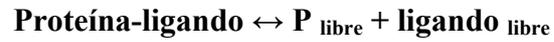


Unión de ligandos

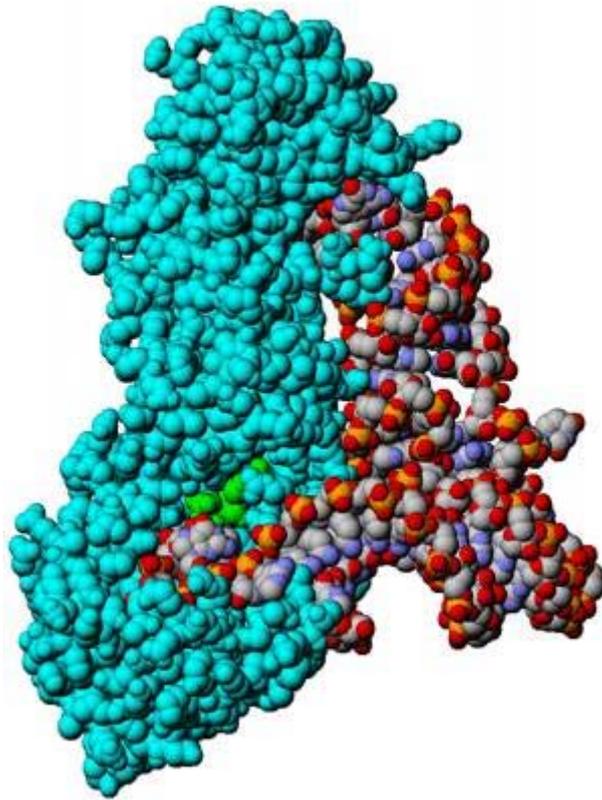
Un ligando es cualquier molécula que se una específicamente a una proteína

Características de los ligandos:

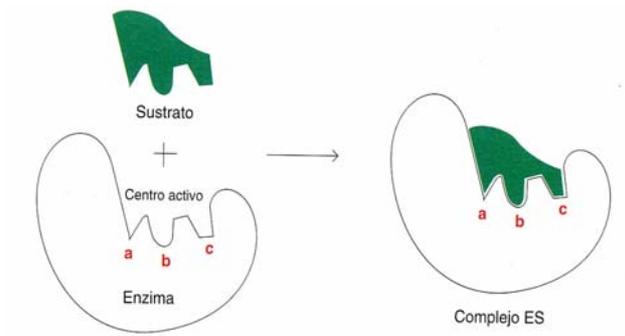
- Tamaño y naturaleza química variable
- El sitio de unión es específico
- La unión es reversible –Interacciones débiles- se alcanza el equilibrio entre:



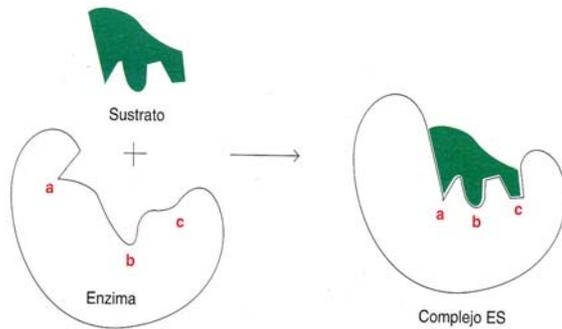
Ejemplo: de reconocimiento específico: Glutamin-tARN sintetasa de E. coli



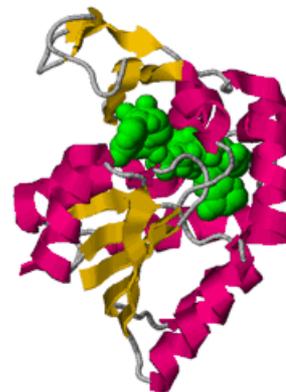
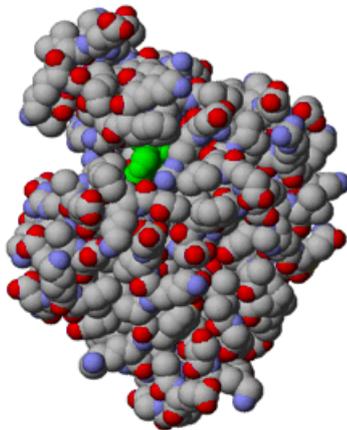
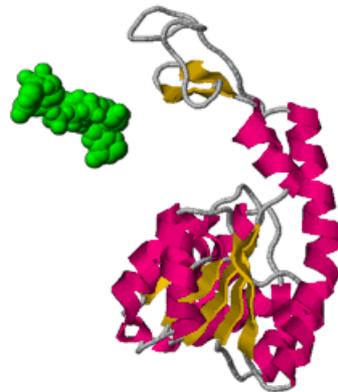
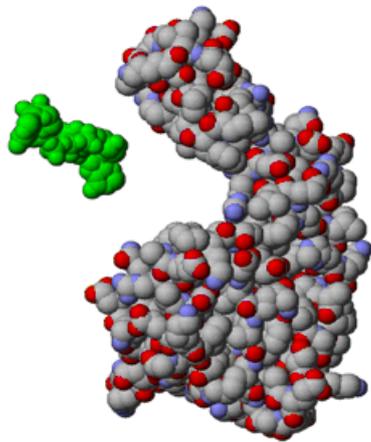
Especificidad de la unión proteína-ligando: modelos



Emil Fischer propuso a finales del siglo XIX que la unión es del tipo "llave y cerradura", es decir, que las formas del sitio de unión y del ligando son estrictamente complementarias.



En 1958 Daniel Koshland refinó este concepto, proponiendo que en la fase inicial de la unión la complementariedad es relativamente pobre, pero que tras esa unión inicial la proteína sufre un cambio conformacional que "ajusta" la forma del sitio de unión a la del ligando. Es la hipótesis del "ajuste inducido".



Ejemplo: Adenilato kinasa de E. coli

¿y después?

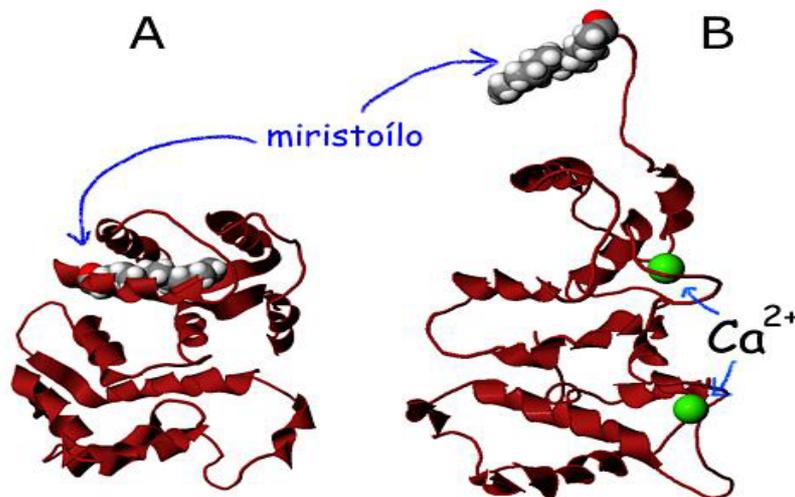
- 1) El ligando no se modifica. Ejemplo transporte
- 2) El ligando es modificado químicamente. Ejemplo enzimas
- 3) La proteína sufre un cambio conformacional.

Consecuencias de los cambios conformacionales

- a) Modificación de la afinidad de otro sitio de unión de ligandos: **Alosterismo** → **cooperatividad**
- b) Modificación de la conformación del sitio catalítico de una enzima: activación o inhibición alostérica.

Importancia de los cambios conformacionales inducidos:

- Control de los procesos de control metabólico
- regulación de la expresión génica
- Control hormonal



Cambio conformacional en la proteína recoverina inducido por la unión de calcio.

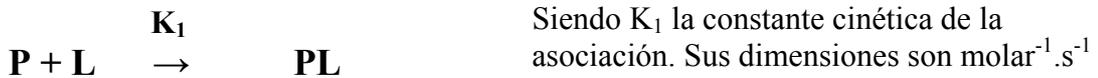
El equilibrio químico aplicado a la interacción macromolécula - ligando

Dependencia de la concentración de ligando

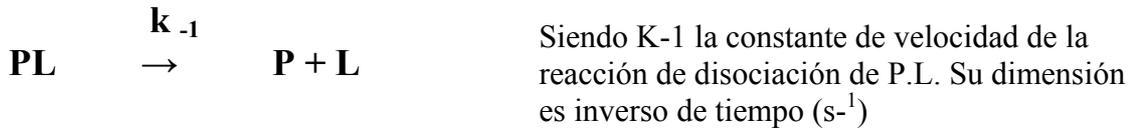
El estudio cuantitativo de la dependencia de la formación del complejo proteína-ligando respecto de la concentración de reactantes se desarrollará para el caso particular en el que se cumplen las siguientes condiciones:

- a) **La concentración de ligando es superior a la concentración de proteína.** O, lo que es lo mismo, la concentración de ligando unido a la proteína es despreciable frente a la concentración total del ligando
- b) **La proteína tiene un único sitio de unión para el ligando.**

La formación del complejo entre una proteína P y un ligando L se puede representar por la siguiente ecuación:



Dado que la formación del complejo PL es un proceso reversible, este complejo se disociará según:



Si en el medio se encuentran inicialmente P y L libres, al cabo de un tiempo se habrá establecido un equilibrio entre la proteína y el ligando libres y el complejo proteína ligando. Si consideramos la disociación del complejo, el equilibrio se ajustará a:



K_d es la denominada Constante de Disociación, y corresponde a la constante de equilibrio de la disociación del complejo P.L. No confundir con K_{-1} , que es la constante de velocidad para la reacción de disociación. K_d tiene unidades de concentración

$$[P]_{\text{total}} = [PL] + [P]_{\text{libre}} ; \qquad [P]_{\text{libre}} = [P]_{\text{total}} - [PL]$$

$$K_d = \frac{[P]_{\text{libre}} [L]}{[PL]}; \quad K_d [PL] = ([P]_{\text{total}} - [PL]) [L]; \quad K_d [PL] = [P]_{\text{total}} [L] - [PL] [L]$$

$$K_d [PL] + [PL] [L] = [P]_{\text{total}} [L]; \quad [PL] (K_d + [L]) = [P]_{\text{total}} [L]$$

$$[PL] = \frac{[P]_{\text{total}} [L]}{K_d + [L]}$$

Se puede deducir fácilmente esta ecuación. Considere que en el equilibrio las velocidades de formación y de disociación del complejo PL son iguales, y que la concentración de proteína libre es igual a la concentración total de proteína menos la concentración del complejo PL

En muchas ocasiones lo que interesa conocer es la proporción de moléculas de proteína que tienen unido el ligando, en vez de su concentración absoluta. Para ello definimos la fracción de saturación Y:

$$Y = \frac{\text{nº de sitios ocupados}}{\text{nº total de sitios}} = \frac{[PL]}{[P]_{\text{total}}}$$

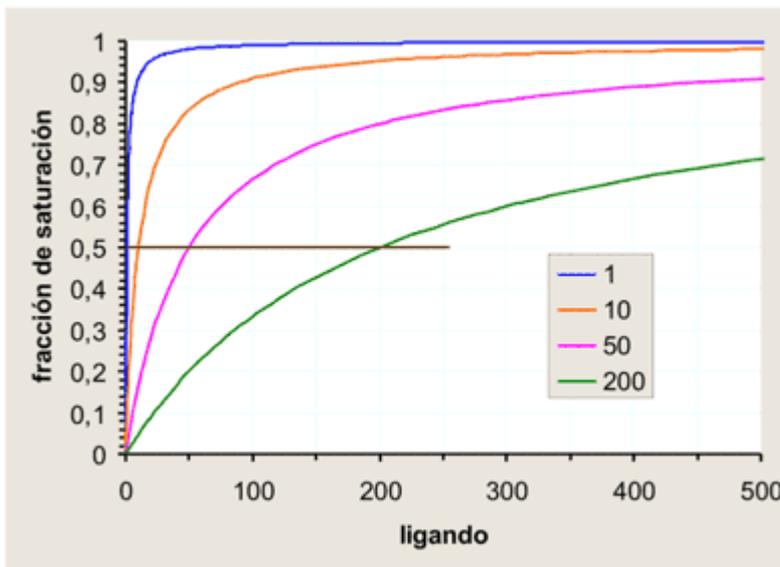
Evidentemente, Y varía entre 0 (ninguna molécula de proteína tiene ligando unido) a 1 (todas las moléculas de proteína están unidas al ligando). En el caso de que la proteína tenga más de un sitio de unión para el ligando la fracción de saturación se definiría de igual manera, pero ahora habría que multiplicar $[P]_{\text{total}}$ por el número de sitios totales por molécula de proteína, y la $[P.L]$ por el número medio de sitios ocupados en el complejo.

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

Esta ecuación corresponde a una hipérbola equilátera; la rama horizontal tiende asintóticamente al valor 1 de la fracción de saturación; desde un punto de vista estrictamente matemático, nunca se alcanza la saturación total. Un aspecto importante es que el valor numérico de K_d corresponde a la concentración de ligando que hace que la fracción de saturación valga exactamente 0,5.

El valor de K_d , para una proteína y ligando concretos, depende críticamente de las condiciones experimentales: pH, fuerza iónica, temperatura o presencia de otros solutos en el medio. Esto es lógico si recordamos que todos los factores anteriormente señalados influyen sobre la estructura tridimensional de las proteínas, y que el sitio de unión es una zona concreta con una estructura definida dentro de la molécula de proteína.

Curvas de saturación de cuatro ligandos cuyas K_d para una proteína hipotética tienen los valores de 1, 10, 50 y 200 unidades de concentración



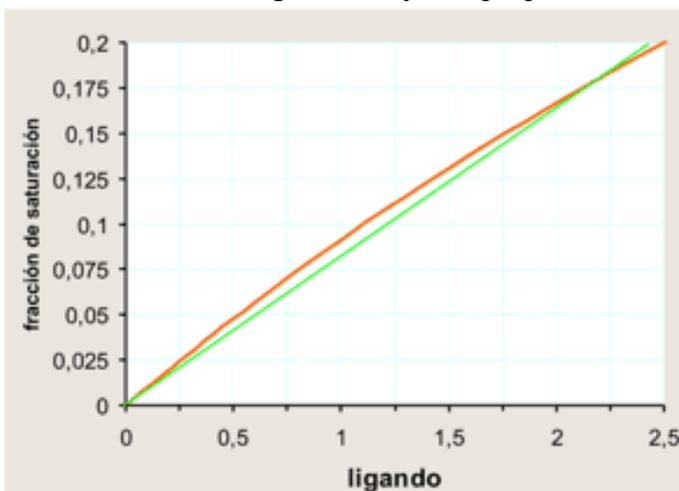
En los cuatro casos, cuando la concentración del ligando iguala al valor de K_d , la fracción de saturación vale 0,5.

Note que la diferente forma de las curvas es un efecto de escala; las cuatro curvas son similares.

Antes del empleo común de ordenadores y de los programas de ajuste de datos a funciones no lineales la determinación de K_d debía hacerse previa linearización de la ecuación de saturación. Existen varias posibilidades, pero una de las más empleadas ha sido la denominada representación de Scatchard.

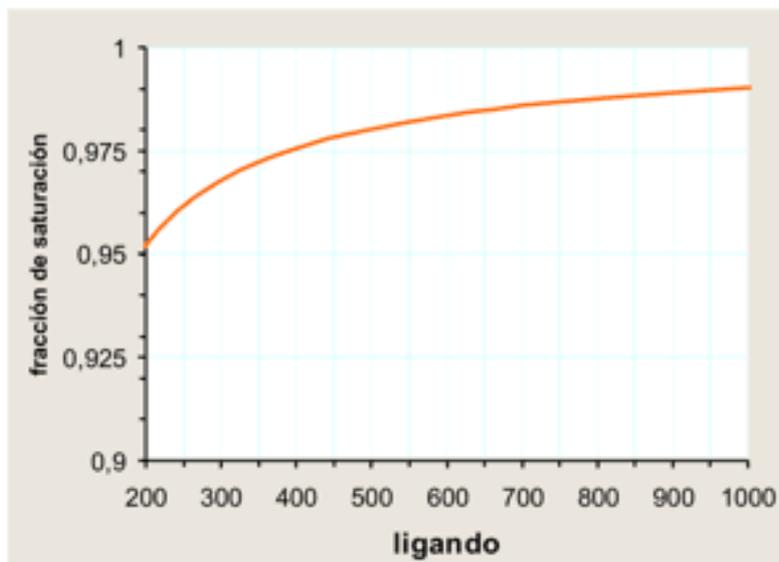
Cuanto menor sea K_d menor es la concentración de ligando necesaria para saturar la proteína, y mayor es la afinidad de la proteína hacia el ligando. Podemos definir la afinidad de una enzima hacia un ligando como un parámetro semicuantitativo relacionado con la inversa de la constante de disociación. Semicuantitativo porque se dice "mucho" o "poca afinidad", o "la afinidad de la proteína A hacia L es mayor que la de B". Esta última afirmación es análoga a decir que la K_d del complejo A.L es menor que la K_d del complejo B.L.

El hecho de que la curva de saturación sea hiperbólica tiene algunas consecuencias interesantes. En primer lugar, si la concentración de ligando es inferior a la K_d , la saturación depende casi linealmente de la concentración de ligando. Hay una proporcionalidad casi perfecta entre ambas:



En el ejemplo se supone que la K_d vale 10 unidades. En rojo, la curva de saturación calculada. En verde, ajuste lineal.

Por el contrario, a concentraciones de ligando superiores a 10 veces K_d la fracción de saturación resulta prácticamente independiente de la concentración del ligando:



K_d , 10 unidades. Note ambas escalas; un cambio de concentración de 200 a 1000 unidades se traduce en un incremento de la saturación mínimo, de 0,95 a 0,98.

Cuando la proteína está saturada por encima del 50%, para incrementar la saturación de la proteína en un factor pequeño es preciso aumentar mucho la concentración del ligando. Este comportamiento es antiintuitivo: tendemos a pensar que al duplicar la cantidad total de ligando se aumenta en la misma medida la cantidad del ligando unido, pero no es así

Significado de las constantes cinéticas

Aunque la formación del complejo P.L. se define habitualmente empleando el valor de K_d , merece la pena comentar brevemente el significado físico y los límites de variación de las constantes individuales K_1 y K_{-1} .

A) K_1 es la constante de velocidad de segundo orden para la unión de la proteína al ligando:

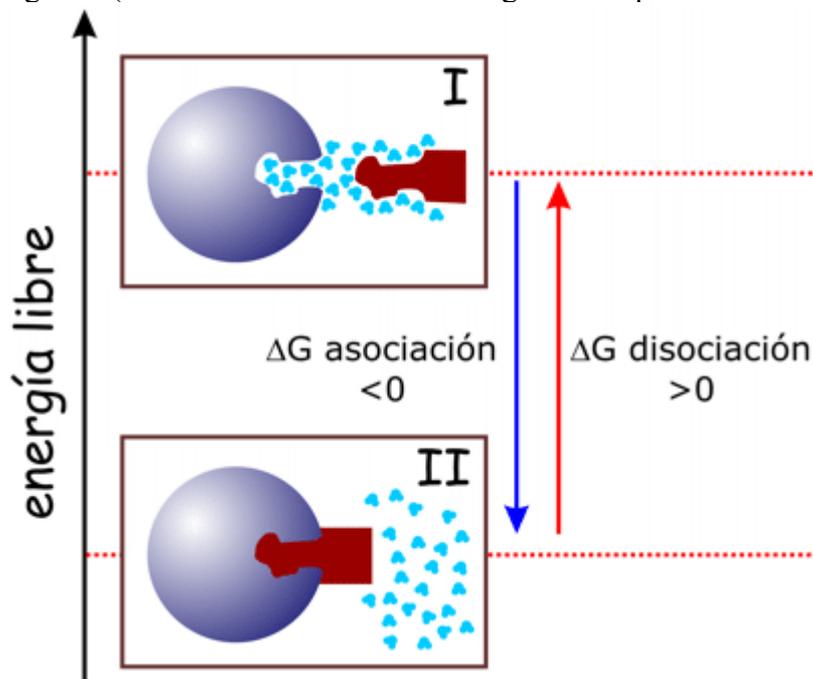
Esta constante no puede superar un valor máximo, que viene dado por la velocidad a la que se pueden encontrar ambas moléculas cuando se desplazan al azar en disolución, y que depende de sus respectivos Coeficientes de Difusión. En un medio líquido homogéneo, este valor máximo se encuentra en el rango 10^8 a $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. En la mayor parte de los casos los valores de K_1 van a ser inferiores a este máximo, ya que no todos los choques posibles entre dos moléculas van a ocurrir con la orientación adecuada para que se forme el complejo. De hecho, en la mayor parte de los casos los valores de K_1 se encuentran en el rango $10^5 - 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Por otra parte, cualquier factor que disminuya el valor de los coeficientes de difusión (aumento de la viscosidad del medio, aumento del tamaño -por agregación, por ejemplo- de los reactantes), va a traducirse en una disminución del valor de esta constante de velocidad. Como ejemplo, el valor de K_1 para la asociación proteína-proteína entre la elastasa y la α_1 -antitripsina se ha estimado en $6,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

B) K_{-1} es la constante de velocidad de primer orden para la separación del complejo P.L.

En este caso, y como ocurre para cualquier proceso cinético de primer orden, hay una relación sencilla entre la vida media del complejo y el valor de K_{-1} . NO se debe confundir con el periodo de semidisociación (análogo al periodo de semidesintegración, o semiperiodo, en la desintegración radiactiva).

Relación entre Kd y la variación de energía libre en la asociación

Es importante considerar la variación de la energía libre que se produce en la formación del complejo proteína ligando. Para empezar, veamos cuales son las situaciones inicial y final en el sistema proteína y ligando (sin olvidar las moléculas de agua en la que se encuentran ambos disueltos):



El sistema puede estar en dos estados. I: la proteína y el ligando separados, e interaccionando con moléculas de agua, y II, el complejo proteína ligando formado; las moléculas de agua que antes estaban unidas a la proteína y al ligando ahora se encuentran formando parte del conjunto de disolvente.

La asociación es exergónica, y por consiguiente la disociación es endergónica; -si fuese al revés el complejo no se formaría-. El valor absoluto de la variación de energía libre será el mismo en ambos casos, pero el signo de la misma será opuesto. Es muy importante tener en cuenta que la variación de energía libre depende, no solo de los enlaces -iónicos, de hidrógeno, de van der Waals- que se formen entre la proteína y el ligando, sino también de las interacciones con y entre las moléculas de agua. Lo que resulta significativo es la variación global de la energía libre en el conjunto del sistema proteína-ligando-disolvente.

La variación de la energía libre en condiciones estándar (concentración 1 M de reactantes, pH 7,0, 25° C) está relacionada con la constante de equilibrio de la reacción por la expresión:

$$\Delta G^{\circ'} = - RT \ln K_{eq}$$

Siendo R la constante de los gases y T la temperatura absoluta

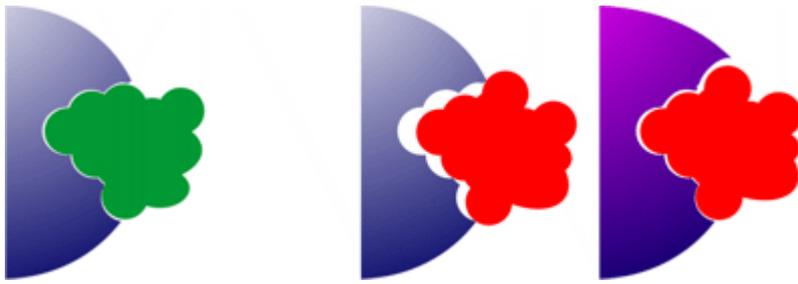
En nuestro caso, si queremos saber la energía que se libera cuando se asocian la proteína y el ligando, suponiendo que el sistema se encuentra en equilibrio, y teniendo en cuenta que vamos a emplear habitualmente Kd, que es la constante de equilibrio de disociación, se cumple que:

$$\Delta G^{\circ'} = - R.T.\ln K_{asociación} = + R.T.\ln K_d$$

Como era de esperar, cuanto menor sea Kd mas exergónica será la formación del complejo P.L; más favorecida está la asociación y mas desfavorecida está la disociación del complejo. Es fácil calcular el valor de $\Delta G^{\circ'}$ que corresponde a un valor de Kd; algunos ejemplos se muestran en la siguiente tabla (la temperatura se ha supuesto 25° C o 298,15° K):

ΔG		
(kJ/mol)	K_d (M)	
-2,5	0,365	← Fuerza de dispersión entre dos átomos
-5	0,133	
-10	0,018	
-15	0,002	
rango habitual para la unión de enzimas a sus sustratos		
-20	$3,12 \cdot 10^{-4}$	← Enlace de hidrógeno (fuerte)
-25	$4,15 \cdot 10^{-5}$	
-30	$5,51 \cdot 10^{-6}$	
rango de las uniones hormona-receptor		
-35	$7,33 \cdot 10^{-7}$	← adrenalina-receptor α -adrenérgico
-40	$9,74 \cdot 10^{-8}$	
-45	$1,30 \cdot 10^{-8}$	
-50	$1,72 \cdot 10^{-9}$	
-55	$2,29 \cdot 10^{-10}$	← FSH-receptor
-60	$3,04 \cdot 10^{-11}$	← progesterona-receptor
menor K_d conocida	- 85	$1,30 \cdot 10^{-15}$ ← avidina-biotina

Es interesante ver que un cambio pequeño en la variación de energía libre estándar corresponde a un cambio muy notable en el valor de K_d . Y además, con valores relativamente bajos de ΔG° se encuentran valores de K_d significativos desde el punto de vista funcional. Por ejemplo, sea un complejo cuya formación ocurre con una variación de energía libre neta de -15 kJ/mol, equivalente a la resultante de unos 7-10 átomos unidos por fuerzas de dispersión de London; esto es suficiente para que K_d alcance el valor típico de muchas interacciones entre enzimas y sus sustratos. En este punto hay que recordar que la energía de estas interacciones depende críticamente de la distancia [Tema 3: interacciones no covalentes] y son importantes exclusivamente a distancias interatómicas extremadamente pequeñas. Así, una complementariedad perfecta entre las formas del sitio de unión y del ligando, que permita el contacto directo de muchos átomos y por consiguiente el establecimiento de un número elevado de enlaces débiles, dará lugar a valores de K_d bajos. Cualquier alteración en la forma del ligando, que no permita ese ajuste perfecto, se traducirá en un aumento importante del valor de K_d . Otro tanto cabe decir de los puentes de hidrógeno, que requieren una orientación precisa para ser energéticamente significativos.



Un cambio pequeño en una zona concreta del ligando puede impedir el ajuste en el conjunto del sitio de unión, u obligar a un cambio conformacional, energéticamente costoso, en la molécula de proteína.

El valor más bajo de K_d (y, por tanto la afinidad más elevada) que se ha encontrado para un par proteína-ligando es el correspondiente a la unión de la vitamina biotina por la avidina, una proteína de la clara de huevo. No hay una razón biológica clara para esa excepcional afinidad, resultante de una también excepcional complementariedad entre el sitio de unión de la avidina y la biotina. Tal vez el secuestro de la biotina en la clara del huevo tenga un efecto inhibitor del crecimiento de bacterias que pudiesen estar presentes. Sin llegar a este extremo, los valores de K_d para las interacciones hormona-receptor son también muy bajos. En este caso sí hay una razón clara: cuanto menor sea K_d , menos cantidad de hormona habrá que liberar a la circulación que se forme un número adecuado de complejos hormona-receptor. (Ver también la página anterior)

Es importante entender que en esta página y las anteriores hemos estudiado K_d , definida como la constante de disociación del complejo P.L, desde tres puntos de vista diferentes y complementarios:

- 1) Como una medida de la concentración de ligando necesaria para saturar la proteína.
- 2) Como un parámetro relacionado inversamente con el tiempo que se mantiene formado el complejo P.L.
- 3) Como un parámetro relacionado inversamente con la energía que se libera cuando se forma el complejo.

Cada uno de estos enfoques nos suministra un tipo de información diferente sobre la unión del ligando a la proteína.

K_d y duración del complejo PL

Dado que K_d, K₋₁ y K₁ están relacionadas, se puede calcular la vida media de existencia de un complejo P.L. si conocemos K_d y la constante de asociación K₁.

$$\text{Vida media} = \frac{1}{k_{-1}}$$

Tiempo promedio de existencia de un complejo PL

$$k_d = \frac{k_{-1}}{k_1}; \quad k_{-1} = k_d k_1; \quad \text{vida media} = \frac{1}{k_d + k_{-1}}$$

ΔG° (Kj/mol)	k _d (M)	k ₁ = 1x10 ⁶ (M ⁻¹ s ⁻¹)		k ₁ = 1x10 ⁸ (M ⁻¹ s ⁻¹)	
		k ₋₁ (s ⁻¹)	1/k ₋₁ (s)	k ₋₁ (s ⁻¹)	1/k ₋₁ (s)
-1	0.67	6.7x10 ⁵	0.0000015	6.7x10 ⁷	0.000000015
-20	3.12x10 ⁻⁴	3.1x10 ²	0.0032	3.1x10 ⁴	0.000032
			2136.7		2150
DNApol III		k _{cat} = 850 N/seg	1/k _{cat} = 0.0012 s		

K _d (M)	K ₁ (M ⁻¹ · s ⁻¹)	
	1.10 ⁶	1.10 ⁸
1.10 ⁻³	0,001 s	0,00001 s
1.10 ⁻⁴	0,01 s	0,0001 s
1.10 ⁻⁶	1 s	0,01 s
1.10 ⁻⁸	1,7 min	1 s
1.10 ⁻⁹	16,7 min	10 s
1.10 ⁻¹⁰	2,78 h	100 s
1.10 ⁻¹¹	1,16 días	16,7 min
1.10 ⁻¹⁵	32,7 años	115 días

Cooperatividad: estudio cinético

Muchas **proteínas son oligoméricas**, y muchas de ellas poseen varios sitios de unión para un determinado ligando. Estos sitios pueden ser **independientes entre si** y los valores de **kd para la disociación del ligando de cada sitio pueden ser idénticos**. El resultado es el mismo que para las proteínas monoméricas que se han visto hasta ahora.

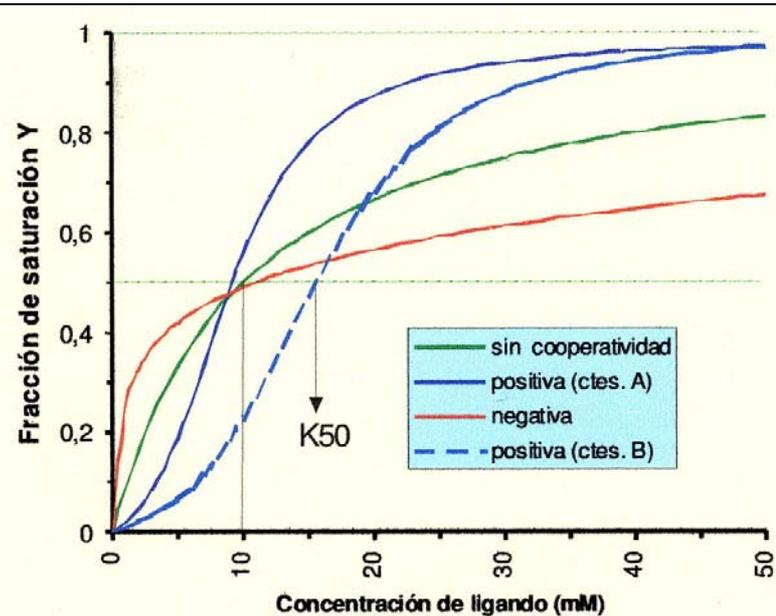
¿Pero que pasa si los valores de kd son distintos? (Cuando la kd deja de ser constante)

Cuando una proteína con varios sitios de unión para un ligando presenta valores de kd diferentes para cada sitio, osea, kd es variable en función del grado de saturación de la proteína

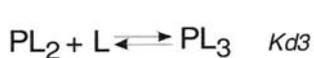


Cooperatividad homotrópica

La saturación de una proteína por un ligando, cuando no hay cooperatividad es hiperbólica (curva verde). Cuando los valores de kd son variables se originan curvas sigmoideas (hipérbolas no equiláteras). En estos casos no podemos hablar de kd, sino de un parámetro empírico, **k50**, que se define como la concentración de ligando que hace que Y valga 0.5



Equilibrios de asociación para una enzima con cuatro sitios de unión de ligandos



Sin cooperatividad: $Kd1 = Kd2 = Kd3 = Kd4 = 10 \text{ mM}$

Negativa: $Kd1 = 1; Kd2 = 5; Kd3 = 25; Kd4 = 50 \text{ (mM)}$

Positiva (A): $Kd1 = 50; Kd2 = 25; Kd3 = 5; Kd4 = 1 \text{ (mM)}$

Positiva (B): $Kd1 = 97; Kd2 = 43; Kd3 = 119; Kd4 = 0,09 \text{ (mM)}$

(estos últimos valores corresponden a los valores numéricos de las cuatro constantes de disociación del oxígeno de la hemoglobina con 3BPG y NaCl 0,1 M)

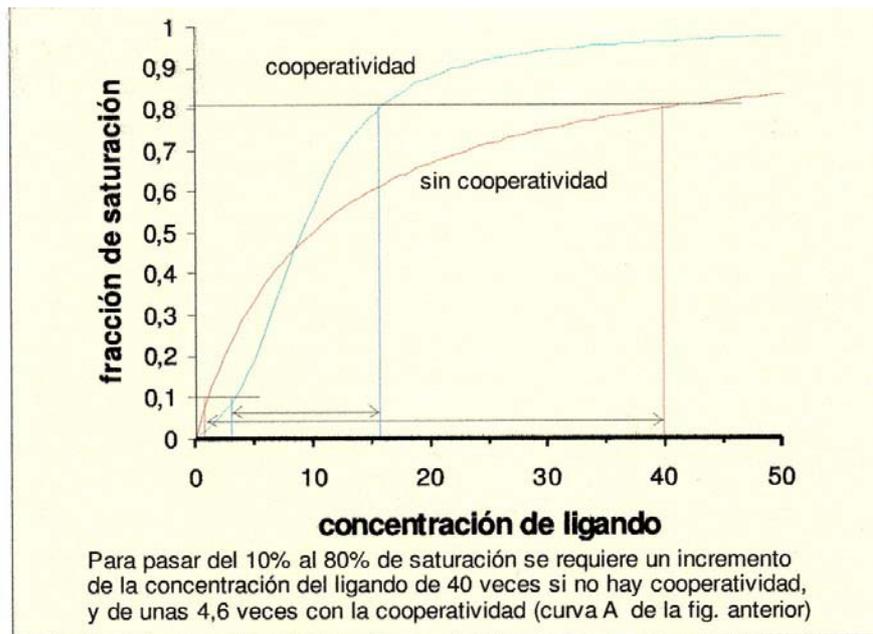
Valores de las constantes empleadas para calcular la gráfica

Ecuación de Adair

Es un modelo cinético simple que no hace ninguna suposición sobre las CAUSAS de la cooperatividad. Simplemente tiene en cuenta las distintas constantes de disociación. Aquí se muestra para el caso de un tetrámero.

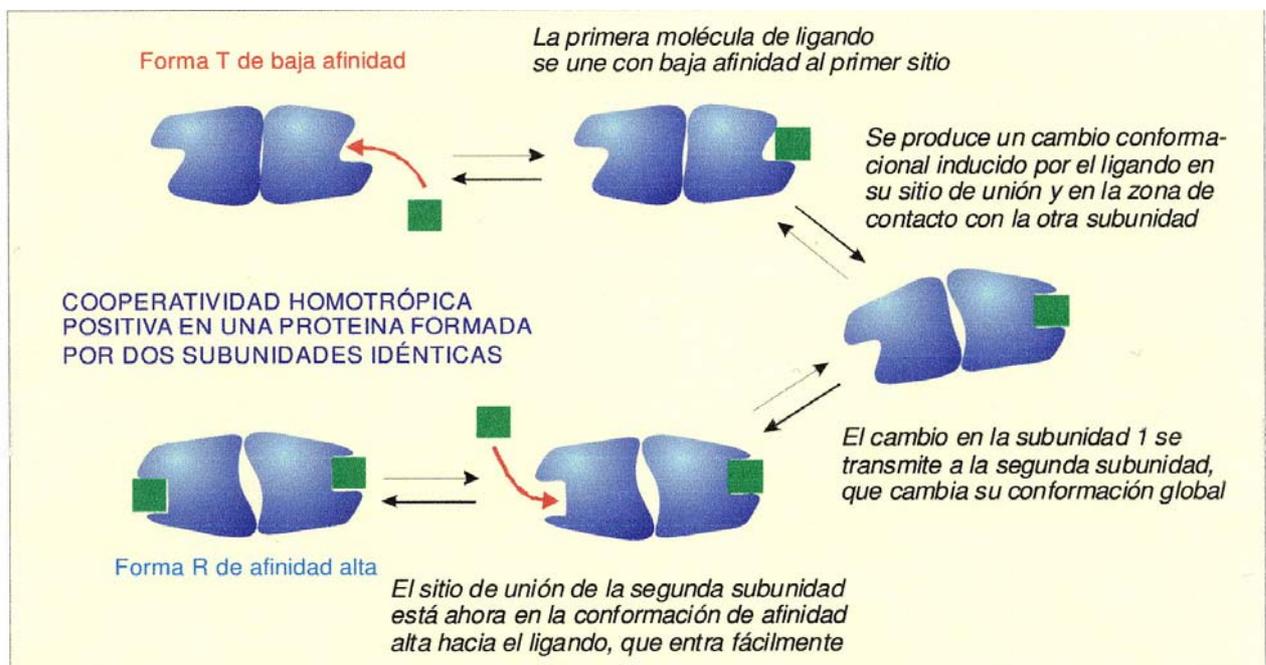
$$Y = \frac{\frac{L}{Kd1} + 3 \frac{L^2}{Kd1 \cdot Kd2} + 3 \frac{L^3}{Kd1 \cdot Kd2 \cdot Kd3} + \frac{L^4}{Kd1 \cdot Kd2 \cdot Kd3 \cdot Kd4}}{1 + 4 \frac{L}{Kd1} + 6 \frac{L^2}{Kd1 \cdot Kd2} + 4 \frac{L^3}{Kd1 \cdot Kd2 \cdot Kd3} + \frac{L^4}{Kd1 \cdot Kd2 \cdot Kd3 \cdot Kd4}}$$

La cooperatividad homotrópica positiva no significa que la afinidad global de la enzima hacia el ligando sea mayor que sin cooperatividad, sino que se requiere menor variación de la cantidad de ligando para modificar el grado de saturación de la proteína.



¿Cómo se produce la cooperatividad homotrópica?: mecanismo físico

- 1) Requiere que la proteína tenga dos o más sitios de unión para el ligando
- 2) La unión de una molécula de ligando produce un cambio conformacional en la proteína que se transmite a los restantes sitios de unión. Este cambio conformacional se traduce en una modificación de la afinidad de la proteína hacia otras moléculas de ligando:



Esta interacción FÍSICA entre sitios distintos se conoce como **ALOSTERISMO**