

RESOLUCIONES**Ejercicios Complementarios – Módulo 2****INTERACCIONES RECEPTOR-LIGANDO**

*Sección Biofísica y Biología de Sistemas
Facultad de Ciencias, Universidad de la República*

1) (Exámen 17/2/2011):

Un receptor simple (hiperbólico) se encuentra en equilibrio con su ligando. Inicialmente, la mitad de las moléculas del receptor están formando complejo. Si se agrega ligando al sistema hasta que el 75% del receptor está ocupado, determine por qué factor se ha incrementado la concentración de ligando libre.

Resolución: Un receptor simple, o hiperbólico en equilibrio con su ligando sigue la curva de saturación

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

Inicialmente, se sabe que $Y = 0.5$, lo que quiere decir que $[L] = K_{0.5}$ (esta es la definición de $K_{0.5}$, pero puede verse sustituyendo en la ecuación). Sabiendo esto, el factor por el cual incrementó la concentración de ligando es lo mismo que buscar $[L]/K_{0.5}$. Saber que para la nueva concentración de ligando, el 75% está ocupado nos dice que:

$$0.75 = \frac{3}{4} = \frac{[L]}{K_{0.5} + [L]}$$

con lo que:

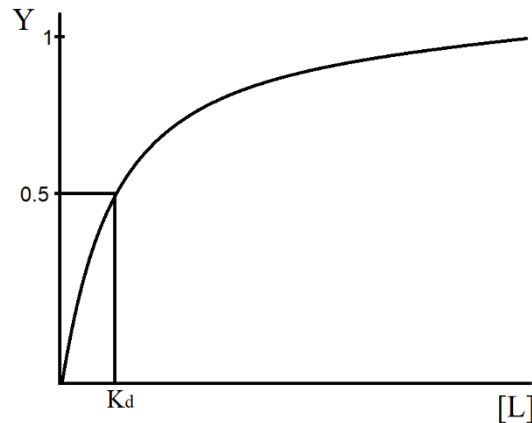
$$3(K_{0.5} + [L]) = 4[L] \Rightarrow [L] = 3K_{0.5}$$

y finalmente

$$\frac{[L]}{K_{0.5}} = 3$$

2) Considere un receptor hiperbólico con un sitio de unión para el ligando. En un experimento de unión receptor-ligando, se constata que el 50% de los sitios del receptor se encuentran ocupados cuando la concentración de ligando libre (L) es 1 mM . Indique qué valor adoptará la fracción de saturación de dicho receptor cuando se triplica la concentración de L .

Resolución:



$$Y = \frac{[L]^q}{K_d + [L]^q} = \frac{1}{2} \quad \text{à} \quad K_d = [L]^q ; q = 1$$

Entonces:

$$K_d = 10^{-3} M$$

Por lo tanto, cuando se triplica la $[L]$, tendremos que:

$$Y = \frac{3 \cdot 10^{-3}}{10^{-3} + 3 \cdot 10^{-3}} = 0.75$$

- 3) Supongamos que tenemos un receptor simple con tres sitios de unión y constante de disociación $K_d = 1 \text{ mM}$, ¿cuál sería el número de sitios ocupados por molécula de receptor (r) para una saturación del 50%.

Resolución: Como sabemos, para un receptor simple, la función r en función de la concentración de ligando tiene la forma

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

Tenemos como información que $K_d = 1 \text{ mM}$ y nos pregunta cuál es el valor de r cuando la saturación es del 50%.

Ahora, siendo un receptor simple, sabemos que la saturación, Y , es igual a $Y = \frac{[L]}{K_d + [L]}$, de donde rápidamente se deduce que la concentración de ligando debe ser igual a K_d para que la saturación sea $\frac{1}{2}$.

Entonces, conociendo la concentración de ligando (1 mM) y el número de sitios (3), solo debe sustituirse en la ecuación de r , llegando a que:

$$r = \frac{n[L]}{K_d + [L]} = \frac{3 \times 1 \text{ mM}}{1 \text{ mM} + 1 \text{ mM}} = 3/2$$

- 4) Si tenemos un receptor simple con dos sitios de unión y constante de disociación $K_d = 10 \text{ mM}$, ¿cuál sería la concentración de ligando para que la saturación sea del 90%?

Resolución: Partiendo de la ecuación:

$$Y = \frac{[L]}{K_d + [L]} = 0.9$$

Rápidamente se puede despejar la concentración de ligando correspondiente para alcanzar un cierto nivel de saturación, conociendo la constante de disociación.

Entonces:

$$\begin{aligned} [L] &= 0.9K_d + 0.9[L] \\ [L] - 0.9[L] &= 0.9K_d \Rightarrow 0.1[L] = 0.9K_d \\ [L] &= 9K_d \Rightarrow [L] = 90 \text{ mM} \end{aligned}$$

- 5) Muestre que para un receptor hiperbólico:

$$Y = \frac{s}{K + s}$$

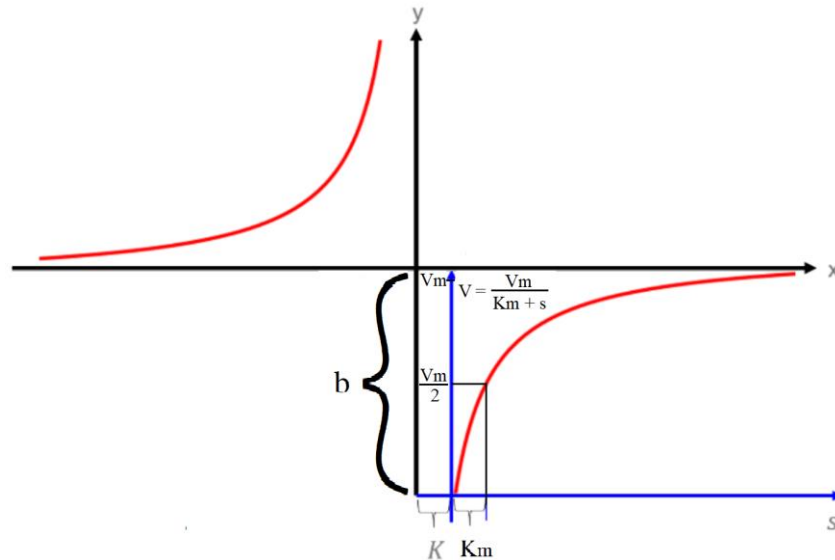
Donde Y : función de saturación; s : concentración de ligando sustrato; K : constante de disociación), la curva de saturación puede obtenerse del cuadrante inferior derecho de la hipérbola equilátera:

$$y = -\frac{A}{x}; y, x \in \mathbb{R}$$

Indique cuáles son los cambios de coordenadas necesarios para obtener la ecuación de saturación del receptor a partir de dicha hipérbola equilátera.

Resolución:

Comenzaremos dibujando el gráfico de la hipérbola equilátera y vs. x . A continuación, superponemos el gráfico anterior con el gráfico de velocidad de reacción (V) vs. concentración de sustrato (s), desfasando este último una distancia $K = K_m$ en la dirección horizontal. Como se puede observar, la curva del cuadrante inferior derecho de la hipérbola equilátera, describe la hipérbola rectangular de Michaelis-Menten de la cinética enzimática así como la función de saturación de un receptor monomérico:



Ahora, realizaremos los siguientes cambios de variable, a efectos de alinear el eje “x” con el eje “s”, y el eje “y” con el eje “V”:

$$x = K + s$$

$$y = V - b$$

De esta manera, la ecuación de la hipérbola equilátera de más arriba, queda escrita como:

$$(K + s) (V - b) = (K + s) (V - V_m) = -A$$

Observemos que si $s = 0$, $V = 0$. Por lo tanto $(K) (-V_m) = -A$. De esta forma, podemos escribir:

$$(K + s) (V - V_m) = -K \cdot V_m$$

A partir de lo anterior, podemos entonces despejar V:

$$V = -\frac{KV_m}{K + s} + V_m = \frac{-KV_m + V_m(K + s)}{K + s} = \frac{\cancel{-KV_m} + \cancel{KV_m} + V_m \cdot s}{K + s}$$

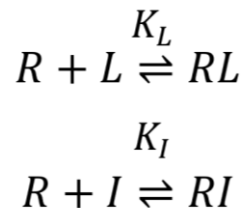
$$\Rightarrow \boxed{V = \frac{V_m \cdot s}{K + s}}$$

Para el caso del receptor monomérico, consideraremos que $V = Y$ y $V_m = 1$, con lo cual:

$$Y = \frac{s}{K + s}$$

- 6) Considere un receptor hiperbólico R que se une a un ligando L . Este receptor es capaz a su vez de unirse a un segundo ligando I , de forma también hiperbólica, en el mismo sitio de unión de L , por lo que no puede estar unido a ambos a la vez. Llamaremos K_L a constante de asociación entre R y L y K_I a la constante de asociación entre R e I . K_L y K_I no son necesariamente iguales.
- Determine la expresión de la fracción de saturación del receptor por unión a L , en función de las concentraciones de L e I .
 - ¿Es posible establecer una constante de disociación “aparente” entre R y L que contemple la presencia de I ? Hágalo.
 - En presencia de una cantidad constante de I , ¿cambia la hiperbolicidad de la relación entre Y y L ?
 - Bosqueje Y vs L para distintos valores de I .

Resolución: El sistema puede representarse de la siguiente forma:



A partir de esta representación podemos escribir la fracción de saturación como sigue:

$$Y_L = \frac{[RL]}{[R] + [RL] + [RI]}$$

Tomando las relaciones entre las concentraciones en equilibrio de las especies químicas y las constantes de asociación:

$$K_L = \frac{[RL]}{[R][L]}; K_I = \frac{[RI]}{[R][I]}$$

Podemos reescribir Y_L de la siguiente manera:

$$Y_L = \frac{[RL]}{[R] + [RL] + [RI]} = \frac{K_L[R][L]}{[R] + K_L[R][L] + K_I[R][I]} = \frac{K_L[L]}{1 + K_L[L] + K_I[I]}$$

Operaremos sobre los términos del denominador que son independientes de la concentración de L , y multiplicaremos numerador y denominador por el inverso de K_L :

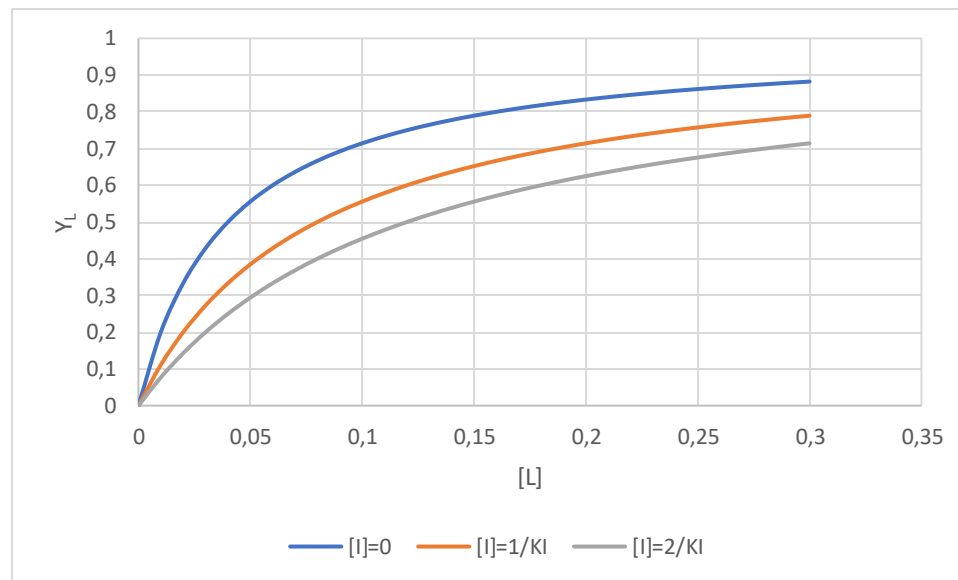
$$Y_L = \frac{[L]}{(1 + K_I[I])\frac{1}{K_L} + [L]}$$

Podemos definir $K_{D \text{ aparente}} = (1 + K_I[I])\frac{1}{K_L}$, una constante de disociación observable experimentalmente, para distintos valores de concentración de I .

La incorporación del ligando I genera cambios en la constante de asociación observada, pero no cambia la cooperatividad observada para la unión entre R y L , esto lo podemos ver fácilmente introduciendo la expresión de $K_{D \text{ aparente}}$ aparente en la fracción de saturación por L :

$$Y_L = \frac{[L]}{K_{D \text{ aparente}} + [L]}$$

Aquí se puede ver fácilmente que la relación entre Y_L y $[L]$ sigue siendo hiperbólica.



Compruebe que cuando $[I] = 0$, $K_{D \text{ aparente}} = K_D \text{ real}$; cuando $[I] = 1/KI$, $K_{D \text{ aparente}} = 2K_D \text{ real}$; y cuando $[I] = 2/KI$, $K_{D \text{ aparente}} = 3K_D \text{ real}$.

Nota: Todo este desarrollo corresponde al estudio del efecto de un inhibidor competitivo a la unión no cooperativa de un receptor y un ligando. Otras formas de inhibición pueden ser estudiadas de forma similar.

- 7) Estudiando la forma en la que un cierto receptor se une a un ligando, se obtienen valores de fracción de saturación en función de concentración de ligando. Cuando

se grafica Y vs Y/L^2 se obtiene una recta de pendiente negativa, que corta el eje Oy en 1. ¿Se comporta este receptor de forma hiperbólica o cooperativa?

Resolución: Con la información brindada por la letra del ejercicio, podemos plantear la siguiente relación entre Y e Y/L^2 :

$$Y = 1 - a \frac{Y}{L^2}$$

Donde "a" es un parámetro positivo dado por el opuesto de la pendiente de la recta obtenida.

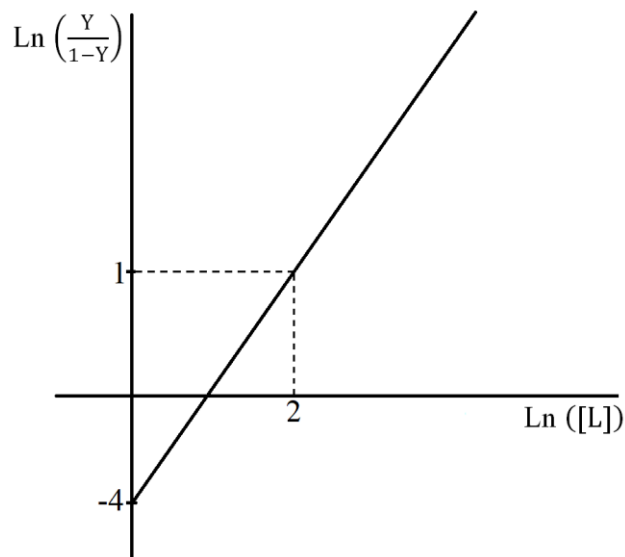
A partir de esto necesitamos obtener una expresión de Y vs L . Existen varias formas de hacerlo. Una forma sencilla de hacerlo es:

$$Y = 1 - a \frac{Y}{L^2} = \frac{L^2 - aY}{L^2} \Rightarrow YL^2 = L^2 - aY \Rightarrow YL^2 + aY = L^2 \Rightarrow Y(L^2 + a) = L^2$$

$$Y = \frac{L^2}{a + L^2}$$

En esta expresión "a" es la constante de disociación, y los términos de orden dos en L indican que estos datos se ajustan bien al modelo de Hill, con cooperatividad positiva, debido a que el número de Hill es mayor que 1.

- 8) Al analizar los datos de unión de un ligando a una molécula de receptor se obtuvo el siguiente gráfico:

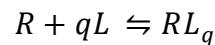


a) Obtenga una ecuación que relacione la fracción de saturación $Y = \frac{\text{sitios ocupados}}{\text{sitios totales}}$ con la concentración de ligando libre (L) en la que figuren los valores numéricos de los parámetros relevantes.

b) Proponga un esquema de unión que explique los datos derivados del gráfico, y explique el significado de la pendiente del mismo en el contexto del modelo propuesto.

Resolución:

a)



$$\left\{ \begin{array}{l} K_a = \frac{[RL_q]}{[R][L]^q} \quad (1) \\ Y = \frac{[RL_q]}{[RL_q] + [R]} \quad (2) \end{array} \right.$$

De la ecuación (1) podemos despejar $[RL_q] = K_a[R][L]^q$. Sustituyendo esto en la ecuación (2) obtenemos:

$$Y = \frac{K_a[R][L]^q}{K_a[R][L]^q + [R]} = \frac{K_a \cancel{[R]} [L]^q}{\cancel{[R]}(K_a[L]^q + 1)} = \frac{K_a[L]^q}{K_a[L]^q + 1} \quad (3)$$

Por su parte, como $K_a = 1/K_d$, sustituyendo en la ecuación (3) tenemos que:

$$Y = \frac{1/K_d[L]^q}{1/K_d[L]^q + 1} = \frac{[L]^q}{K_d + [L]^q} \quad (4)$$

Ahora, invirtiendo la ecuación (4) obtenemos lo siguiente:

$$\frac{1}{Y} = \frac{K_d + [L]^q}{[L]^q} = \frac{K_d}{[L]^q} + 1 \quad \rightarrow \quad \frac{1-Y}{Y} = \frac{K_d}{[L]^q}$$

Invirtiendo nuevamente lo anterior:

$$\frac{Y}{1-Y} = \frac{[L]^q}{K_d} \quad (5)$$

Aplicando Ln a ambos lados de la ecuación (5), obtenemos que:

$$\ln\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = \ln\left(\frac{[L]^q}{K_d}\right) = q\ln[L] - \ln(K_d) \quad (6)$$

La ecuación 6 (ecuación de Hill) claramente describe la recta del gráfico de más arriba. A partir de dicha ecuación, puede deducirse que la pendiente del gráfico corresponderá al parámetro q (o número de Hill "h"), mientras que el valor de la ordenada en el origen es $-\ln(K_d)$. De esta forma, a partir de los valores que se muestran en el gráfico, podemos escribir la ecuación (6) (la cual relaciona Y con $[L]$) con los valores de los parámetros de interés:

$$\ln\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = \frac{1}{2}\ln[L] - 4$$

b) Un posible esquema de unión que explica los datos del gráfico, es uno según el cual la unión del receptor al ligando presenta cooperatividad negativa. Es decir, que a medida que el receptor se satura, la afinidad de los sitios del receptor para la unión del ligando va disminuyendo. En este contexto, dado que el gráfico de la figura corresponde al gráfico de Hill, la pendiente del mismo (número de Hill, "h") sirve como indicador de cooperatividad. Así, el hecho de que $h < 1$ ($h = 1/2$), es un indicador que apoya el comportamiento de cooperatividad negativa del esquema de unión propuesto

- 9) Se estudia una interacción receptor-ligando que se sabe sigue el modelo de Adair para un dímero simétrico. Por estudios anteriores, sabemos que los valores de las constantes cinéticas **microscópicas** son $k_1 = 0.5 M^{-1}$ y $k_2 = 1.5 M^{-1}$. Sabiendo estos datos, ¿para qué valor de concentración de ligando libre ($[L]$) se espera que $Y = 0.5$?

Resolución: Un dímero simétrico, según el modelo de Adair, sigue la fórmula:

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

sustituyendo los valores de k_1 , k_2 e Y :

$$\frac{1}{2} = \frac{1 M^{-1}[L] + 1.5 M^{-2} [L]^2}{2(1 + 1 M^{-1}[L] + 0.75 M^{-2}[L]^2)}$$

de donde obtenemos que:

$$0.75 M^{-2}[L]^2 = 1$$

con lo que:

$$[L] = \sqrt{\frac{1}{0.75}} M^2 = 1.154 M$$

- 10) Dada la definición del número de Hill, probar que $h_{ext} = 1$ si el receptor es simple.

Nota: Es útil utilizar la siguiente propiedad: $\frac{df(x)}{d \ln x} = x \frac{df(x)}{dx}$

Resolución: Por definición, el número de Hill se corresponde con la pendiente del gráfico de Hill, en otras palabras:

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

Entonces, se debe aplicar la definición de número de Hill a la función de saturación del receptor simple

$$Y = \frac{[L]}{K_d + [L]} \quad (2)$$

Primero, notar que se puede reescribir $h(L) = [L] \frac{d \left[\ln \left(\frac{Y}{1-Y} \right) \right]}{d[L]}$ (3) según la propiedad sugerida.

Como siguiente paso, debemos calcular la expresión $\frac{Y}{1-Y}$ sustituyendo Y por la ecuación (2)

$$\begin{aligned} \frac{Y}{1-Y} &= \frac{\frac{[L]}{K_d + [L]}}{1 - \left(\frac{[L]}{K_d + [L]} \right)} \\ &= \frac{\frac{[L]}{K_d + [L]}}{\frac{K_d + [L]}{K_d + [L]} - \left(\frac{[L]}{K_d + [L]} \right)} = \frac{[L]/(K_d + [L])}{(K_d + [L] - [L])/(K_d + [L])} \end{aligned}$$

$$\frac{Y}{1-Y} = \frac{[L]}{K_d} \quad (3)$$

Ahora, si volvemos a la ecuación 3 con este resultado, tenemos que;

$$\begin{aligned} [L] \frac{d \left[\ln \left(\frac{Y}{1-Y} \right) \right]}{d[L]} &= [L] \frac{d \ln \left(\frac{[L]}{K_d} \right)}{d[L]} \\ [L] \frac{d \ln \left(\frac{[L]}{K_d} \right)}{d[L]} &= [L] \cdot [\ln[L] - \ln K_d]' = [L] \frac{1}{[L]} = 1 \end{aligned}$$

$\Rightarrow h(L) = 1$ para cualquier concentración de ligando, en particular $h_{ext} = 1$