

Enzimas con sitios múltiples y alostéricos

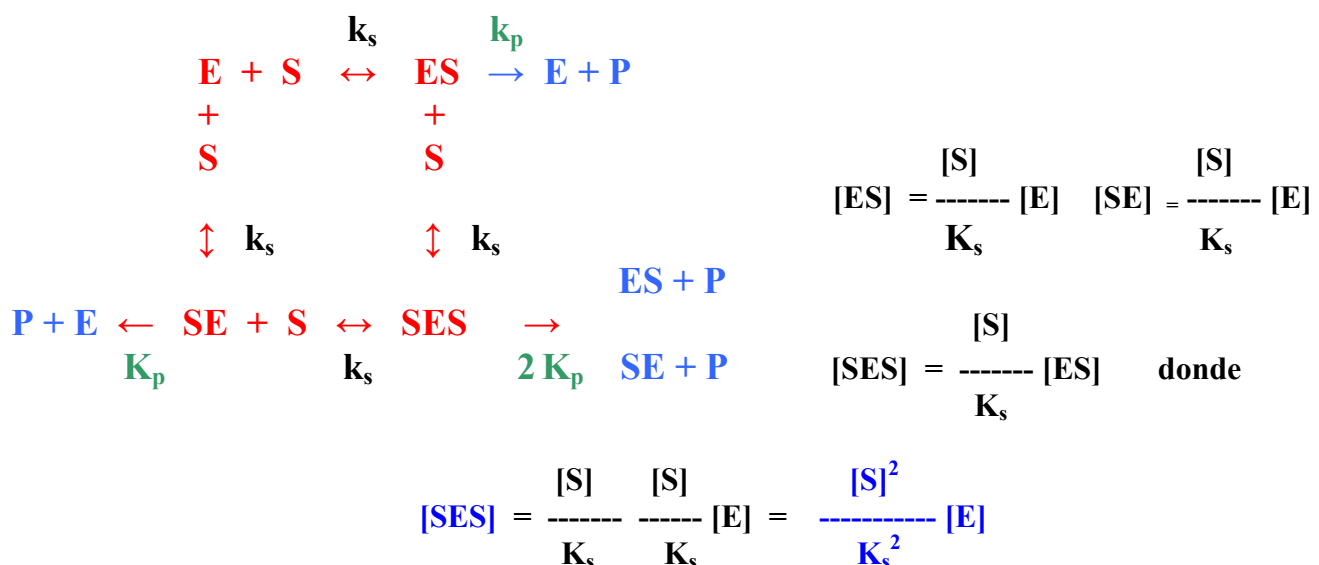
Muchos enzimas son oligómeros compuestos de distintas subunidades de monómeros. A menudo, las subunidades son idénticas, teniendo cada una un sitio catalítico. Si los sitios son idénticos y completamente independientes unos de otros, entonces la presencia de sustrato en un sitio no tendrá efecto ni sobre las propiedades de unión de los sitios vacantes ni sobre las actividades catalíticas de los otros sitios ocupados. Si el enzima es un tetrámero, entonces para cualquier concentración fija de sustrato, la $[E]_t$ se distribuirá entre cinco especies diferentes: E, ES, ES_2 , ES_3 , y ES_4 . Aunque como veremos, la curva de unión de S o la curva de velocidad será la hipérbola habitual. Es decir, n moléculas de un enzima con un sitio se comportan idénticamente igual que una molécula de un enzima de n sitios. Aunque no hay interacciones claras entre los sitios, los monómeros aislados, a menudo, son completamente inactivos. La asociación a un tetrámero puede producir pequeños cambios en la estructura terciaria de cada uno de los monómeros, dando lugar a la formación del sitio de unión al sustrato, o a la yuxtaposición adecuada del sitio de unión al sustrato y de los grupos catalíticos. La oligomerización puede también contribuir a la estabilidad de enzimas “in vivo”.

Si la presencia de sustrato en uno de los sitios influye sobre la unión del sustrato a los sitios vacantes o sobre la velocidad de formación del producto en otros sitios ocupados, entonces tenemos una situación en la que el propio sustrato actúa como modificador o efector produciendo la activación por el sustrato (incluyendo respuestas sigmoideas de v frente a [S]) o la inhibición por el sustrato.

Sitios no cooperativos

Examinemos primero un modelo de un dímero (dos sitios) en el que ambos sitios son idénticos e independientes. La secuencia de unión al sustrato es la siguiente.

Dímero



La velocidad viene dada por:

$$v = K_p [ES] + K_p [SE] + 2K_p [SES]$$

Dividiendo por $[E]_t$

$$\frac{v}{[E]_t} = \frac{K_p [ES] + K_p [SE] + 2 K_p [SES]}{[E] + [ES] + [SE] + [SES]}; \quad \text{Sustituyendo los valores de los complejos y eliminando [E]}$$

$$\frac{v}{[E]_t} = \frac{K_p \frac{[S]}{K_s} + K_p \frac{[S]}{K_s} + 2 K_p \frac{[S]^2}{K_s^2}}{1 + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{K_s^2}} = \frac{2K_p \frac{[S]}{K_s} + 2K_p \frac{[S]^2}{K_s^2}}{1 + \frac{2[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{K_s^2}}$$

Sacar $2K_p$ factor común en el numerador del 2º miembro y pasarlo al denominador del 1º miembro.

La V_{max} se observará cuando ambos sitios estén ocupados.
Por tanto, podemos designar a $2 K_p [E]_t$ como V_{max}

$$\frac{V}{V_{max}} = \frac{\frac{[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{K_s^2}}{1 + \frac{2[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{K_s^2}};$$

Tetrámero

$$[ES] = [E] [S] / K_s = 4 [E] [S] / k_s$$

$$[ES_2] = [ES] [S] / K_s = 3 / 2 [ES] [S] / k_s = 6 [E] [S]^2 / k_s^2$$

$$[ES_3] = [ES_2] [S] / K_s = 2 / 3 [ES_2] [S] / k_s = 4 [E] [S]^3 / k_s^3$$

$$[ES_4] = [ES_3] [S] / K_s = 1 / 4 [ES_3] [S] / k_s = [E] [S]^4 / k_s^4$$

La ecuación de velocidad viene dada por

$$V = K_p [ES] + 2 K_p [ES_2] + 3 K_p [ES_3] + 4 K_p [ES_4] \quad \text{dividiendo por enzima total}$$

$$\frac{V}{[E]_t} = \frac{K_p [ES] + 2 K_p [ES_2] + 3 K_p [ES_3] + 4 K_p [ES_4]}{[E] + [ES] + [ES_2] + [ES_3] + [ES_4]}$$

Sustituyendo los valores de los complejos, eliminando [E] e introduciendo los factores estadísticos (números entre paréntesis)

$$\frac{V}{[E]_t} = \frac{(4) K_p \frac{[S]}{K_s} + (6) 2 K_p \frac{[S]^2}{K_s^2} + (4) 3 K_p \frac{[S]^3}{K_s^3} + (1) 4 K_p \frac{[S]^4}{K_s^4}}{[E] + 4 \frac{[S]}{K_s} + 6 \frac{[S]^2}{K_s^2} + 4 \frac{[S]^3}{K_s^3} + \frac{[S]^4}{K_s^4}}$$

Sacar $4K_p$ factor común en el numerador del 2º miembro y pasarlo al denominador del 1º miembro.

La V_{max} se observará cuando todos los sitios estén ocupados.

Por tanto, podemos designar a $4 K_p [E]_t$ como V_{max}

$$\frac{V}{V_{max}} = \frac{\frac{[S]}{k_s} + \frac{3 [S]^2}{k_s^2} + \frac{3 [S]^3}{k_s^3} + \frac{[S]^4}{k_s^4}}{1 + \frac{4 [S]}{k_s} + \frac{6 [S]^2}{k_s^2} + \frac{4 [S]^3}{k_s^3} + \frac{[S]^4}{k_s^4}}$$

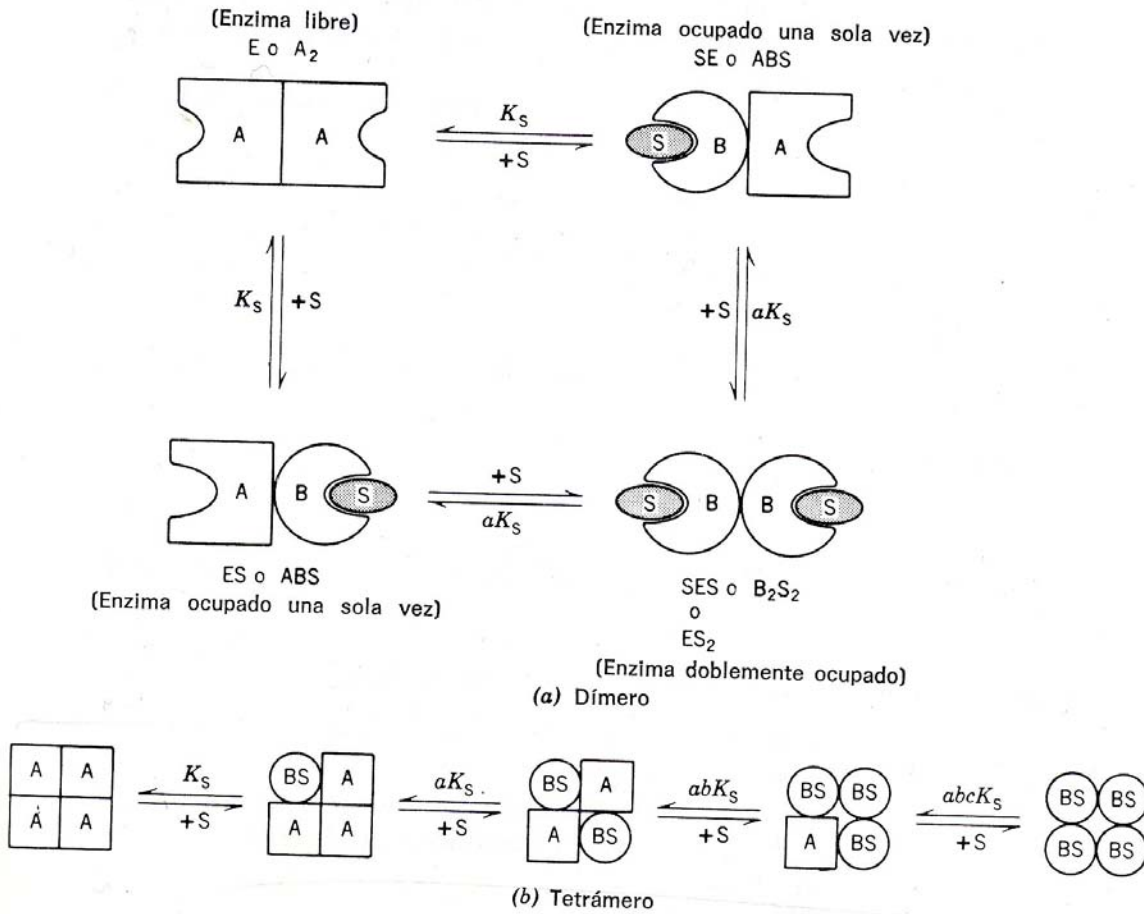
$4 K_p [E]_t$ se toma como V_{max}

$$\frac{V}{V_{max}} = \frac{\frac{[S]}{K_s} (1 + \frac{[S]}{K_s})^{n-1}}{(1 + \frac{[S]}{K_s})^n};$$

En general, la ecuación de velocidad para un enzima con n sitios idénticos

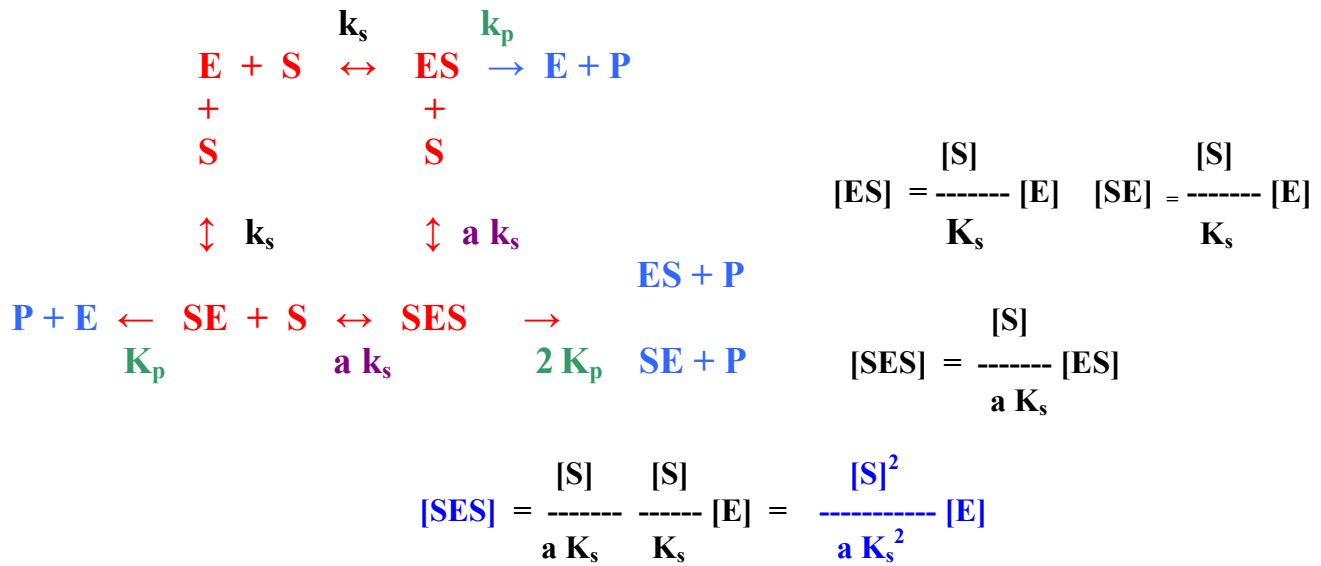
Enzimas alostéricos – Unión cooperativa

Modelo sencillo de interacción secuencial



Modelo de interacción secuencial de enzimas alostéricos. A medida que cada sitio es ocupado, la subunidad que posee el sitio experimenta un cambio de la conformación A a la conformación B. Por lo tanto, se establecen nuevas interacciones entre las subunidades, y las afinidades de los sitios vacantes varían. K_s representa una constante de disociación. Así, si las afinidades de los sitios vacantes aumentan, a, b y c (los factores de interacción) son < 1 y observamos una cooperatividad positiva (curva de velocidad sigmoidea). El modelo de interacción secuencial también proporciona una cooperatividad negativa ($a, b, y c$ son > 1). (a) Modelo de dímero. Se muestran las dos formas en las que S se dispone para formar una especie ocupada una sola vez. (b) Modelo de tetramero. Para simplificar, sólo se muestra una de las disposiciones de cada una de las especies ocupadas.

Dímero



Cuando un sitio es ocupado, la constante de disociación del sitio vacante cambia a $a K_s$, donde $a < 1$. La ecuación de velocidad es:

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{\frac{[\text{S}]}{K_s} + \frac{[\text{S}]^2}{a K_s^2}}{1 + \frac{2 [\text{S}]}{K_s} + \frac{[\text{S}]^2}{a K_s^2}};$$

Si consideramos un tetrámero alostérico:

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{\frac{[\text{S}]}{k_s} + \frac{3 [\text{S}]^2}{a k_s^2} + \frac{3 [\text{S}]^3}{a^2 b k_s^3} + \frac{[\text{S}]^4}{a^3 b^2 c k_s^4}}{1 + \frac{4 [\text{S}]}{k_s} + \frac{6 [\text{S}]^2}{a k_s^2} + \frac{4 [\text{S}]^3}{a^2 b k_s^3} + \frac{[\text{S}]^4}{a^3 b^2 c k_s^4}}$$

$4 K_p [\text{E}]_t$ se toma como V_{\max}

Ecuación de velocidad simplificada para enzimas alostéricos – Ecuación de Hill

Si la cooperatividad en la unión del sustrato está muy marcada (es decir, los factores $a, b, c,$ etc. son números muy pequeños), entonces las concentraciones de todos los complejos enzima-sustrato que contienen menos de n moléculas de sustrato serán insignificantes para cualquier $[S]$ que sea apreciable comparada con K_s . En estas condiciones, la ecuación de velocidad estará dominada por el término $[S]^n$. La ecuación de velocidad para el enzima de cuatro sitios se reduce a:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{\frac{[S]^4}{a^3 b^2 c K_s^4}}{1 + \frac{[S]^4}{a^3 b^2 c K_s^4}} = \frac{\frac{[S]^4}{K'}}{1 + \frac{[S]^4}{K'}} = \frac{[S]^n}{K' + [S]^n} \quad \text{Donde } K' = a^3 b^2 c K_s^4$$

Ecuación de Hill

n = número de sitios de unión al sustrato por molécula de enzima

K' = constante que abarca a los factores de interacción $a, b, c,$ etc., y a la constante intrínseca de disociación $K_s = K_s^n (a^{n-1} b^{n-2} c^{n-3} \dots z^1)$.

La constante K' en la ecuación anterior ya no es igual a la concentración de sustrato que produce una velocidad semimáxima excepto cuando $n = 1$.

$$\text{Cuando } v = 0.5 V_{\max}; \quad 0.5 K' + 0.5 [S]^{n_{0.5}} = [S]^{n_{0.5}}$$

$$[S]_{0.5}^n = K' \quad \text{ó} \quad K' = [S]^{n_{0.5}} \quad n \log [S]_{0.5} = \log K'$$

Forma logarítmica de la ecuación de Hill – Representación de Hill

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{[S]^n}{K' + [S]^n}; \quad V_{\max} [S]^n = V K' + V [S]^n; \quad [S]^n (V_{\max} - V) = V K'$$

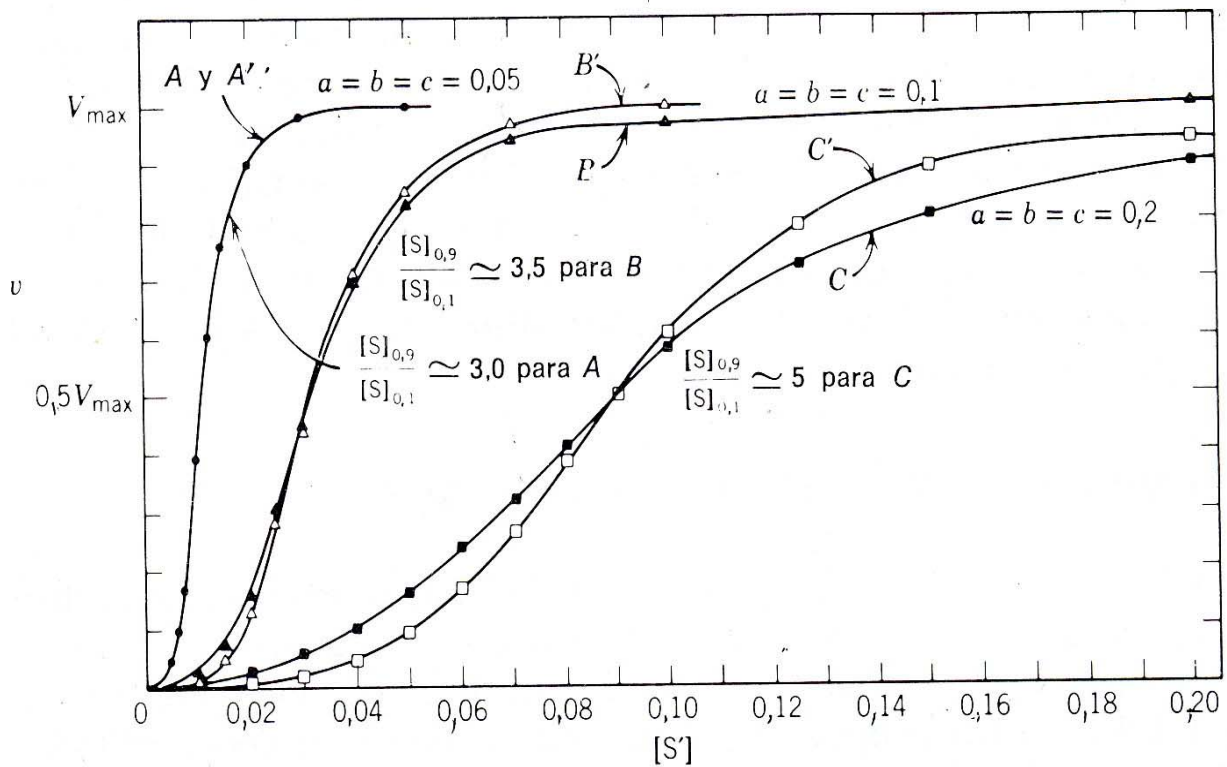
$$\frac{[S]^n (V_{\max} - V)}{V} = K'; \quad n \log [S] + \log \frac{V_{\max} - V}{V} = \log K';$$

$$\log \frac{V_{\max} - V}{V} = \log K' - n \log [S] \quad \text{Cambiamos de signo} \quad \log \frac{V}{V_{\max} - V} = n \log [S] - \log K'$$

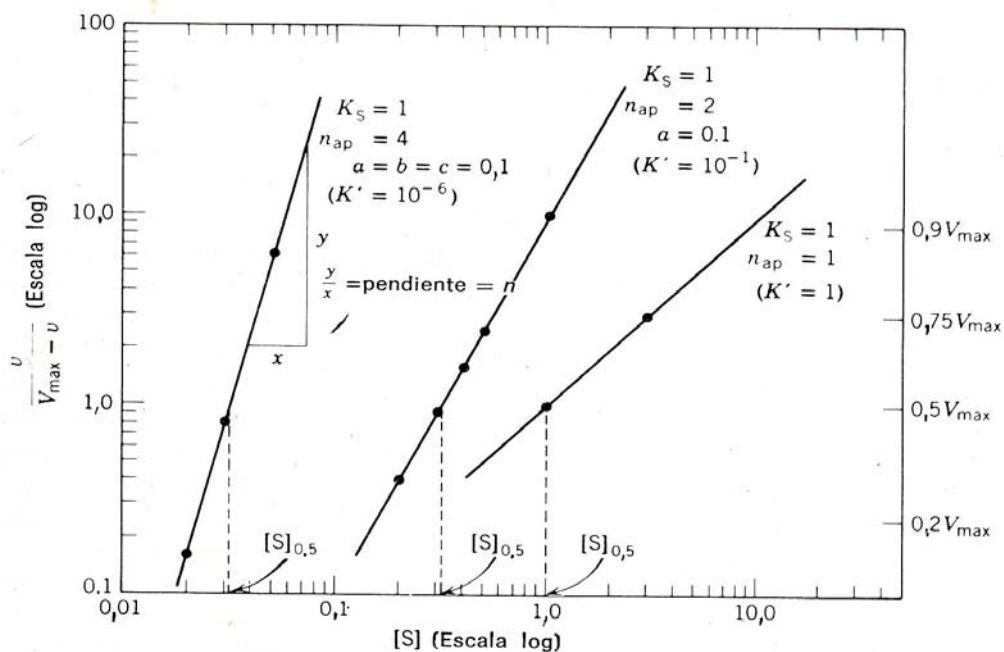
Pendiente = n

Cuando $X = 0$ Entonces $Y = -\log K'$

Cuando $Y = 0$ Entonces $X = \log K' / n$



Efecto de los factores de interacción sobre la sigmoidicidad y la $[S]_{0.5}$ de un enzima con cuatro sitios. Curva A: $a = b = c = 0.05$. Curva B: $a = b = c = 0.1$. Curva C: $a = b = c = 0.2$. Las curvas A, B y C se calcularon utilizando la ecuación de velocidad completa. Las curvas A', B' y C' se calcularon a partir de la correspondiente ecuación de Hill (es decir sólo se tuvieron en cuenta los términos correspondientes a E y a ES_4



Representación de Hill para enzimas con diferentes valores de n y la misma constante intrínseca K_s