

ANÁLISIS MATEMÁTICO DETALLADO DEL CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE PARTICIÓN EN LOS EXPERIMENTOS DE UNIÓN DE PEPTIDO-NBD A VESICULAS LIPÍDICAS.

Bibliografía: **Gazit, E. y Shai, Y.** (1993). *Biochemistry*. 32: 12363-12371.

Se recoge como ejemplo los datos reales de uno de los experimentos de unión del péptido **ShB-21C-NBD** a vesículas unilamelares pequeñas de **PA**.

A alícuotas de péptido **ShB-21C-NBD** de concentración 0.1 mM se le añaden vesículas unilamelares pequeñas (SUV) de **PA** para conseguir distintas relaciones lípido-péptido y se mide la intensidad de fluorescencia inmediatamente después de la mezcla. La longitud de onda de excitación es de 470 nm y la de emisión de 530 nm. Se corrige la fluorescencia de la mezcla **ShB-21C-NBD/PA** restando la dispersión de la luz producida por la mezcla **ShB-21C/PA**. Estos datos iniciales se recogen en la **Tabla 1**.

Tabla 1: intensidades de fluorescencia vs relación molar lípido/péptido.

PA/ péptido	IF _{530nm} de ShB-21C- NBD---PA	IF _{530nm} de ShB-21C-- PA	IF _{530nm}
0.00	4.0	0.8	3.2
1.38	5.63	0.81	4.82
2.77	6.8	0.8	6.0
5.55	8.3	0.9	7.4
19.45	11.5	1.0	10.5
33.36	13.3	1.1	12.2
47.26	14.3	1.2	13.1
75.08	15.4	1.2	14.2
103.99	16.0	1.2	14.8
172.40	17.3	1.3	16.0
311.60	19.0	1.4	17.6
450.94	20.0	1.4	18.6
729.63	21.3	1.45	19.8
1426.21	22.7	1.6	21.1
2061.63	23.4	1.7	21.7
3516.40	24.0	2.0	22.0
6304.37	24.8	2.4	22.4
11878.33	24.5	3.2	21.3

La representación de estos datos se recoge en la **Fig. 1**:

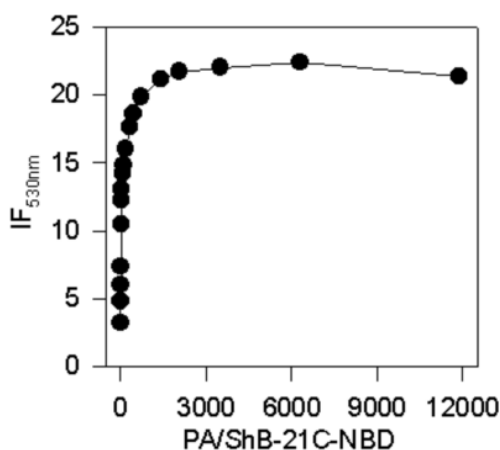


Fig. 1: Curva de unión del péptido ShB-21C-NBD a SUV de PA

Las constantes de unión se analizan como un equilibrio de partición de acuerdo con la ecuación:

$$X_b = K_p \cdot C_f$$

donde **X_b** se define como la relación molar del péptido unido (**C_b**) por lípido total (**CL**), **K_p** es el **coeficiente de partición**, y **C_f** representa la **concentración de péptido libre** (no

unido) en el equilibrio. Para calcular f_b es necesario conocer primero f_b (es decir, la fracción del péptido unido a membrana), que se calcula utilizando la ecuación:

$$f_b = \frac{(F - F_0)}{(F_\infty - F_0)}$$

en la que $F_?$ (la señal de fluorescencia que se obtendría si todo el péptido se une al lípido), que podría calcularse ajustando los datos los datos de la **Fig. 1** a una ecuación hiperbólica similar a la que explica la cinética michaeliana o extrapolando a partir de la representación doble inversa de F (intensidad de la fluorescencia observada, es decir, IF_{530nm} recogido en la **Tabla 1**) y de la CL (concentración total de lípido); equivalente a la representación de Lineweaver-Burk.

Tabla 2: Datos para la representación de dobles inversos.

F = IF_{530nm}	C_L	$1/F$	$1/C_L$
3.2	0.0000	0.3125	$+\infty$
4.82	1.2470e-7	0.2075	8019246.19
6.0	2.4870e-7	0.1667	4020908.72
7.4	4.9500e-7	0.1351	2020202.02
10.5	1.7295e-6	0.0952	578201.79
12.2	2.9580e-6	0.0820	338066.26
13.1	4.1806e-6	0.0763	239200.11
14.2	6.6074e-6	0.0704	151345.46
14.8	9.1090e-6	0.0676	109781.53
16.0	1.4918e-5	0.0625	67033.11
17.6	2.6901e-5	0.0568	37173.33
18.6	3.8835e-5	0.0538	25749.96
19.85	6.2537e-5	0.0504	15990.53
21.1	1.2080e-4	0.0474	8278.14
21.7	1.7260e-4	0.0461	5793.74
22.0	2.8768e-4	0.0455	3476.08
22.4	4.9368e-4	0.0446	2025.60
21.3	8.5524e-4	0.0469	1169.26

Teniendo que para los valores pequeños de CL , pequeños errores de F conducen a grandes errores de $1/F$, lo que supondría grandes errores de $F_?$, despreciamos los valores más pequeños de la **Tabla 2**. El valor de la ordenada en el origen de la ecuación de la recta a la que se ajustan estos puntos será el inverso de $F_?$.

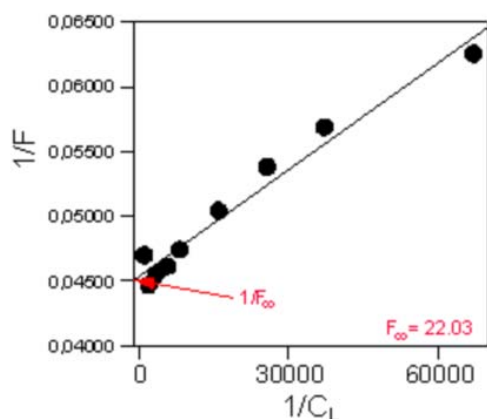


Fig. 2: Representación de dobles inversos para calcular $F_?$

Conociendo $F_?$ podremos calcular la fracción del péptido unido a membrana (f_b):

$$f_b = \frac{(F - 3.2)}{(22.03 - 3.2)}$$

Los datos obtenidos para f_b aparecen en la **Tabla 3**. En ella también aparecen los datos de

concentración de péptido total (Ct) (corregidos para el volumen ligeramente distinto en cada relación lípido-péptido). Multiplicando **fb** por la concentración de péptido total obtenemos la **concentración de péptido unido (Cb)**. La **concentración de péptido libre (Cf) = (Ct)-(Cb)**. Asumiendo que los péptidos se unen sólo a la hemicapa externa de los liposomas (60% del lípido total) debemos corregir el valor de **xb** como:

$$X_b^* = X_b / 0,6$$

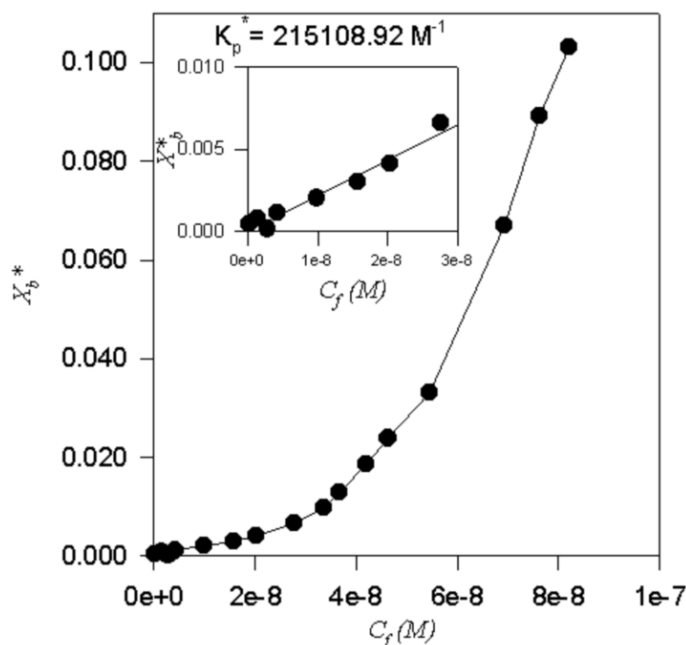
por lo que la ecuación de partición se convierte en:

$$X_b^* = K_p^* \cdot C_f$$

En la **Tabla 3** se recogen todos estos parámetros para el ejemplo elegido:

f_b	C_t	$C_b = f_b \times C_t$	$C_f = C_t - C_b$	$C_L \times 0,6$	$X_b^* = C_b / C_L \times 0,6$
0.0000	9.0000e-8	0.0000	9.0000e-8	0.0000	---
0.0861	8.9770e-8	7.7248e-9	8.2045e-8	7.4820e-8	0.1032
0.1487	8.9550e-8	1.3319e-8	7.6231e-8	1.4922e-7	0.0893
0.2231	8.9100e-8	1.9878e-8	6.9222e-8	2.9700e-7	0.0669
0.3878	8.8880e-8	3.4464e-8	5.4416e-8	1.0377e-6	0.0332
0.4781	8.8670e-8	4.2390e-8	4.6280e-8	1.7748e-6	0.0239
0.5259	8.8450e-8	4.6513e-8	4.1937e-8	2.5084e-6	0.0185
0.5843	8.8000e-8	5.1418e-8	3.6582e-8	3.9644e-6	0.0130
0.6162	8.7590e-8	5.3970e-8	3.3620e-8	5.4654e-6	9.8749e-3
0.6799	8.6530e-8	5.8833e-8	2.7697e-8	8.9508e-6	6.5729e-3
0.7649	8.6330e-8	6.6034e-8	2.0296e-8	1.6141e-5	4.0912e-3
0.8180	8.6120e-8	7.0448e-8	1.5672e-8	2.3301e-5	3.0234e-3
0.8844	8.5710e-8	7.5803e-8	9.9068e-9	3.7522e-5	2.0202e-3
0.9508	8.4700e-8	8.0534e-8	4.1662e-9	7.2480e-5	1.1111e-3
0.9827	8.3720e-8	8.2270e-8	1.4497e-9	1.0356e-4	7.9442e-4
0.9986	8.1810e-8	8.1697e-8	1.1299e-10	1.7261e-4	4.7331e-4
1.0199	7.8260e-8	7.9815e-8	-1.5547e-9	2.9621e-4	2.6945e-4
0.9614	7.2000e-8	6.9223e-8	2.7766e-9	5.1314e-4	1.3490e-4

La representación X_b^* versus C_f es lo que comunmente se conoce como isoterma de unión, y que queda representado en la **Fig. 3**.



El tramo inicial de la isoterma de unión se puede ajustar a una recta que pase por el origen, coincide precisamente con el tramo final o "plato" de la curva de unión (**Fig. 1**). La pendiente de esta recta será K_p^* que para el ejemplo tomado tiene un valor de 249.674, 03 M^{-1} .