

lecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280: 69-76 (1998).

Elgoyhen, A.B., Johnson, D.S., Boulter, J., Vetter, D.E., Heinemann, S. Alpha9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 79: 705-715 (1994).

Galzi, J.L., Revah, F., Bessis, A., Changuex, J.P. Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: from electric organ to brain. *Annu. Rev. Pharmacol.* 31: 37-72 (1991).

Green, T., Heinemann, S.F., Gusev, J.M. Molecular neurobiology and genetics: investigation of neural function and dysfunction. *Neuron* 20: 427-444 (1998).

Hille, B. *Ionic channels of excitable membranes*. (Second ed.). New York: Sinauer (1992).

Jan, L., Jan, Y. Potassium channels and their evolving gates. *Nature* 371: 119-122 (1994).

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. *Principles of neural science*. (Third ed.) New York: Elsevier (1991).

Karlin, A., Akabas, M. Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron* 15: 1231-1244 (1995).

Noda M., Furutani, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Tanabe, T., Shimizu, S., Kikuyotani, S., Kayano, T., Hirose, T., Inayama, S., Numa, S. Cloning and sequence analysis of calf cDNA and human genomic DNA encoding α -subunit precursor of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 305: 818-823 (1983).

Stefani, E., Toro, L., Perozo, E., Bezanilla, F. Gating of Shaker K⁺ channels. I. Ionic and gating currents. *Biophys. J.* 66: 996-1010 (1994).

Unwin, N. Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature* 373: 37-43 (1995).

5. INTERACCIÓN LIGANDO-RECEPTOR

Tomás A. Santa Coloma

"That combining group of the protoplasmic molecule to which the introduced group is anchored will hereafter be termed receptor"

Paul Ehrlich, 1909.

I. Introducción

Las células son muy sensibles a las modificaciones en el medio ambiente, facultad que les permite adaptarse para sobrevivir. Estas modificaciones del medio son captadas por numerosas macromoléculas diferentes, muy especializadas, llamadas **receptores**. Cuando se produce alguna modificación del medio o aparece alguna señal externa, como podría ser un cambio en la presión parcial de oxígeno, la llegada de una hormona, de un factor de crecimiento, o aún la de un fotón, estas macromoléculas se encargan de transducir las señales externas en señales intracelulares. Estas señales pueden entonces ser procesadas y analizadas por las células, con el objetivo final de producir una respuesta al estímulo que las originó. Los receptores estarán localizados en la membrana plasmática cuando las moléculas que deben detectar, los **ligandos**, no son permeables a la bicapa lipídica. En caso contrario, de tratarse de ligandos liposolubles o permeables a la membrana por algún otro mecanismo (por ejemplo en-

docitosis), los receptores se encontrarán en el interior de las células, en diferentes localizaciones (núcleo, citoplasma, etc.) según la función que tengan.

La unión de un ligando a un receptor tiene características únicas: es una unión de alta afinidad, específica, reversible, saturable y con una función biológica asignable. Estas características permiten distinguir las uniones ligando-receptor de aquellas uniones inespecíficas, generalmente irreversibles o de baja afinidad, que no poseen una función biológica. Para poder entender claramente el significado de estas características, es necesario tener presentes algunos conceptos introductorios de la teoría de interacción ligando-receptor, conceptos que desarrollaremos a continuación.

II. Introducción a la teoría de interacción ligando-receptor. Ecuación de Scatchard

Con el fin de entender con detalle la interacción ligando-receptor y los métodos utilizados en la caracterización de

lecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280: 69-76 (1998).

Elgoyhen, A.B., Johnson, D.S., Boulter, J., Vetter, D.E., Heinemann, S. Alpha9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 79: 705-715 (1994).

Galzi, J.L., Revah, E., Bessis, A., Changuex, J.P. Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: from electric organ to brain. *Annu. Rev. Pharmacol.* 31: 37-72 (1991).

Green, T., Heinemann, S.F., Gusev, J.M. Molecular neurobiology and genetics: investigation of neural function and dysfunction. *Neuron* 20: 427-444 (1998).

Hille, B. *Ionic channels of excitable membranes*. (Second ed.). New York: Sinauer (1992).

Jan, L., Jan, Y. Potassium channels and their evolving gates. *Nature* 371: 119-122 (1994).

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. *Principles of neural science*. (Third ed.) New York: Elsevier (1991).

Karlin, A., Akabas, M. Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron* 15: 1231-1244 (1995).

Noda M., Furutani, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Tanabe, T., Shimizu, S., Kikuyotani, S., Kayano, T., Hirose, T., Inayama, S., Numa, S. Cloning and sequence analysis of calf cDNA and human genomic DNA encoding α -subunit precursor of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 305: 818-823 (1983).

Stefani, E., Toro, L., Perozo, E., Bazanilla, F. Gating of Shaker K⁺ channels. I. Ionic and gating currents. *Biophys. J.* 66: 996-1010 (1994).

Unwin, N. Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature* 373: 37-43 (1995).

5. INTERACCIÓN LIGANDO-RECEPTOR

Tomás A. Santa Coloma

"That combining group of the protoplasmic molecule to which the introduced group is anchored will hereafter be termed **receptor**"

Paul Ehrlich, 1909.

I. Introducción

Las células son muy sensibles a las modificaciones en el medio ambiente, facultad que les permite adaptarse para sobrevivir. Estas modificaciones del medio son captadas por numerosas macromoléculas diferentes, muy especializadas, llamadas **receptores**. Cuando se produce alguna modificación del medio o aparece alguna señal externa, como podría ser un cambio en la presión parcial de oxígeno, la llegada de una hormona, de un factor de crecimiento, o aún la de un fotón, estas macromoléculas se encargan de transducir las señales externas en señales intracelulares. Estas señales pueden entonces ser procesadas y analizadas por las células, con el objetivo final de producir una respuesta al estímulo que las originó. Los receptores estarán localizados en la membrana plasmática cuando las moléculas que deben detectar, los **ligandos**, no son permeables a la bicapa lipídica. En caso contrario, de tratarse de ligandos liposolubles o permeables a la membrana por algún otro mecanismo (por ejemplo en-

dócitos), los receptores se encontrarán en el interior de las células, en diferentes localizaciones (núcleo, citoplasma, etc.) según la función que tengan.

La unión de un ligando a un receptor tiene características únicas: es una unión de alta afinidad, específica, reversible, saturable y con una función biológica asignable. Estas características permiten distinguir las uniones ligando-receptor de aquellas uniones inespecíficas, generalmente irreversibles o de baja afinidad, que no poseen una función biológica. Para poder entender claramente el significado de estas características, es necesario tener presentes algunos conceptos introductorios de la teoría de interacción ligando-receptor, conceptos que desarrollaremos a continuación.

II. Introducción a la teoría de interacción ligando-receptor. Ecuación de Scatchard

Con el fin de entender con detalle la interacción ligando-receptor y los métodos utilizados en la caracterización de

esta interacción, se necesita algún modelo que describa con claridad dicho fenómeno. Sin embargo, la descripción de la interacción ligando-receptor en términos matemáticos puede resultar algo compleja, dependiendo del número de sitios receptores, de la posible interacción entre ellos y con otros ligandos, y de las aproximaciones que se hagan. La descripción detallada de los modelos existentes para casos complejos escapa al objetivo de este libro, pero una introducción a los casos más simples es necesaria para comprender los mecanismos de activación de receptores y el fenómeno de antagonismo.

Vamos a considerar, en primer lugar, el caso más simple, que es la interacción de un ligando L con un receptor R , y donde R posee un único sitio de unión para el ligando. Podría ser, por ejemplo, la interacción de la hormona foliculo estimulante (FSH) con su receptor, o la del oxígeno con la mioglobina. Si agregamos una concentración de ligando $[L]$ a una concentración de receptor $[R]$, el ligando se unirá al receptor con una velocidad de asociación dada por la siguiente ecuación:

$$V_a = k_1 [L][R] \quad (E1)$$

y se disociará con una velocidad de disociación dada por la ecuación:

$$V_d = k_{-1} [LR] \quad (E2)$$

La variación con el tiempo de la concentración del complejo ligando-receptor ($[LR]$) estará dada por:

$$\frac{d[LR]}{dt} = k_1 [L][R] - k_{-1} [LR]$$

Hemos asumido hasta aquí, para simplificar, que las actividades químicas de las distintas especies son equivalentes a sus concentraciones molares y que la unión del ligando a su receptor es reversible. Además, asumimos que no existe ninguna barrera (por ejemplo, la membrana plasmática) o impedimento más que la velocidad de difusión para la unión del ligando a su receptor. Bajo estas condiciones, podemos obtener la expresión correspondiente a la constante de equilibrio de la reacción, en términos de las concentraciones de cada una de las especies que intervienen. En el equilibrio, la concentración de complejo ligando-receptor $[LR]$ será constante:

$$\frac{d[LR]}{dt} = V_a - V_d = k_1 [L][R] - k_{-1} [LR] = 0$$

y entonces la velocidad de asociación del ligando v_a por el receptor igualará a la velocidad de disociación,

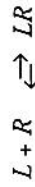
$$V_a = V_d \Rightarrow k_1 [L][R] = k_{-1} [LR] \Rightarrow$$

$$K_a = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[LR]}{[R][L]}$$

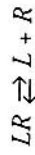
es decir,

$$K_a = \frac{[LR]}{[R][L]} \quad (E3)$$

expresión que corresponde a la constante de equilibrio para la reacción de asociación,



De la misma manera, la ecuación para la reacción de disociación y su constante de equilibrio serán:



$$K_d = \frac{[R][L]}{[LR]} = \frac{1}{K_a} \quad (E4)$$

Ahora, la concentración total de receptor R_t es igual a la concentración de receptor libre $[R]$ más la concentración de receptor unido a su ligando $[LR]$:

$$R_t = [R] + [LR] \quad (E5)$$

Definiremos entonces el grado de unión o fracción de receptores con sus sitios ocupados por los ligandos, Fr , como los moles de ligando unidos por mol de receptor total, es decir:

$$Fr = \frac{[LR]}{[R] + [LR]} \quad (E6)$$

Despejando $[LR]$ de la ecuación (E3) obtenemos que $[LR] = K_a [R][L]$, y reemplazando este valor en (E6) obtenemos,

$$Fr = \frac{K_a [R][L]}{[R] + K_a [R][L]} = \frac{K_a [L]}{1 + K_a [L]}$$

es decir:

$$Fr = \frac{K_a [L]}{1 + K_a [L]} \quad (E7)$$

Como puede verse en la Figura 1A, la función Fr vs. $[L]$ es una hipérbola. A bajas concentraciones de ligando, la fracción de receptor ocupada tiende a 0 y a altas concentraciones de ligando tiende a 1, es decir tiende al 100% de sitios ocupados por el ligando (saturación). Esto se ve mejor en un gráfico del tipo Fr vs. $\log [L]$ como se muestra en la Figura 1B.

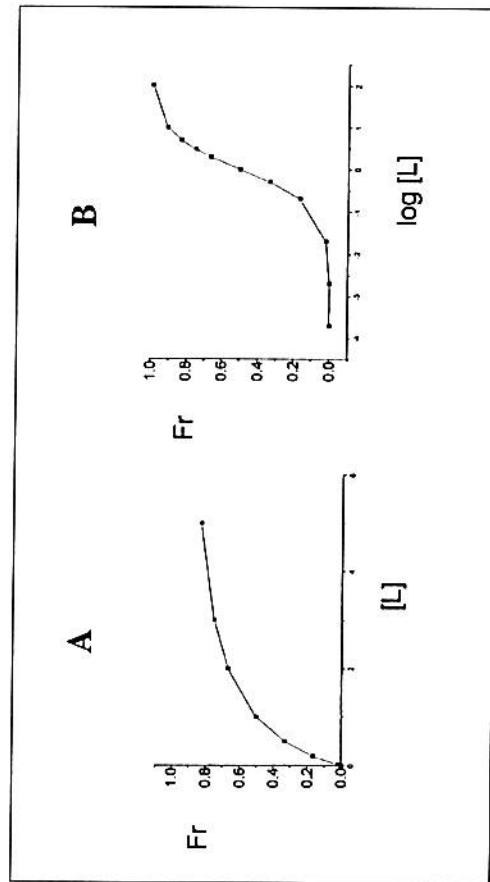


Figura 1.

A saturación media, cuando $Fr = Fr(1 + K_d[L]) = K_d[L] \Rightarrow Fr + K_d Fr[L] = K_d[L]$ 1/2, según la ecuación (E7),

$$1/2 = \frac{K_d[L]}{1 + K_d[L]} \Rightarrow 1/2 + 1/2 K_d[L] = K_d[L] \Rightarrow K_d[L] = 1 + K_d[L]$$

Es decir, $K_d[L] = 1/2 = 1$ y teniendo en cuenta la ecuación (E4),

$$K_d = [L] / 2 \quad (E8)$$

La ecuación (E8) provee una buena definición de la constante de disociación K_d : la constante de equilibrio de disociación es equivalente a la concentración de ligando para la cual se obtiene el 50% de los receptores ocupados (50% de saturación).

Aunque la hipérbola de la Figura 1 ilustra bastante bien el fenómeno de unión del ligando al receptor, la determinación a partir de esta hipérbola de la constante de equilibrio y del número de receptores es poco práctica, porque la función no es lineal y la saturación se obtiene en forma asintótica. Con la ayuda de programas de computación de ajuste de curvas no lineales estas determinaciones pueden hacerse sin dificultad. Sin embargo, en una forma más sencilla, la ecuación (E7) puede ser transformada en una recta, método utilizado por primera vez por Scatchard en 1949:

Para hacer lineal esta ecuación (E7), se debe pasar el denominador del segundo miembro de la ecuación al primero y distribuir Fr :

Si ahora se agrupan los términos conteniendo $K_d[L]$,

$$Fr = K_d[L] - K_d Fr [L]$$

y, finalmente, se divide por $[L]$ ambos miembros, se obtiene la ecuación de Scatchard:

$$\frac{Fr}{[L]} = K_d - K_d \frac{Fr}{[L]} \quad (E9) \text{ Ecuación de Scatchard}$$

La función $Fr/[L]$ vs. Fr es la ecuación de una recta de pendiente $-K_d$. Haciendo un gráfico de valores de $Fr/[L]$ vs. Fr se puede estimar el valor de K_d de una forma bastante simple.

Sin embargo, la determinación de los valores de Fr no es siempre sencilla. En general, hay que conocer de antemano la cantidad total de receptor y esto sólo ocurre cuando agregamos algún receptor puro, cuantificable, a una solución en estudio. Pero el caso más común es que no conozcamos la cantidad de receptor y que sea precisa-mente ésta una de las variables a determinar junto con la constante de afinidad.

Existe una solución a este problema: La ecuación de Scatchard puede tomar otra forma que es más comúnmente utilizada en la bibliografía. Según las ecuaciones E5 y E6,

$$Fr = \frac{[LR]}{[R] + [LR]} = \frac{[LR]}{R_t}$$

y ahora reemplazamos Fr por $[LR]/R_t$ en la ecuación de Scatchard (E9), obtenemos:

$$\frac{[LR]}{[L]R_t} = K_d - \frac{K_d [LR]}{R_t}$$

Si ahora se multiplican ambos miembros por R_t y se simplifica, obtenemos una forma diferente de la ecuación de Scatchard:

$$\frac{[LR]}{[L]} = R_t K_d - K_d [LR]$$

Finalmente, cambiando la nomenclatura de las variables $[LR]$ por B (por ligando "bound"), $[L]$ por F (por ligando "Free" - no confundir F con Fr , que es la fracción de receptor ocupado) y R_t por Q (por "receptor quantity") se obtiene la ecuación de Scatchard más comúnmente utilizada en la literatura científica actual:

$$\frac{B}{F} = Q K_d - K_d B \quad (E10) \text{ Ecuación de Scatchard equivalente a (E9)}$$

Graficando B/F vs. B obtenemos la ecuación de una recta como se muestra en la Figura 2.

Aquí, el valor de la pendiente (p) corresponde a la constante de asociación ($-p = K_d$). Por otro lado, cuando $B/F = 0$, según la ecuación de Scatchard (E10), $Q K_d - K_d B = 0$ y por lo tanto $B = Q$. En otras palabras, el valor de B en el gráfico, cuando $B/F = 0$, nos proporciona el valor de la concentración total de receptor Q (o el número de sitios de binding según cómo especifiquemos los valores de B). De este modo es posible obtener gráficamente, de una manera sencilla, los valores para estos dos parámetros tan importantes en la caracterización de la interacción ligando-receptor. La única variable que hay que conocer es el valor de B para concentraciones crecientes de ligando y esto no es algo complicado. De ser necesario, el valor de B puede obtenerse exactamente por métodos numéricos. Más adelante veremos algunos métodos que nos permiten medir B en forma sencilla.

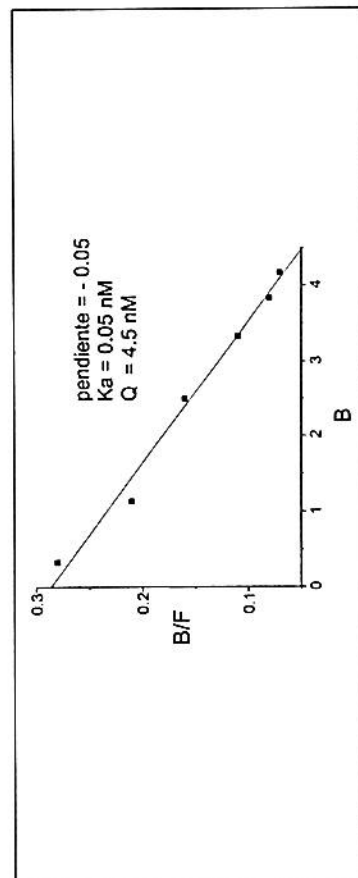
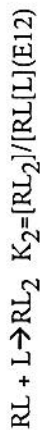
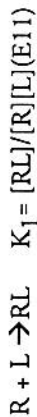


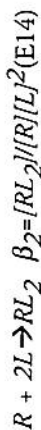
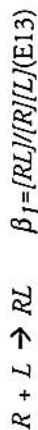
Figura 2. Ecuación de Scatchard (para un sitio de unión único).

Receptores con más de un sitio de unión

Consideremos ahora el caso de una macromolécula que posea dos sitios de unión para el ligando. En este caso, las ecuaciones de equilibrio involucradas son:



Una forma equivalente es expresar estos equilibrios referidos a la macromolécula libre R sería la siguiente:



Así, los moles de ligando L unidos por mol de receptor estarán representados por la ecuación:

$$\bar{Fr} = \frac{[LR] + 2[L_2R]}{[R] + [LR] + [L_2R]}$$

El factor 2 aparece porque existen 2 moléculas de ligando por molécula de receptor para la especie L_2R y nos interesa expresar los valores en términos de moles de ligando unidos por mol de receptor. Ahora, si reemplazamos esta ecuación de modo que quede expresada en términos de las ecuaciones de equilibrio sucesivas (E11) y (E12), obtenemos,

$$\bar{Fr} = \frac{K_1 [L] + 2 K_1 K_2 [L]^2}{1 + K_1 [L] + K_1 K_2 [L]^2}$$

y en términos de las constantes globales β_1 de las ecuaciones (E13) y (E14),

$$\bar{Fr} = \frac{\beta_1 [L] + 2 \beta_2 [L]^2}{1 + \beta_1 [L] + \beta_2 [L]^2} \text{ (E15)}$$

En este caso ya no es tan simple linealizar la ecuación, y lo más práctico es utilizar métodos numéricos (no-lineales) de ajuste de curvas. Pero también pueden utilizarse gráficos relativamente simples para describir y analizar la interacción con más detalle, como los gráficos de Hill y a los gráficos de Scatchard.

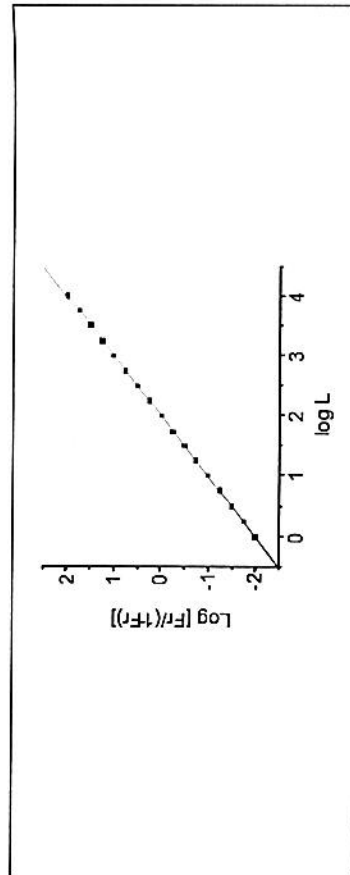


Figura 3. Gráfico de Hill (para un sitio único).

Un gráfico de Hill se obtiene graficando el logaritmo del cociente entre la fracción de sitios ocupados sobre libres, es decir, el $\log(\bar{Fr}/(1-\bar{Fr}))$ vs. $\log [L]$, donde n es igual al número total de sitios por receptor. Por ejemplo, para el caso de la mioglobina, $n=1$ y el gráfico de Hill será una recta de pendiente $p = 1$. Veamos esto; según la ecuación de Scatchard:

$$\frac{\bar{Fr}}{[L]} = K_a - K_a \bar{Fr}$$

Por lo tanto,

$$\frac{\bar{Fr}}{[L]} = K_a(1-\bar{Fr}) \Rightarrow \frac{\bar{Fr}}{1-\bar{Fr}} = K_a [L]$$

y aplicando logaritmos,

$$\log\left(\frac{\bar{Fr}}{1-\bar{Fr}}\right) = \log K_a + \log [L] \text{ (E16)}$$

Esta ecuación nos proporciona una recta de pendiente $p = 1$, tal como se muestra en la Figura 3.

Ahora, para el caso de dos sitios de

unión, puede demostrarse fácilmente (dividiendo Fr por (1-Fr) en ambos miembros, reemplazando Fr por su valor en el segundo y simplificando) que,

$$\frac{\bar{Fr}}{2-\bar{Fr}} = \frac{K_1[L] + 2K_1K_2[L]^2}{2 + K_1[L]}$$

El gráfico de Hill (Figura 4) en este caso corresponderá a la función,

$$\log\left(\frac{\bar{Fr}}{2-\bar{Fr}}\right) \text{ vs. } \log [L]$$

A bajas concentraciones de ligando,

$$\frac{\bar{Fr}}{2-\bar{Fr}} = \frac{K_1 [L]}{2} \text{ (E17)}$$

Y a altas concentraciones de ligando,

$$\frac{\bar{Fr}}{2-\bar{Fr}} = 2 K_2 [L] \text{ (E18)}$$

De modo que el gráfico de Hill será lineal a estos extremos, con una intersección en el eje-Y igual al $\log((1/2)K_1)$ y

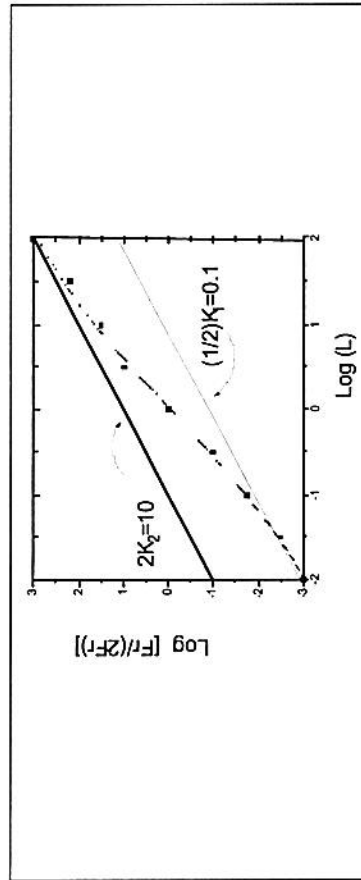


Figura 4. Gráfico de Hill (para dos sitios de unión independientes).

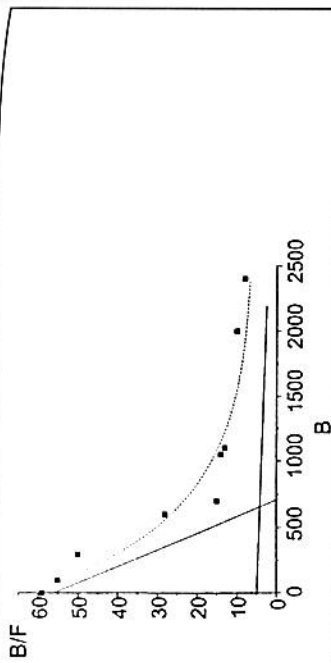


Figura 5. Gráfico de Scatchard (para dos sitios de unión independientes).

($2K_2$) para las asíntotas de baja y alta saturación respectivamente, y nos permitirá identificar la presencia de dos sitios diferentes.

¿Cómo se vería un gráfico de Scatchard cuando existen dos sitios de unión independientes? Esto se ilustra en figura 5.

En este caso el gráfico no es lineal y responde a la resultante de la contribución del sitio de alta afinidad y baja capacidad, y del sitio de baja afinidad y alta capacidad, representados por las dos líneas del gráfico.

Finalmente, la ecuación (E15) puede generalizarse para múltiples sitios de unión n :

$$\sum_{i=0}^n i \beta_i [L]^i = \sum_{i=0}^n i \beta_i [L]^i \quad (E19)$$

Estas ecuaciones se tornan complejas cuando hay cooperatividad en la unión de ligando, es decir, cuando la unión de un ligando afecta en forma negativa o positiva la unión de un segundo ligando.

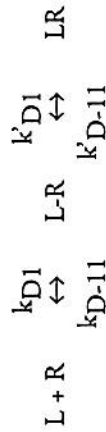
do. Para un estudio detallado de estos modelos remitimos al lector al excelente libro "Binding and Linkage", de Wyman y Gill, y también a los trabajos de Gregorio Weber y de Pedro Cuatrecasas, entre otros.

III. Afinidad, especificidad, capacidad, reversibilidad, respuesta biológica

Ahora estamos en mejores condiciones para interpretar las características de la interacción ligando-receptor. La propiedad de un receptor de "atraer" a un ligando es llamada **afinidad**. La representación numérica de la afinidad es la constante K_a . La unión de un ligando a su receptor no debe ser vista como un proceso estático, sino como un proceso estocástico, dinámico, en el que ciertas moléculas de ligando se acercan y unen a los receptores mientras que otras se disocian y alejan. En un instante determinado, la fracción de moléculas unidas dependerá de las velocidades de asociación y disociación del ligando. La afinidad

puede interpretarse también como la frecuencia con que un ligando, que se ha acercado por difusión a un receptor, permanece en una posición de energía mínima dentro del campo de fuerza del receptor. La especificidad está determinada por la afinidad, que es la resultante de la velocidad de asociación y de la velocidad de disociación. Cuanto más fácilmente se asocie una droga a un receptor (y menos fácilmente se disocie) más afin será la unión. Ligandos no específicos tendrán una alta velocidad de disociación y/o baja velocidad de asociación, y en consecuencia su afinidad será baja.

La alta velocidad de disociación de un ligando no-específico puede estar dada por la presencia de un menor número de sitios de anclaje por el receptor, en comparación con el ligando específico, lo que resultará en un campo de fuerza menor. Otra posibilidad es que la velocidad de difusión sea menor y por lo tanto la constante de asociación también. Para ilustrar mejor esto, veamos la relación entre la constante de asociación y la difusión. En una interacción ligando-receptor, existe un primer proceso que es la difusión hacia (o desde) el receptor y luego un segundo proceso cuando el ligando entra en el campo de fuerza del receptor y se forma el complejo ligando-receptor:



La constante de velocidad de asociación mediada por difusión está dada por la ecuación de Smoluchowski:

$$k_{D1} = \frac{4\pi N D r}{1000}$$

donde N es el número de Avogadro, D es el coeficiente de difusión y r es el radio del sitio de unión del ligando en el receptor. Por otro lado, de acuerdo con la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r}$$

donde k es la constante de Boltzmann, η es la viscosidad del medio y R el radio del ligando. Asumiendo que el radio de la molécula que difunde y el radio del sitio de unión coinciden:

$$k_{D1} = \frac{2RT}{3000\eta}$$

Esto significa que a temperatura y viscosidad del medio constantes, la velocidad de asociación para la etapa de difusión será una constante, es decir, será la misma independientemente del ligando considerado. Esto ocurrirá siempre que los radios coincidan. Cuando el ligando está formado por polímeros o péptidos grandes este puede no ser el caso, y el radio en el receptor puede ser mucho más chico que el radio de la molécula. Hay otros factores que pueden afectar a k_{D1} . Por ejemplo, la formación de una estructura cuasi-cristalina alrededor de las zonas hidrofóbicas puede modificar el radio efectivo del ligando y producir una disminución de la velocidad de difusión. Asimismo, la hidratación de las proteínas u otras estructuras alrededor del receptor puede produ-

r un medio anisotrópico, obteniéndose como resultado una disminución del coeficiente de difusión. Otro factor muy importante que puede modificar D_I es el impedimento estérico. Es decir, el sitio de anclaje del receptor puede estar al final de un túnel formado por diferentes estructuras que impidan la accesibilidad de moléculas similares al sitio. En este caso el proceso de difusión ya no es aleatorio y k_{DI} se verá alterada.

Una vez que la primera etapa de difusión es superada, una serie de fuerzas intermoleculares afectarán a k_{DI} que se anformará en k_{DI} dentro del campo de fuerza del sitio de unión. Estas fuerzas están representadas por la función Y de Debye:

$$f = e^{-u/RT}$$

La constante de velocidad de disociación dependerá del tipo y número de interacciones entre el ligando y el receptor. Cuanto mayor sea la molécula mayor será la probabilidad de que posea múltiples sitios de interacción y una baja velocidad de disociación (por lo tanto, alta afinidad). De forma similar a la velocidad de asociación,

$$k'd_2 = kd_2 * Y'$$

Y' , para el caso de una interacción iónica toma la forma

$$Y' = w / (1 - e^{-w})$$

donde w depende de las valencias respectivas, carga electrónica, temperatura, y constante dieléctrica. Es importante aquí tener en cuenta que la función Y' puede ser sumamente compleja, dependiendo de la naturaleza de ligando y del receptor.

Veamos finalmente las otras características de los receptores. Habíamos

dicho que los receptores poseían una capacidad limitada. Esto es así porque el número de receptores en una célula es limitado, generalmente entre 1000 y 10.000, y sólo las interacciones inespecíficas, de baja afinidad, tienen gran capacidad. Esto último es debido precisamente a que al ser de baja afinidad (y por lo tanto especificidad), los ligandos tienen interacciones promiscuas con múltiples moléculas diferentes, que superan en número ampliamente a los receptores. Finalmente, el requisito de poseer una función biológica es para distinguir a los receptores de aquellas uniones de alta afinidad que ocurre por ejemplo con proteínas de matriz extracelular, a las que no llamamos receptores.

IV. Agonistas y Antagonistas

Luego de la unión de un ligando a su receptor se produce una respuesta biológica. Si un ligando produce estimulación es llamado agonista, mientras que aquel que bloquea esta respuesta es llamado antagonista.

Hay cuatro tipos de mecanismos por el cual los antagonistas pueden bloquear una respuesta. El primer mecanismo es el antagonismo (antagonista) químico o de neutralización, por el cual el antagonista se unirá con el agonista neutralizando su capacidad de unión al receptor (por ejemplo un anticuerpo específico para un ligando que impida la unión a su receptor). Mediante un segundo mecanismo, el antagonista puede unirse al mismo sitio que el agonista en el receptor y competir con su unión;

se denomina entonces a este mecanismo antagonismo (antagonista) competitivo. En tercer lugar, el antagonista puede unirse a un sitio distinto que el agonista y por efectos alostéricos o de otro tipo inhibir la acción del agonista; este mecanismo es denominado antagonismo (antagonista) no competitivo. Por último, el antagonista puede interferir en una etapa posterior a la de la unión del agonista a su receptor, interfiriendo con la respuesta celular; este mecanismo es llamado antagonismo (antagonista) fisiológico o funcional. Por otro lado, los antagonistas pueden ser reversibles, pseudo-irreversibles o irreversibles según formen una unión reversible, de muy baja velocidad de disociación o irreversible (covalente) con su receptor.

Un agonista potente producirá una respuesta máxima en cualquier tejido; aquellos agonistas que produzcan una respuesta menor a la máxima se denominan agonistas parciales. Una vez que el ligando se ha unido a su receptor se produce una respuesta biológica. Los tejidos o células se comportan como amplificadores de la señal producida por los diferentes ligandos. La amplitud, sensibilidad y concentración mínima de disparo de estos amplificadores varía enormemente dependiendo del tipo celular o tejido. La afinidad y la eficacia intrínseca de los ligandos son parámetros muy importantes en la respuesta biológica. Anteriormente vimos el concepto de afinidad. La eficacia intrínseca de un ligando es una característica propia del ligando que determina su habilidad para inducir una respuesta biológica. Es una propiedad del

ligando, no del receptor ni del tejido o célula considerada. De modo que la afinidad y la especificidad llevan al ligando a unirse al receptor y la eficacia intrínseca determina que tipo de respuesta a dicha unión tiene el sistema.

El tratamiento matemático de estos conceptos permite su cuantificación, tal como hicimos anteriormente para K_a y K_d . Sin embargo, estos conceptos cubren un campo muy extenso en cuanto a la formulación de los modelos matemáticos y escapan al objetivo de este libro introductorio.

7. Métodos para determinar la reacción de ligando unido

Como hemos visto en la ecuaciones anteriores, para poder realizar un gráfico de Scatchard necesitamos alguna forma de medir la cantidad de ligando unido (variable B). Dado que la cantidad de ligando total es generalmente conocida (la agregamos en concentraciones crecientes a cantidades fijas de receptor), la cantidad de ligando libre F determina muy fácilmente una vez conocido B :

$$\text{El ligando total } T = B + F, \text{ entonces} \\ T = T - B \quad (\text{E20})$$

Por lo tanto, midiendo B conocemos también F . Para medir B , es necesario encontrar algún método de separación entre el ligando unido y el libre. La separación deberá ser lo suficientemente rápida como para que no ocurra una dilución apreciable de ligando unido durante el tiempo que ésta dure. Existen

numerosas estrategias que permiten realizar estas separaciones y a continuación veremos algunos ejemplos.

Carbón-dextrano: Un método muy utilizado es la separación mediante una suspensión de carbón-dextrano. Se ha utilizado, por ejemplo, para el estudio de la unión de hormonas esteroideas a sus receptores. En este método, una cantidad fija de muestra (proteínas totales constantes) conteniendo receptores es incubada con la hormona radioactiva en concentraciones crecientes (o con la hormona radioactiva constante y concentraciones crecientes de hormona fría) y luego de la incubación (en general a 4°C, en una mezcla de hielo y agua) se agrega una suspensión de carbón activado, cuya superficie ha sido parcialmente bloqueada con una mezcla de dextrano, adsorbido sobre la misma. Esta cobertura de dextrano permite que el carbón adsorba a los esteroideos libres, pero no a las proteínas (receptores). Al centrifugar la suspensión de carbón, el esteroide libre es precipitado junto con el carbón, quedando en el sobrenadante el esteroide (radioactivo) unido al receptor. Una fracción del sobrenadante es luego mezclada con una solución centelleante, que permite medir la radioactividad en un contador líquido de centelleo. De esta forma, es posible medir con gran exactitud la concentración de ligando unido B y por diferencia obtener F . Si la curva se construyó agregando concentraciones crecientes de hormona fría, hay que hacer los cálculos correspondientes de dilución isotópica para determinar B . Veamos un ejemplo numérico:

Utilizaremos el método más común de cálculo que es el caso en que agregamos concentraciones crecientes de hormona fría a cada tubo. Supongamos que en ciertas células queremos caracterizar los receptores (exceso de 100 veces de hormona de estradiol. Realizaremos entonces un homogenato de las células en una solución adecuada para preservar la integridad de los receptores (por ejemplo, buffer Tris 20 mM, pH 7.4, en presencia de DTT como reductor) y mediremos la concentración de proteínas. Supongamos que la concentración de proteínas obtenida por el método de Lowry es 1 mg/ml. Agregaremos 10 µl de esta solución a 10 tubos distintos (5 por duplicado). Ahora tomaremos una cantidad de hormona radioactiva que nos proporcione unas 10.000 cpm por cada 10 µl. Agregaremos entonces esa cantidad a cada uno de los tubos donde realizaremos la

medición de radioactividad (el volumen final de la incubación será de 400 µl). Supongamos que en estas condiciones obtenemos los valores siguientes:

Tubo Nº	(cpm)	(cpm) Duplic.	Promedio	Ligando no radioactivo agregado	Ligando total agregado	% B	B (ng)	B (pM)	F (ng)	F (nM)	B/F
1	1990	2010	2000 (1852)	0 ng	0.09 ng	18.5	0.02	0.33	0.07	1.17	0.28
2	1910	1888	1899 (1751)	0.3	0.39	17.5	0.07	1.14	0.32	5.33	0.21
3	1480	1516	1498 (1350)	1	1.09	13.5	0.15	2.50	0.94	15.66	0.16
4	1110	1096	1103 (955)	2	2.09	9.6	0.20	3.33	1.89	31.49	0.11
5	910	890	900 (752)	3	3.09	7.5	0.23	3.83	2.86	47.65	0.08
6	751	745	748 (600)	4	4.09	6.0	0.25	4.17	3.84	63.97	0.07
7 Inespecífico	150	146	148 (0)	100 ng							
8 Total	10020	9980	10000								
9 Blanco	49	45	47								

Los cálculos fueron hechos de la forma siguiente:

Los valores obtenidos del contador centelleo se expresan en la tabla en cpm (cuentas por minuto). El valor del blanco es útil para saber si la suspensión de carbón-dextrano funcionó bien. El valor del inespecífico incluye al blanco y resta a todos los valores de los tubos -6 (el resultado se indica entre paréntesis en la columna de promedios). El porcentaje de ligando unido se calcula tomando como 100% a la radioactividad registrada a cada tubo (10.000 cpm). Para calcular B es necesario primero conocer la masa de ligando radioactivo agregado. Supongamos que el ligando está marcado con tritio, que tiene un peso molecular de 300, que la actividad específica es de 30 mCi/nmol y que la eficiencia de contador para tritio es del 0%. Con esta eficiencia las dpm (deintegraciones por minuto) correspondientes son el doble que las cpm (dpm = cpm/eficiencia del equipo = cpm/0.50). En este caso, para 10.000 cpm corresponderán 20.000 dpm. Ahora, 1 µCi es equivalente a 2.22 x 10⁶ dpm. De modo que la masa mL de ligando correspondiente a 20.000 dpm es:

$$L = \frac{(20.000 \text{ dpm})}{(2,22 \times 10^6 \text{ dpm}/(1 \mu\text{Ci}))} (30 \text{ mCi/nmol}) \times 10^{-4} \text{ nmoles}$$

Dijimos que el peso molecular era 300, entonces la masa en nanogramos será:

$$L = (3 \times 10^{-4} \text{ nmoles})(300 \text{ ng/nmol}) = 0,09 \text{ ng}$$

Si luego sumamos este valor a la masa agregada fría (no-radioactiva) a los distintos tubos (en la mayoría será despreciable salvo en el primero) obtendremos la masa total. Como ya conocemos el porcentaje de ligando unido (%B), podemos calcular fácilmente la masa unida (B en ng). Teniendo en cuenta que el volumen de incubación fue de 200 µl, podemos calcular la concentración de ligando unida (B en nM):

$$[B] = \frac{(\text{mL en ng}) (1 \times 10^6 \mu\text{L/L})}{(300 \text{ ng/nmol})(200 \mu\text{L})} = \text{mL} \times 16,66 \text{ nmol/L} = [B] = \text{mL} \times 1666 \text{ nM}$$

Entonces, por ejemplo, para el primer valor de 0,02 ng,

$$[B] = 0,02 \times 16,66 = 0,33 \text{ nM}$$

La masa de ligando libre la obtendremos por diferencia (ecuación E20), luego la expresamos en nM (como se indicó para [B]) y por último calculamos B/F. Finalmente, graficando B/F vs. B obtenemos el gráfico de Scatchard correspondiente (Figura 2). El valor de su pendiente corresponderá al valor de Ka y el valor de B cuando B/F=0 corresponderá a la concentración de receptor (en nM).

Se han desarrollado múltiples variaciones de este método, cambiando las sustancias adsorbentes (por ejemplo usando talco en lugar de carbón) para diversas aplicaciones, no sólo de esteroides, sino de diversos ligandos como prostaínas, prostaglandinas, factores de crecimiento, etc.

No siempre es posible utilizar los métodos de adsorción del ligando libre. Para ligandos de baja afinidad, normalmente la velocidad de disociación es muy alta y los métodos de separación no son confiables (el ligando se disocia antes de poder medirlo). En estos casos hay que usar métodos de estado estacionario (ver referencias). Se han desarrollado diversas estrategias para medir las interacciones en estado estacionario. En estos métodos se mide el ligando unido sin perturbar el equilibrio. Un caso típico es realizar la separación en geles de poliacrilamida que han sido equilibrados previamente con ligando libre, o en columnas de cromatografía líquida, también equilibradas previamente con ligando libre. Una vez realizada la corrida, se cuantifican diversas fracciones del gel o del eluido de la columna y se obtiene el perfil. Es posible identificar así fácilmente donde está el pico correspondiente al receptor y descontar los valores basales para obtener la concentración de ligando unido. De esta forma el equilibrio nunca es perturbado y se pueden medir constantes de afinidad muy bajas.

También se han diseñado métodos de estado estacionario o comunes, que utilizan la precipitación del receptor en lugar de la precipitación del ligando libre. Esto se logra de diversas maneras, como por ejemplo, mediante la adsorción del receptor sobre una matriz de intercambio iónico, o mediante su precipitación usando una concentración alta de polietilenglicol, o usando anticuerpos específicos.

Otros métodos más sofisticados utilizan propiedades intrínsecas del ligando, del receptor o del medio, como po-

sibles cambios en la longitud de onda de fluorescencia, en el pH, en la presión parcial de gases, etc. Basta con que pueda determinarse un cambio en algún parámetro después de la unión del ligando al receptor para que se puedan medir sin dificultad Ka y Q.

Bibliografía

Cuatrecasas, P., Hollenberg, M.D. Membrane receptors and hormone action. *Adv. Protein Chem.* 30: 252-450 (1976).

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951).

Munson, P.J., Rodbard, D. LIGANDS: A versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Analyt. Biochem.* 107: 220-239 (1980).

Programa de ajuste de curvas Origin 5.0, de Microcal Software, Inc., Northampton, MA, USA. (<http://www.microcal.com>).

Rodbar, D. (1975) Theory of protein-ligand interaction. En "Methods in Enzymology". O'Malley, B.W. y Hardman J.G., Eds. Academic Press, N.Y. Vol. XXXVI, pág. 1-16.

Sagripanti, J.L., Santa Coloma, T.A., Calvo, J.C. A simple computer program for Scatchard plot analysis of hormone receptor including statistical

- analysis on a low cost desk top calculator. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 34: 45-53 (1984).
- Santa Coloma, T.A., Muschietti, J.P., Charreau, E.H. Sex steroid binding protein from *Bufo arenarum*: Further characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* 85A: 401-405 (1986).
- Santa Coloma, T.A., Bley, M.A., Charreau, E.H.. Improvement on the competitive binding assay for the measurement of cyclic AMP by using ammonium sulphate precipitation. *Biochem. J.* 245: 923-924 (1987).
- Santa Coloma, T.A., Calvo, J.C. The use of computers in the teaching of hormone receptor interactions in the presence of two types of binding sites or negative cooperativity. *Biochemical Education* 16: 90-91 (1988).
- Santa Coloma, T.A., Rossi, R.J., Charreau, E.H. Solid-phase assay for determination of binding parameters of ligand-protein complexes with high-dissociation rates. *Anal. Biochem.* 192: 367-371 (1991).
- Scatchard, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51: 660-672 (1949).
- Weber, G. Energetics of ligand binding to proteins. *Adv. Protein Chem.* 29: 1-83 (1975).
- Wyman, J., Gill, S.J. En "Binding and Linkage, Functional Chemistry of Biological Macromolecules". University Science Books, Mill Valley, CA, USA. (1990).

6. PROTEÍNAS G-HETEROTRIMÉRICAS

María Julia Marinissen y J. Silvio Gutkind

I. Introducción

Tal como se describiera en capítulos anteriores, la transducción de señales extracelulares al interior de la célula se lleva a cabo por la interacción de moléculas regulatorias con receptores anclados en la membrana que presentan dominios en la superficie celular externa. La familia de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas comprende de mas de mil diferentes clases de proteínas integrales de membrana. Estos receptores son capaces de recibir estímulos tales como la luz, neurotransmisores, factores de crecimiento, hormonas, sustancias relacionadas con el gusto, el olfato y ciertos fosfolípidos. Su función es convertir estas señales externas en señales intracelulares específicas.

II. Mecanismo de activación de las proteínas G heterotriméricas

Las proteínas G heterotriméricas, referidas aquí simplemente como proteínas G, son estructuralmente diferentes de las proteínas G monoméricas involucradas en la transducción de señales originadas en receptores tirosina-quinasa y en diversos procesos típicos de células eucariotas que serán discutidos en capítulos posteriores. De acuerdo a datos basados en la estructura cristalina,

Las proteínas G son parte de una superfamilia de proteínas que unen e hidrolizan GTP. Este grupo incluye las proteínas G heterotriméricas, el factor de elongación Ef-Tu (involucrado en la síntesis de proteínas), las proteínas G de bajo peso molecular tipo Ras y por último, grandes proteínas asociadas al ci-