Estudio cinético de la fase de transición del mecanismo de Michaelis-Menten con inhibición por exceso de sustrato

R. Varón Castellanos*, J. Tudela Serrano**, F. García Carmona**, F. García Cánovas**

* Dpto. de Química Física. Facultad de Ciencias Químicas y Matemáticas
 ** Dpto. interfacultativo de Bioquímica

Recibido: 22-3-85 Aceptado: 30-10-85

Kinetic study of the transient phase of the Michaelis-Menten mechanism with inhibition by substrate excess

Summary: The kinetic behaviour in the transient phase of a Michaelis-Menten mechanism with inhibition by substrate excess has been analyzed. Time dependent equations for all species involved to mechanism are derived. Several procedures for rate constants evaluation are proposed.

Key-words: Transient phase, Michaelis-Menten, Substrate inhibition.

INTRODUCCIÓN

En la literatura científica, desde el año 1965, se han descrito más de 800 enzimas que sufren desviaciones de la cinética de Michaelis-Menten, basándose en estudios de estado estacionario ¹. Estos hechos han animado a distintos autores a intentar explicar los resultados experimentales bajo enfoques más rigurosos que los utilizados previamente ², encontrando que a diferencia de la ecuación clásica de Michaelis-Menten, que es de grado 1:1 con respecto al sustrato, podrían darse grados tales como 1:2; 2:2; 2:3; 3:4; etc.

Estos descubrimientos cuestionan fuertemente si debe aceptarse que las enzimas son en su mayoría michaelianas, ya que si esto no es así, los parámetros clásicos tales como K_{M} y V_{max} perderían su significado físico para tales enzimas

Es conocida la existencia de posibles causas que pueden dar lugar a desviaciones de la cinética de Michaelis-Menten³. Algunos ejemplos son: la enzima que contiene una

impureza que reacciona con el sustrato, o bien la enzima que existe en dos formas con diferentes actividades o en la que se producen agregaciones o micelas ¹. Algunas de las desviaciones cinéticas encontradas podrían deberse a talcs hechos. No obstante, una vez suprimidos tales efectos donde es posible, los hechos experimentales indican que son muchas las enzimas que dan cinéticas anómalas, entre ellas se encuentran acetilcolinesterasa, fosfatasa ácida, adenosín desaminasa, arilsulfatasa, bencilamina oxidasa. α-quimotripsina, fumarasa, β-galactosidasa, galactosa deshidrogenasa, peroxidasa y xantín oxidasa ². Algunas posibles causas cinéticas para explicar estas desviaciones podrían ser: a) inhibición por sustrato, b) activación por sustrato, c) rutas al azar, d) efectos alostéricos.

El grupo más numeroso de desviaciones de la cinética de Michelis-Menten corresponde a la inhibición por sustrato (352 ejemplos). En la mayoría de los casos en los que aparece este tipo de efecto, lo que se ha hecho es trabajar a bajas concentraciones de sustrato, de tal manera que se obtenga una ecuación de velocidad 1:1 con respecto al

sustrato y así poder definir K_M y V_{max} . No obstante, se han utilizado en algunos trabajos ² concentraciones elevadas de sustrato de tal manera que se obtiene la ecuación de velocidad real para el mecanismo bajo estudio; la regresión no lineal permite calcular los parámetros globales que aparecen bajo estas condiciones en la ecuación de velocidad.

Sin embargo, el cálculo de las constantes de velocidad implicadas en el mecanismo no puede llevarse a cabo con datos únicamente de estado estacionario. La posibilidad del uso de técnicas rápidas permite obtener información sobre la fase de transición del sistema y la elucidación completa del mecanismo puede llevarse a cabo mediante la utilización conjunta de ambas técnicas ⁴.

Bajo este enfoque abordamos el estudio cinético del mecanismo más simple de inhibición por sustrato: mecanismo de Michaelis-Menten con inhibición por sustrato o bien mecanismo Uni-Uni con inhibición por sustrato.

TEORÍA

El mecanismo antes citado viene definido por el esquema

$$\begin{array}{c|c}
 & k_1 & A \\
\hline
 & k_2 \\
\hline
 & k_3 & A
\end{array}$$

$$\begin{array}{c|c}
 & k_2 \\
\hline
 & k_2 \\
\hline
 & k_3 & A
\end{array}$$

$$\begin{array}{c|c}
 & k_2 \\
\hline
 & k_3 & A
\end{array}$$

$$\begin{array}{c|c}
 & k_2 \\
\hline
 & k_3 & A
\end{array}$$

cuyo grafo dirigido se muestra en la figura 1. Con la notación:

X_i = especie enzimática i-ésima, de modo que

$$E \equiv X_1$$

 $EA \equiv X_2$
 $EA_1 \equiv X_3$

x_i = concentración de la especie enzimática X_i

 x_i^0 = concentración inicial de la especie X_i

$$\dot{x}_i = \frac{dx_i}{dt}$$

Y_s = especie ligando s-ésima, de modo que

$$\begin{array}{c}
A & \equiv Y_1 \\
P & \equiv Y_2
\end{array}$$

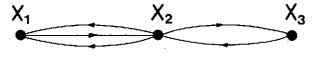


FIGURA I. Grafo dirigido.

 y_s = concentración de la especie Y, (s = 1,2)

 y_s^0 = concentración inicial de la especie ligando Ys (s = 1,2)

$$\dot{y}_s = \frac{dy_s}{dt}$$
 (s = 1,2)

y si las condiciones iniciales son 5:

$$x_i^0 = 0, i \neq 1$$
 (1)

$$y_i^0 = 0, i \neq 1$$
 (2)

$$\mathbf{v}_{1}^{0} >> \mathbf{x}_{1}^{0} \tag{3}$$

el sistema de ecuaciones que describe la dependencia de la concentración de las especies enzimáticas con el tiempo viene dado por la ecuación matricial:

$$\begin{bmatrix} \dot{x}_{i} \\ \dot{x}_{2} \\ \dot{x}_{3} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} k_{11} & k_{21} & 0 \\ k_{12} & k_{22} & k_{32} \\ 0 & k_{23} & k_{33} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_{1} \\ x_{2} \\ x_{3} \end{bmatrix}$$
(4)

El determinante secular de la matriz K es:

$$D(\lambda) = \begin{vmatrix} k_{11} - \lambda & k_{21} & 0 \\ k_{12} & k_{22} - \lambda & k_{32} \\ 0 & k_{23} & k_{33} - \lambda \end{vmatrix}$$
 (5)

donde los valores de K_{ij} vienen dados en el apéndice.

La ecuación (4) puede resolverse en la forma descrita en la referencia (5) y así se obtiene:

$$x_i = A_{i0} + \sum_{h=1}^{2} A_{ih} e^{\lambda_h t}$$
 (i=1, 2, 3)

siendo

$$A_{i0} = (-1)^{i+1} \frac{(a_{1i})_0 x_1^0}{\lambda_1 \lambda_2}$$
 (i=1, 2, 3) (7)

$$A_{ih} = (-1)^{i} \frac{D_{1i}(\lambda_{h})x_{1}^{0}}{\lambda_{h}(\lambda_{p}-\lambda_{h})} \qquad (i=1, 2, 3; p \neq h) \qquad (8)$$

En la ec. (7) $(a_{ii})_o$ es el término independiente en el desarrollo del polinomio $D_{ii}(\lambda)$, es decir $D_{ii}(0)$, y los valores de λ_h (h=1,2) son las raíces de la ecuación

$$\lambda^2 + p\lambda + Q = 0 \tag{9}$$

donde

$$P = k_{-1} + k_2 + k_{-3} + (k_1 + k_3) y_1^0$$
 (10)

$$Q = (k_{-1} + k_2)k_{-3} + k_1k_{-3}y_1^0 + k_1k_3y_1^0^2$$
 (11)

y, a su vez,

$$\lambda_1 \, \lambda_2 = Q \tag{12}$$

$$-(\lambda_1 + \lambda_2) = P \tag{13}$$

 λ^2 y λ_2 son siempre reales y negativas.

Por otra parte, y2 depende de t según

$$y_2 = \beta + \alpha t + \sum_{h=1}^{2} \gamma_h e^{\lambda_h t}$$
 (14)

donde

$$\alpha = \frac{k_1 k_2 k_{-3} y_1^0 x_1^0}{(k_{-1} + k_2) k_{-3} + k_1 k_{-3} y_1^0 + k_1 k_3 y_1^{0.2}}$$
(15)

$$\beta = \frac{k_1 k_2 y_1^0 x_1^0 - P\alpha}{O} \tag{16}$$

$$\gamma_1 = -\frac{k_1 k_2 (k_{-3} + \lambda_1) y_1^0 x_1^0}{\lambda_1^2 (\lambda_2 - \lambda_1)}$$
 (17)

$$\gamma_2 = -\frac{k_1 k_2 (k_{-3} + \lambda_2) y_1^0 x_1^0}{\lambda_2^2 (\lambda_1 - \lambda_2)}$$
 (18)

Algunos ejemplos típicos de la variación de α con respecto a y^0_1 y de y_2 con respecto a t se muestran en las figs. 2 y 3, respectivamente.

El período de inducción tiene el valor

$$\tau = -\frac{1}{k_{-3}} + \frac{P}{Q} \tag{19}$$

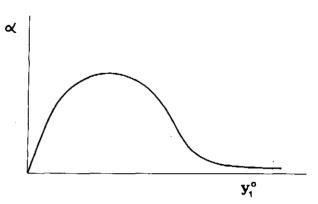


FIGURA 2. Representación esquemática de α vs. y_1^0

DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES

El mecanismo bajo estudio se ajusta, en las curvas de acumulación de producto Y_2 frente al tiempo, a la suma de dos exponenciales. La determinación de las λ_n permitirá determinaç todas las constantes implicadas en el sístema. Puesto que las λ_n son reales y negativas, el procedimiento a seguir sería⁶:

- 1) Determinación en el estado estacionario de α, β y τ
- Representación, en la fase de transición, de ln (y₂-β-- α t) vs. t, lo que da, supuesto |λ₁| < |λ₂| y a partir de cierto instante, tp, una recta de pendiente λ₁ y ordenada en el origen In γ₁.
- La determinación de λ₂ puede hacerse de acuerdo con

$$\lambda_2 = \frac{\gamma_1 \cdot \lambda_1^2}{\lambda_1 \gamma_1 + \alpha} \tag{20}$$

expresión deducida teniendo en cuenta las ecs. (12),

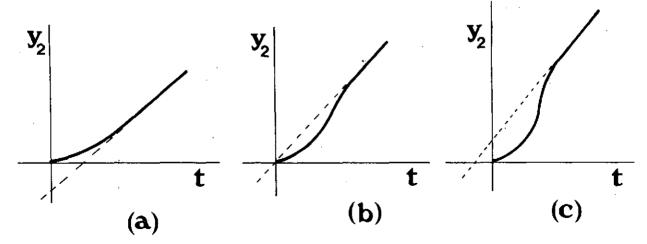


FIGURA3. Representación esquemática de los perfiles concentración del producto-tiempo. Los casos representados en (a), (b) y (c) corresponden, respectivamente a un valor de τ positivo, nulo o negativo. A su vez, τ es positivo, nulo o negativo según que $k_{-3}(k_{-3}+k_3y_1^0)$ sea, respectivamente, mayor, igual o menor que $k_1k_3y_1^0$.

(13) y (15) - (17). La ec. (20) permite el cálculo de λ_2 de una forma analítica sin necesidad de representar In (y_2 -

$$-\beta - \alpha t - \gamma_1 e^{\lambda_1 t}$$
) vs. t para $0 \le t \le t_p$.

Con los valores de λ_1 y λ_2 podemos calcular todas las k_i (i=1, 2, 3, -1, -3), puesto que λ_1 + λ_2 según la ec. (13) es lineal respecto de y_1^0 . A partir de la pendiente y ordenada en el origen tenemos dos ecuaciones y aplicando regresión no lineal a λ_1 λ_2 (ec. (12)) obtenemos tres ecuaciones adicionales

Otra posibilidad sería el ajuste por regresión no lineal a la ec. (19), con lo que se obtendrían cinco ecuaciones. Además se cumplen las siguientes relaciones:

$$\lim_{\mathbf{y}_{0}^{0} \to \infty} \tau = -\frac{1}{\mathbf{k}_{-3}} \tag{21}$$

$$\lim_{y_1^0 \to 0} \tau = \frac{1}{k_{-1} + k_2}$$
 (22)

$$\lim_{y_1^0 \to \infty} \frac{2y_1^0}{x_1^0} = \frac{k_2 k_{-3}}{k_3}$$
 (23)

las cuales nos permiten otras aproximaciones al conocimiento de los valores de las k₁.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados experimentales de velocidad en estado estacionario frente a la concentración de sustrato indican que un gran número de enzimas se desvían del comportamiento michaeliano. Los estudios en estado estacionario detectan estas desviaciones a partir de gráficas a vs. y⁰ o $1/\alpha$ vs. $1/y_1^0$. Se han establecido criterios para poder dilucidar a qué grado con respecto al sustrato está correspondiendo la velocidad. Sin embargo, puesto que según la ec. (15) los factores que multiplican a la concentración de sustrato son expresiones algebraicas de las ki, la determinación de sus valores nos permite conocer cuál va a ser la influencia de cada término en la ecuación y saber a qué etapa se debe en concreto el que ese término sea significativo o no. En el caso sencillo de un mecanismo 1:2 queda claro cómo a partir de la determinación de las λ_h (h = 1,2) puede obtenerse esta información. En mecanismos más

complejos sería conveniente utilizar la expresión de τ para el cálculo de k, mediante regresión no lineal.

Desde el punto de vista experimental la determinación de λ_h (h = 1,2) o τ tienen el condicionamiento de necesitar medidas en fase de transición (normalmente en una escala de tiempo de milisegundos), lo cual exige la utilización de técnicas rápidas 7. Otro requisito experimental viene impuesto por la necesidad de medir pequeños niveles de productos de reacción, lo que obliga a usar sustratos con características apropiadas (alto coeficiente de extinción, alta solubilidad, etc.), y elevadas concentraciones de enzima 7.

A partir de lo expuesto anteriormente, en el caso de mecanismos 1:2, desaparece el sentido físico de K_M y V_{max} y la descripción de la reacción catalizada por la enzima sería conveniente hacerla, en los casos donde sea posible, por los valores de las k_i .

BIBLIOGRAFÍA

- HILL, M. C., WAIGHT, D. R. y BARDSLEY, G. W. Molecular Biochemistry 15, 173 (1977).
- 2 BARDSLEY, G. W., LEFF, P., KAVANAGH, J. y WAIGHT, D. R. Biochem. J. 187, 739 (1980).
- 3 LAIDLER, K. J. y BUNTING, P. S. The Chemical Kinetics of Enzyme Action, Clarendon Press, Oxford (1973).
- 4 GÁLVEZ, J., VARÓN, R., GARCÍA CÁNOVAS, F. y GAR-CÍA CARMONA, F. J. Theor. Biol. 94, 413 (1982).
- 5 GÁLVEZ, J. y VARÓN, R., J. Theor. Biol. 98, 1 (1981).
- 6 GÁLVEZ, J., VARÓN, R., GARCÍA CÁNOVAS, F. y GAR-CÍA CARMONA, F. An. Quím. 79, 5 (1983).
- 7 HIROMI, K., Kinetics of Fast Enzyme Reactions, John Wiley & Sons, New York (1979).

APÉNDICE

Valores de las Kij de la ec. (4):

$$\begin{split} K_{11} &= -K_{12} \\ K_{12} &= k_1 y_1^0 \\ K_{22} &= -(K_{21} + K_{23}) \\ K_{21} &= K'_{21} + K''_{21} \\ K'_{21} &= k_{-1} \\ K''_{21} &= k_2 \\ K_{23} &= k_3 y_1^0 \\ K_{33} &= -K_{32} \\ K_{32} &= k_{-3} \end{split}$$