2[L] + k_1^2k_2[L]^2}{(1 + k_1[L])^2} = \frac{k_1(1 + 2k_2[L] + k_1k_2[L]^2)}{(1 + k_1[L])^2}
 \end{aligned}$$

Entonces,

$$h = \frac{d \left( \frac{Y}{1 - Y} \right)}{d[L]} \left( \frac{[L](1 - Y)}{Y} \right)$$

$$h = \left( \frac{k_1(1 + 2k_2[L] + k_1k_2[L]^2)}{(1 + k_1[L])^2} \right) \left( \frac{[L](1 - Y)}{Y} \right)$$

### Paso 3: Obtener una expresión para $h([L])$

$$\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = \frac{k_1[L] + k_1k_2[L]^2}{1 + k_1[L]}$$

$$\Rightarrow \frac{1-Y}{Y} = \frac{(1 + k_1[L])}{k_1[L] + k_1k_2[L]^2} = \frac{(1 + k_1[L])}{k_1[L](1 + k_2[L])}$$

$$\begin{aligned}
 h &= \left( \frac{k_1(1 + 2k_2[L] + k_1k_2[L]^2)}{(1 + k_1[L])^2} \right) [L] \left( \frac{(1 + k_1[L])}{k_1[L](1 + k_2[L])} \right) \\
 &= \frac{k_1[L](1 + 2k_2[L] + k_1k_2[L]^2)(1 + k_1[L])}{k_1[L](1 + k_1[L])^2(1 + k_2[L])} \\
 &= \frac{1 + 2k_2[L] + k_1k_2[L]^2}{(1 + k_1[L])(1 + k_2[L])}
 \end{aligned}$$

**Paso 4: Calcular el extremo de  $h([L])$  haciendo  $\frac{dh}{d[L]} = 0$**

$$\frac{dh}{d[L]} = \left( \frac{1 + 2k_2[L] + k_1k_2[L]^2}{(1 + k_1[L])(1 + k_2[L])} \right)'$$

$$= \frac{(1 + 2k_2[L] + k_1k_2[L]^2)'(1 + k_1[L])(1 + k_2[L]) - (1 + 2k_2[L] + k_1k_2[L]^2)[(1 + k_1[L])(1 + k_2[L])]'}{(1 + k_1[L])^2(1 + k_2[L])^2}$$

$$= \frac{(2k_2 + 2k_1k_2[L])(1 + k_1[L])(1 + k_2[L]) - (1 + 2k_2[L] + k_1k_2[L]^2)[1 + k_1[L] + k_2[L] + k_1k_2[L]^2]'}{(1 + k_1[L])^2(1 + k_2[L])^2}$$

$$= \frac{(2k_2 + 2k_1k_2[L])(1 + k_1[L])(1 + k_2[L]) - (1 + 2k_2[L] + k_1k_2[L]^2)(k_1 + k_2 + 2k_1k_2[L])}{(1 + k_1[L])^2(1 + k_2[L])^2}$$

$$= \frac{(2k_2 + 2k_1k_2[L])(1 + k_1[L])(1 + k_2[L]) - (1 + 2k_2[L] + k_1k_2[L]^2)(k_1 + k_2 + 2k_1k_2[L])}{(1 + k_1[L])^2(1 + k_2[L])^2}$$

$$\begin{aligned}
 &= \frac{(2k_2 + 2k_1k_2[L])(1 + k_1[L] + k_2[L] + k_1k_2[L]^2) - (k_1 + k_2 + 2k_1k_2[L] + 2k_1k_2[L] + 2k_2^2[L] + 4k_1k_2^2[L]^2 + k_1^2k_2[L]^2 + k_1k_2^2[L]^2 + 2k_1^2k_2^2[L]^3)}{(1 + k_1[L])^2(1 + k_2[L])^2} \\
 &= \frac{(2k_2 + 2k_1k_2[L] + 2k_2^2[L] + 2k_1k_2^2[L]^2 + 2k_1k_2[L] + 2k_1^2k_2[L]^2 + 2k_1k_2^2[L]^2 + 2k_1^2k_2^2[L]^3) - (k_1 + k_2 + 2k_1k_2[L] + 2k_1k_2[L] + 2k_2^2[L] + 4k_1k_2^2[L]^2 + k_1^2k_2[L]^2 + k_1k_2^2[L]^2 + 2k_1^2k_2^2[L]^3)}{(1 + k_1[L])^2(1 + k_2[L])^2} \\
 &= \frac{(2k_2 + 2k_1k_2[L] + 2k_2^2[L] + 2k_1k_2^2[L]^2 + 2k_1k_2[L] + 2k_1^2k_2[L]^2 + 2k_1k_2^2[L]^2 + 2k_1^2k_2^2[L]^3) - (k_1 + k_2 + 2k_1k_2[L] + 2k_1k_2[L] + 2k_2^2[L] + 4k_1k_2^2[L]^2 + k_1^2k_2[L]^2 + k_1k_2^2[L]^2 + 2k_1^2k_2^2[L]^3)}{(1 + k_1[L])^2(1 + k_2[L])^2}
 \end{aligned}$$

Al final (después de muchas cuentas...):

$$= \frac{k_2 + k_1^2k_2[L]^2 - k_1 - k_1k_2^2[L]^2}{(1 + k_1[L])^2(1 + k_2[L])^2} = \frac{k_2 - k_1 + k_1k_2[L]^2(k_1 - k_2)}{(1 + k_1[L])^2(1 + k_2[L])^2} = \frac{dh}{d[L]}$$

**Paso 4:** Calcular el extremo de  $h([L])$  haciendo  $\frac{dh}{d[L]} = 0$

$$\frac{k_2 - k_1 + k_1 k_2 [L]^2 (k_1 - k_2)}{(1 + k_1 [L])^2 (1 + k_2 [L])^2} = \frac{dh}{d[L]}$$

Las raíces de esta derivada permiten estudiar los extremos de la función  $h([L])$ . La derivada se hace 0 solamente cuando el numerador se hace 0.

$$k_2 - k_1 + k_1 k_2 [L]^2 (k_1 - k_2) = 0 \implies k_1 k_2 [L]^2 (k_1 - k_2) = k_1 - k_2$$

$$k_1 k_2 [L]^2 = \frac{k_1 - k_2}{(k_1 - k_2)} \implies k_1 k_2 [L]^2 = 1 \implies [L]^2 = \frac{1}{k_1 k_2} \implies [L] = \sqrt{\frac{1}{k_1 k_2}}$$

$$h_{ext}([L]) = h \left( \frac{1}{\sqrt{k_1 k_2}} \right) = \frac{1 + 2k_2 \left( \frac{1}{\sqrt{k_1 k_2}} \right) + k_1 k_2 \left( \frac{1}{\sqrt{k_1 k_2}} \right)^2}{\left( 1 + k_1 \left( \frac{1}{\sqrt{k_1 k_2}} \right) \right) \left( 1 + k_2 \left( \frac{1}{\sqrt{k_1 k_2}} \right) \right)}$$

$$\begin{aligned}
 & 1 + \frac{2k_2}{\sqrt{k_1k_2}} + \frac{k_1k_2}{k_1k_2} && 2 + 2\sqrt{\frac{k_2}{k_1}} \\
 = & \frac{\quad}{\left(1 + \frac{k_1}{\sqrt{k_1k_2}}\right)\left(1 + \frac{k_2}{\sqrt{k_1k_2}}\right)} = \frac{\quad}{\left(1 + \sqrt{\frac{k_1}{k_2}}\right)\left(1 + \sqrt{\frac{k_2}{k_1}}\right)} \\
 & && \\
 & && 2\left(1 + \sqrt{\frac{k_2}{k_1}}\right) \\
 = & \frac{\quad}{\left(1 + \sqrt{\frac{k_1}{k_2}}\right)\left(1 + \sqrt{\frac{k_2}{k_1}}\right)}
 \end{aligned}$$

$$h_{ext}([L]) = h \left( \frac{1}{\sqrt{k_1 k_2}} \right) = \frac{2 \left( 1 + \sqrt{\frac{k_2}{k_1}} \right)}{\left( 1 + \sqrt{\frac{k_1}{k_2}} \right) \left( 1 + \sqrt{\frac{k_2}{k_1}} \right)} = \frac{2}{1 + \sqrt{\frac{k_1}{k_2}}}$$

Notar que:

si  $k_1 \gg k_2 \Rightarrow \frac{k_1}{k_2} \gg 1 \Rightarrow h < 1 \Rightarrow$  *Cooperatividad Negativa*

si  $k_2 \gg k_1 \Rightarrow \frac{k_1}{k_2} \ll 1 \Rightarrow h > 1 \Rightarrow$  *Cooperatividad Positiva*

si  $k_1 = k_2 \Rightarrow \frac{k_1}{k_2} = 1 \Rightarrow h = 1 \Rightarrow$  *No cooperatividad*

¿Qué ocurre con un dímero asimétrico con interacciones entre los sitios?

$$k_{1a} \neq k_{1b} \neq k_{2a} \neq k_{2b}$$

$$k_{1a} = \frac{e_{10}}{[L]e_{00}}, k_{1b} = \frac{e_{01}}{[L]e_{00}}, k_{2a} = \frac{e_{11}}{[L]e_{10}}, k_{2b} = \frac{e_{11}}{[L]e_{01}}$$

$$K_1 = \frac{e_{10} + e_{01}}{[L]e_{00}} = \frac{k_{1a}[L]e_{00} + k_{1b}[L]e_{00}}{[L]e_{00}} = \mathbf{k_{1a} + k_{1b}}$$

$$k_{1a} \neq k_{1b} \neq k_{2a} \neq k_{2b}$$

$$k_{1a} = \frac{e_{10}}{[L]e_{00}}, k_{1b} = \frac{e_{01}}{[L]e_{00}}, k_{2a} = \frac{e_{11}}{[L]e_{10}}, k_{2b} = \frac{e_{11}}{[L]e_{01}}$$

$$K_2 = \frac{e_{11}}{[L](e_{10} + e_{01})} = \frac{e_{11}}{[L] \left( \frac{e_{11}}{[L]k_{2a}} + \frac{e_{11}}{[L]k_{2b}} \right)} = \frac{e_{11}}{[L] \left( \frac{1}{k_{2a}} + \frac{1}{k_{2b}} \right)}$$

$$K_2 = \frac{\frac{e_{11}}{[L]}}{\frac{1}{k_{2a}} + \frac{1}{k_{2b}}} = \frac{1}{\frac{1}{k_{2a}} + \frac{1}{k_{2b}}} = \frac{1}{\frac{k_{2b} + k_{2a}}{k_{2a}k_{2b}}} = \frac{k_{2a}k_{2b}}{k_{2b} + k_{2a}}$$

$$k_{1a} \neq k_{1b} \neq k_{2a} \neq k_{2b}$$

$$K_1 = k_{1a} + k_{1b}, \quad K_2 = \frac{k_{2a}k_{2b}}{k_{2b} + k_{2a}}$$

$$\text{si } Y = \frac{K_1[L] + 2K_1K_2[L]^2}{2(1 + K_1[L] + K_1K_2[L]^2)}$$

$$= \frac{(k_{1a} + k_{1b})[L] + 2(k_{1a} + k_{1b}) \left( \frac{k_{2a}k_{2b}}{k_{2a} + k_{2b}} \right) [L]^2}{2 \left( 1 + (k_{1a} + k_{1b})[L] + (k_{1a} + k_{1b}) \left( \frac{k_{2a}k_{2b}}{k_{2a} + k_{2b}} \right) [L]^2 \right)} = \dots$$

$$\begin{aligned}
 & (k_{1a} + k_{1b})[L] + 2(k_{1a} + k_{1b}) \left( \frac{k_{2a}k_{2b}}{k_{2a} + k_{2b}} \right) [L]^2 \\
 = & \frac{(k_{1a} + k_{1b})[L] + 2(k_{1a} + k_{1b}) \left( \frac{k_{2a}k_{2b}}{k_{2a} + k_{2b}} \right) [L]^2}{2 \left( 1 + (k_{1a} + k_{1b})[L] + (k_{1a} + k_{1b}) \left( \frac{k_{2a}k_{2b}}{k_{2a} + k_{2b}} \right) [L]^2 \right)} \\
 = & \frac{\left( \frac{(k_{1a} + k_{1b})(k_{2a} + k_{2b})[L] + 2(k_{1a} + k_{1b})(k_{2a}k_{2b})[L]^2}{\cancel{k_{2a} + k_{2b}}} \right)}{2 \left( \frac{(k_{2a} + k_{2b}) + (k_{2a} + k_{2b})(k_{1a} + k_{1b})[L] + (k_{1a} + k_{1b})(k_{2a}k_{2b})[L]^2}{\cancel{k_{2a} + k_{2b}}} \right)} \\
 = & \frac{(k_{1a} + k_{1b})(k_{2a} + k_{2b})[L] + 2(k_{1a} + k_{1b})(k_{2a}k_{2b})[L]^2}{2[(k_{2a} + k_{2b}) + (k_{2a} + k_{2b})(k_{1a} + k_{1b})[L] + (k_{1a} + k_{1b})(k_{2a}k_{2b})[L]^2]}
 \end{aligned}$$

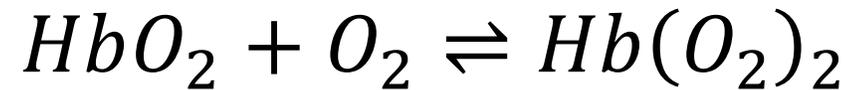
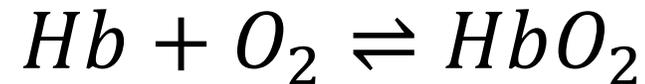
Condición de asimetría sin interacción:

$$k_{1a} + k_{1b} = k_{2a} + k_{2b} = k_a + k_b, \quad k_{1a}k_{1b} = k_{2a}k_{2b} = k_a k_b$$

$$\begin{aligned}
 Y &= \frac{(k_{1a} + k_{1b})(k_{2a} + k_{2b})[L] + 2(k_{1a} + k_{1b})(k_{2a}k_{2b})[L]^2}{2[(k_{2a} + k_{2b}) + (k_{2a} + k_{2b})(k_{1a} + k_{1b})[L] + (k_{1a} + k_{1b})(k_{2a}k_{2b})[L]^2]} \\
 &= \frac{(k_a + k_b)^2 [L] + 2\cancel{(k_a + k_b)}k_a k_b [L]^2}{2[\cancel{(k_a + k_b)} + (k_a + k_b)\cancel{(k_a + k_b)}[L] + \cancel{(k_a + k_b)}k_a k_b [L]^2]} \\
 &= \frac{(k_a + k_b)[L] + 2k_a k_b [L]^2}{2(1 + (k_a + k_b)[L] + k_a k_b [L]^2)}
 \end{aligned}$$

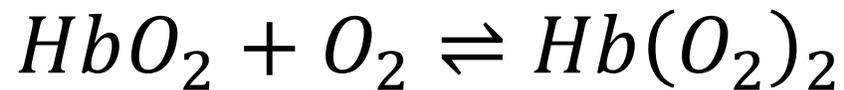
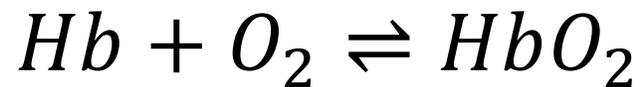
## ¿Qué ocurre con la hemoglobina?

Es posible generalizar los cálculos del Dímero de Adair para la hemoglobina, modelándola como un tetrámero. Adair propuso un mecanismo de cuatro pasos:



Cada paso de unión tiene una constante *macroscópica* de disociación diferente.

Llamaremos  $s$  a la concentración de ligando ( $O_2$ ),  $e_0$  a la concentración de receptor (Hb) y  $es_i$  a la concentración del complejo RL unido a  $i$  ligandos (Ej.:  $es_1$  es la concentración del complejo RL cuando el receptor está unido a 1 ligando, o también, 1 subunidad está completa).



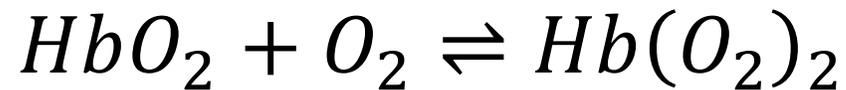
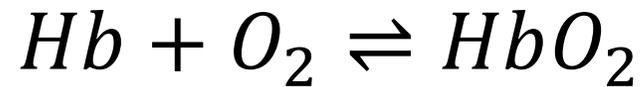
$$es_1 = K_1 e_0 s$$

$$es_2 = K_2 es_1 s$$

$$es_3 = K_3 es_2 s$$

$$es_4 = K_4 es_3 s$$

Podemos expresar las concentraciones de las especies intermedias “*anidando*” (en inglés: ‘*nesting*’) las ecuaciones entre sí:



$$es_1 = K_1 e_0 s$$

$$es_2 = K_2 K_1 e_0 s^2$$

$$es_3 = K_3 K_2 K_1 e_0 s^3$$

$$es_4 = K_4 K_3 K_2 K_1 e_0 s^4$$

La Función de Saturación  $Y$  queda expresada de la siguiente manera:

$$Y \equiv \frac{[\textit{sitios ocupados}]}{[\textit{sitios totales}]} = \frac{es_1 + 2es_2 + 3es_3 + 4es_4}{4(e_0 + es_1 + es_2 + es_3 + es_4)}$$

El número de sitios totales es el número de estados del complejo RL multiplicado por el número de sitios (subunidades) del tetrámero. El número de sitios ocupados es la concentración de cada estado ocupado multiplicado el número de sitios ocupados por estado.

Sustituimos:

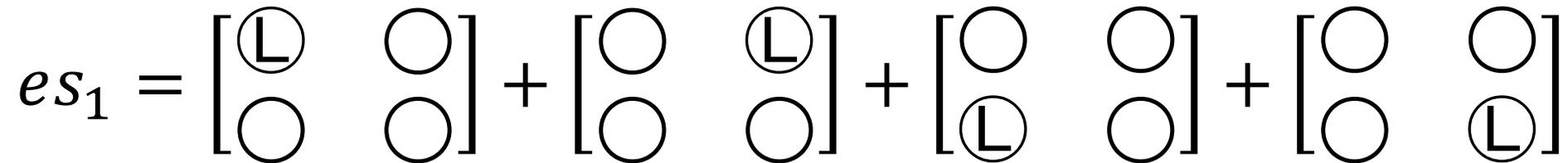
$$Y = \frac{K_1s + 2K_2K_1s^2 + 3K_3K_2K_1s^3 + 4K_4K_3K_2K_1s^4}{4(1 + K_1s + K_2K_1s^2 + K_3K_2K_1s^3 + K_4K_3K_2K_1s^4)}$$

Notar que se obtiene un cociente de polinomios en función de la concentración de ligando. Al polinomio numerador se le conoce como **Polinomio de Unión** (del inglés '*Binding Polynomial*'). El polinomio denominador es una expresión asociada a la **Función de Partición**.

Ver clases teóricas del Módulo 1: Termodinámica Biológica y Anexo de esta presentación.

# ¿Cómo podemos expresar la fracción de saturación en términos de las constantes microscópicas?

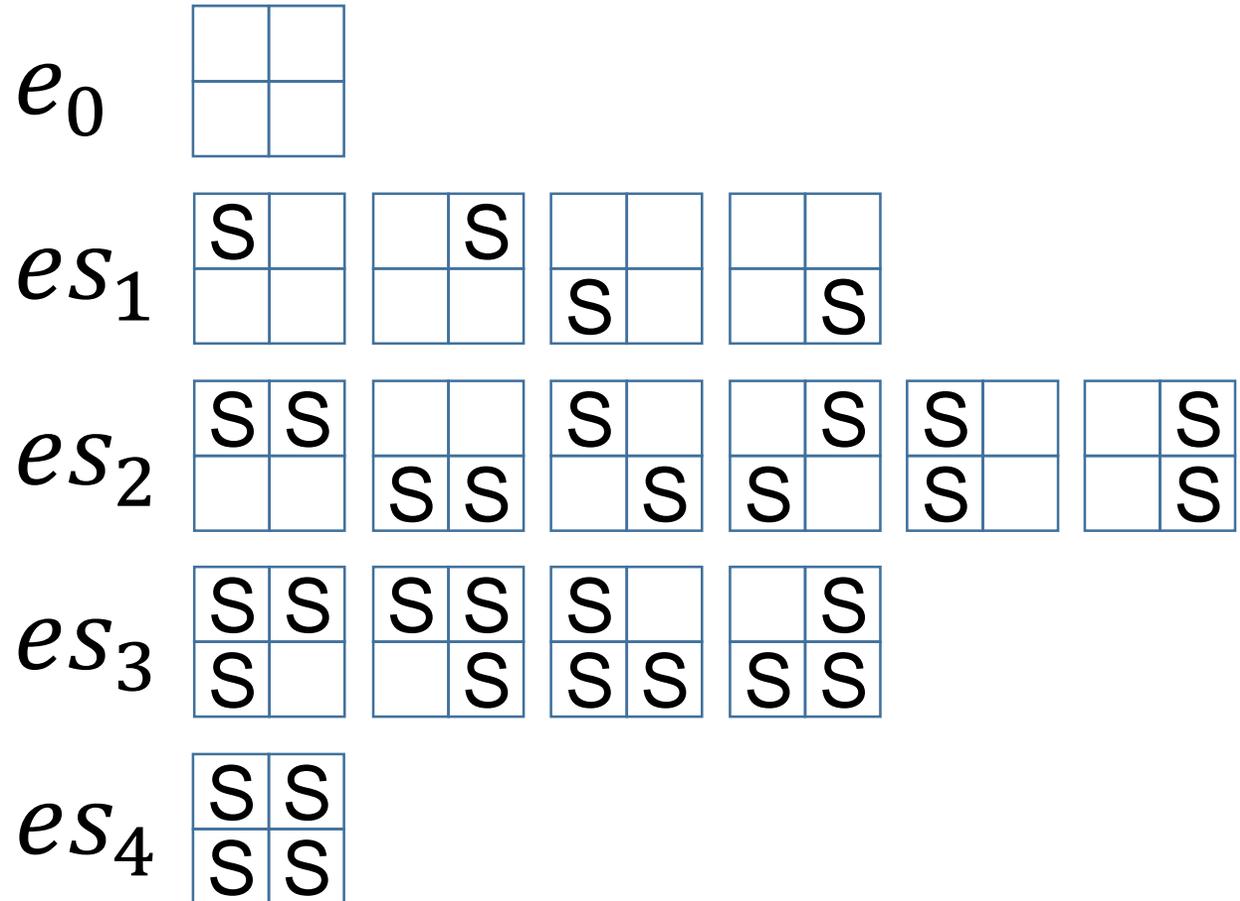
Debemos reconocer cuál es la relación entre los macroestados del sistema y los microestados del sistema. Ej.: Para un tetrámero simétrico (como Hb) debemos reconocer la relación entre “*tener 1 subunidad completa*” y todas las formas de obtener 1 subunidad completa a partir de 4 subunidades totales.



El número de microestados posibles puede ser computado utilizando **Combinatoria**.

En general, para una macromolécula de  $n$  sitios, el número de estados posibles para  $i$  ligandos (subunidades completas) es:

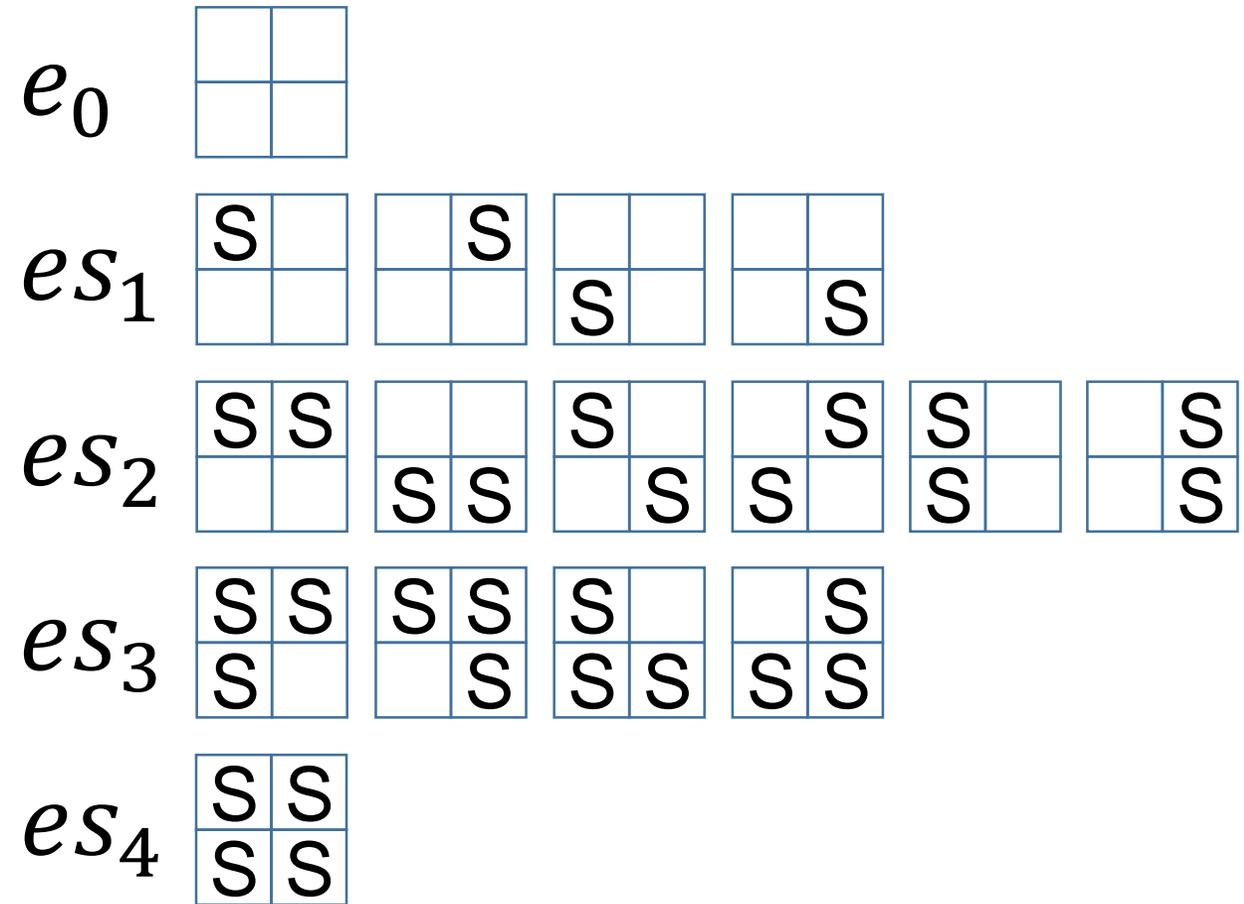
$$C(n, i) = \frac{n!}{i! (n - i)!}$$



Ej.: para un tetrámero (Hb) el número de microestados con 2 subunidades completas es:

$$C(4,2) = \frac{4!}{2! (4 - 2)!}$$

$$C(4,2) = \frac{24}{4} = 6$$



Si llamamos  $M_i$  a la concentración de un macroestado, y  $m_i$  a la concentración de los microestados. Si todos los microestados son equiprobables, las concentraciones son iguales, por lo que:

$$M_i = C(n, i)m_i$$

La reacción del  $i$ -ésimo paso es:



Cuya constante macroscópica de disociación es:

$$K_i = \frac{M_{i-1}S}{M_i}$$

$$K_i = \frac{M_{i-1}S}{M_i} \Rightarrow S = \frac{K_i M_i}{M_{i-1}} \quad k_i = \frac{m_{i-1}S}{m_i}$$

$$M_i = C(n, i)m_i \Rightarrow m_i = \frac{M_i}{C(n, i)}$$

$$\Rightarrow k_i = \frac{\left(\frac{M_{i-1}}{C(n, i-1)}\right)^S}{\frac{M_i}{C(n, i)}} \Rightarrow k_i = \frac{M_{i-1}C(n, i)}{M_i C(n, i-1)} \frac{K_i M_i}{M_{i-1}} = \frac{K_i C(n, i)}{C(n, i-1)}$$

$$\Rightarrow \mathbf{K_i = k_i \frac{C(n, i-1)}{C(n, i)}}$$

$$\begin{aligned}
 K_i &= k_i \frac{C(n, i-1)}{C(n, i)} = k_i \left( \frac{\left( \frac{n!}{(i-1)! (n-(i-1))!} \right)}{\left( \frac{n!}{i! (n-i)!} \right)} \right) \\
 &= k_i \left( \frac{\frac{n!}{(i-1)! (n-i+1)!} \frac{i! (n-i)!}{n!}}{\frac{i! (n-i)!}{(i-1)! (n-i+1)!}} \right) \\
 &= k_i \left( \frac{(i \cancel{(i-1)} \dots) (\cancel{(n-i)} \cancel{(n-i-1)} \dots)}{(\cancel{(i-1)} \cancel{(i-2)} \dots) ((n-i+1)(n-i) \cancel{(n-i-1)} \dots)} \right) \\
 &= k_i \left( \frac{i}{n-i+1} \right)
 \end{aligned}$$

$$K_{i_{dis}} = k_{i_{dis}} \left( \frac{i}{n - i + 1} \right)$$

Las constantes de disociación macroscópicas y microscópicas se relacionan como:

$$K_{i_{asc}} = k_{i_{asc}} \frac{(n - i + 1)}{i}$$

A partir de estas relaciones podemos sustituir en la fracción de saturación las constantes macroscópicas por las microscópicas.

La relación entre constantes es:  $n = 4, i = 1, 2, 3, 4.$

$$K_1 = k_1 \frac{4 - 1 + 1}{1} \Rightarrow K_1 = 4k_1$$

$$K_2 = k_2 \frac{4 - 2 + 1}{2} \Rightarrow K_2 = \frac{3}{2}k_2$$

$$K_3 = k_3 \frac{4 - 3 + 1}{3} \Rightarrow K_3 = \frac{2}{3}k_3$$

$$K_4 = k_4 \frac{4 - 4 + 1}{4} \Rightarrow K_4 = \frac{1}{4}k_4$$

$$Y = \frac{K_1 s + 2K_2 K_1 s^2 + 3K_3 K_2 K_1 s^3 + 4K_4 K_3 K_2 K_1 s^4}{4(1 + K_1 s + K_2 K_1 s^2 + K_3 K_2 K_1 s^3 + K_4 K_3 K_2 K_1 s^4)}$$

$$= \frac{4k_1 s + 2 \left(\frac{3}{2} k_2\right) (4k_1) s^2 + 3 \left(\frac{2}{3} k_3\right) \left(\frac{3}{2} k_2\right) (4k_1) s^3 + 4 \left(\frac{1}{4} k_4\right) \left(\frac{2}{3} k_3\right) \left(\frac{3}{2} k_2\right) (4k_1) s^4}{4 \left(1 + 4k_1 s + (4k_1) \left(\frac{3}{2} k_2\right) s^2 + \left(\frac{2}{3} k_3\right) \left(\frac{3}{2} k_2\right) (4k_1) s^3 + \left(\frac{1}{4} k_4\right) \left(\frac{2}{3} k_3\right) \left(\frac{3}{2} k_2\right) (4k_1) s^4\right)}$$

$$Y = \frac{4k_1 s + 12k_2 k_1 s^2 + 12k_3 k_2 k_1 s^3 + 4k_4 k_3 k_2 k_1 s^4}{4(1 + 4k_1 s + 6k_2 k_1 s^2 + 4k_3 k_2 k_1 s^3 + k_4 k_3 k_2 k_1 s^4)}$$

¿Cómo podemos generalizar para una macromolécula de  $n$  sitios? [Ver Anexo 2 de esta presentación]

Notar que para un tetrámero simétrico sin interacción:

$$k_1 = k_2 = k_3 = k_4 = k$$

$$\begin{aligned}
 Y &= \frac{4k_1s + 12k_2k_1s^2 + 12k_3k_2k_1s^3 + 4k_4k_3k_2k_1s^4}{4(1 + 4k_1s + 6k_2k_1s^2 + 4k_3k_2k_1s^3 + k_4k_3k_2k_1s^4)} \\
 &= \frac{4ks + 12k^2s^2 + 12k^3s^3 + 4k^4s^4}{4(1 + 4ks + 6k^2s^2 + 4k^3s^3 + k^4s^4)} \\
 &= \frac{4ks(1 + 3ks + 3k^2s^2 + k^3s^3)}{4(1 + ks)^4} \\
 &= \frac{4ks(1 + 3ks + 3k^2s^2 + k^3s^3)}{4(1 + ks)^4} = \frac{4ks(1 + ks)^3}{4(1 + ks)^4} = \frac{ks}{1 + ks}
 \end{aligned}$$

Triángulo de Pascal  
[Ver Anexo 2 de esta presentación]

# Contenido de la clase

- Recapitulación de clase (Semana 05/04-08/04)
- Modelo de Hill
- Modelo de Adair
- Modelo Concertado (Monod, Wyman, Changeaux)
- Modelo Secuencial (Koshland, Némethy, Filmer)

# Contenido de la clase

- Recapitulación de clase (Semana 05/04-08/04)
- Modelo de Hill
- Modelo de Adair
- **Modelo Concertado (Monod, Wyman, Changeaux)**
- Modelo Secuencial (Koshland, Némethy, Filmer)

# Modelo de Monod, Wyman y Changeux (1965)

En 1965, Monod, Wyman y Changeux propusieron un modelo que intenta explicar por qué se observa cooperatividad en algunos sistemas alostéricos conocido como **Modelo MWC**, sobre la base de la **Hipótesis Llave-Cerradura**<sup>[4]</sup>.

[4] Monod J, Wyman J, Changeux JP. (1965). On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* 12:88–118.

*J. Mol. Biol.* (1965) 12, 88-118

On the Nature of Allosteric Transitions:  
A Plausible Model  
JACQUES MONOD, JEREMY WYMAN AND JEAN-PIERRE CHANGEUX  
Service de Biochimie Cellulaire, Institut Pasteur, Paris, France  
and Istituto Eugenio Elzei per lo Studio in Chimica del Fattore, Roma, Italy  
(Received 20 December 1965)

"It is ironic that all before us, though they have no eyes, yet they have perception, for when we look at a molecule, there is a kind of vision in response that which is normally not to be seen or felt which is greater, and deeper, and more intimate, than that which we see or feel, and which is a perception possible only for the eye that looks inside the eye to another."

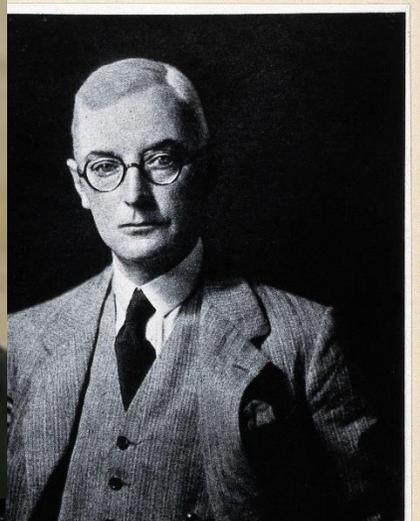
Francis Bacon  
(about 1600)

**1. Introduction**

Ever since the two-state interaction of hemoglobin was first observed (Bohr, 1905), this remarkable phenomenon has excited much interest, both because of its physiological significance and because of the challenge which its observed interconversion effect of Wyman, 1948-1950). The elucidation of the structure of hemoglobin (Perutz et al., 1955) has, if anything, made this problem more challenging, since it has revealed that the heme is far apart from one another in the molecule.

Until fairly recently, hemoglobin appeared as an almost unique example of a protein endowed with the property of exhibiting such infinite transitions between distinct, specific, configurations. Following the pioneer work of Crick and his school on muscle phosphorylation (see Holmberg & Crick, 1964), it has become clear, especially during the past few years, that, in nature as well as in higher organisms, many enzymes are endowed with specific functions of allosteric regulation. A systematic, comparative analysis of the properties of these proteins has led to the conclusion that in most, if not all, of them, lateral interactions between distant specific binding sites (allosteric effect) are responsible for the performances of their regulatory function (Monod, Changeux & Jacob, 1965).

By their very nature, allosteric effects cannot be interpreted in terms of the classical theories of enzyme action. It must be assumed that these interactions are mediated by some kind of molecular transition (allosteric transition) which is induced or activated in the protein when it binds an "allosteric ligand". In the present paper, we wish to submit and discuss a general interpretation of allosteric effects in terms of certain features of protein structure, such as observed in particular, we believe, by the fact that, even though they perform widely different functions, the dimer or an allosteric system which have been studied in some detail do appear to possess in common certain remarkable properties.



Monod recibió el Premio Nobel de Medicina o Fisiología por sus trabajos sobre la regulación génica del Operón Lac junto con Jacob y Loeb, el mismo año en que publicó el modelo MWC.

*J. Wyman*

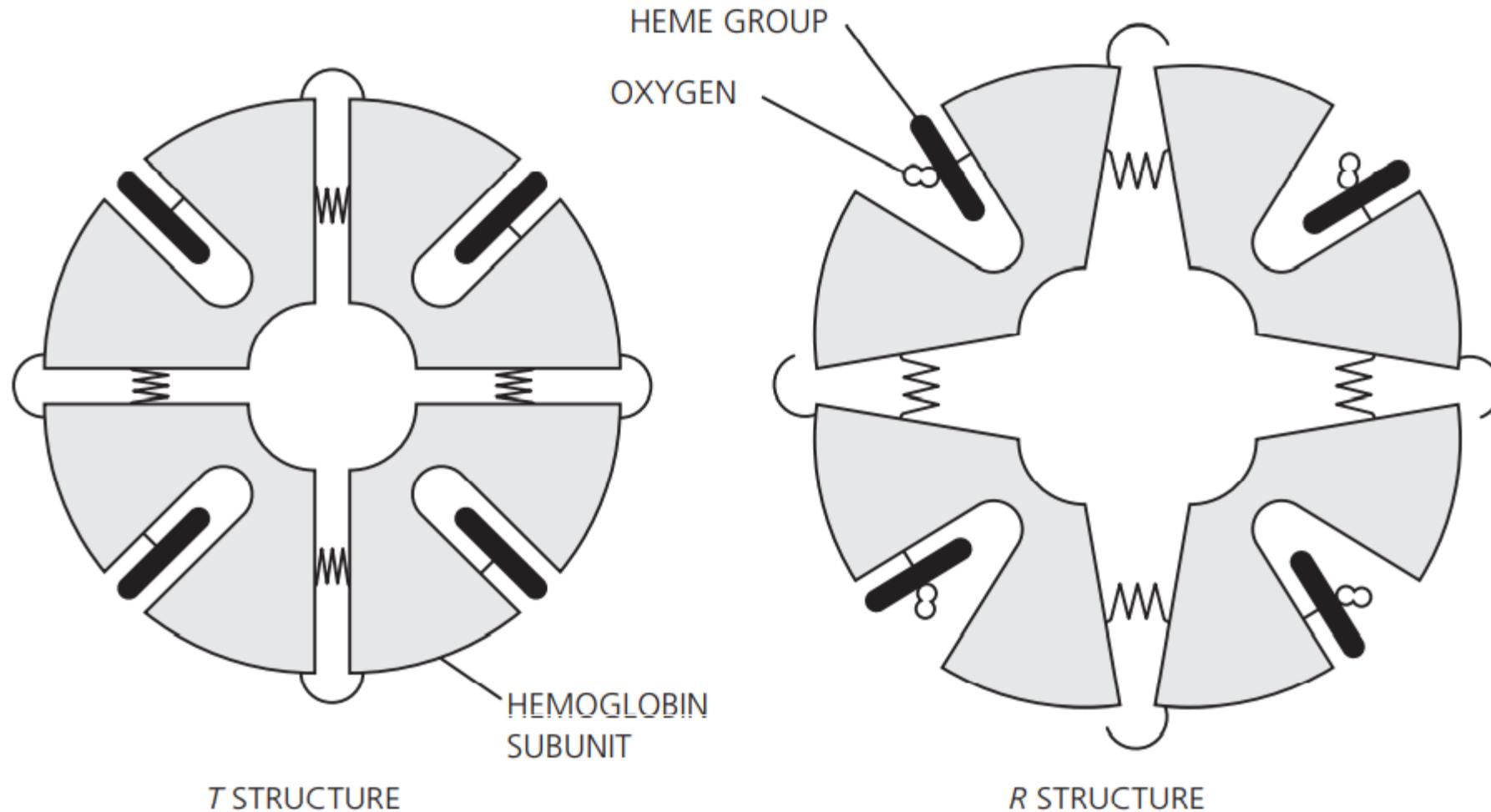
# Modelo de Monod, Wyman y Changeux (1965)

## Postulados (principales):

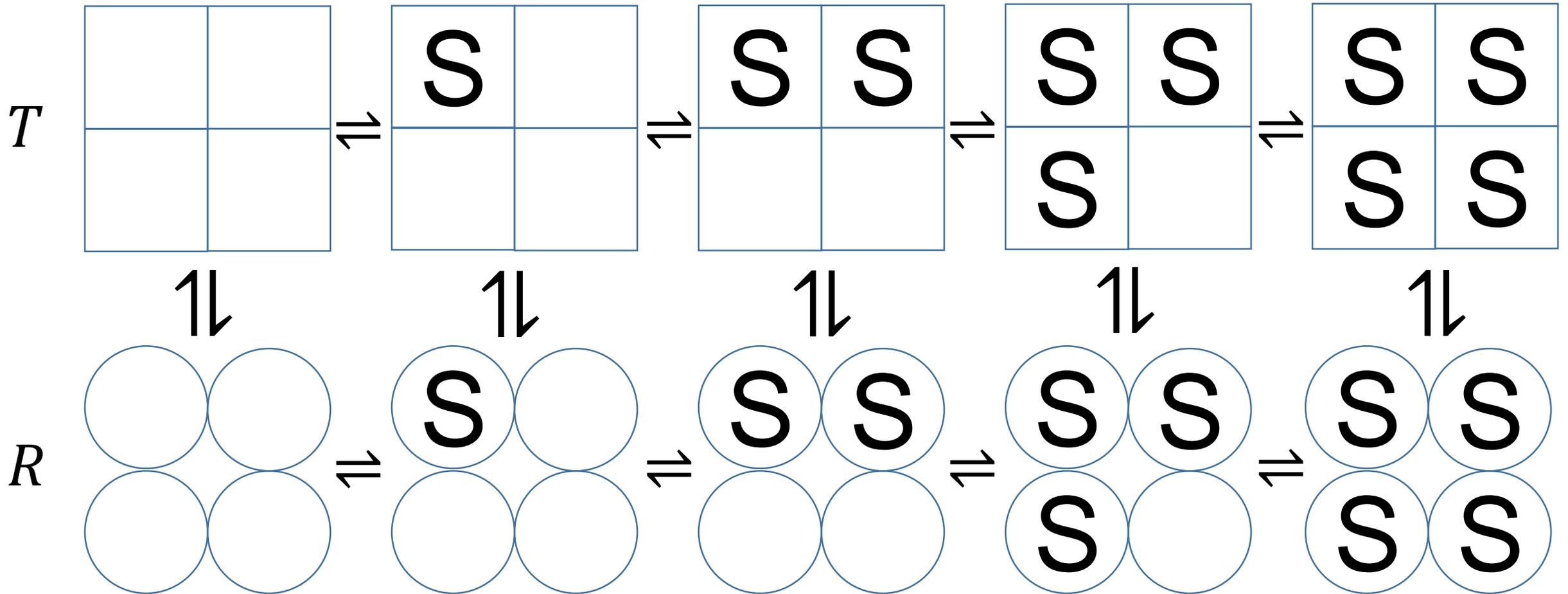
- 1) El receptor puede existir en **dos estados conformacionales** diferentes: **relajado (R)** y **tenso (T)**. El ligando se une al estado relajado (Hipótesis Llave-Cerradura).
- 2) **Todas las subunidades deben estar en la misma conformación en todo momento.** Ej.: para un tetrámero solo se admiten estados  $R_4$  y  $T_4$ .
- 3) Los estados relajado y tenso están en equilibrio.

[4] [Monod J, Wyman J, Changeux JP. \(1965\). On the nature of allosteric transitions: a plausible model. J. Mol. Biol. 12:88–118.](#)

# Modelo de Monod, Wyman y Changeux (1965)



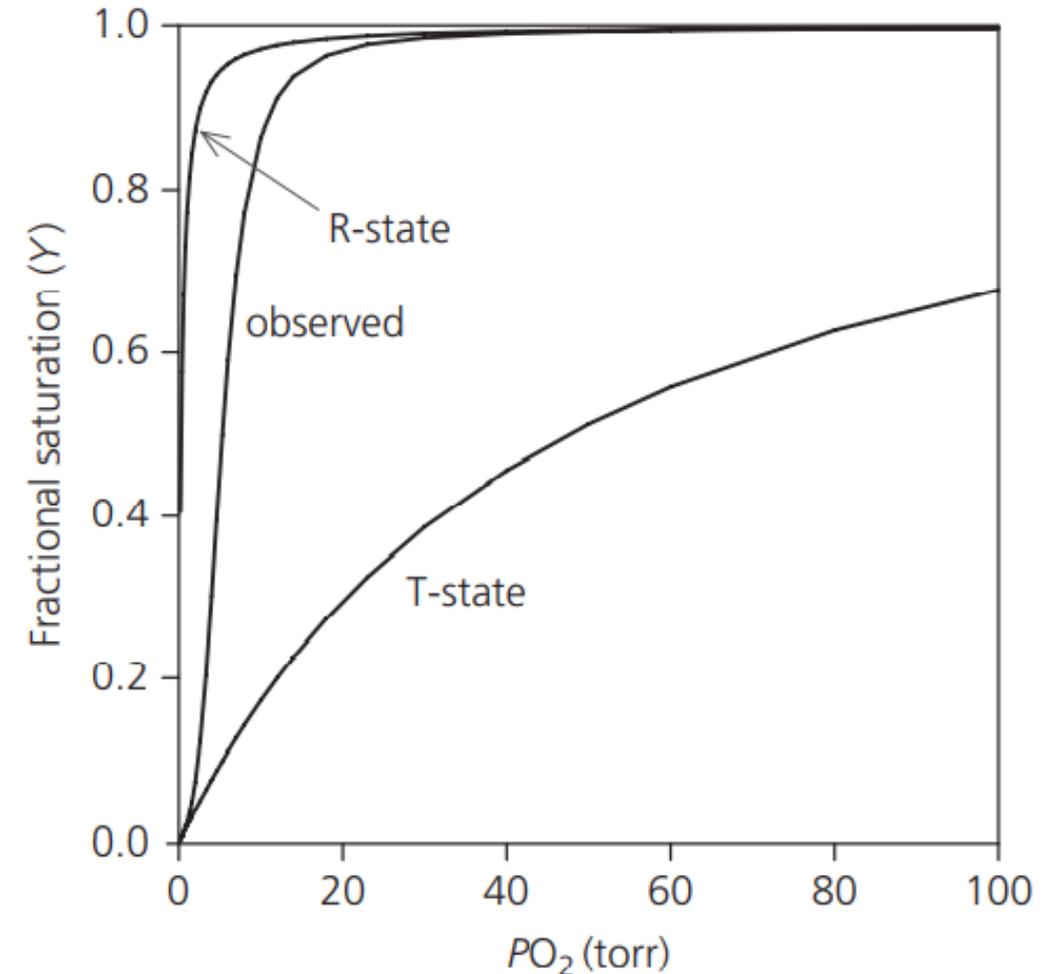
# Modelo de Monod, Wyman y Changeux (1965)



[4] [Monod J, Wyman J, Changeux JP. \(1965\). On the nature of allosteric transitions: a plausible model. J. Mol. Biol. 12:88–118.](#)

En este modelo, la cooperatividad se explica en base a que el estado T se ve favorecido cuando hay pocos (o ningún) ligandos asociados, mientras que el estado R se ve favorecido cuando la cantidad de ligando asociado es grande.

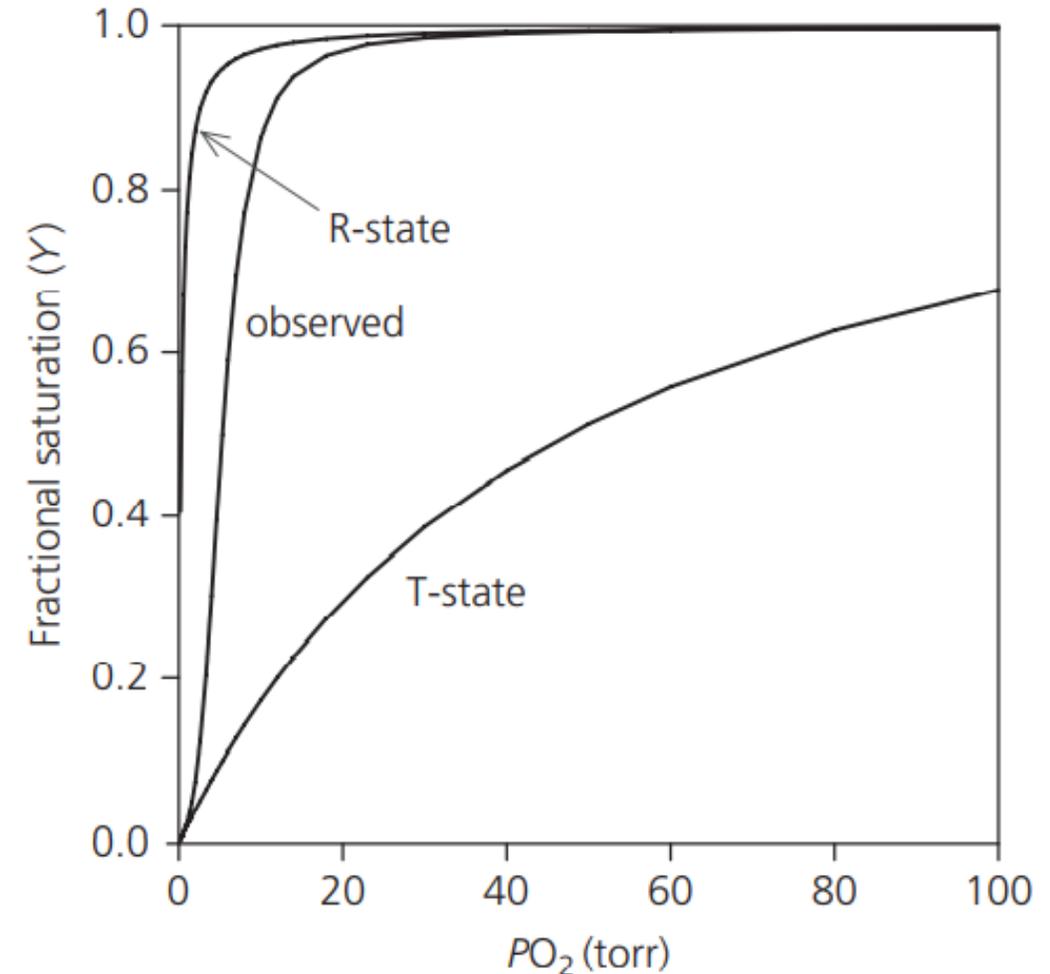
La curva observada de la fracción de saturación es una combinación de las curvas para los estados T y R.



De acuerdo a este modelo, la afinidad solo se incrementa cuando todas las subunidades forman el estado R.

**Sin embargo, esto NO es lo que se observa experimentalmente y es la principal debilidad del modelo<sup>[5]</sup>.**

[5] Lindstrom, T. R., & Ho, C. (1972). Functional nonequivalence of  $\alpha$  and  $\beta$  hemes in human adult hemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(7), 1707-1710.



# Contenido de la clase

- Recapitulación de clase (Semana 05/04-08/04)
- Modelo de Hill
- Modelo de Adair
- Modelo Concertado (Monod, Wyman, Changeaux)
- Modelo Secuencial (Koshland, Némethy, Filmer)

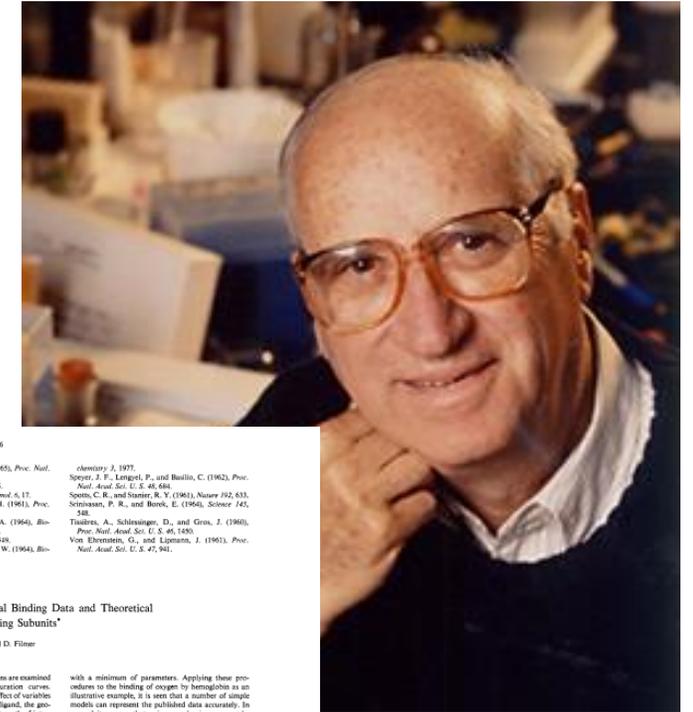
# Contenido de la clase

- Recapitulación de clase (Semana 05/04-08/04)
- Modelo de Hill
- Modelo de Adair
- Modelo Concertado (Monod, Wyman, Changeaux)
- **Modelo Secuencial (Koshland, Némethy, Filmer)**

# Modelo de Koshland, Némethy y Filmer (1966)

Un año después de la propuesta del Modelo MWC, Koshland y sus colaboradores propusieron una alternativa conocida como **Modelo Secuencial o modelo KNF**.

A diferencia del MWC, el modelo KNF se basa en la **Hipótesis del Encaje por Inducción** (*'Induce-fit Hypothesis'*)<sup>[6]</sup>.



VOL. 5, NO. 1, JANUARY 1966

McCarthy, B. J., and Hilland, J. J. (1965), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 54, 880.  
Nakada, D. (1965), *J. Mol. Biol.*, 12, 605.  
Nienberg, M. W. (1964), *Mol Biol. Evol.*, 1, 17.  
Nienberg, M. W., and Mathias, J. H. (1961), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 47, 1588.  
Otsuka, E., Otsuka, S., and Shibata, A. (1964), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 15, 568.  
Sikavits, P. (1952), *J. Biol. Chem.*, 195, 549.  
So, A. G., Bodley, J. W., and Davis, E. W. (1964), *Biochemistry*, 3, 977.

Sorey, J. E., Langford, P., and Basilio, C. (1962), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 48, 684.  
Spencer, C. R., and Steiner, R. W. (1961), *Nature*, 192, 533.  
Srinivasan, P. R., and Borek, E. (1964), *Science*, 146, 548.  
Tsielias, A., Schlessinger, D., and Gros, J. (1960), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 46, 1450.  
Von Elversten, G., and Lippman, J. (1965), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 47, 941.

## Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits\*

D. E. Koshland, Jr.,† G. Némethy, and D. Filmer

**ABSTRACT:** Models for subunit interactions are examined by means of interpreting ligand saturation curves. Equations are derived to indicate the effect of variables such as the strength of binding of the ligand, the geometrical arrangement of subunits, the strength of interaction between subunits, the energy of the conformation change, and the effect of nonidentical subunits. Rapid methods, i.e., equations and nomograms, are developed to fit theoretical curves to experimental data

with a minimum of parameters. Applying these procedures to the binding of oxygen by hemoglobin as an illustrative example, it is seen that a number of simple models can represent the published data accurately. In general it appears that unique mechanisms cannot be established from ligand saturation curves by themselves, but the mathematical analysis of the curves indicates possible sources of additional information to make such distinctions possible.

For many years it has been known that the binding of oxygen to hemoglobin follows a sigmoid curve which differs appreciably from the typical Michaelis-Menten equation covering the same concentration range. An empirical equation developed by Hill (1910),  $Y = \frac{K_1 X^n}{1 + K_1 X^n}$ , gave a reasonable approximation to the data with  $n = 2.6$ . Adair (1925) obtained a closer fit using a four-constant equation in which the constants related the successive affinity constants of oxygen to the four heme groups in hemoglobin. Adair's equation did not provide any theoretical explanation for the changing affinity constants, but it was capable of fitting the data quite accurately. Pilling (1935) made the first attempt to relate the change in three constants to the geometry of the protein by assuming a single affinity constant and an interaction term which depended on the geometry of

the four subunits. Excellent recent reviews on linked functions and binding of hemoglobin have been presented by Wyman (1964) and Rossi-Fanelli et al. (1965).

The recent emphasis on the properties of proteins has highlighted the importance of the hemoglobin problem in several ways. In the first place, gross conformational changes provide perhaps the best explanation for the "interaction" between heme groups during the binding of oxygen. This hypothesis is supported by the elegant studies of Perutz and co-workers (1965) who found that the hemes lie far from each other in the hemoglobin molecule and that a conformational change apparently occurs when oxygen is absorbed to hemoglobin. In the second place, the widespread observation of conformational effects in enzyme systems in general and in regulatory systems in particular together with the observation that most of these enzymes are composed of subunits indicates that the hemoglobin interactions may not be an isolated phenomenon but rather one manifestation of a general situation (Gibson, 1964; Lillibarger, 1964; Cleland and Purdie, 1962; Monod et al., 1962; Koshland, 1965).

Monod et al. (1965) have recently proposed an interesting new model to explain the hemoglobin saturation

\* From the Biology Department, Brookhaven National Laboratory, Upton, New York 11973, and the Biophysical Institute, New York, New York 10021, *Received August 2, 1965*. A portion of the research was carried out at Brookhaven National Laboratory under the auspices of the U. S. Atomic Energy Commission. † Present address: Department of Biochemistry, University of California, Berkeley, Calif.

[6] Koshland Jr, D. E., Némethy, G., & Filmer, D. (1966). Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry*, 5(1), 365-385.

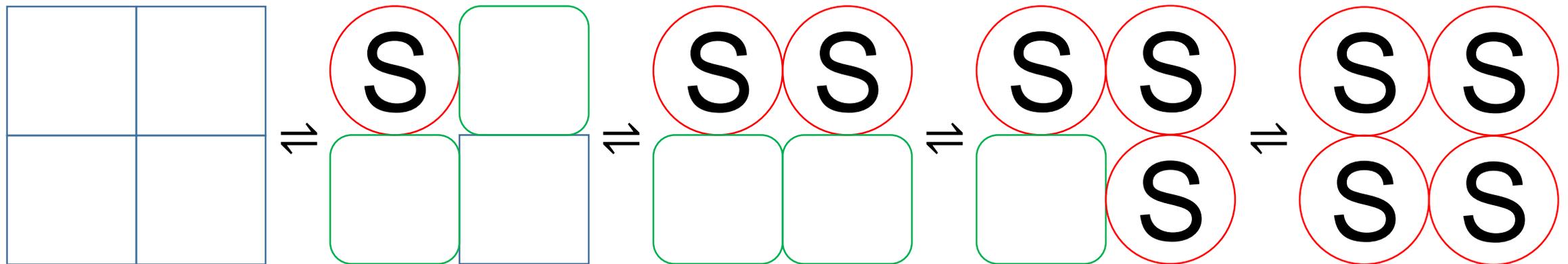
# Modelo de Koshland, Némethy y Filmer (1966)

Postulados:

- 1) El receptor posee **dos conformaciones diferentes**: relajada (R) y tensa (T), con diferente afinidad por el ligando.
- 2) Los estados tenso y relajado se encuentran en equilibrio, pero ese **equilibrio** está **modulado por la presencia de ligando**.
- 3) La unión con el ligando genera un **cambio conformacional** de la subunidad a la que se une e **induce un cambio en las subunidades vecinas**, incrementando sus afinidades.

[6] [Koshland Jr, D. E., Némethy, G., & Filmer, D. \(1966\). Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. \*Biochemistry\*, 5\(1\), 365-385.](#)

# Modelo de Koshland, Némethy y Filmer (1966)



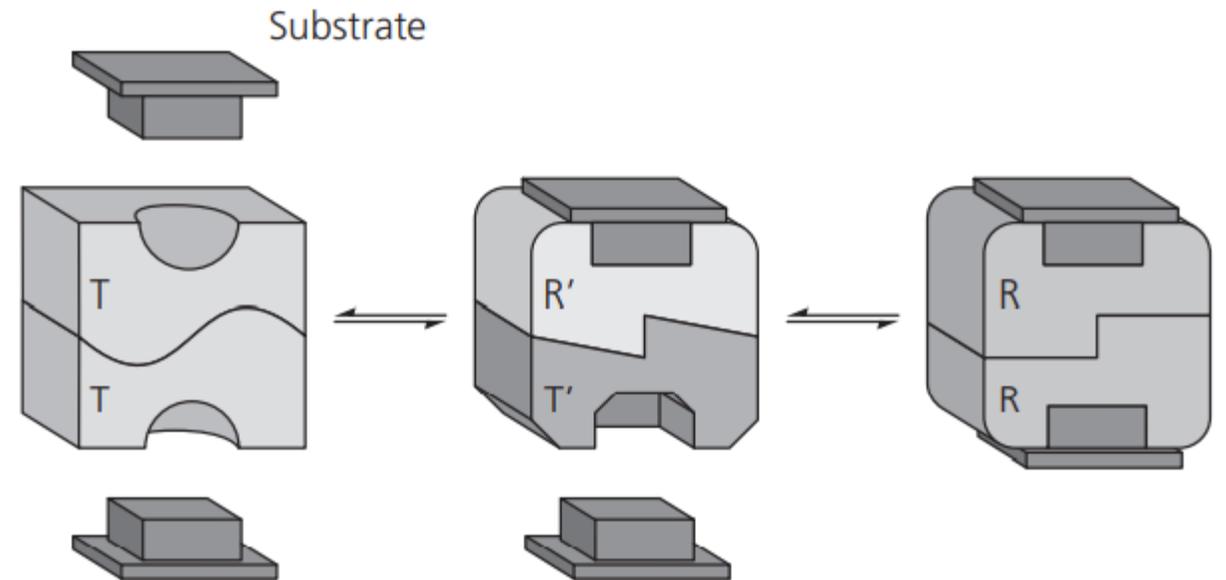
 Subunidad ligada

 Subunidad no ligada

 Subunidad no ligada inducida por la presencia de una subunidad ligada vecina

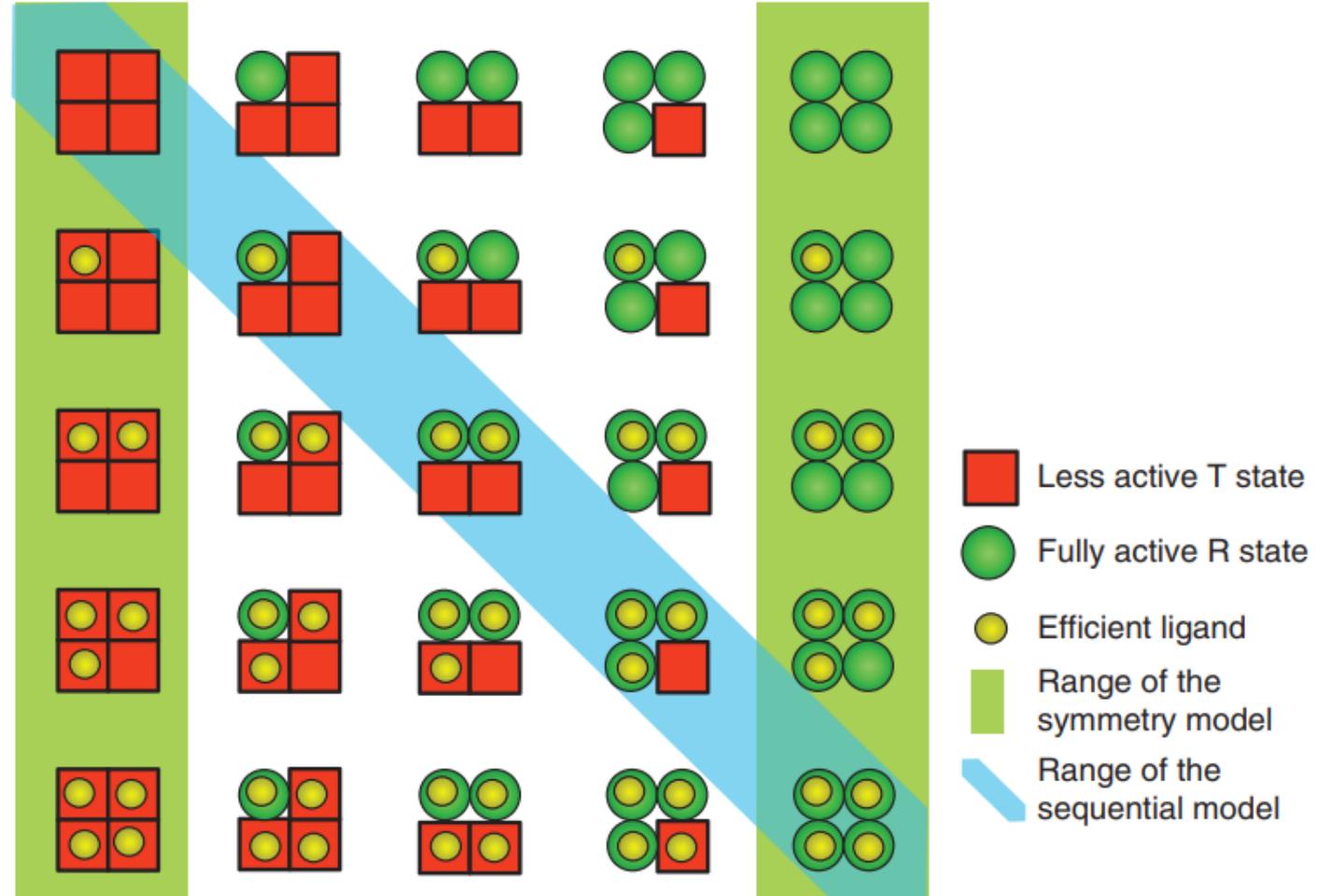
La gran debilidad de este modelo es que el **receptor solamente alcanza el estado relajado (R) si todas sus subunidades están unidas al ligando.**

**Esto también contradice las observaciones experimentales.**



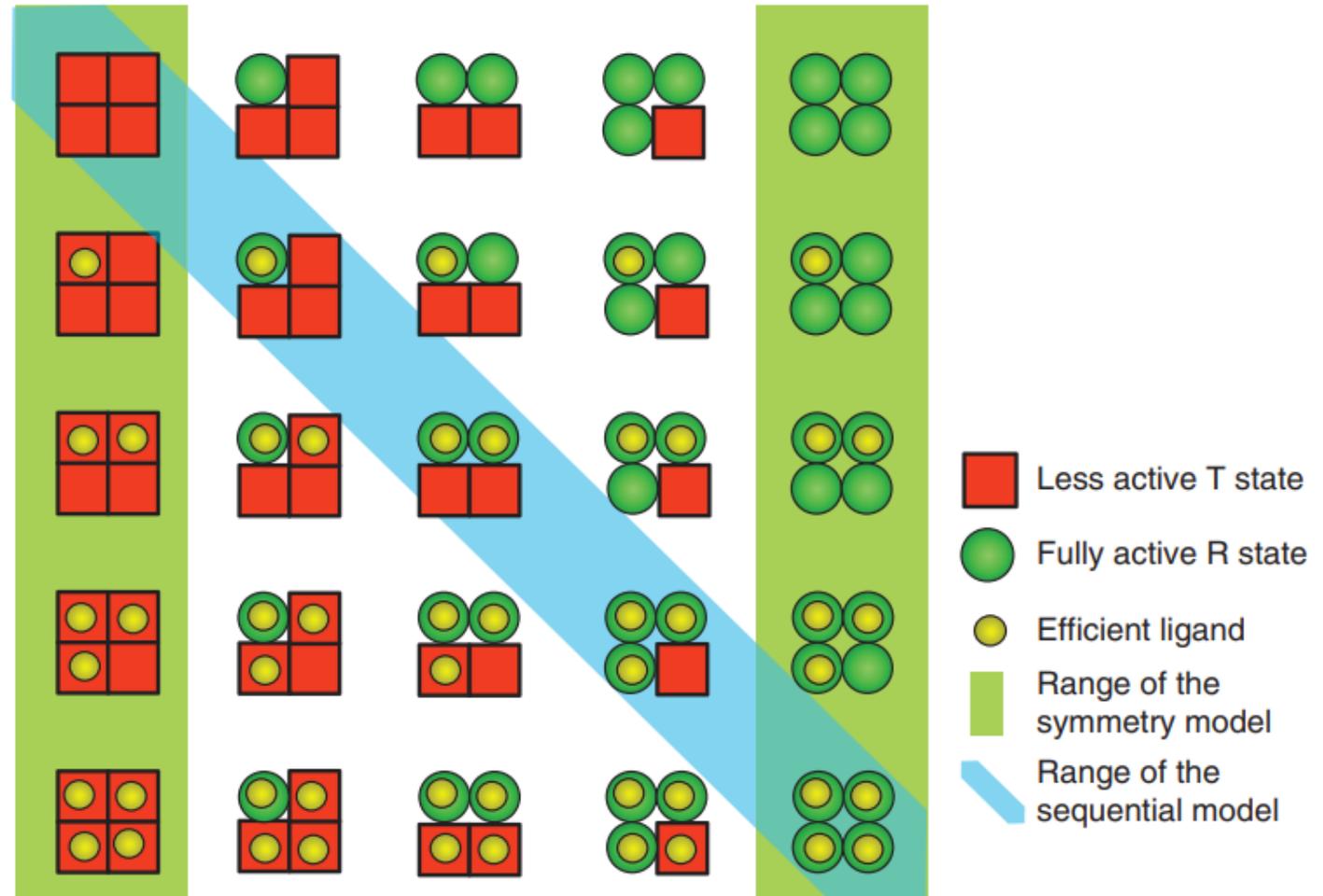
# Comparación: MWC vs. NFK

Si bien ninguno de los dos modelos por sí solos puede describir correctamente la naturaleza cooperativa de la Hb, una combinación de ambos modelos permite entender mejor los fenómenos de cooperatividad.



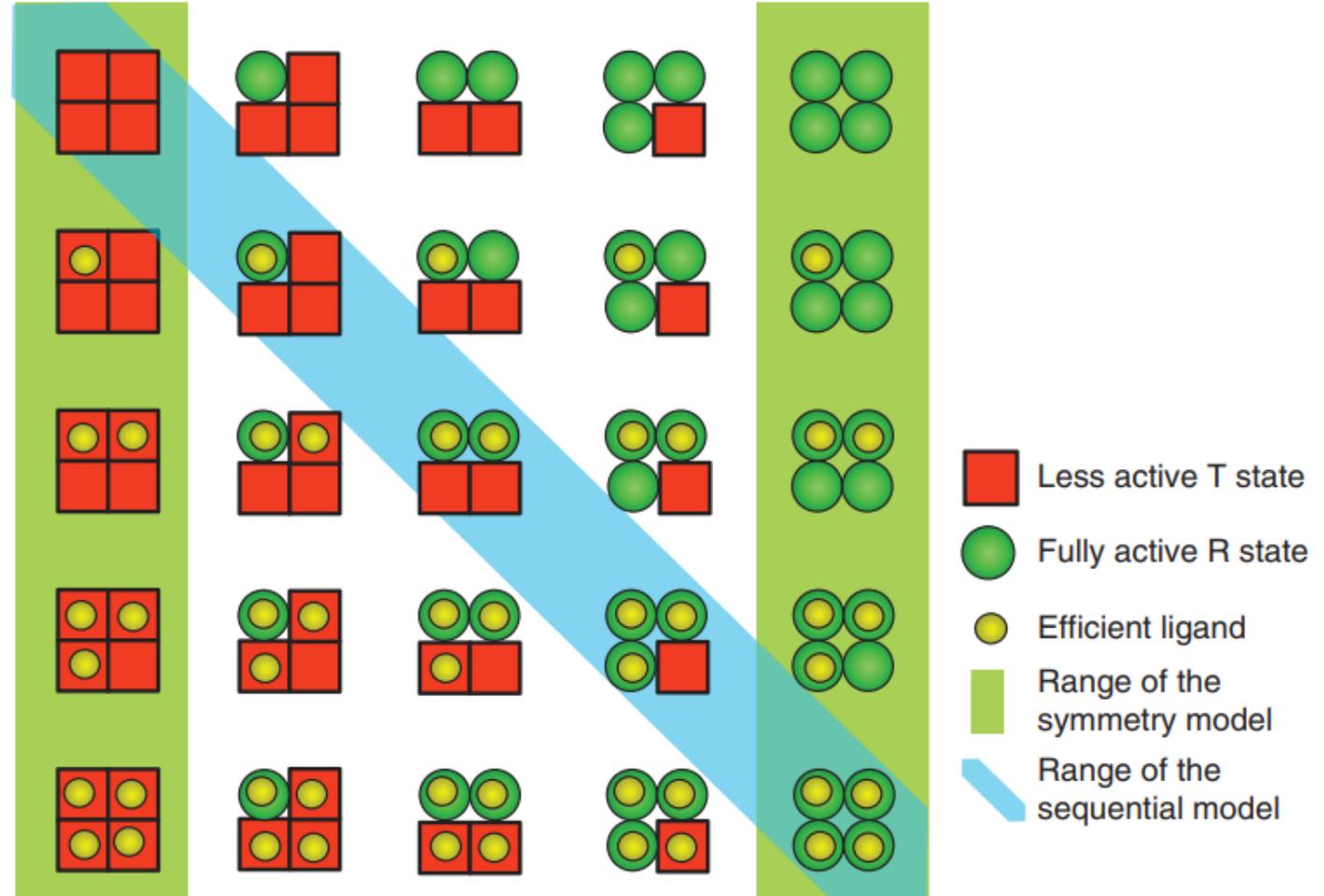
# Comparación: MWC vs. NFK

Ambos modelos asumen que la **cooperatividad surge de la interacción entre subunidades**. Esto es una debilidad teórica que impide explicar por qué algunos receptores monoméricos exhiben cooperatividad.



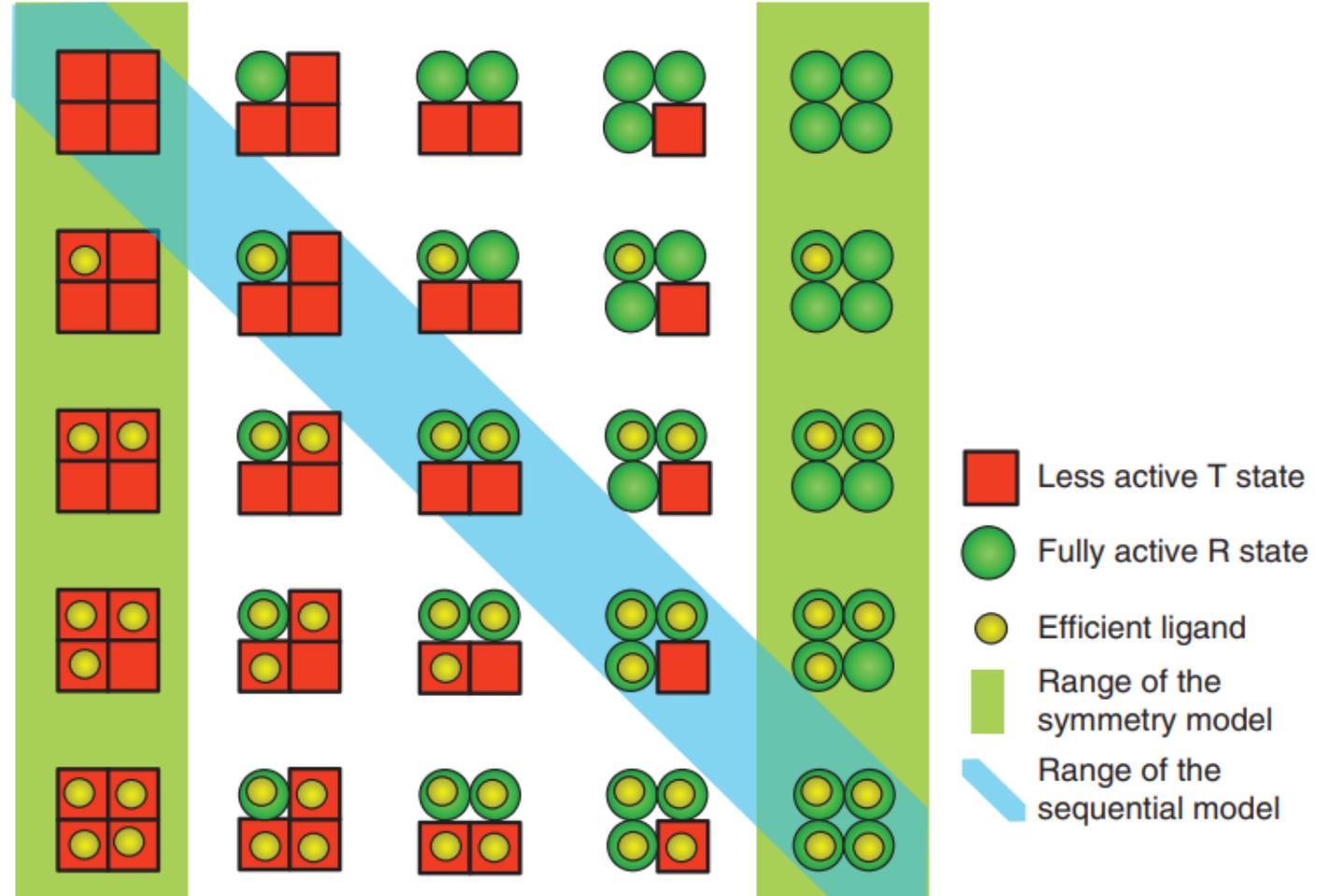
# Comparación: MWC vs. NFK

El modelo **MWC** trata las diferentes conformaciones como estructuras independientes del ligando, mientras que el modelo **NFK** trata las conformaciones como estructuras íntimamente asociados a la unión con el ligando.



# Comparación: MWC vs. NFK

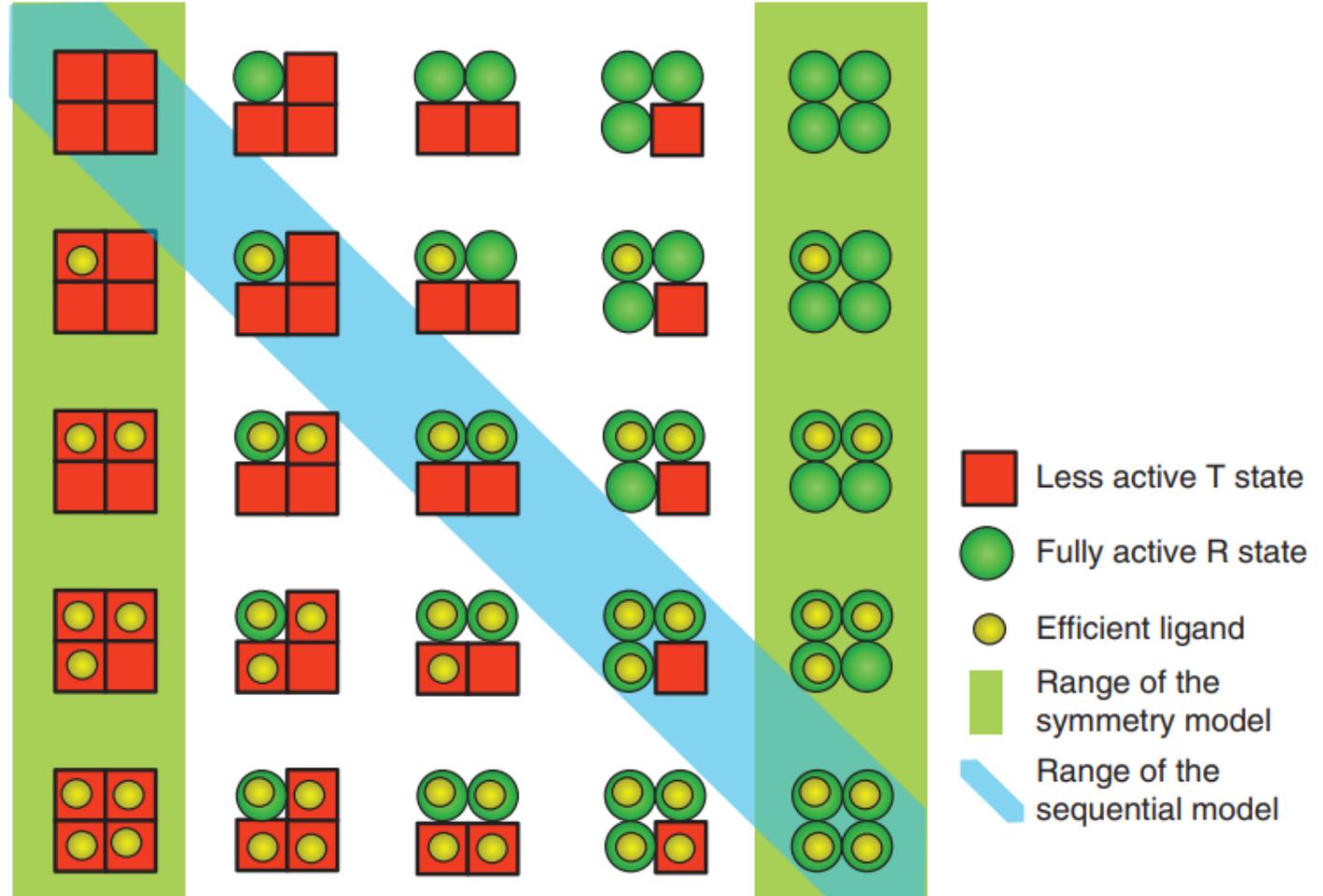
El modelo **MWC** requiere que se mantenga la **simetría estructural** de cada una de las subunidades a medida que se van completando con el ligando. El **modelo NFK rompe la simetría estructural** para poder explicar la cooperatividad.



# Comparación: MWC vs. NFK

**MWC no admite cooperatividad negativa:**  
solo aumenta la afinidad con un cambio de conformación.

**NFK explica la cooperatividad negativa:**  
la unión de un ligando induce una baja de la afinidad en subunidades vecinas.



# Resumen *(de las dos clases)*

La Fracción de Saturación ( $Y$ ) es una función que permite estudiar la interacción entre las concentraciones de un receptor  $[R]$ , su ligando  $[L]$  y las constantes de asociación ( $K_a$ ) y disociación ( $K_d$ ) en el equilibrio.

Dicha función exhibe una curva denominada Hipérbola Rectangular.

La Constante de Disociación ( $K_d$ ) se establece para el 50% de los sitios ocupados por ligando ( $Y = 0.5$ ). A mayor  $K_d$  menor será la velocidad de crecimiento de  $Y$ .

# Resumen *(de las dos clases)*

Para un receptor con  $n$  sitios de unión con el ligando, podemos suponer que las uniones entre receptor y ligandos son independientes entre sí:  $r = nY$

A través de diferentes linealizaciones de la función  $r$  podemos obtener parámetros importantes de la reacción tales como  $K_d$  y el número de sitios por receptor ( $n$ ). (Ej.: Scatchard, Lineweaver-Burk, Langmuir-Hines).

# Resumen *(de las dos clases)*

El modelo de Hill surgió como una alternativa para explicar comportamientos de interacción RL donde no se cumplía la independencia de unión entre sitios.

El Número de Hill ( $h$ ) permite establecer la relación de cooperatividad entre ligandos para con los sitios de su receptor. A medida que aumenta  $[L]$ , si  $h > 1$  la unión RL favorece otras uniones (Cooperatividad Positiva), si  $h < 1$  (Cooperatividad Negativa) la unión RL se ve desfavorecida. Con  $h = 1$  el modelo vuelve a la independencia de sitios de unión (no cooperativo).

# Resumen *(de las dos clases)*

El Modelo de Adair permite obtener expresiones para receptor con  $n$  sitios con especies intermedias de unión.

Dependiendo de si existe simetría, asimetría, interacción o no interacción entre las subunidades de un receptor, es posible expresar la función de saturación en términos de las constantes macroscópicas y microscópicas.

Este modelo significó un gran avance en el entendimiento de la cooperatividad observada en la Hemoglobina.

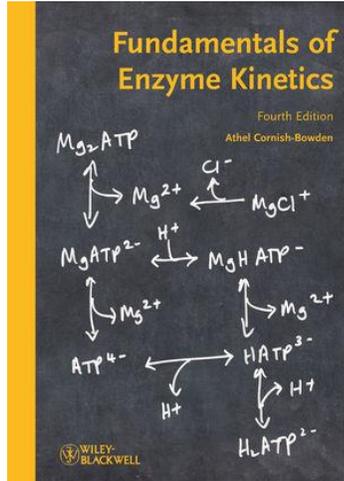
# Resumen *(de las dos clases)*

Los modelos MWC y NFK intentan dar una explicación a los mecanismos de cooperatividad, aunque ambos son incompletos.

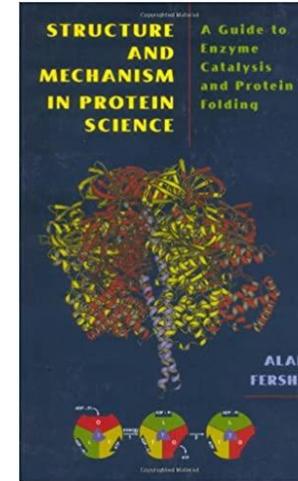
El modelo MWC supone dos estados conformacionales en equilibrio (relajado y tenso) independientes de la presencia de ligando. La afinidad solo aumenta cuando el receptor se encuentra en una única conformación.

El modelo NFK supone dos estados conformacionales en equilibrio cuya presencia se ve favorecida por la presencia de ligando. La unión ligando-subunidad induce la afinidad de unión con otras subunidades.

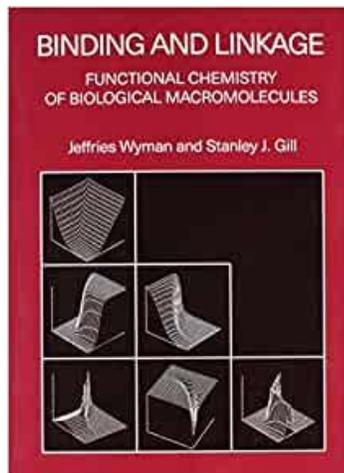
# Bibliografía



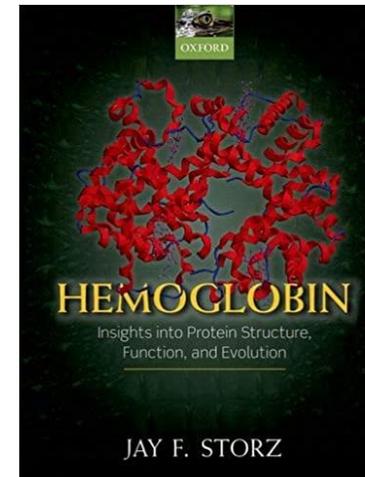
Cornish-Bowden, A. (2013). *Fundamentals of enzyme kinetics*. John Wiley & Sons. Cap. 12: Regulation of Enzyme Activity.  
[\[Disponible en Biblioteca\]](#)  
[\[Disponible en EVA\]](#)



Fersht, A. (1999). *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*. Macmillan. Cap. 10: Conformational Change, Allosteric Regulation, Motors and Work.  
[\[Disponible en Biblioteca\]](#)



Wyman, J., & Gill, S. J. (1990). *Binding and linkage: functional chemistry of biological macromolecules*. University Science Books. Cap. 3: The Binding Polynomial (Nonassociating Macromolecules). Cap. 4: Allosteric Systems.  
[\[Disponible en EVA\]](#)



Storz, J. F. (2018). *Hemoglobin: insights into protein structure, function, and evolution*. Oxford University Press. Cap. 2: A Study in Scarlet. Cap. 3: Allosteric Theory.  
[\[Disponible en Biblioteca\]](#)

# Bibliografía



[Acerenza, L., & Mizraji, E. \(1997\). Cooperativity: a unified view. \*Biochimica et Biophysica Acta \(BBA\)-Protein Structure and Molecular Enzymology\*, 1339\(1\), 155-166.](#)



Biochimica et Biophysica Acta 1339 (1997) 155–166



## Cooperativity: a unified view

Luis Acerenza \*, Eduardo Mizraji



*Departamento de Biofísica, Facultad de Ciencias, Tristán Narvaja 1674, Montevideo 11200, Uruguay*

Received 3 September 1996; revised 5 December 1996; accepted 6 December 1996