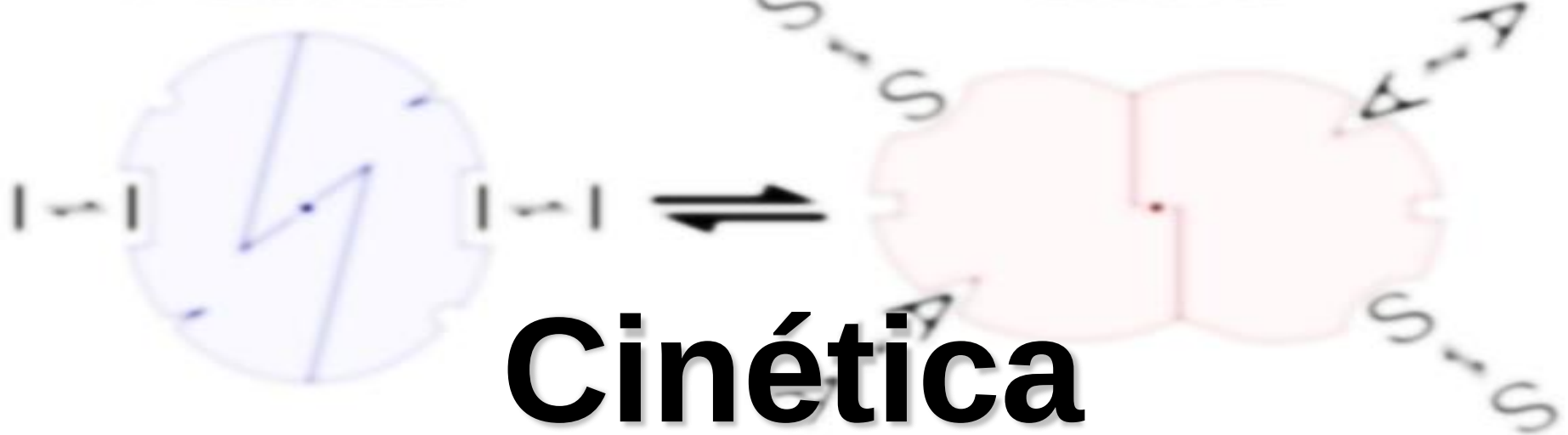


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

EQB738 – ENGENHARIA ENZIMÁTICA



Cinética Alostérica

Prof Bernardo Dias

Introdução

Regulação metabólica de enzimas

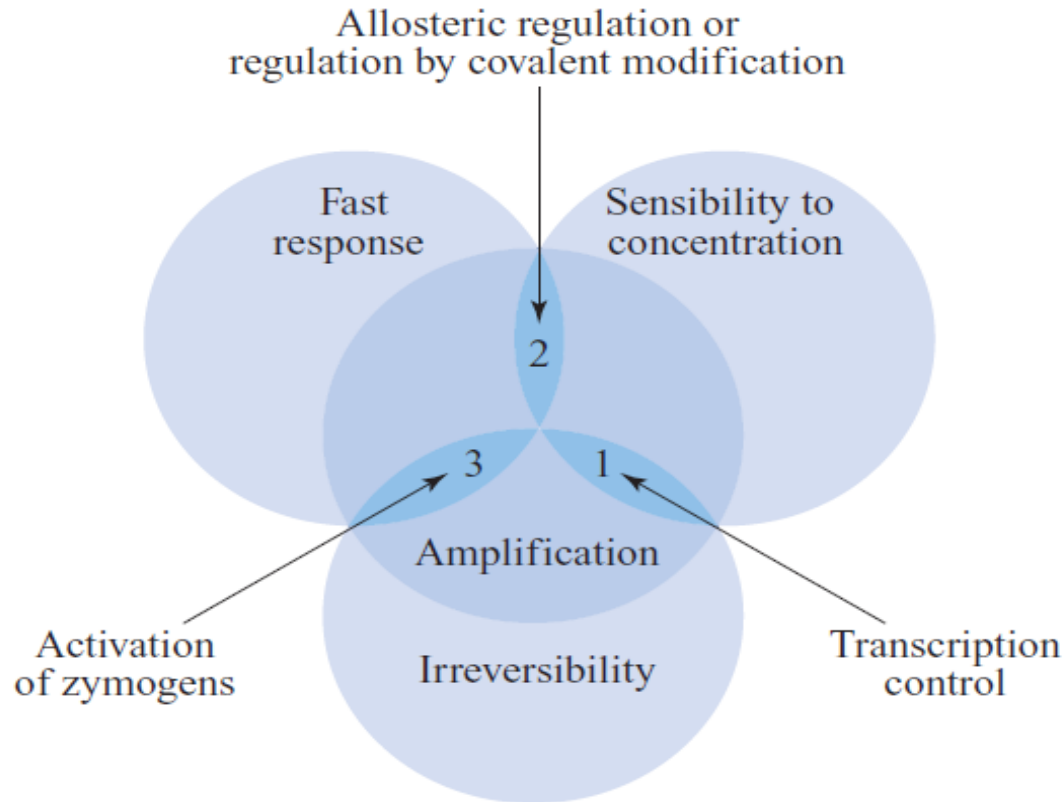


Diagram showing the inter-relation between the fundamental aspects of metabolic regulation by means of the three main mechanisms

1: transcription control; 2: allosteric regulation or regulation by covalent modification; 3: activation of zymogens. Each of the three mechanisms implies a combination of three of the four aspects noted in the circles; the combination is represented by the overlapping section of the circles (from NEURATH, 1977).

Introdução

Regulação da Atividade Enzimática

Controle da Disponibilidade Enzimática:

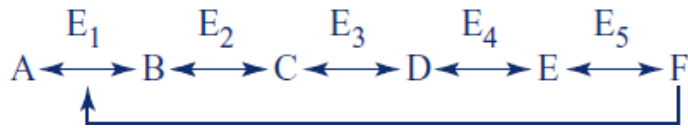
A quantidade de uma dada enzima na célula depende da sua taxa de síntese e da sua taxa de degradação

Controle da Atividade Enzimática:

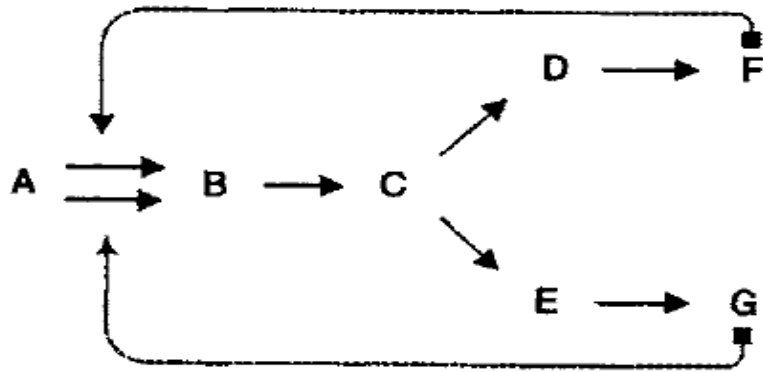
A atividade catalítica de uma enzima pode ser diretamente regulada por meio de alterações conformacionais ou estruturais

Introdução

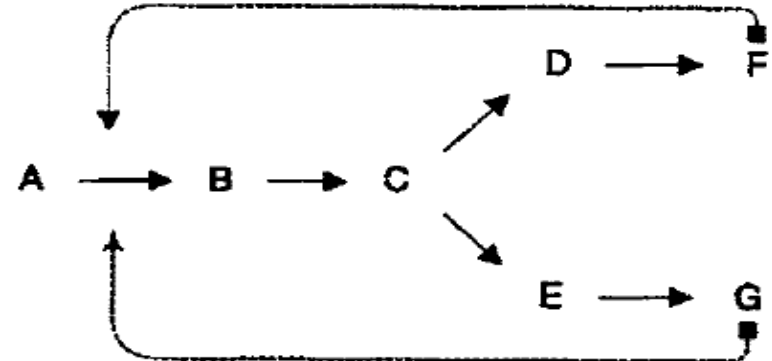
Inibição por Feedback ou Regulação por Retroinibição



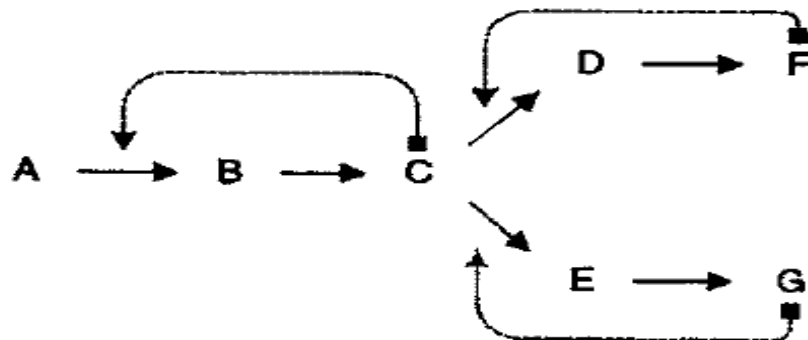
(i) Isofunctional Enzymes



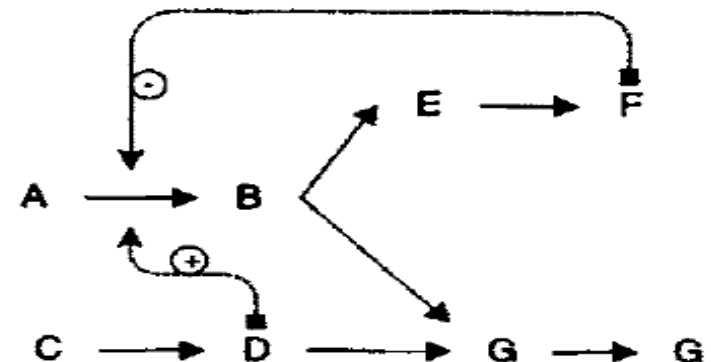
(ii) Cumulative feedback Inhibition



(iii) Sequential Feedback Inhibition



(iv) Inhibition plus Activation



Introdução

Enzimas multiméricas podem ter em cada subunidade sítio ativos e de ligação. Estes também podem atuar independentemente, mas podem influenciar no aumento ou diminuição da afinidade dos outros sítios nas outras subunidades → **Cooperatividade positiva ou negativa**, respectivamente

Alosteria → alterações estruturais na subunidade proteica causadas pela interação cooperativa entre dois sítios ativos em unidades diferentes

Efetores alostéricos → compostos que promovem cooperatividade positiva

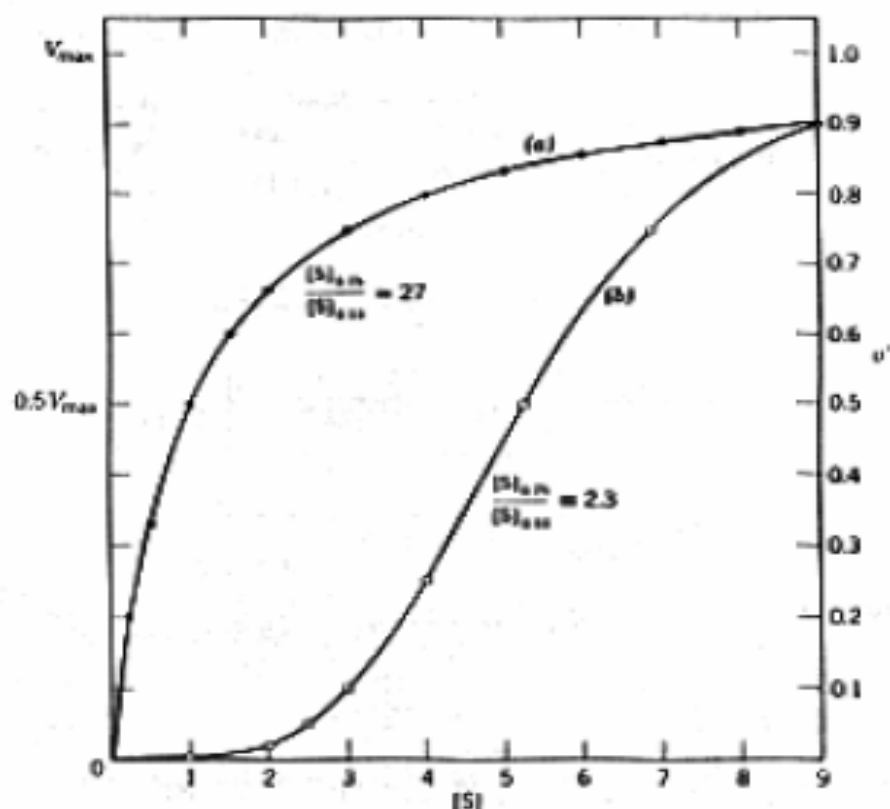
Repressores alostéricos → compostos que promovem cooperatividade negativa

Cooperatividade homotrópica → efeitos alostéricos causados pelo mesmo ligante (substrato) a uma dada enzima em dois sítios ligantes separados.

Cooperatividade heterotrópica → efeitos alostéricos causados pela ligação de um composto não estruturalmente relacionado (não-substrato) em sítio distante da enzima.

Ex.: Cooperatividade → hemoglobina, enzimas de vias metabólicas, enzimas ligadas a membranas, sistemas de transporte e ATPases e nas associações de receptor-ligante.

Resposta sigmoidal à variação do substrato



proporciona um maior controle da taxa de reação pelas variações na concentração de substrato

Table 1. Different types of cooperative and allosteric phenomena

Types of binding			Examples
Non-cooperative binding			Lactate dehydrogenase + NADH
Cooperative binding	Homotropic	Positive	Pyruvate kinase + PEP Hemoglobin + O ₂
		Negative	Alcohol dehydrogenase + NADH
	Heterotropic	Positive	Pyruvate kinase + FDP
		Negative	Threonine deaminase + isoleucine

Introdução

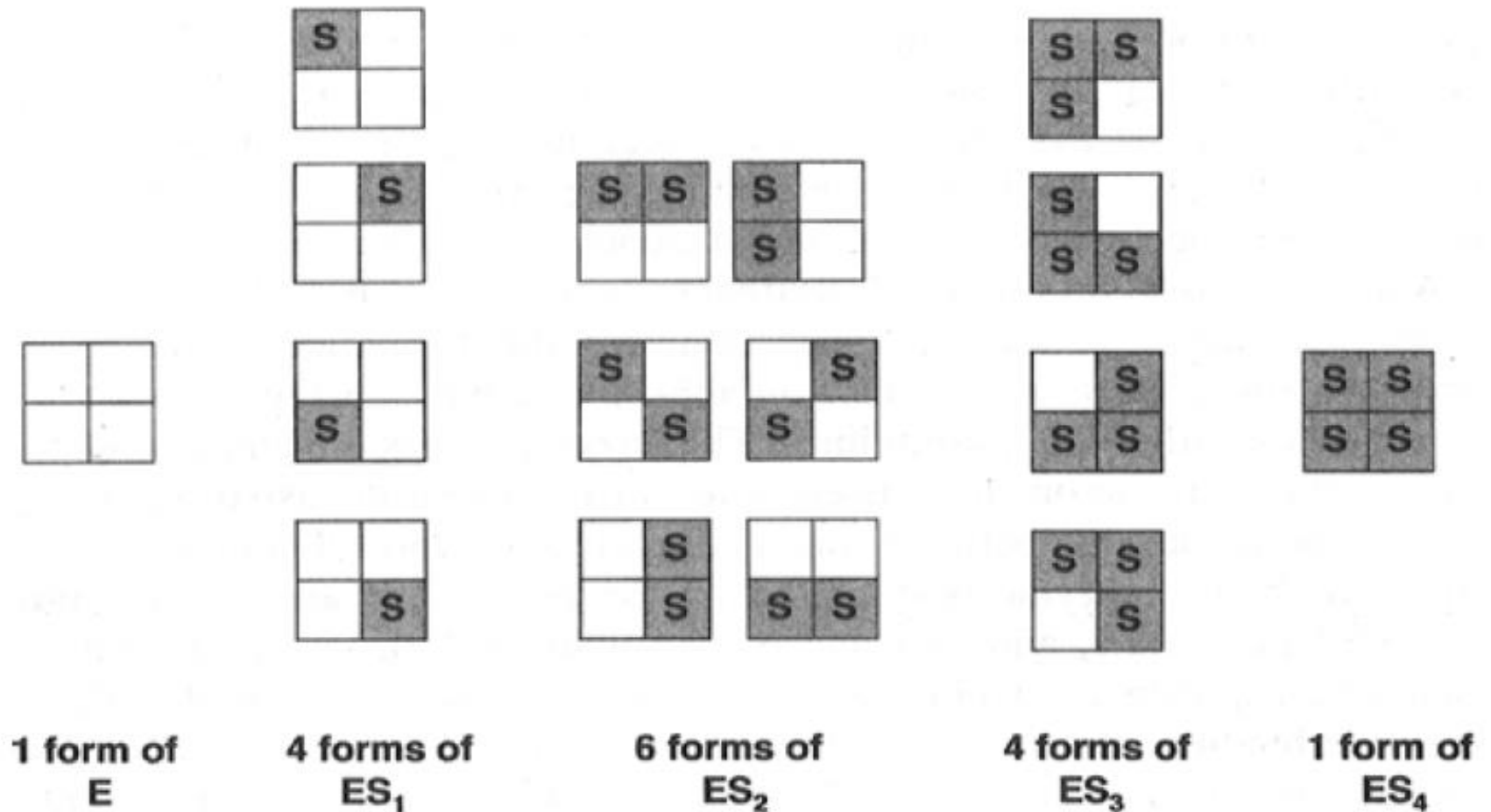


Figure 12.4 Schematic illustration of the number of possible forms of ligand binding to an enzyme that is a homotetramer: open squares, subunits with empty binding site; shaded squares with S, subunits to which a molecule of substrate has bound to the active site.

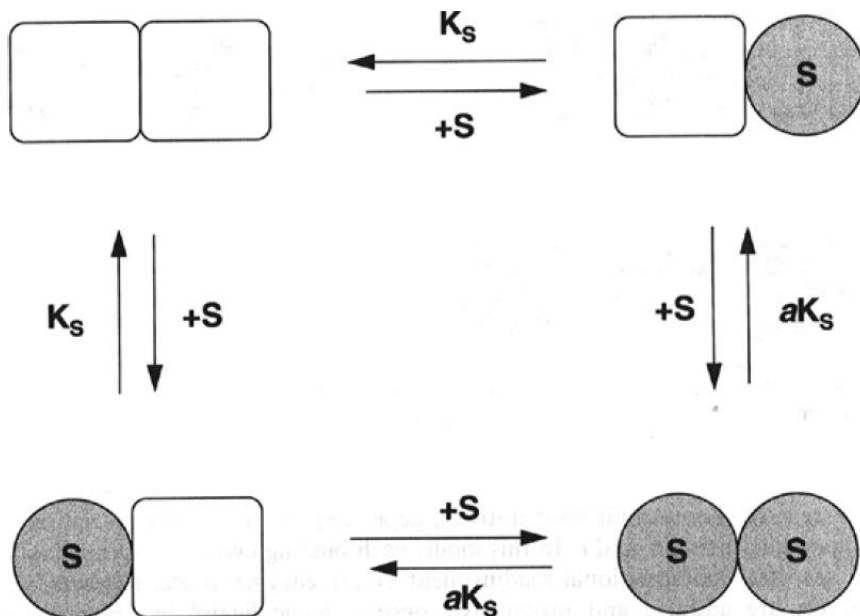
Alostéria

Modelo Koshland-Némethy-Filmer

Modelo de Interação Sequencial Simples

Uma grande alteração conformacional está relacionado a um evento de ligação em um dos sítios ativos da enzima, afetando em sequencia a afinidade da enzima para o proximo ligante

Ex.: enzima alostérica com 2 sítios de ligação com substratos com cooperatividade positiva



$$v = \frac{V_{\max} \left(\frac{[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{aK_s^2} \right)}{1 + \frac{2[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{aK_s^2}}$$

$$V_{\max} = 2k_{\text{cat}}E_0$$

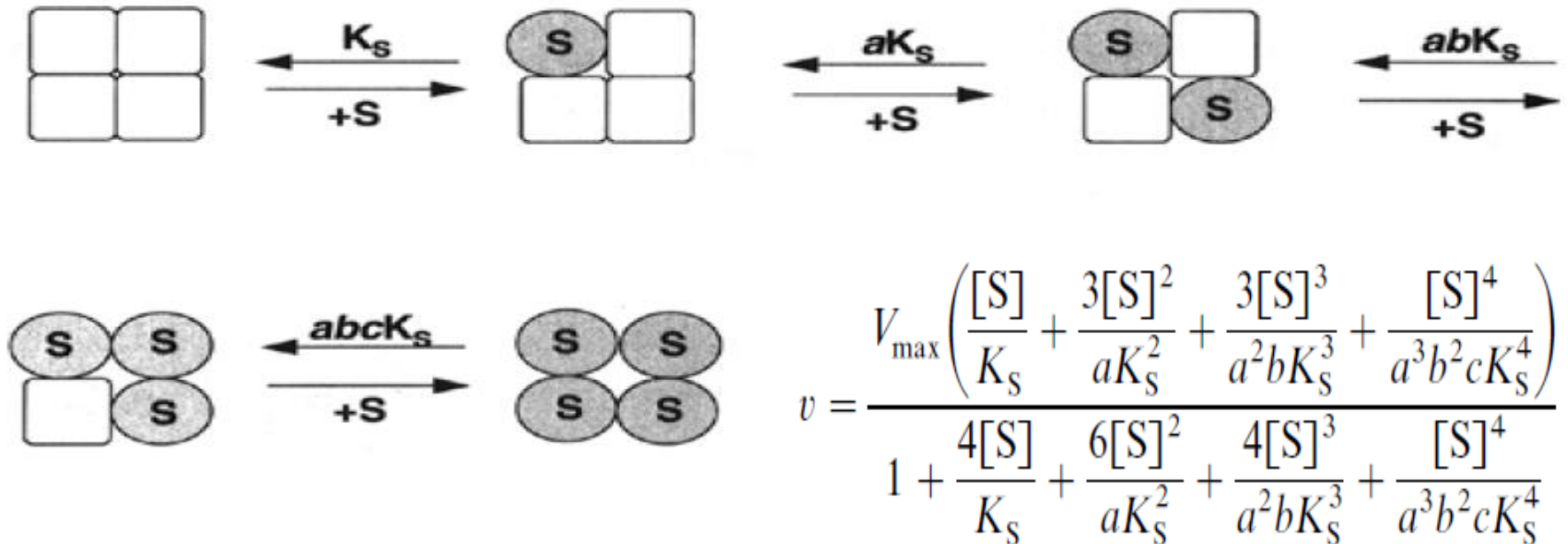
Fator de interação 'a' $\rightarrow a < 1$,
cooperatividade positiva

Alosteria

Modelo Koshland-Némethy-Filmer

Modelo de Interação Sequencial Simples

Ex.: Enzima tetramérica



Os coeficientes a , b e c vão determinar se a cooperatividade homotrópica será positiva ou negativa

Alosteria

Equação de Hill

No modelo KNF, se a cooperatividade é alta, as concentrações das espécies com no mínimo um sítio ativo não-saturado será muito pequena em qualquer $[S] > K_s$. Assim, no caso de uma enzima tetramérica:

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

Generalizando, tendo $h = n^\circ$ total de sítios de ligação na enzima $\rightarrow$ **constante de Hill**, e K' = constant que relaciona os coeficientes de interação individual de 'a' até 'h' e a constant de dissociação intrínseca K_s

$$v = \frac{V_{\max} [S]^h}{K' + [S]^h} \quad \longrightarrow \quad \log\left(\frac{v}{V_{\max} - v}\right) = h \log[S] - \log(K')$$

Obs.: Quando a cooperatividade é moderada, $h \neq n^\circ$ total de sítios de ligação na enzima. A associação com a equação deve ser feita substituindo h por h_H , definido como o número mínimo de sítios ligantes.

Alosteria

Equação de Hill

Apesar da linearização, regiões de baixo [S] desviam da linearidade. Os dados se ajustam bem em valores de [S] entre 10 e 90% da saturação ($V_{\max}$)

When $v = 0.9V_{\max}$

$$v = 0.9V_{\max} = \frac{V_{\max}[S]_{0.9}^h}{K' + [S]_{0.9}^h}$$
$$\therefore [S]_{0.9} = (9K')^{1/h}$$

and when $v = 0.1V_{\max}$,

$$v = 0.1V_{\max} = \frac{V_{\max}[S]_{0.1}^h}{K' + [S]_{0.1}^h}$$
$$\therefore [S]_{0.1} = \left(\frac{K'}{9}\right)^{1/h}$$

Therefore:

Índice de cooperatividade $\longrightarrow \frac{[S]_{0.9}}{[S]_{0.1}} = \frac{(9K')^{1/h}}{(K'/9)^{1/h}} = (81)^{1/h}$

or

$$h = \frac{\log(81)}{\log\left(\frac{[S]_{0.9}}{[S]_{0.1}}\right)}$$

Alosteria

Equação de Hill

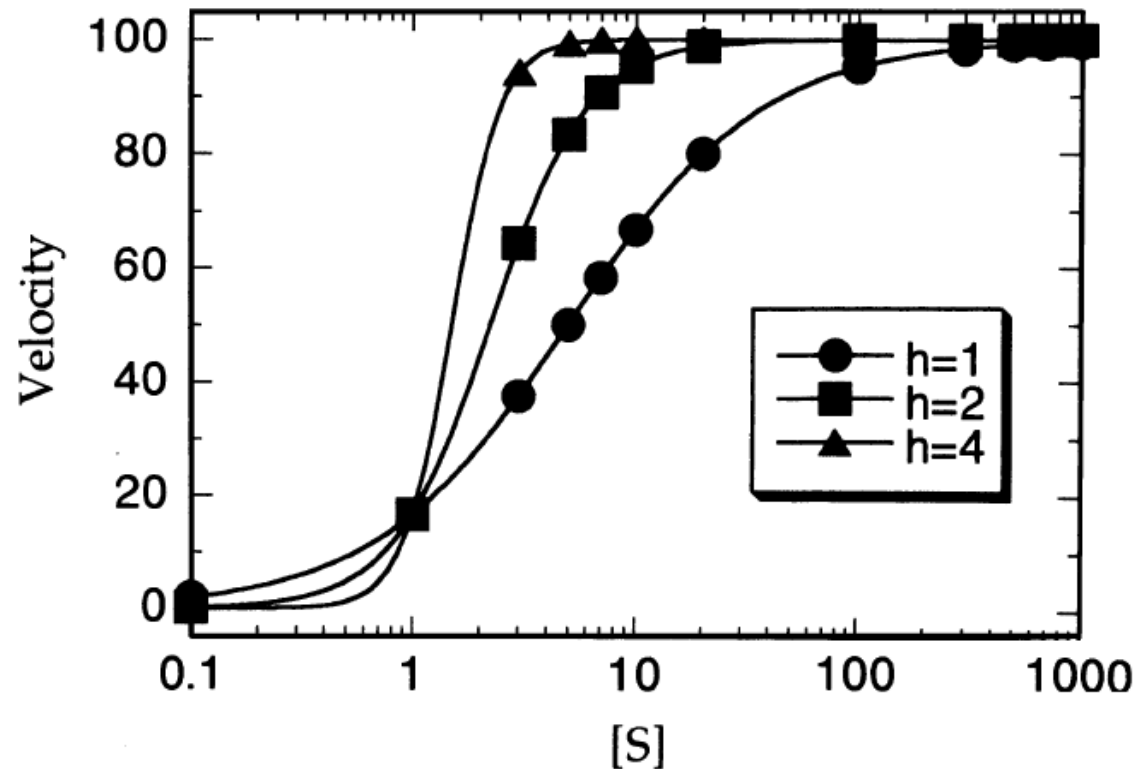
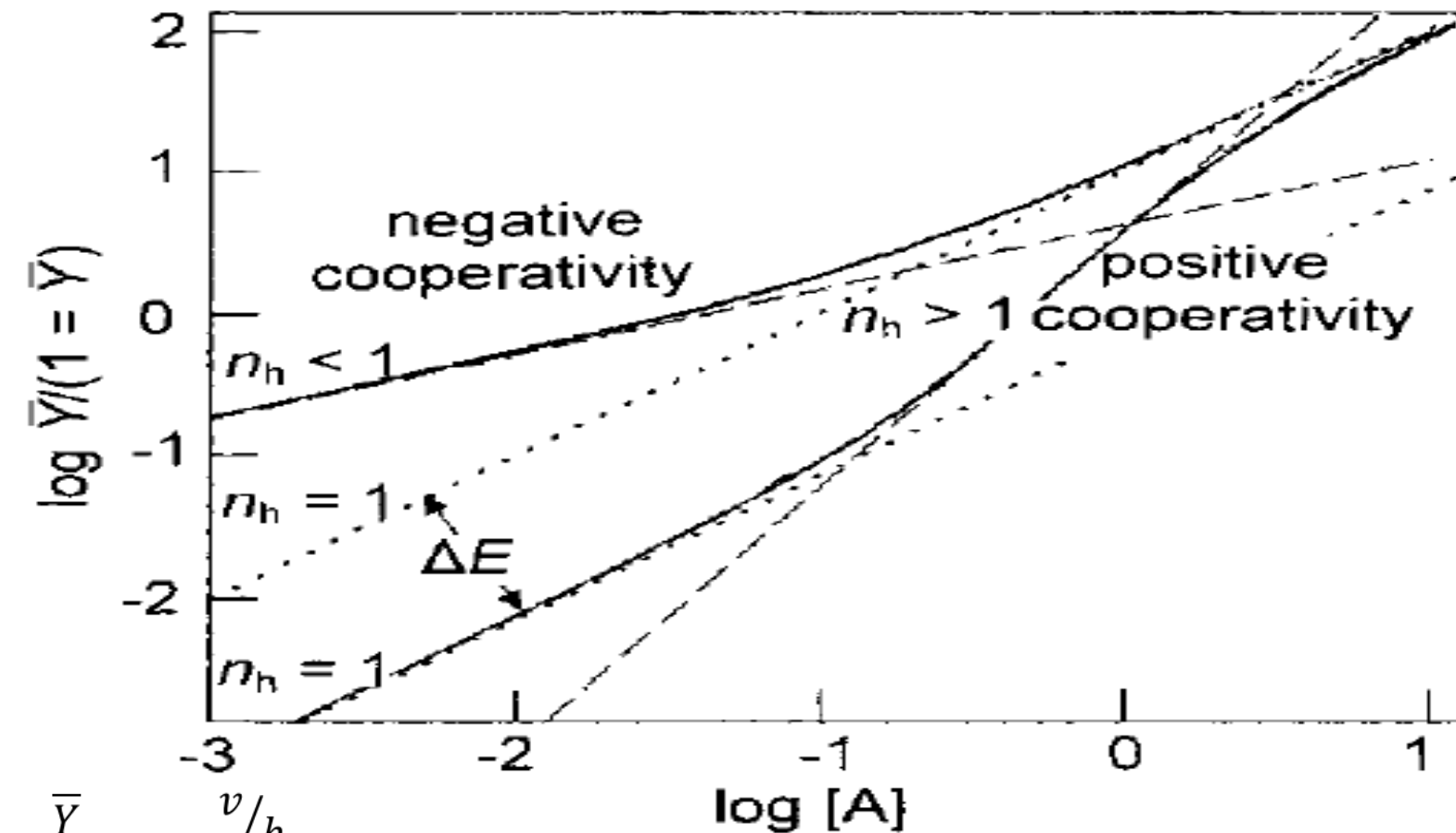


Figure 12.8 Velocity as a function of substrate concentration plotted in semilog fashion: data for a noncooperative enzyme; squares and triangles, data for enzymes displaying positive cooperativity. Each solid line through the data represents the best fit of an individual data set to Equation 12.7.

Alsteria

Gráfico de Hill

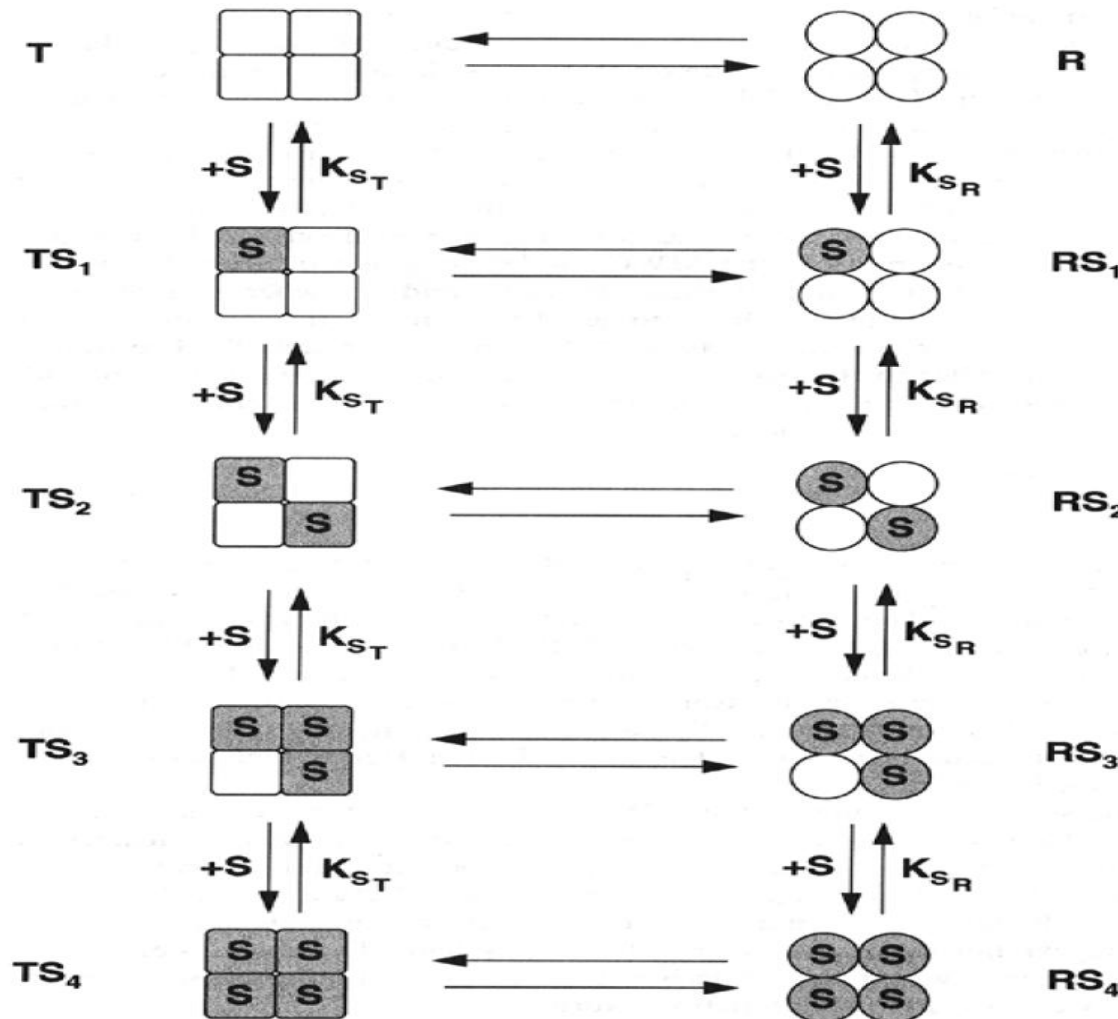


$$\frac{\bar{Y}}{1-\bar{Y}} = \frac{v/h}{1-v/h}$$

Alosteria

Modelo Monod-Wyman-Changeux

Modelo de Simetria (ou Transição) Orquestrada



T – tenso, estado de baixa afinidade pelo ligante; e **R- relaxado**, alta afinidade

Enzimas são oligômeros simétricos e cada unidade apresenta um único sítio de ligação. Neste caso, só existiria dois estados conformacionais que estão em equilíbrio.

A transição entre as conformações ocorre com retenção de simetria, sendo que todas as subunidades devem se alterar orquestradamente.

A afinidade do ligante na subunidade vai depender da conformação deste, alterando assim a conformação dos demais.

$$L = \frac{[T_0]}{[R_0]}$$

Constante alostérica
→ razão entre os estados sem ligantes

$$c = \frac{K_{SR}}{K_{ST}}$$

nonexclusive binding coefficient

Alosteria

Modelo Monod-Wyman-Changeux

Modelo de Simetria (ou Transição) Orquestrada

Both L and c influence the degree of cooperativity displayed by the enzyme.

$\uparrow L$, $\uparrow$ *carater sigmoidal da curva, favorecendo estado T_0 .*

$\uparrow c$, $\uparrow$ *afinidade do estado T por ligantes.*

Alta cooperatividade $\rightarrow \downarrow c$.

Ex. Enzima dimérica

$c = 0 \rightarrow$ estado T não tem afinidade pelo substrato $\rightarrow K_{SR} = K_S$

$$v = \frac{V_{\max} \frac{[S]}{K_S} \left(1 + \frac{[S]}{K_S} \right)}{L + \left(1 + \frac{[S]}{K_S} \right)^2}$$

Alosteria

Modelo Monod-Wyman-Changeux

Modelo de Simetria (ou Transição) Orquestrada

Para oligomeros > dimeros $\rightarrow h = n^{\circ}$ total de sítios de ligação na enzima

$$v = \frac{V_{\max} \frac{[S]}{K_S} \left(1 + \frac{[S]}{K_S}\right)^{h-1}}{L + \left(1 + \frac{[S]}{K_S}\right)^h}$$

Este modelo só se aplica para cooperatividade homotrópica positiva ou heterotrópica

Já cooperatividade homotrópica negativa é explicada pelo modelo Koshland-Némethy-Filmer

Alosteria

Modelo Monod-Wyman-Changeux

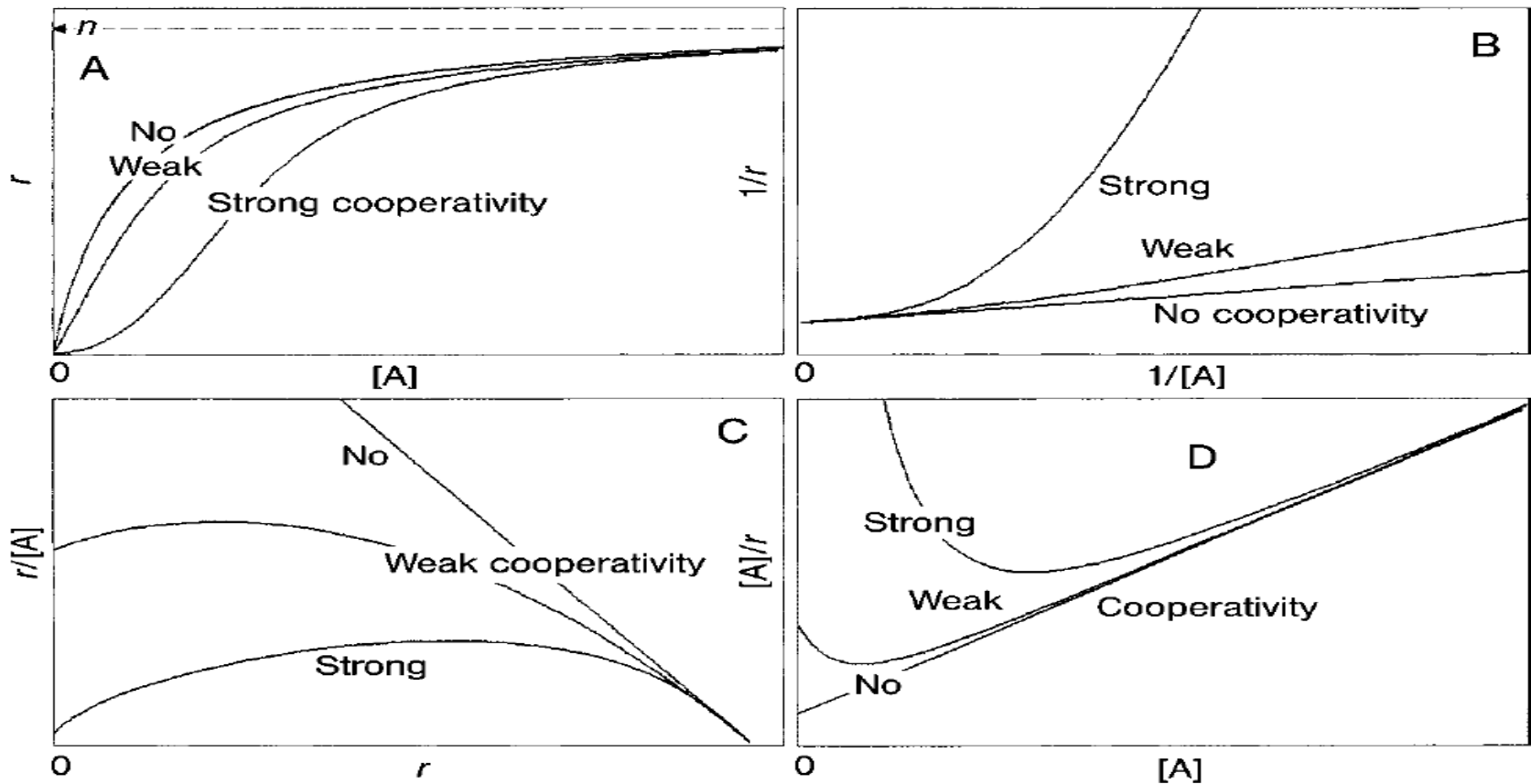
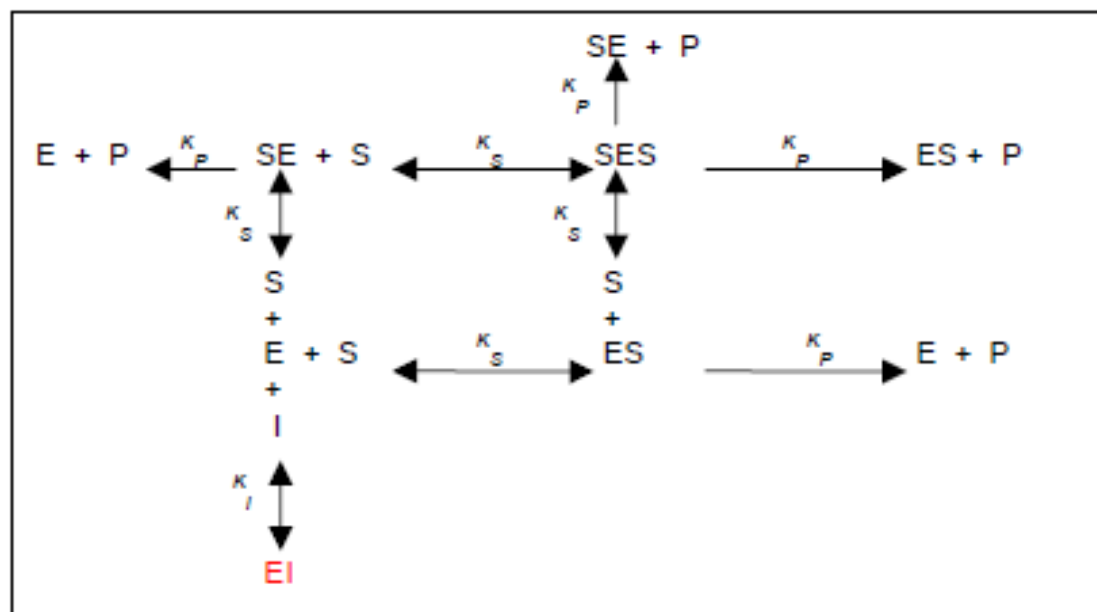


Fig. 1.11 Binding curves of cooperative systems according to the symmetry model in different representations. (A) Direct plot, (B) double-reciprocal plot, (C) Scatchard plot, (D) Hanes plot. No cooperativity: $L=c=1$; weak cooperativity: $L=5$, $c=0.1$; strong cooperativity: $L=100$, $c=0.01$.

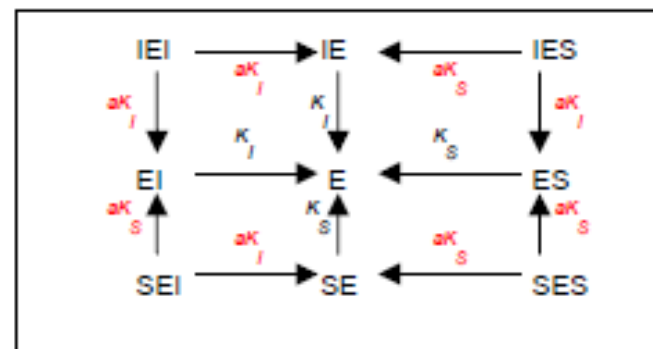
Formas de Inibição em Sistemas Alostéricos

1. Inibição Competitiva Pura

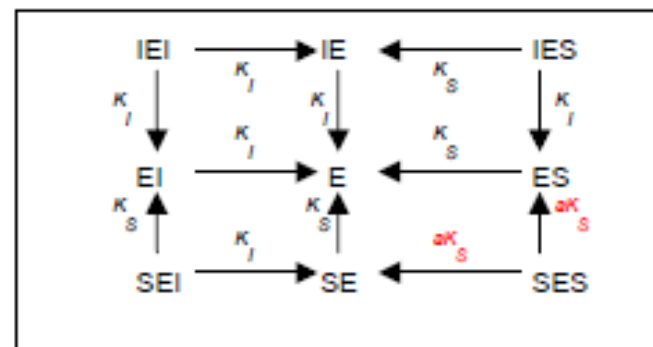


2. Inibição Competitiva em Dois Sítios

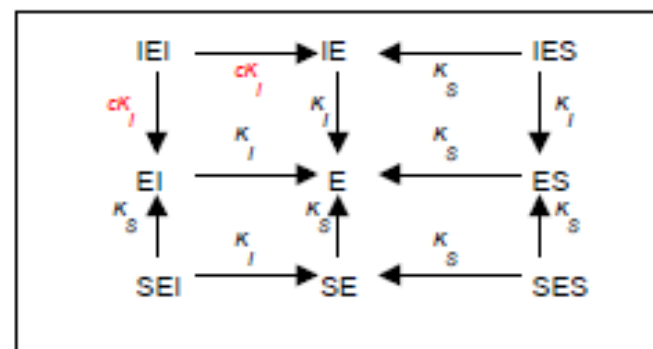
2.1 - *Ligação Cooperativa do Substrato;
Inibidor simula a molécula de substrato*



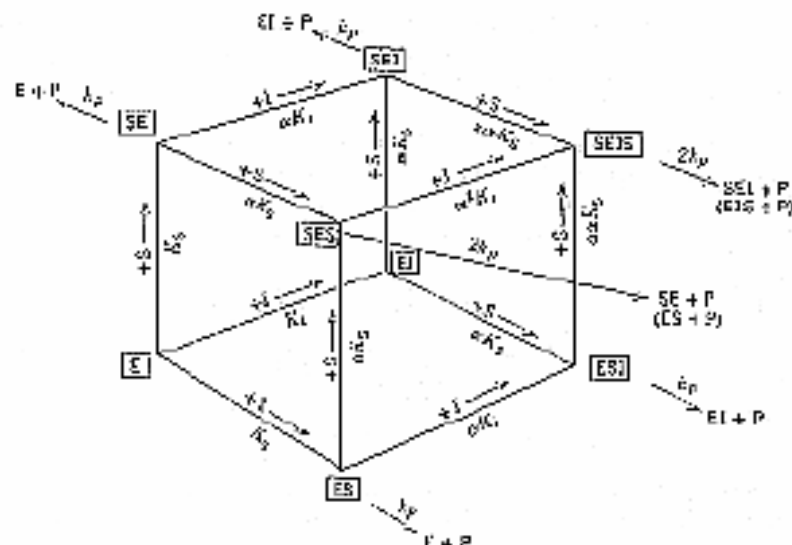
2.2 - *Ligação Cooperativa do Substrato;
Inibidor não simula a molécula de substrato*



2.3 - *Ligação Cooperativa do Inibidor*



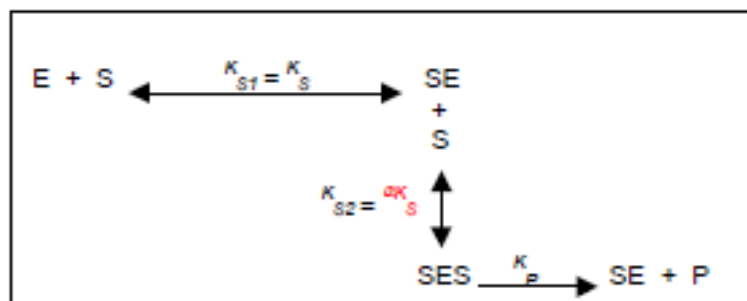
3. Inibição Competitiva Parcial



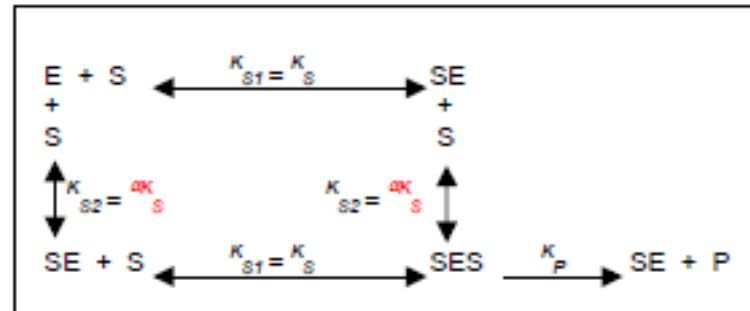
*S se liga cooperativamente com o fator de interação α ;
 I aumenta a constante de dissociação dos sítios de ligação S por um fator α ,
 mas não tem efeito de interação entre os sítios de substrato*

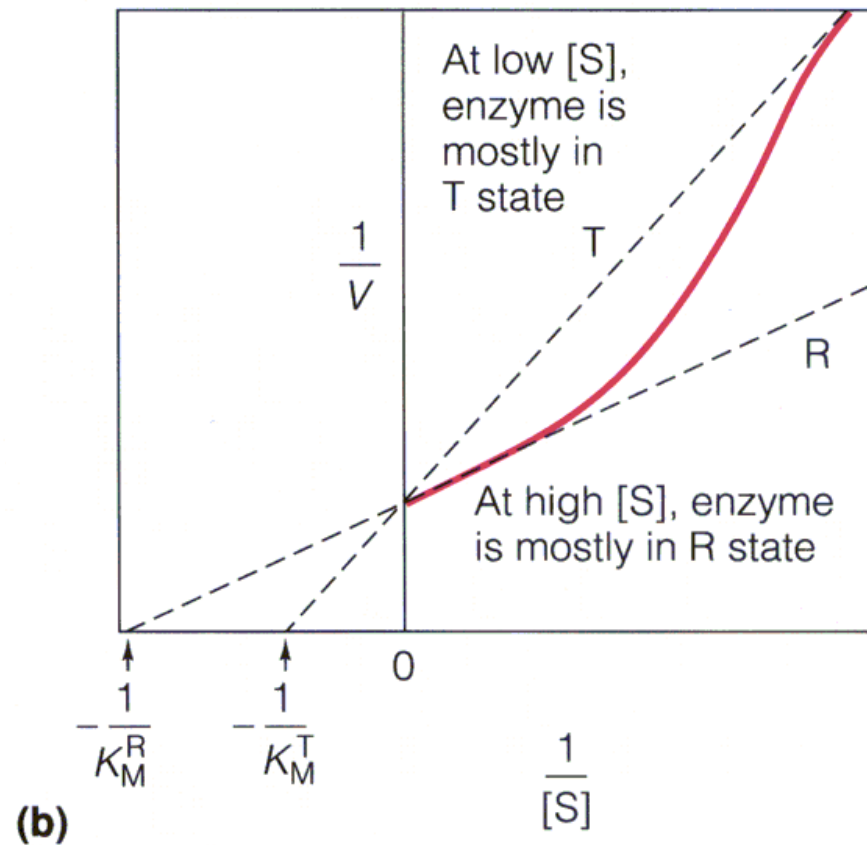
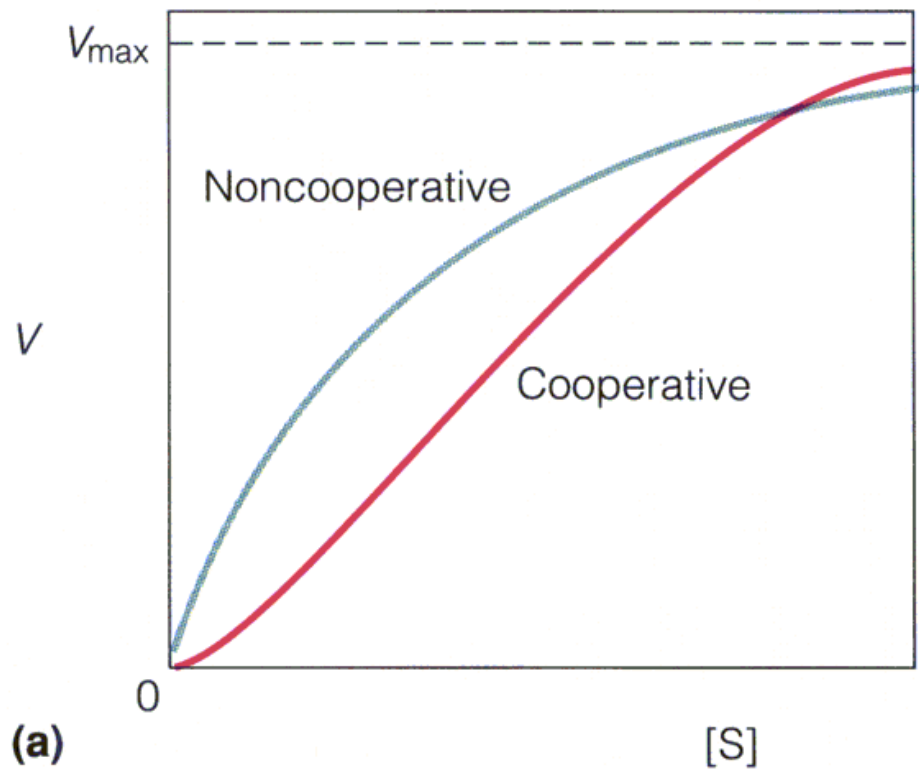
4. Ativação do Substrato

4.1 - Ligação Ordenada



4.2 - Ligação Randômica





Grau de inibição

$$\text{Grau inibição} = \frac{\text{Velocidade não inibida} - \text{Velocidade inibida}}{\text{Velocidade não inibida}} \times 100$$

Alosteria

Modelo Monod-Wyman-Changeux

Efeito dos efetores e repressores

$$L' = L \left(\frac{1 + d\beta}{1 + \beta} \right)^n \cdot \left(\frac{1 + e\gamma}{1 + \gamma} \right)^n .$$

β and γ are the concentrations of inhibitor, or activator, reduced by their respective binding constants K_{Ri} and K_{Ra} to the R-form; $d = K_{Ri}/K_{Ti} > 1$ and $e = K_{Ra}/K_{Ta} < 1$ are the ratios of the binding constants for the R- and T-states of inhibitor and activator, respectively.