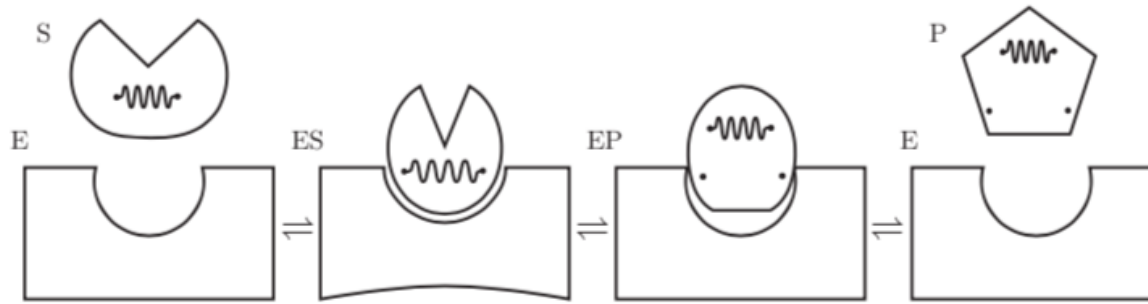
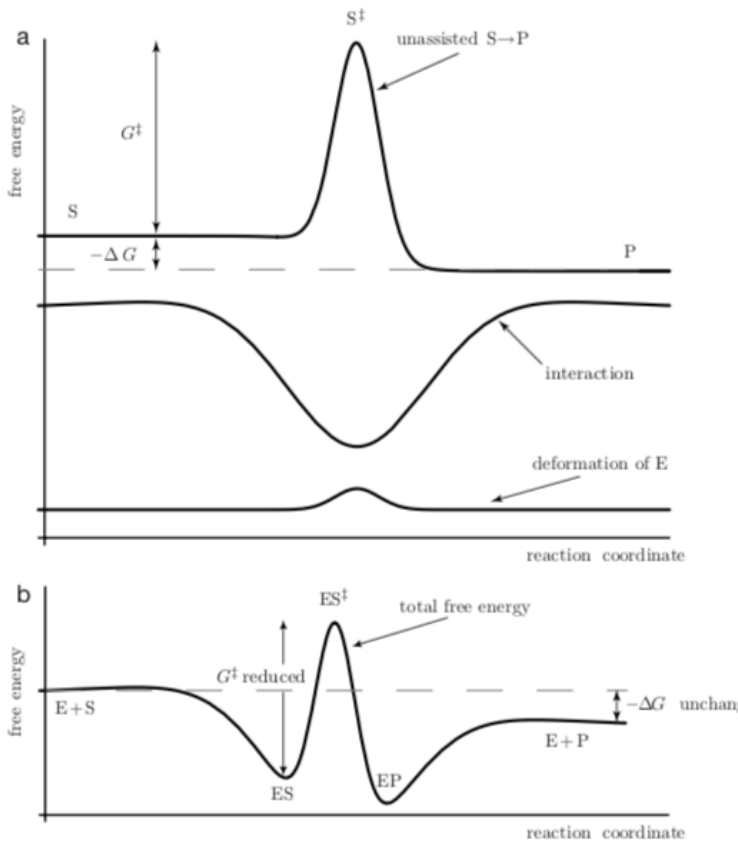


Reacciones con enzimas (libro P. Nelson)

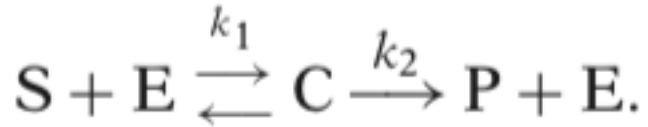


S: sustrato
E: enzima
P: producto



(a) Esquema de paisajes de energía libre que se pueden asociar a la figura de lo que hace la enzima. Curva superior: el sustrato S puede convertirse espontáneamente en P solo superando una gran barrera de activación G^\ddagger . Curva media: la energía libre de interacción entre el sustrato y el producto incluye una gran energía libre de unión (además del costo entrópico de alinear el sustrato adecuadamente en relación a la enzima que genera 2 máximos locales a cada lado del mínimo). Curva inferior: la energía libre de unión puede compensarse en parte por una deformación de la enzima al unirse, pero aún así el efecto neto de la enzima es reducir la barrera G^\ddagger . (b) Paisaje imaginado de energía libre neta obtenido sumando las tres curvas en (a). La enzima ha reducido G^\ddagger , pero no puede cambiar ΔG .

Reacciones con enzimas



Michaelis-Menten

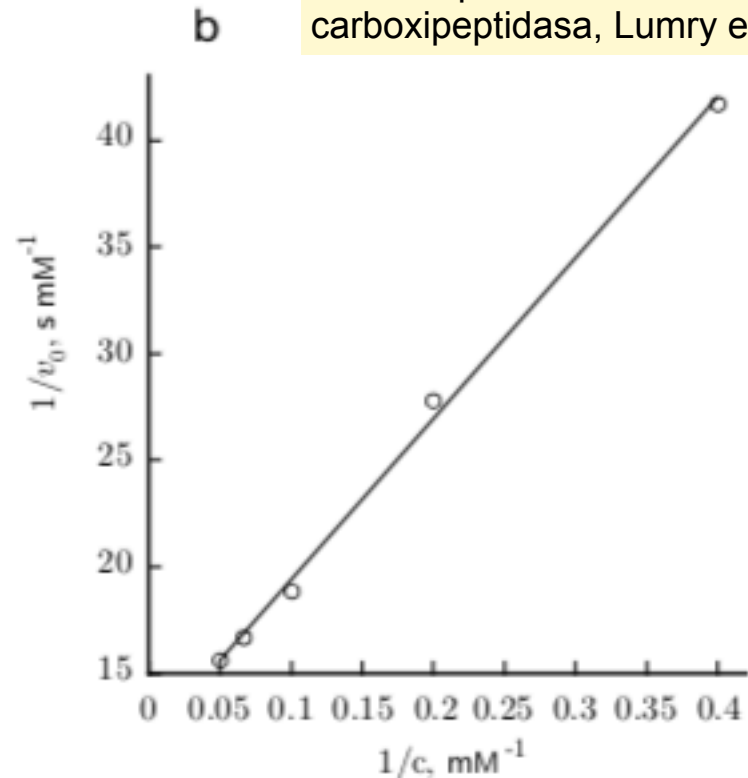
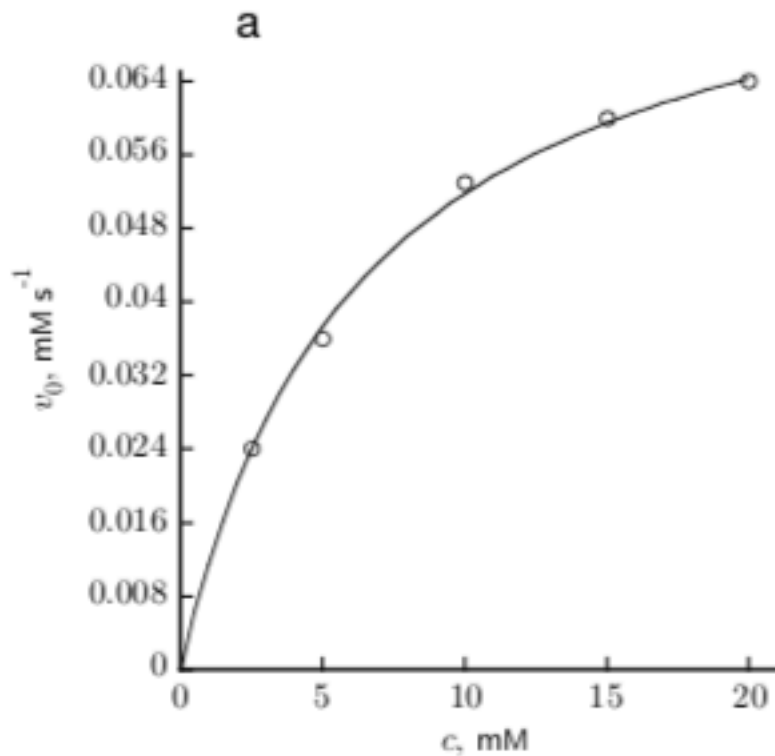
$$v = v_{\max} \frac{c_S}{K_M + c_S} \quad \text{Michaelis-Menten rule}$$

$$K_M = k_{-1}/k_1; \quad K_M = (k_2 + k_{-1})/k_1$$

Gráfico de Lineweaver-Burk

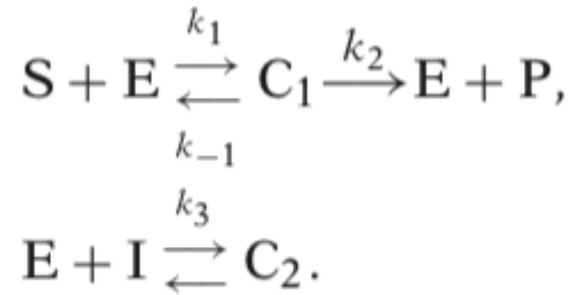
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} \left(1 + \frac{K_M}{c_S} \right)$$

Datos experimentales de carboxipeptidasa, Lumry et al, 1951

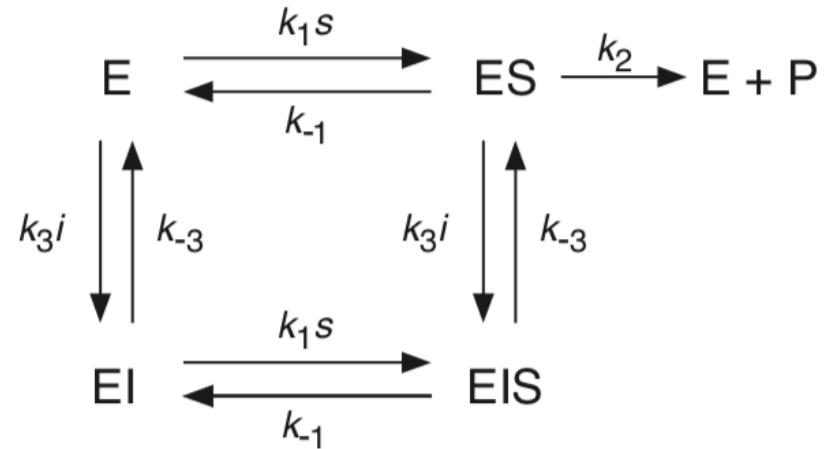


Reacciones con enzimas, más modelos

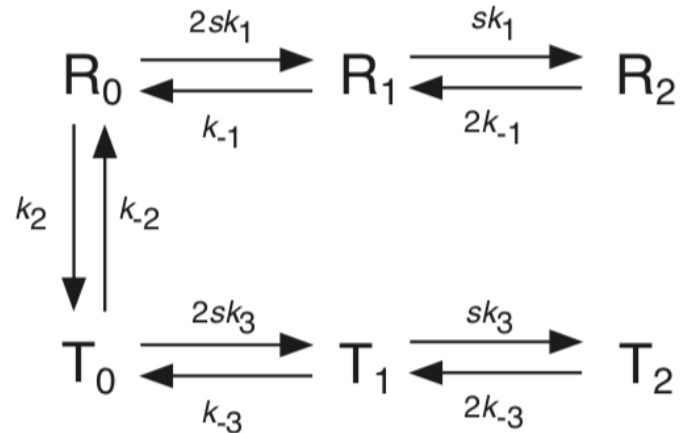
Inhibición competitiva



Inhibición por alosterismo

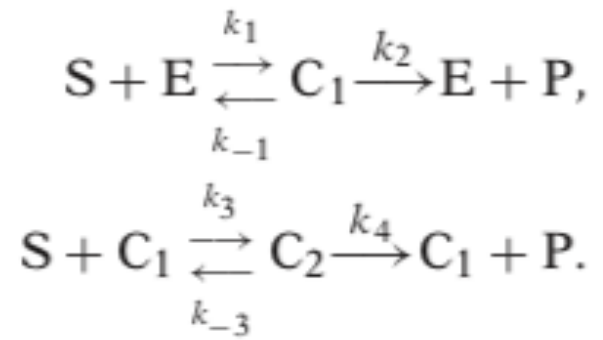


MWC

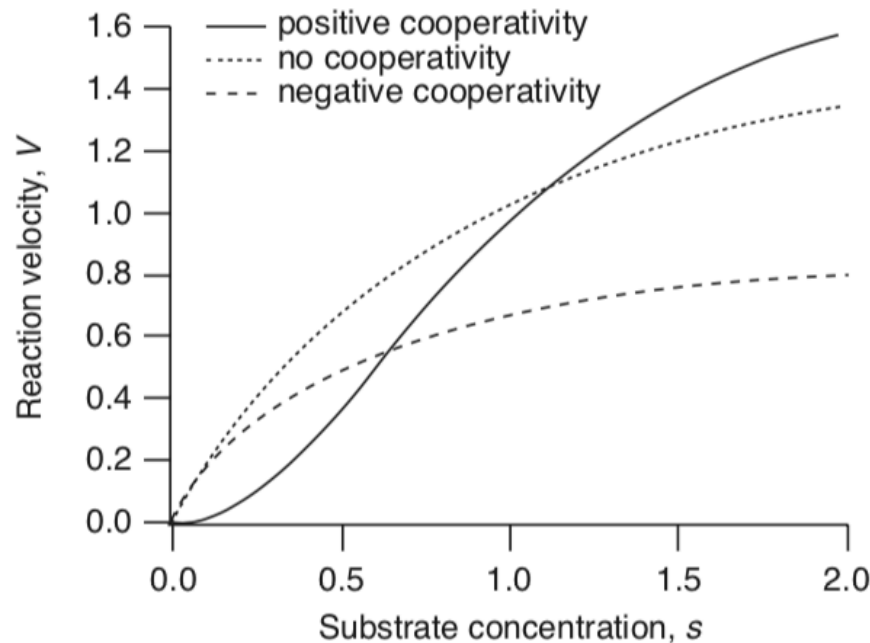


Cooperatividad

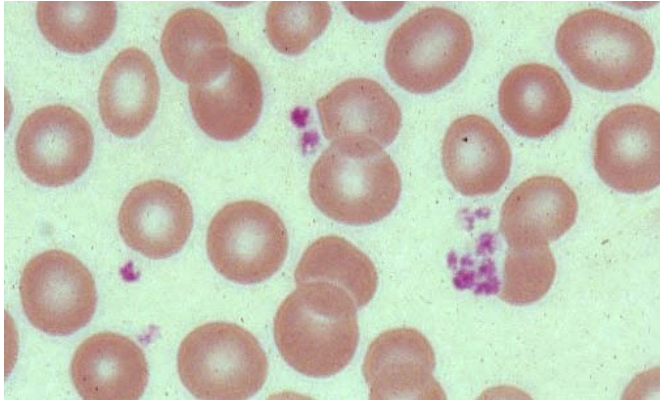
Es como MM si los sitios de ligadura actúan independientemente.
Coop+ si $k_3 \gg k_1$



Comparación de velocidad de generación de P

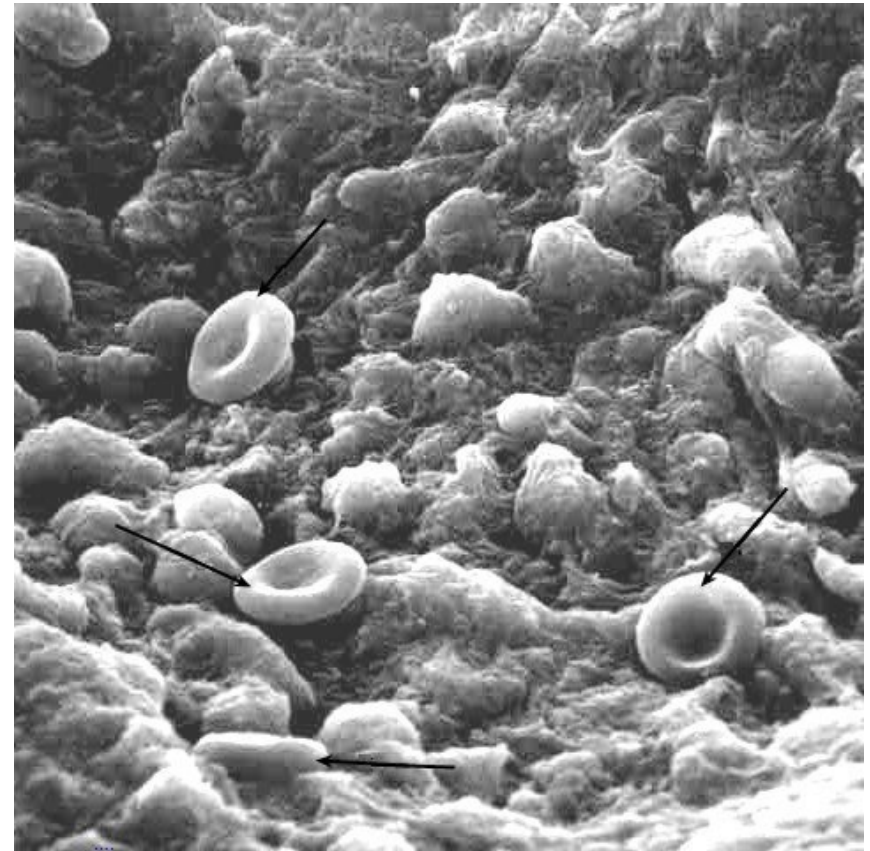


Ejemplo típico de cooperatividad: hemoglobina



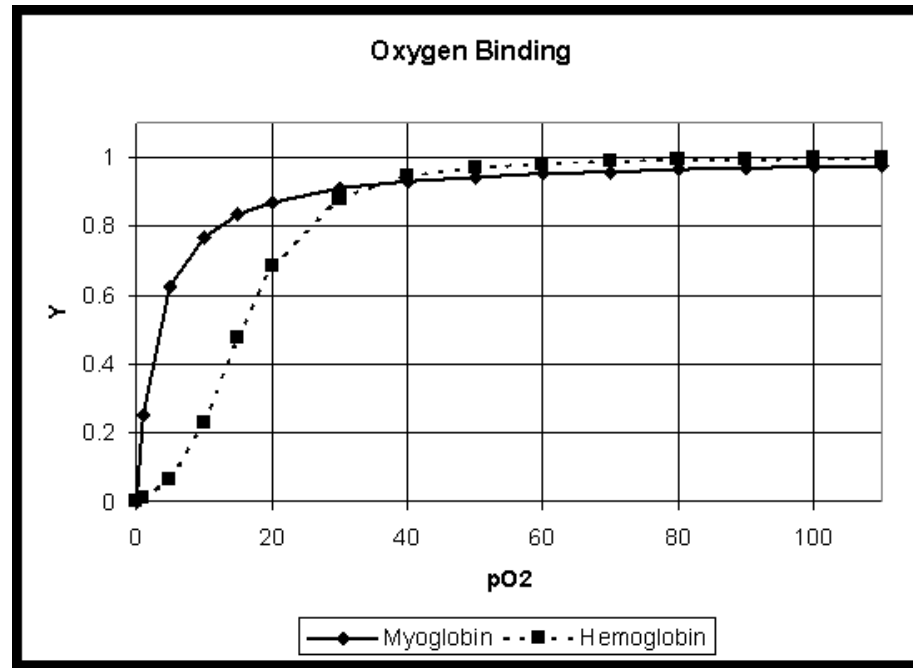
El transporte de oxígeno en el cuerpo es llevado a cabo por el torrente sanguíneo y por los glóbulos rojos o eritrocitos. A 37C 100 ml disuelven 0.3ml de O₂; 100 ml de sangre disuelven 20.4ml.

Los eritrocitos derivan su color rojizo de la proteína llamada hemoglobina. Tienen una forma bicóncava. Esto hace que su superficie sea relativamente grande lo que facilita la difusión del O₂ y del CO₂ hacia adentro y fuera de la célula.



Acarreo del oxígeno:

La hemoglobina liga oxígeno en los pulmones, liberándolo en los tejidos donde puede ser recapturado por la mioglobina. Ambas son proteínas. Comparando las curvas de saturación de la mioglobina y de la hemoglobina se entiende cómo esto puede ser posible.

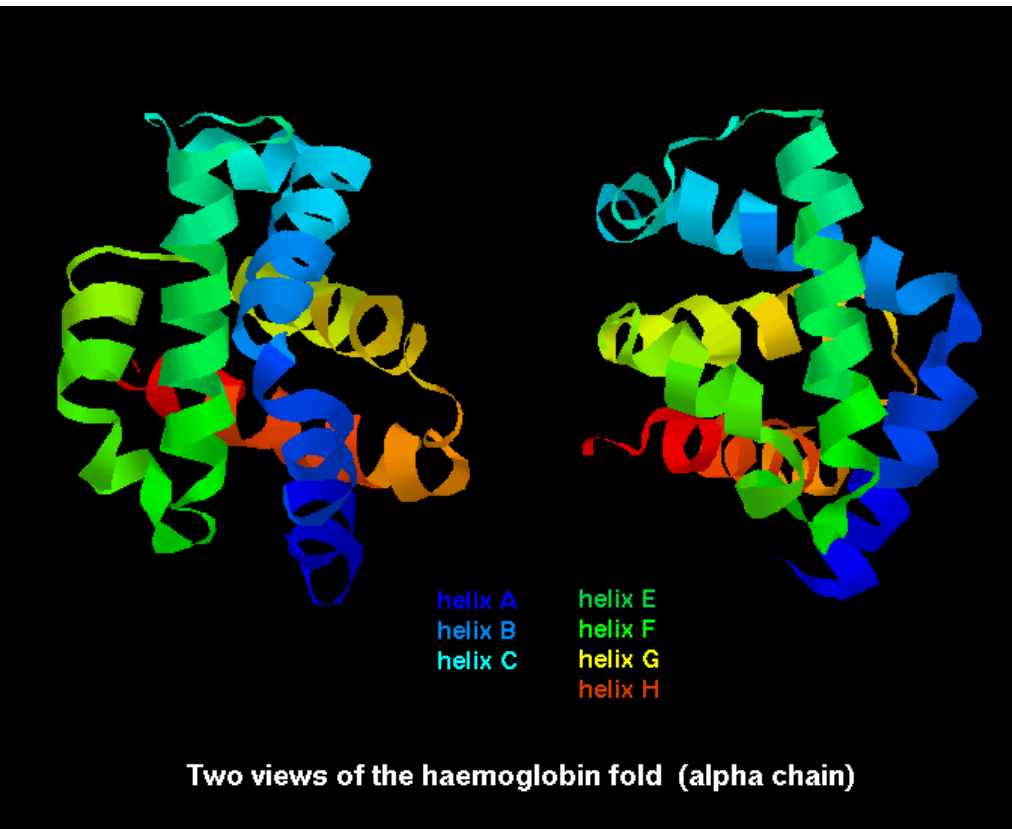


From <http://stingray.bio.cmu.edu/~web/bc/Lec/Lec12/lec12.html>

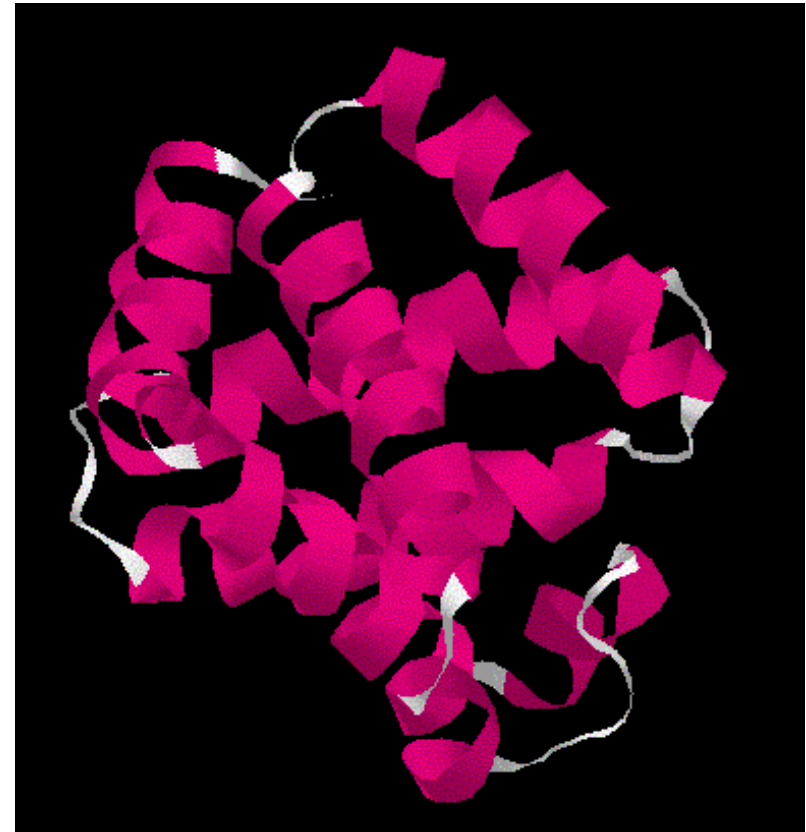
La hemoglobina se satura a presiones parciales de oxígeno muy altas y libera cantidades significativas de oxígeno a presiones que no son extremadamente bajas. En cambio, la mioglobina, a presiones tan bajas como los 20 mmHg, todavía sigue casi totalmente saturada. 20mmHg es la presión parcial de oxígeno en los capilares musculares. La presión arterial es de 100mmHg. La hemoglobina está saturada en un 50% a 26mmHg mientras que el 50% de saturación de la mioglobina ocurre a 1mmHg.

La curva sigmoidea es consecuencia de un comportamiento cooperativo que involucra más de un sitio de ligadura.

Mientras que la mioglobina existe como un monómero, la hemoglobina es un tetrámero donde cada una de sus subunidades se pliegan de un modo similar a la mioglobina.



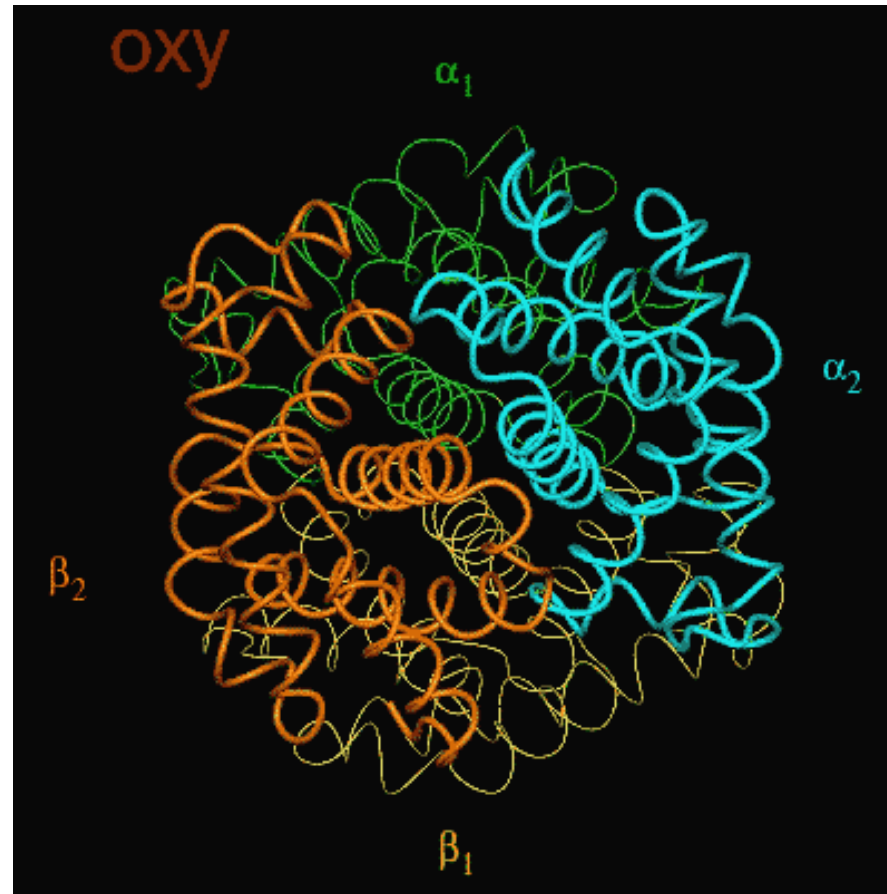
Hemoglobina



Mioglobina

Modelo MWC de la hemoglobina

Cada subunidad de la hemoglobina puede existir en dos conformaciones: un estado **tenso (T)** y un estado **relajado (R)**. El estado **T** corresponde a la estructura cuaternaria de la deoxihemoglobina. Cuando una subunidad de la hemoglobina liga una molécula de oxígeno, pasa a estar preferentemente en el estado **R**. De este modo aumenta la afinidad para ligar oxígeno de las otras subunidades que aún no lo han ligado.

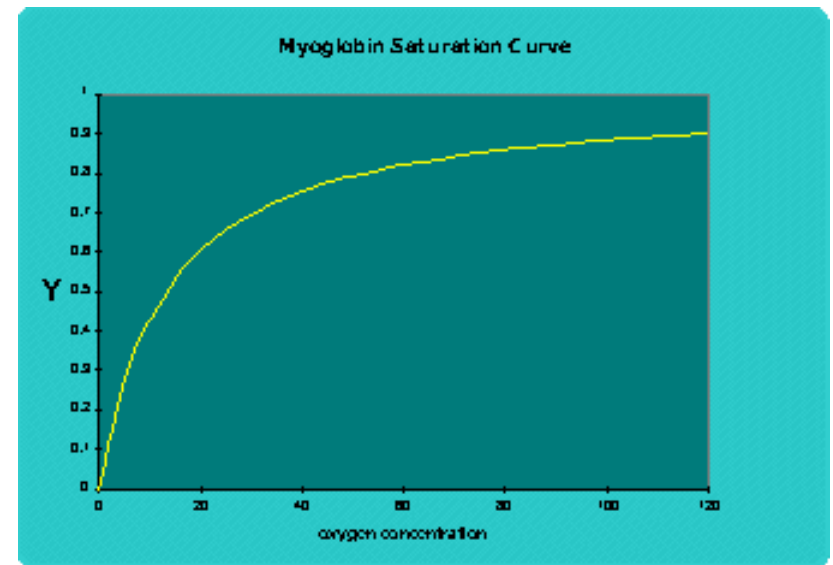
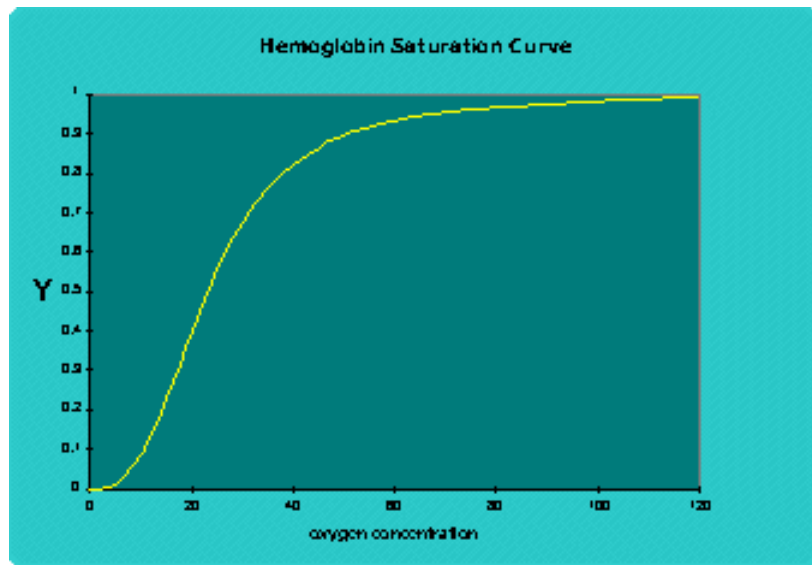


Este cambio conformacional es una muestra de **alosterismo**.

Se ve también que el proceso de ligar oxígeno es cooperativo, ya que la afinidad por el oxígeno aumenta cuando la proteína ya ligó alguno. La afinidad para ligar el cuarto oxígeno es 300 veces mayor que para ligar el primero.

Esto no se puede explicar si se supone que las cuatro subunidades actúan en forma independiente, cada una con una afinidad distinta, dado que en ese caso, el oxígeno se ligaría primero al sitio de mayor afinidad y las ligaduras sucesivas ocurrirían con menor probabilidad. Esto implicaría un decrecimiento en lugar de un crecimiento de la afinidad con ligaduras sucesivas.

La cooperatividad (positiva) se traduce en una curva de disociación del oxígeno (un gráfico del nivel de saturación de los sitios de ligadura del oxígeno como función de la presión parcial de oxígeno) que es sigmoidea en lugar de hiperbólica.



Un mecanismo de ligadura cooperativa es más eficiente para poder recolectar oxígeno cuando su concentración es alta. Por otro lado, la hemoglobina, debido a su cooperatividad, va a liberar oxígeno cuando la concentración no sea demasiado baja, y eso es lo que necesitan los músculos, ya que sólo pueden ser levemente deficientes en oxígeno.

Allosteric Mechanisms of Signal Transduction

Jean-Pierre Changeux^{1*} and Stuart J. Edelstein¹

Trabajo de revisión sobre la teoría de Monod, Wyman, and Changeux (MWC) elaborada entre 1961 y 1967 para explicar mecanismos alostéricos (interacción indirecta entre sitios distintos de una misma proteína).

Mecanismo alostérico.

Hay dos tipos de sitios y dos tipos de ligandos:

- “efectores” (regulan la actividad de la enzima)
- sustratos (los que eventualmente se transforman en producto)

Ambos se afectan mutuamente a través de un cambio conformacional de la proteína.

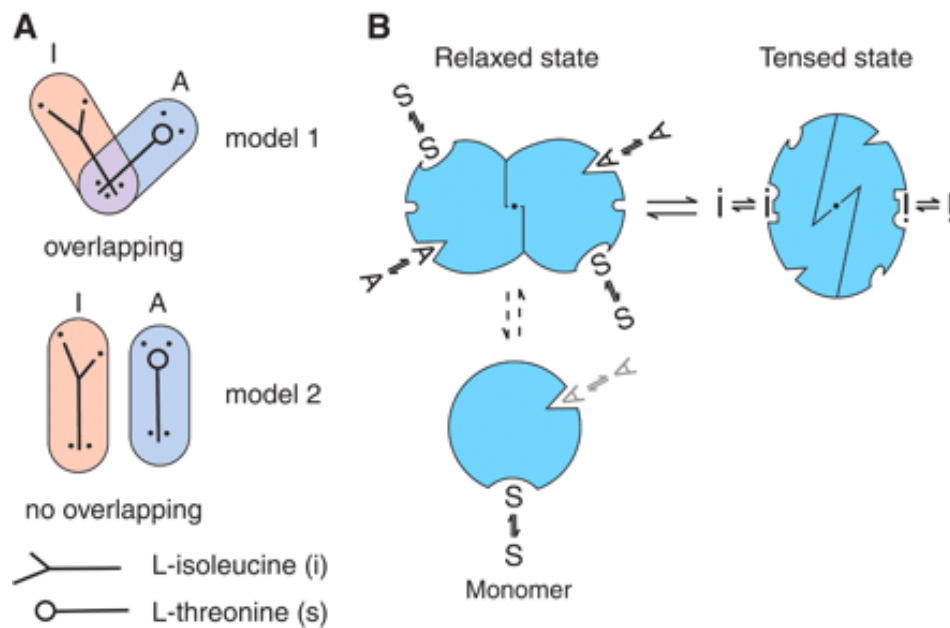


Fig. 1. Modelos iniciales de sitios y transiciones alostéricas.

(B) Transiciones conformacionales. En este ejemplo hay 3 tipos de ligandos: activador (A), sustrato (S) e inhibidor (I). La enzima puede estar en un estado relajado (R) y en uno tenso (T)

El modelo MWC (1965)

Busca modelar el mecanismo por el cual un ligando regulador controla el estado de actividad biológica de un sitio biológicamente activo (por ejemplo, el sitio catalítico de una enzima) a pesar de que actúa sobre un sitio distinto de la proteína.

Tiene en cuenta que muchas proteínas alostéricas tienen una estructura cuaternaria con subunidades idénticas organizadas preservando ciertas simetrías.

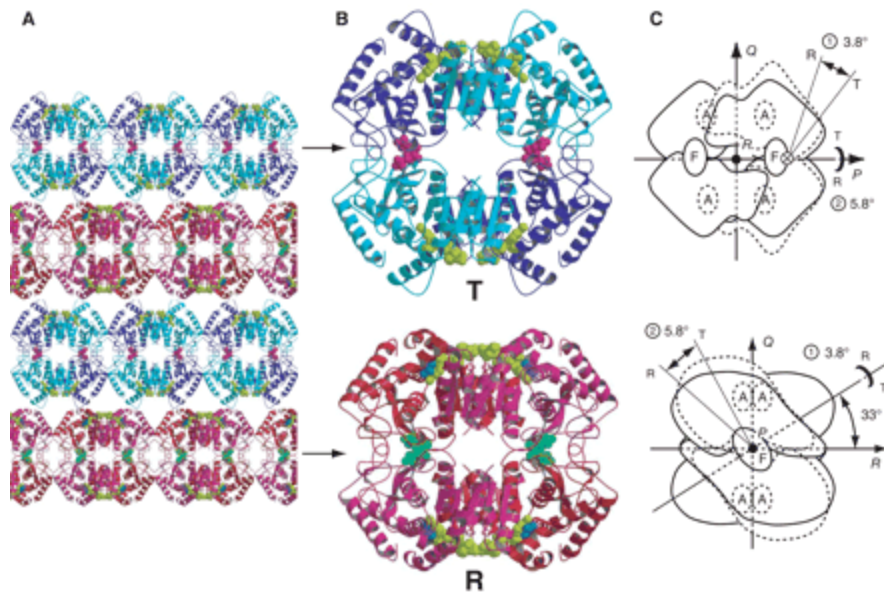


Fig. 2. Demostración estructural del modelo MWC: Los estados T y R que coexisten en cristales de una enzima (bacterial L-lactate dehydrogenase). **(A)** Plano del cristal **(B)** Estados T y R con sus ligandos [coenzima: NADH, verde claro; regulador: fructosa 1,6-bisfosfato, fucsia en T, verde en R; análogo al sustrato: oxalato, azul]. Se ve que la simetría de la estructura cuaternaria se mantiene con pequeños cambios en la organización de las subunidades. **(C)** Rotaciones correspondientes a la transición T-R A es el oxalato y F la fructosa.

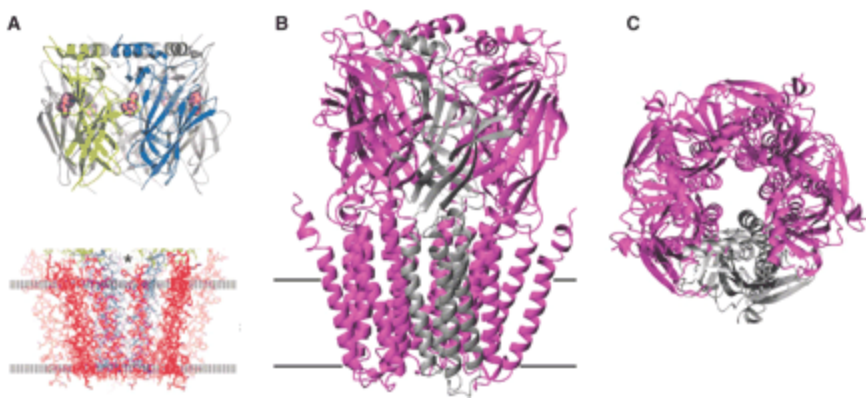


Fig. 3. El receptor de acetilcolina.
 (A) Estructura a partir de rayos X (arriba) y de microscopía electrónica (abajo)
 (B y C) Modelos computacionales

Postulados del modelo MWC:

- cambios conformacionales son cambios de la estructura cuaternaria que preservan su simetría
- número finito de estados conformacionales
- la proteína puede hacer la transición entre esos estados en ausencia de ligando.

Diferencia respecto de lo que vimos:

El cambio conformacional no es inducido por el ligando

Los ligandos estabilizan una u otra conformación dependiendo de a cual de las dos se ligan con más afinidad.

A favor: Se ha observado una gran cantidad de receptores espontáneamente en distintas conformaciones en ausencia de ligando.

En contra: Evidencias de estados intermedios